

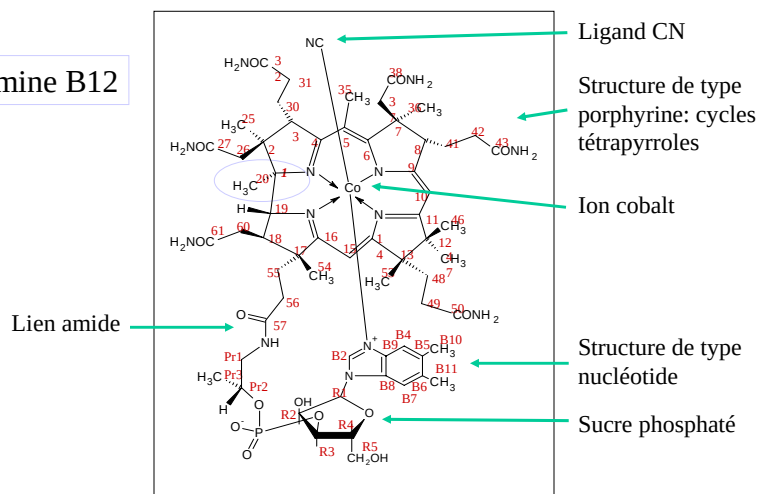
Applications de la RMN en biochimie

Applications biochimiques

- 1- Identification de petites molécules
- 2- Structure des macromolécules
- 3- Études des membranes
- 4- Applications *in vivo*

Identification de petites molécules

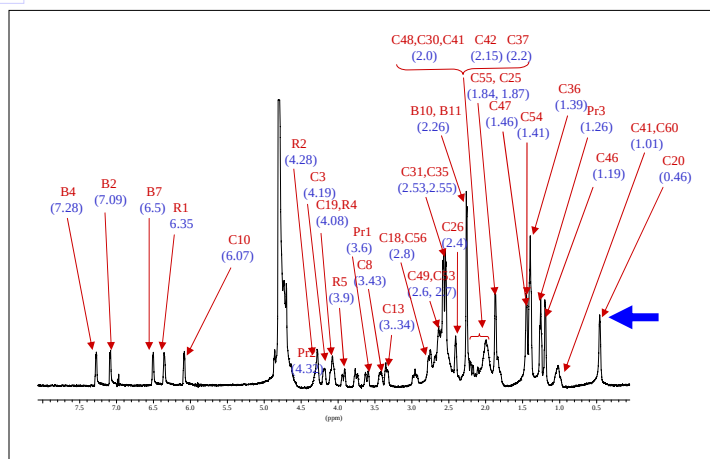
Vitamine B12



Identification de petites molécules

Vitamine B12

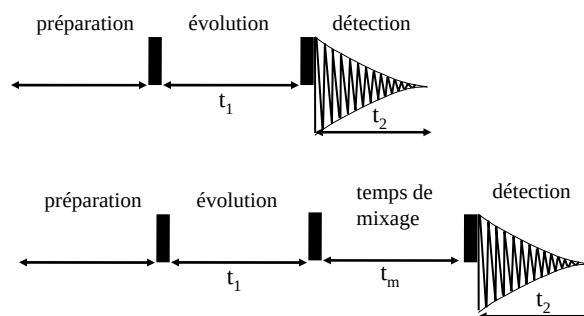
Spectre RMN du ^1H



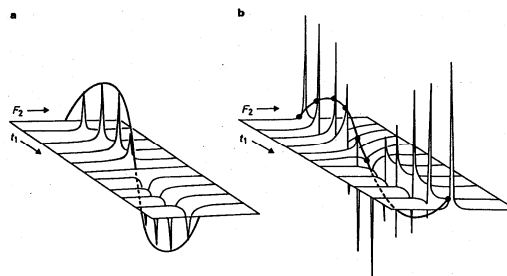
Structure des macromolécules

Principe de la RMN 2D

Un spectre à deux dimensions (2D) est constitué de plusieurs spectres à une dimension (1D) acquis en variant un délai particulier (t_1) dans une séquence d'excitation comprenant au moins deux impulsions.



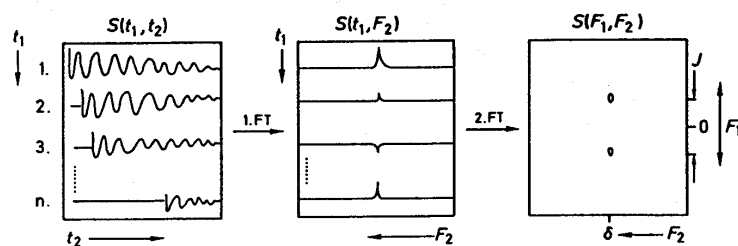
Spectres 1D formant un 2D



Modulation d'amplitude
en fonction de t_1

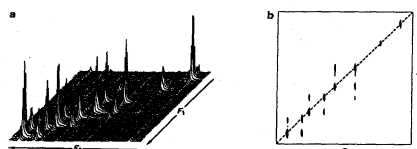
Modulation de phase en
fonction de t_1

Double transformation de Fourier



Présentation des données 2D

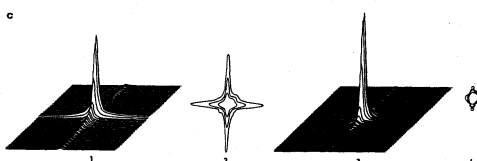
Spectre 2D



Tracé en contour
ou Carte contour

Contour plot

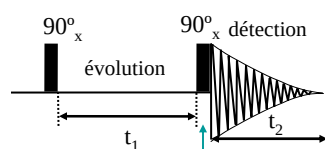
Pic de
magnitude



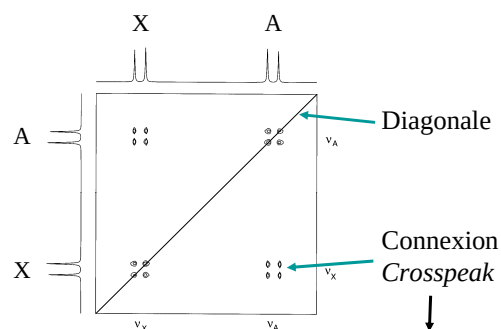
Pic traité avec
une fonction
sinusoïdale

Spectroscopie COSY ^1H - ^1H

Correlation spectroscopy



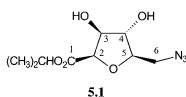
Mixage
Transfert de cohérence



Deux noyaux couplés

Le noyau A a
un couplage
scalaire avec le
noyau X.

Spectroscopie COSY ^1H - ^1H



H2 couplé à H3

H3 couplé à H4

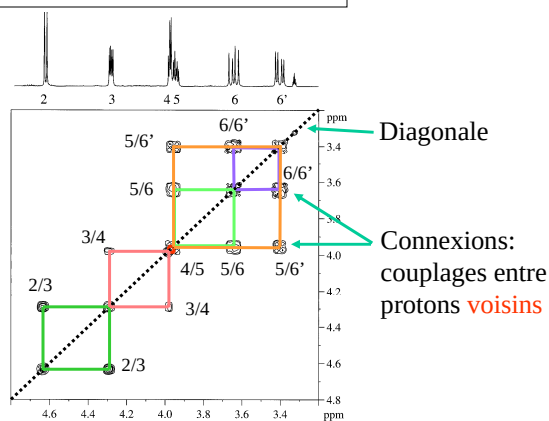
H4 couplé à H5

H5 couplé à H6

H5 couplé à H6'

H6 couplé à H6'

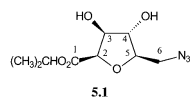
COSY à 400 MHz de sucre azo



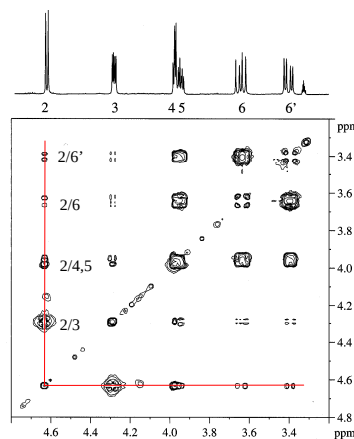
Spectroscopie TOCSY

Total correlation spectroscopy

Connecte tous les protons dans un même système de spins i.e. tous les protons sur des carbones protonés voisins.



Système de spins
2-3-4-5-6-6'

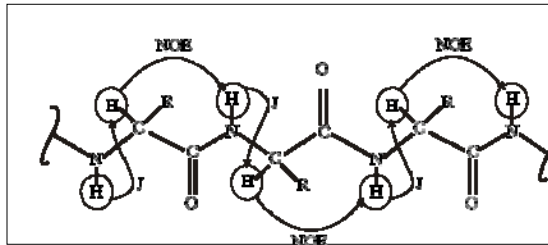


Spectroscopie NOESY

*Nuclear Overhauser
enhancement
spectroscopy*

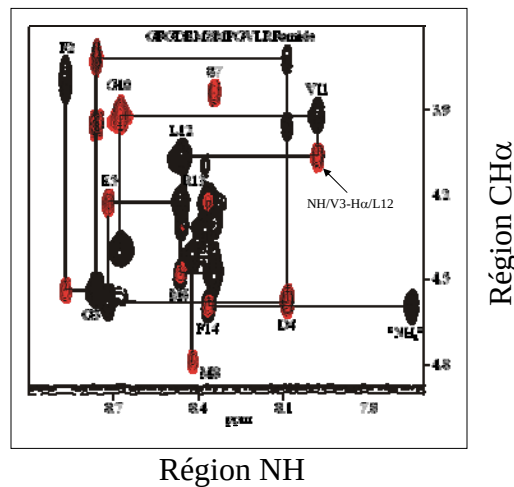
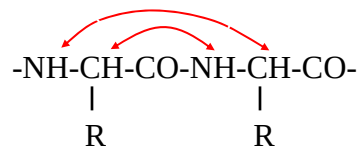
Basée sur le NOE
Connexions ^1H - ^1H à
travers l'espace jusqu'à
5 Å.

Effet Overhauser (NOE)
dû au couplage dipolaire
à travers l'espace.



Spectroscopie NOESY

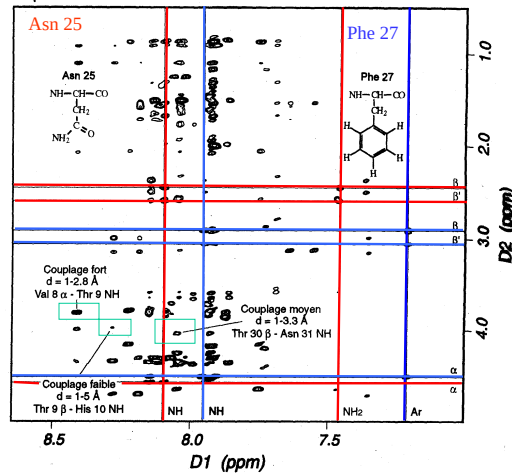
Connexions NH-CH α
dans un même acide
aminé (noir) et avec les
acides aminés voisins
(rouge) conduisant à une
assignation séquentielle



Spectroscopie NOESY

Peptide h-CGRP 8-37
dans H₂O 90%

Région NH-aliphatique

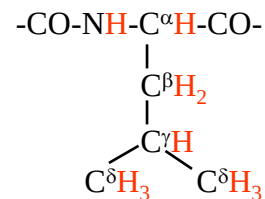


Analyse structurale de peptides par RMN 2D

1. Attribution des protons: a) non-séquentielle

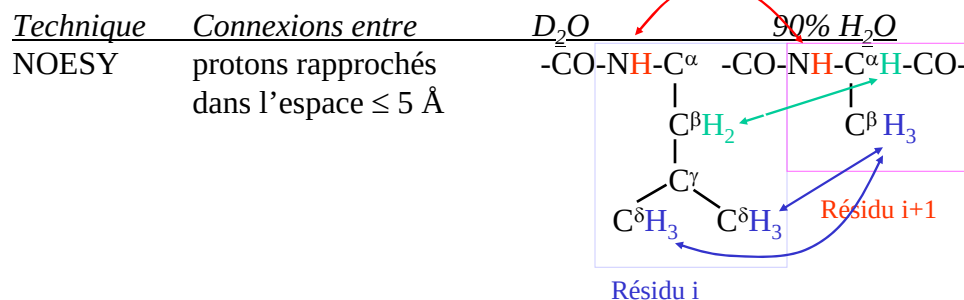
Technique	Connexions entre	D ₂ O	90% H ₂ O
COSY	protons voisins couplés	C ^α H-C ^β H	NH-C ^α H

TOCSY	protons dans un même système de spins	-CO-NH-C ^α H-CO-
-------	---------------------------------------	-----------------------------



Analyse structurale de peptides par RMN 2D

1. Attribution des protons: b) séquentielle



Analyse structurale de peptides par RMN 2D

2. Information structurale

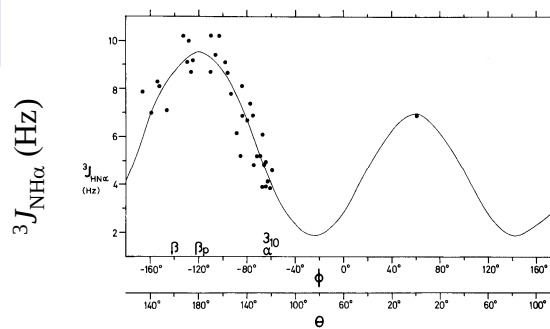
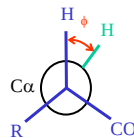
Technique	Information
NOESY	distances interprotons approximatives
Résolution δ, J ECOSY	angles dièdres
Échange D_2O	vitesse d'échange des NH $\rightarrow$ liens H

Analyse structurale de peptides par RMN 2D

Angles dièdres à
partir de $^3J_{\text{NH}\alpha}$

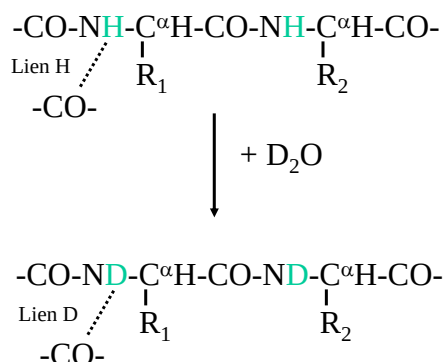
$$\theta = |\phi - 60^\circ|$$

Relation de
Karplus



Angle dièdre H-N-C α -H

Échange avec D₂O



Prendre des spectres en
fonction du temps pour
voir la diminution du pic
de NH.

La diminution est plus
lente si NH forme un lien
hydrogène.

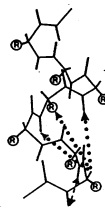
Analyse structurale de peptides par RMN 2D

3. Calcul de structure 3D: modélisation moléculaire

Technique

Minimisation d'énergie
Dynamique moléculaire

α (3.16 Å)

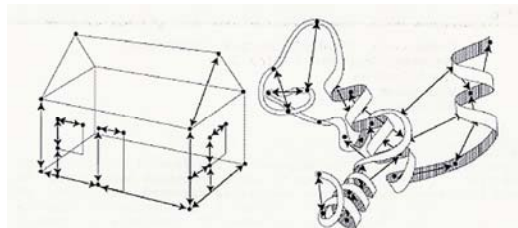


	β, β_p	α -Helix	3_0 -Helix	Turn I	Turn II	Turn I'	Turn II'	Half-Turn
$d_{\alpha\alpha}(i, i+4)$		—	—					
$d_{\alpha\beta}(i, i+3)$		—	—					
$d_{\alpha\alpha}(i, i+3)$		—	—					
$d_{\alpha\alpha}(i, i+2)$		—	—					
$d_{\alpha\alpha}(i, i+2)$		—	—					
d_{NH}	—	—	—	—	—	—	—	—
$d_{\text{NH}}/d_{\text{NH}\alpha}(\text{Hz})$	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4 5 6 7 8	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4

Distances caractéristiques du type de structure: hélice α , feuillet β , tournants β ...

Modélisation moléculaire

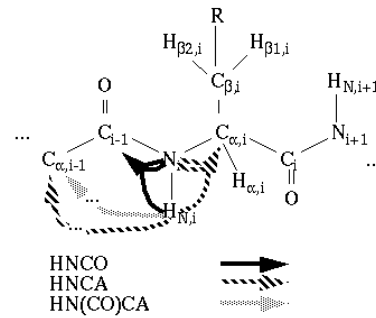
Si on connaît toutes les dimensions d'une maison, on peut la construire.



Si on connaît suffisamment de distances internucléaires (et d'angles dièdres) dans une molécule (connexions NOESY, $^3J_{\text{NH}\alpha}$), on peut construire sa structure tridimensionnelle.

RMN 3D

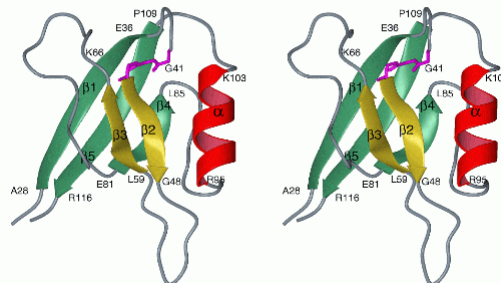
Peptides ou
protéines marqués
au ^{13}C et ^{15}N



RMN 3D: structure

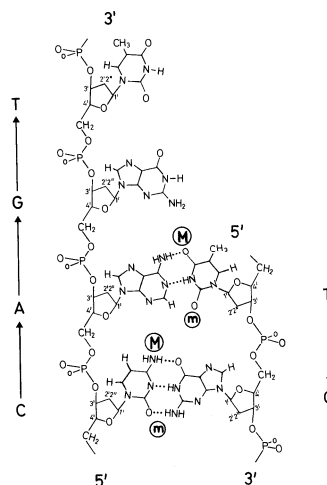
Interleukine-16
10 kDa marquée au ^{13}C
et ^{15}N
2 mM
Mesure RMN: 2-4 mois
Analyse: 6-12 mois

Muhlhahn, P. et coll. (1998)
Nat. Struct. Biol. **5**, 682-686.



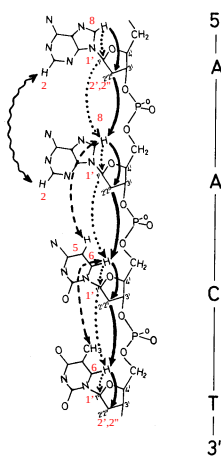
NOESY des acides nucléiques

Connexions intranucléotides
Connexions séquentielles
Connexions interbrins



NOESY des acides nucléiques

Connexions
séquentielles
NOESY
observables pour
ADN-B



$d_1(6,8;2')$ et $d_s(2'';6,8)$: $\longrightarrow$
 $d_1(6,8;1')$ et $d_s(1';6,8)$: $\cdots\cdots\cdots\longrightarrow$
 $d_s(6,8;5,M)$: $-\ - - \longrightarrow$
 $d_s(2;2)$: vagues

NOESY des acides nucléiques

Connexions interbrins
possibles selon le type
d'ADN

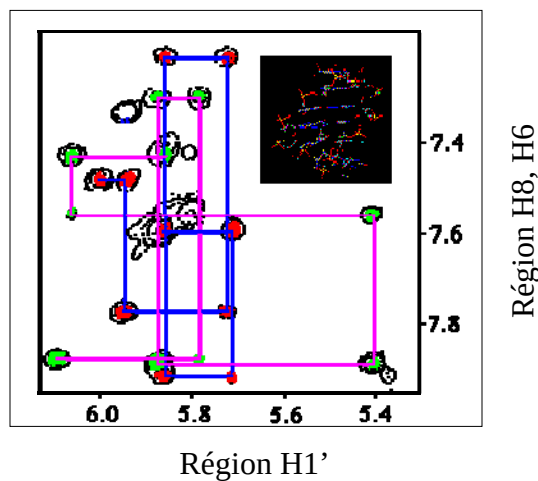
i = protons non-labiles
s = protons labiles

TABLE 11.4. Short Interstrand ¹H-¹H Distances in Three Standard DNA Conformations

Distance ^a	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
d _{P1} (A2,T3)	2.8 Å	2.8 Å	
A6,T3	2.5	2.5	
G1,C4	2.5	2.5	2.5 Å
d _{P2} (A2,T2;A1-,2) ^b	4.2 Å	2.9 Å	
A2+,6;A3-,2	-	4.4	
A2+,6;A1-,6	3.2	4.0	
A2+,6;A3-,6	2.7	3.3	
A2+,2;T1-,3	4.0	3.8	
A2+,6;T1-,3	4.1	4.8	
A2+,6;T3-,3	4.1	3.5	
A2+,2;G1-,1	4.7	3.8	
A2+,2;G1-,2	4.9	3.4	
A2+,6;G1-,2	4.3	4.2	
A2+,2;G3-,1	4.7	4.1	
A2+,2;G3-,2	4.7	4.1	
A2+,6;G3-,1	3.9	4.1	
A2+,6;C1-,4	3.2	4.5	
A2+,6;C3-,4	3.0	2.9	
T2+,3;T1-,3	3.6	4.3	
T2+,3;T3-,3	-	4.1	
T2+,3;G1-,1	3.5	3.5	
T2+,3;G1-,2	4.3	3.5	
T2+,3;G3-,1	4.3	3.6	
T2+,3;C1-,4	4.2		
T2+,3;C3-,4	4.9	3.9	
G2+,1;G1-,1	4.3	3.4	-
G2+,1;G1-,2	-	4.1	-
G2+,2;G1-,1	-	4.1	-
G2+,2;G1-,2	-	4.1	-
G2+,1;G3-,1	3.6	3.6	3.6
G2+,1;G3-,2	4.5	4.3	4.3
G2+,2;G3-,1	4.5	4.3	4.3
G2+,2;G3-,2	4.3	4.0	4.3
G2+,1;C1-,4	3.9	4.2	
G2+,1;C3-,4	4.4	4.2	
C2+,4;C1-,4	3.5	-	4.2
C2+,4;C3-,4	3.6	2.9	4.9
C2+,5;C3-,5	-	-	4.5
A2+,2;X1-,1'	4.1	-	

Spectroscopie NOESY

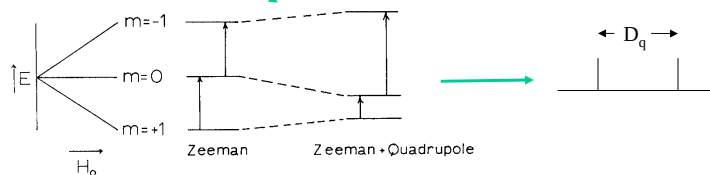
Connexions
intrarésiduelles et
séquentielles dans
nucléotide



RMN des membranes

RMN du ^2H des solides

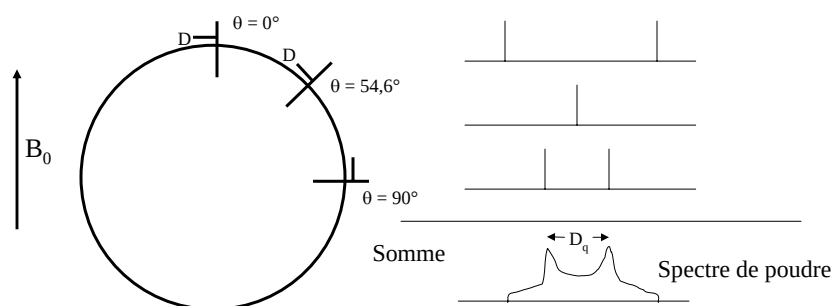
Interaction quadrupolaire entre le moment quadrupolaire Q et le gradient de champ électrique e_q cause un écart quadrupolaire D_q (doublet).



RMN du ^2H des membranes

L'écart quadrupolaire D_q dépend de l'angle θ entre le champ magnétique B_0 et l'axe directeur du lipide:

$$D_q = \frac{3}{4} \frac{e^2 q Q}{h} (3 \cos^2 \theta - 1) S_{CD}$$

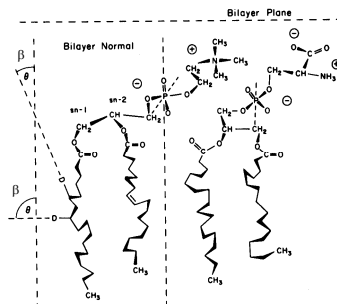


RMN du ^2H des membranes

Le paramètre d'ordre S_{CD} mesure la déviation moyenne par rapport à l'axe directeur de la chaîne lipidique:

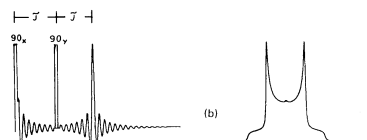
$$S_{CD} = \frac{1}{2} \overline{(3 \cos^2 \beta - 1)}$$

$$0 \leq S_{CD} \leq 1$$



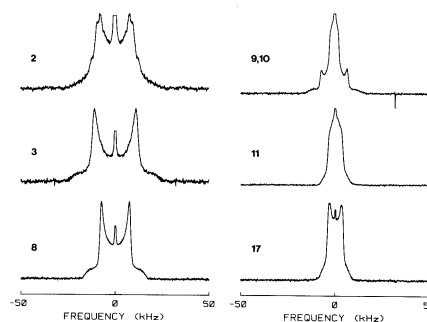
RMN du ^2H des membranes

Détection avec séquence d'écho quadrupolaire (haute puissance)



$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Acide oléique

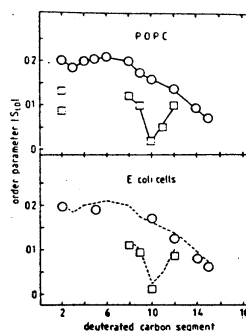
Spectres du ^2H de chaînes d'oléoyle (18 C, lien double 9-10) deutérées aux positions indiquées dans des membranes de *A. laidlawii*



RMN du ^2H des membranes

Variation de S_{CD} avec la position de deutération dans la chaîne de POPC

POPC = 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

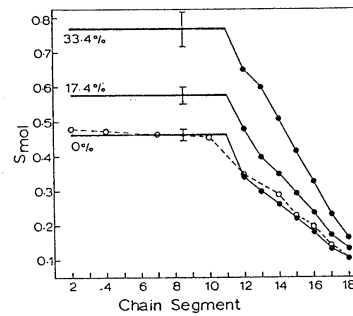
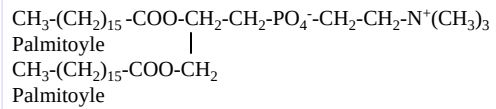


$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{PO}_4^--\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Oléoyle
|
 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{15}-\text{COO}-\text{CH}_2$
Palmitoyle

RMN du ^2H des membranes

Variation de S_{CD} avec la position de deutération dans la chaîne de DPC en fonction du pourcentage de cholestérol

DPC = 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine



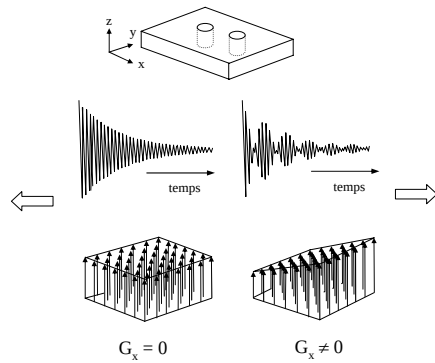
Spectroscopie par résonance magnétique
(SRM)

Imagerie par résonance magnétique (IRM)

Différence spectroscopie - imagerie

SPECTROSCOPIE

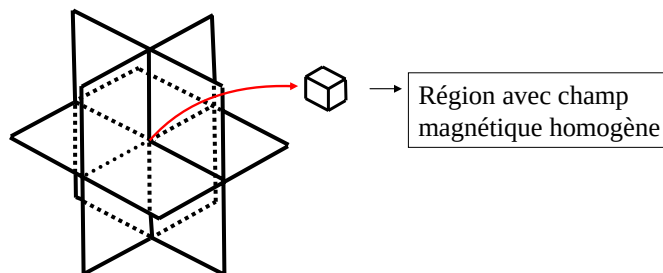
- Champ magnétique constant dans l'échantillon
- Champ local dépend de l'environnement chimique



IMAGERIE

- Champ magnétique varie avec le gradient imposé
- Champ local dépend de la position

Définition du voxel pour SRM



Séquences:

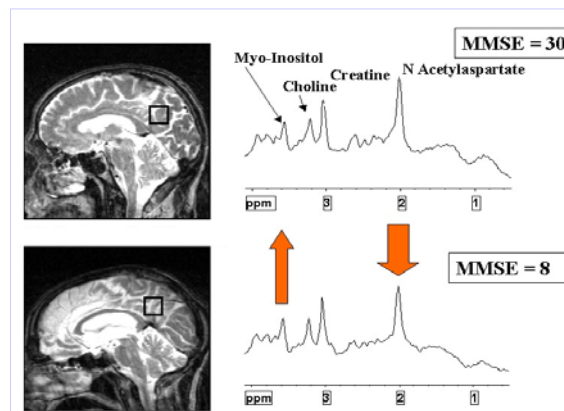
PRESS = *Point-resolved spectroscopy*

STEAM = *Stimulated echo acquisition mode*

Principaux composés observables en SRM du ^1H dans le cerveau

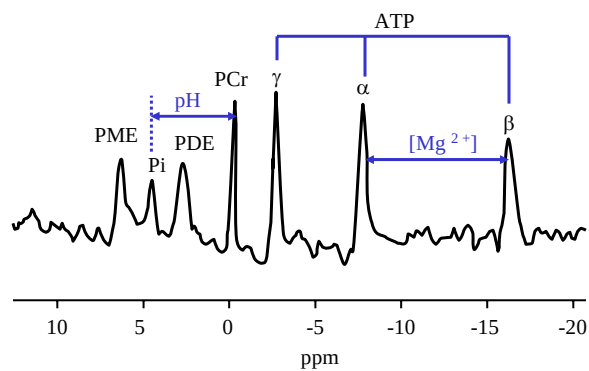
<u>Composé</u>	<u>Abréviation</u>	<u>Rôle biologique</u>
N-acétyl aspartate	NAA	Marqueur neuronal. D'autres composés avec groupes N-acétyl contribuent au signal (NAAG).
Créatine/phosphocréatine	Cr	Source de phosphate pour convertir ADP en ATP
Choline	Cho	Somme des signaux de tous les dérivés de la choline dont le neurotransmetteur acétylcholine, les dérivés de la phosphatidylcholine membranaire et la bétaine
myo-Inositol	mI	Marqueur glial

Maladie d'Alzheimer



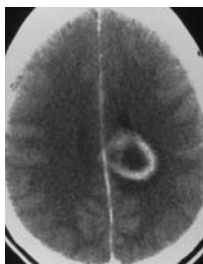
Rose, S.E. et coll. *Magn. Reson. Med.* 17, 291-299, 1999.

Spectre ^{31}P du cerveau



IRM du cerveau

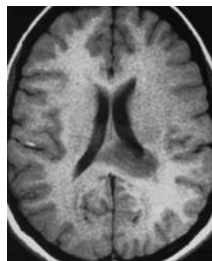
Tomodensitométrie



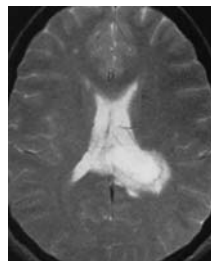
CT

IRM

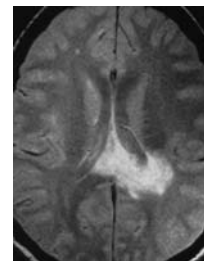
Pondération
T1



Pondération
T2



Densité de
protons



Site Internet sur RMN

<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>

Joseph P. Hornak
Rochester Institute of Technology

Atkins & de Paula, chapitre 14