



**HAL**  
open science

# Corrélation croisée entre mécanisme dipolaire et anisotropie de déplacement chimique : dynamique des protéines en solution

Sabine Bouguet-Bonnet

► **To cite this version:**

Sabine Bouguet-Bonnet. Corrélation croisée entre mécanisme dipolaire et anisotropie de déplacement chimique : dynamique des protéines en solution. Chimie analytique. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2004. Français. NNT : 2004NAN10028 . tel-01747403

**HAL Id: tel-01747403**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747403>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

U.F.R. Sciences & Techniques de la Matière et des Procédés (STMP)  
Ecole Doctorale Lorraine de Chimie et Physique Moléculaires (SESAMES)

## Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I

en Chimie et Physico-chimie Moléculaires

par Sabine BOUGUET-BONNET

**Corrélation croisée entre mécanisme dipolaire et anisotropie de déplacement chimique.**

**Dynamique des protéines en solution.**

Soutenue le 26 mai 2004 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Président :	M. Daniel CANET	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I
Rapporteurs :	M. Eric GUITTET	Directeur de recherche CNRS, ICSN Gif sur Yvette
	M. Bruno KIEFFER	Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg I
Examineurs :	M. Christian ROUMESTAND	Professeur, Université de Montpellier I
	M. Pierre MUTZENHARDT	Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I

*A ma maman,  
A mon mari, Stéphane,*

*Et en la mémoire de  
mon papa qui me manque tant.*

## ***Remerciements***

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Méthodologie en Résonance Magnétique Nucléaire, dirigé par Monsieur le Professeur Daniel Canet, qui me fait l'honneur de présider cette commission d'examen. Je l'en remercie sincèrement. En me donnant l'opportunité d'intégrer son laboratoire, il m'a permis de travailler sur cette thèse et bien d'autres sujets passionnants. Merci pour ses conseils constants quant à l'évolution de mon travail, et pour ses idées nombreuses.

Je remercie avec le même élan Monsieur le Professeur Pierre Mutzenhardt pour avoir encadré mon travail depuis le DEA et pendant ces années de thèse. Son dynamisme et ses compétences scientifiques m'ont permis de mener à bien cette étude, et il a su me communiquer avec beaucoup d'entrain une part de son savoir-faire. Merci aussi pour sa confiance. Je voudrais également lui exprimer ma très grande reconnaissance pour ses qualités humaines : sa bienveillance et son soutien m'ont été d'une aide sans mesure pendant ces années, pas toujours faciles.

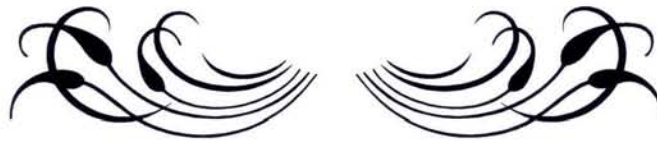
Je remercie Monsieur Eric Guittet, directeur de recherche à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette, ainsi que Monsieur Bruno Kieffer, professeur à l'université Louis Pasteur de Strasbourg, qui ont accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Merci pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Je suis très sensible à la présence dans ce jury de Monsieur le Professeur Christian Roumestand du Centre de Biochimie Structurale de Montpellier. Son accueil chaleureux lors de mes séjours au sein de son laboratoire m'a permis de mener à bien plusieurs expériences. Merci pour ses conseils devant le spectromètre, mais aussi pour sa sympathie et sa franchise.

Par leur gentillesse et leur disponibilité, les membres du laboratoire de méthodologie RMN, permanents ou doctorants, ont grandement contribué à rendre ce travail vraiment agréable. Je pense tout particulièrement à Piotr Tekely, Jean Brondeau, Jean-Claude Boubel, Denis Grandclaude, Alain Retournard, Eliane Eppiger, Seb, Christie, Grégory, Olivier, Hervé, Cédric, Carole, Benoît, Jérôme, Nicolas, Roxane, Réda, Magalie. Je leur exprime ma profonde sympathie et souhaiterais tous les remercier, pour la bonne ambiance qu'ils savent entretenir au sein du laboratoire, mais aussi pour leur présence, aussi bien dans les moments heureux que malheureux.

Pour finir ('last but not least'), merci à toute ma famille, en particulier Stéphane, pour leur aide et leurs encouragements. Je tiens à remercier mes parents pour m'avoir permis de vivre ça. J'adresse une pensée particulière à mon papa, j'aurais tant aimé pouvoir lui montrer la fin de ce travail.

Chacun a contribué à sa manière à rendre agréable et passionnant mon 'apprentissage' de chercheur et ma reconnaissance s'adresse à tous ceux qui, de près ou de loin, ont permis que ce travail se réalise. Merci à tous !



## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>4</b>
<b>1 . LES MECANISMES DE RELAXATION DE SPIN.....</b>	<b>7</b>
1.1. UN APERÇU DES DIFFERENTS MECANISMES DE RELAXATION.....	7
1.2. INTERACTION AVEC UN CHAMP LOCAL FLUCTUANT.....	10
1.3. RELAXATION PAR ANISOTROPIE DU DEPLACEMENT CHIMIQUE.....	11
1.4. DENSITES SPECTRALES NORMALISEES.....	14
1.5. RELAXATION DANS LES SYSTEMES COUPLES – EQUATIONS DE REDFIELD.....	16
<i>Relaxation longitudinale.....</i>	<i>17</i>
<i>Relaxation transversale.....</i>	<i>17</i>
<i>Relaxation longitudinale d'un système de deux spins 1/2.....</i>	<i>18</i>
1.6. L'EFFET OVERHAUSER NUCLEAIRE.....	19
1.7. INTERFERENCE ENTRE MECANISMES DE RELAXATION.....	20
1.8. LES PHENOMENES D'ECHANGE.....	22
1.9. RESUME.....	24
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 1.....	27
<b>2 . NOUVELLES METHODES POUR LA MESURE DU TERME DE CORRELATION CROISEE DANS LES PROTEINES.....</b>	<b>29</b>
2.1. LE SYSTEME DE SPINS <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N DANS LES PROTEINES.....	29
2.2. MESURE DES PARAMETRES D'AUTORELAXATION T <sub>1</sub> ET T <sub>2</sub> .....	35
2.3. MESURE DE L'EFFET OVERHAUSER NUCLEAIRE.....	39
2.3.1. <i>Mesure classique du facteur eOn.....</i>	<i>39</i>
2.3.2. <i>Une tentative de mesure de la relaxation croisée via la courbe d'édification de l'eOn.....</i>	<i>41</i>
2.4. MESURE DE LA CORRELATION CROISEE CSA( <sup>15</sup> N)-DIPOLAIRE( <sup>1</sup> H <sup>15</sup> N).....	53
2.4.1. <i>Méthodes de mesure existantes.....</i>	<i>53</i>
2.4.2. <i>Une nouvelle méthode de mesure de la corrélation croisée longitudinale csa(X)- dipolaire(<sup>1</sup>HX) basée sur la courbe d'édification de l'ordre longitudinal.....</i>	<i>58</i>
2.4.3. <i>Nouvelles méthodes utilisant les états de spin.....</i>	<i>68</i>
2.5. CONCLUSION.....	85
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 2.....	86
ANNEXES DU CHAPITRE 2.....	90
<b>3 . DES PARAMETRES DE RELAXATION A LA DYNAMIQUE DES PROTEINES.....</b>	<b>101</b>
3.1. INTRODUCTION.....	101
3.2. LES MODELES DE DYNAMIQUE DANS LES PROTEINES.....	102
3.2.1. <i>La réorientation isotrope.....</i>	<i>103</i>
3.2.2. <i>Les macromolécules et le modèle Lipari-Szabo.....</i>	<i>103</i>
3.2.3. <i>Le modèle de Lipari-Szabo étendu.....</i>	<i>110</i>
3.2.4. <i>L'anisotropie de réorientation.....</i>	<i>111</i>
3.3. ANALYSE DES DONNEES DE RELAXATION EN TERME DE DYNAMIQUE.....	114
3.3.1. <i>Analyse classique.....</i>	<i>114</i>
3.3.2. <i>Analyse résidu par résidu.....</i>	<i>118</i>

3.4. INTERPRETATION DU TEMPS DE CORRELATION EFFECTIF ASSOCIE AUX MOUVEMENTS LENTS DE LA PROTEINE .....	132
3.4.1. <i>Représentation quadratique des temps de corrélation effectifs</i> .....	132
3.4.2. <i>Interprétation du temps de corrélation effectif dans un modèle de réorientation globale de symétrie axiale</i> .....	134
3.5. LES PARAMETRES DE CORRELATION CROISEE .....	141
3.5.1. <i>Anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 et analyse dynamique résidu par résidu</i> .....	142
3.5.2. <i>Evaluation de l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 et des contributions de l'échange</i> .....	145
3.6. CONCLUSION .....	151
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE 3 .....	152
ANNEXES DU CHAPITRE 3 .....	156
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>158</b>



## Abréviations

1D	Monodimensionnel
2D	Bidimensionnel
BIRD	Bilinear Rotation Decoupling
CPMG	Carr Purcell Meiboom Gill
CSA	Chemical Shift Anisotropy
eOn	effet Overhauser nucléaire
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
INEPT	Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer
IPAP	In-Phase Anti-Phase
PDB	Protein Data Bank
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
S <sup>2</sup> ED	Spin State Echo Differentiation
S <sup>3</sup> E	Spin State Selective Excitation
TMS	Tetra Methyl Silane
TPPI	Time Proportional Phase Increment
TROSY	Transverse Relaxation Optimised Spectroscopy
WATERGATE	WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation

## Constantes

Constante de Planck :	$h=6.626.10^{-34}\text{J.s}$
Longueur de la liaison NH:	$r_{NH}=1.02\text{\AA}$
Perméabilité du vide :	$\mu_0=1.256\ 10^{-6}\ \text{H.m}^{-2}$
Rapport gyromagnétique du proton :	$\gamma_H=26.752\ 10^7\ \text{rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$
Rapport gyromagnétique de l'azote-15 :	$\gamma_N=-2.711\ 10^7\ \text{rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$
Rapport gyromagnétique du carbone-13 :	$\gamma_C=6.73\ 10^7\ \text{rad.s}^{-1}.\text{T}^{-1}$

## Notations

—	moyenne d'ensemble
*	conjugué complexe
$B_0$	amplitude du champ magnétique statique
$I_x^A, I_y^A, I_z^A$ ou $A_x, A_y, A_z$	opérateurs de spin du noyau A

## Introduction

Depuis sa création, le laboratoire de méthodologie RMN a développé une thématique de recherche concernant les phénomènes dynamiques en RMN et plus particulièrement la relaxation de spin. Majoritairement, les études réalisées concernaient des molécules organiques de taille moyenne. Les travaux présentés dans ce mémoire constituent une première thèse entièrement dédiée à la relaxation de spin dans des macromolécules biologiques : les protéines. L'étude exposée ici décrit de nouvelles méthodes de détermination et d'exploitation des paramètres de la relaxation du noyau azote-15 dans des protéines marquées. Nous nous intéresserons plus particulièrement à des termes dits de corrélation croisée qui prennent leur origine dans l'interférence entre deux mécanismes de relaxation : le mécanisme dipolaire (lié à un couple d'atomes NH), d'une part, et le mécanisme d'anisotropie de déplacement chimique du noyau azote-15, d'autre part. Dans le domaine de la spectroscopie RMN, il est possible de concevoir une variété incroyable de méthodes expérimentales qui sont applicables aussi bien à des liquides qu'à des solides, en passant par les milieux orientés. Des méthodes appropriées peuvent être mises au point pour mesurer des paramètres qui nous fournissent des informations sur la structure des molécules (distances internucléaires, angles dièdres, orientation de certaines liaisons chimiques par rapport à un référentiel commun, etc.), sur la dynamique intramoléculaire (réarrangements, tautomérie, mobilité locale), sur la diffusion rotationnelle (réorientation des molécules), et sur la diffusion translationnelle. Nous nous sommes intéressés ici au domaine des protéines en solution, et plus précisément à leur dynamique (diffusion rotationnelle) via l'étude de la relaxation de spin.

Le premier chapitre présente de manière générale et condensée la relaxation de spin hétéronucléaire. Il constitue une première approche de la relaxation et se présente ainsi comme une introduction générale. Nous nous intéresserons ensuite aux méthodes utilisées pour mesurer la relaxation de spin dans des macromolécules enrichies en azote-15, le deuxième chapitre sera ainsi consacré à la description des séquences impulsionnelles permettant d'isoler les paramètres de relaxation d'intérêt dans des macromolécules marquées. Nous présenterons notamment les méthodes généralement utilisées pour mesurer l'autorelaxation longitudinale  $R_1$ , l'autorelaxation transversale  $R_2$ , et la relaxation croisée  $\sigma_{NH}$ . Nous présenterons également les techniques que nous avons mises au point pour mesurer le terme d'interférence  $csa(^{15}N)$ -dipolaire( $^{15}N^1H$ ). En effet, la corrélation croisée apparaît

aujourd'hui comme un paramètre de relaxation complémentaire, qui peut être mesuré avec précision et qui apporte des informations concernant la dynamique, la structure et même des paramètres moléculaires. Nous nous intéresserons à extraire des paramètres de relaxation les informations structurales et dynamiques qu'ils contiennent. Ceci constituera le troisième chapitre. Il est en effet important de comprendre les mouvements des protéines en solution car une fonction biologique est déterminée non seulement par la structure de la macromolécule biologique mais aussi par ses mouvements. Nous verrons que les mesures de relaxation donnent accès à de nombreuses informations dynamiques au niveau de chaque acide aminé de la protéine et ceci sur une large gamme de temps.

## **Chapitre 1**

# **Les mécanismes de relaxation de spin**

## 1. Les mécanismes de relaxation de spin

Dans ce premier chapitre, nous nous efforcerons d'introduire le phénomène de relaxation de spin et la façon dont il intervient en résonance magnétique nucléaire. Les formalismes de base ont été proposés pour les liquides simples dès les années 1950 (Bloembergen et al., 1948; Wangness and Bloch, 1953; Bloch, 1956; Solomon, 1956; Redfield, 1957; Abragam, 1961). De nombreux travaux ont depuis complété les ouvrages écrits par ces pionniers et qui constituent les fondements de la théorie expliquant la relaxation de spin.

Après un aperçu des différents mécanismes à l'origine des phénomènes de relaxation, nous poursuivrons notre présentation avec l'objectif d'établir les équations physiques décrivant l'évolution des systèmes, ceci en faisant clairement apparaître les contributions structurales et dynamiques à la relaxation.

### 1.1. Un aperçu des différents mécanismes de relaxation

De façon générale, un ensemble de spins nucléaires placés dans une induction magnétique statique (nous utiliserons ensuite le terme de champ magnétique avec une amplitude  $B_0$ ) donne naissance à une aimantation macroscopique alignée suivant la direction de celle-ci. Cette aimantation est communément désignée sous le terme longitudinale alors que toute aimantation située dans un plan perpendiculaire à  $B_0$  est qualifiée de transversale. La relaxation en résonance magnétique nucléaire est un terme général qui désigne les phénomènes qui ramènent l'aimantation dans son état d'équilibre après qu'elle ait été préalablement perturbée. Ce retour à l'équilibre est gouverné par des champs magnétiques locaux et fluctuants qui prennent naissance au niveau de chaque spin dans l'échantillon. Ceux-ci résultent des diverses interactions affectant les spins et sont modulés par les mouvements moléculaires; ils sont nécessairement de faible amplitude. Les mécanismes responsables des phénomènes de relaxation reposent sur des interactions de plusieurs natures :

*Dipolaire* : ce mécanisme provient de l'interaction directe entre les moments magnétiques de spins nucléaires ou électroniques (figure 1.1a). La modulation de ce phénomène dans le temps peut avoir plusieurs origines (intra ou intermoléculaires): i) La réorientation du vecteur internucléaire due aux mouvements moléculaires, ii) La fluctuation de la distance internucléaire. Dans le cas de l'interaction dipolaire entre un spin nucléaire et un spin électronique, ce mécanisme est appelé interaction de pseudo-contact.

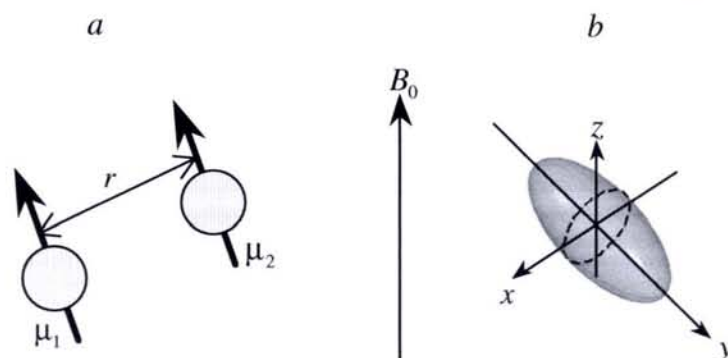


figure 1.1 Représentation illustrant l'interaction dipolaire entre deux moments magnétiques  $\mu_1$  et  $\mu_2$ , séparés par un vecteur  $r$  (figure 1.1a). Illustration de la réorientation moléculaire par l'intermédiaire d'un tenseur d'interaction (anisotropie du tenseur d'écran ou du tenseur quadrupolaire) pour lequel  $x$ ,  $y$ ,  $z$  constituent ses axes principaux (figure 1.1b)

*L'anisotropie de déplacement chimique* (csa, chemical shift anisotropy, en anglais) : ce phénomène provient de l'anisotropie de l'effet d'écran qui a une nature tensorielle. Sa dépendance vis-à-vis du temps résulte de la réorientation des axes principaux du tenseur d'écran par rapport à la direction du champ magnétique, cette réorientation étant induite par les mouvements moléculaires (figure 1.1b).

*Quadrupolaire* : ce mécanisme existe pour les noyaux de spin supérieur à  $\frac{1}{2}$  dans un environnement non symétrique et provient de l'interaction entre le moment quadrupolaire du noyau et le gradient de champ électrique. Elle se traduit à nouveau par une quantité tensorielle qui elle aussi est susceptible d'être modulée par les mouvements moléculaires.

*La spin-rotation* : elle résulte du couplage entre le moment cinétique de spin et le moment cinétique décrivant la rotation du cortège électronique. Ce phénomène n'intervient que pour les molécules possédant une symétrie élevée.

*La relaxation scalaire* : on distingue la relaxation scalaire de première espèce faisant intervenir les phénomènes d'échange chimique et la relaxation scalaire de seconde espèce. Cette dernière provient de l'interaction entre un spin relaxant lentement et un spin relaxant rapidement (un noyau quadrupolaire, un électron non apparié: dans ce dernier cas il s'agit d'une interaction de contact).

A l'équilibre, l'aimantation nucléaire se trouve suivant l'axe  $z$  du repère tournant dont la direction coïncide avec celle du champ magnétique statique  $B_0$ . Toute séquence utilisée en RMN consiste alors en une ou plusieurs impulsions de champ radiofréquence qui amènent les spins hors de leur position d'équilibre. Le retour à l'équilibre thermodynamique de l'aimantation s'effectue selon deux temps de relaxation distincts. Le premier, appelé temps de

relaxation longitudinale  $T_1$  (ou spin-réseau), caractérise la reconstruction de l'aimantation suivant l'axe d'application du champ magnétique z. Le second est le temps de relaxation transversale  $T_2$  (ou spin-spin), il traduit la disparition de l'aimantation du plan de mesure xy. Désormais, on désignera par  $R_1$  ( $1/T_1$ ) la vitesse de relaxation longitudinale et par  $R_2$  ( $1/T_2$ ) la vitesse de relaxation transversale. L'évolution des composantes de l'aimantation nucléaire  $\vec{M}$  (représentant l'ensemble des moments magnétiques de l'échantillon) sous l'effet d'un champ magnétique  $\vec{B}$  peut être décrite par les équations phénoménologiques de Bloch (Bloch, 1946):

$$\begin{aligned} \frac{dM_{x,y}}{dt} &= \gamma(\vec{M} \wedge \vec{B})_{x,y} - \frac{M_{x,y}}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} &= \gamma(\vec{M} \wedge \vec{B})_z - \frac{M_0 - M_z}{T_1} \end{aligned} \quad \text{équation 1.1}$$

où  $\gamma$  désigne le rapport gyromagnétique du noyau considéré et  $M_0$  l'aimantation nucléaire à l'équilibre ( $M_0 = \frac{N(\gamma\hbar)^2 B_0 I(I+1)}{3kT}$  où N représente le nombre de noyaux par unité de volume, et I le spin de l'isotope considéré). Si l'on envisage le cas où l'aimantation a préalablement été totalement basculée suivant l'axe x du repère mobile et en ayant pris soin de fixer les conditions initiales:  $M_x(0) = M_0$ ,  $M_y(0) = 0$  et  $M_z(0) = 0$ , on peut prévoir son comportement à l'aide de la résolution de l'équation 1.1 et en introduisant la fréquence de précession dans le repère tournant  $\nu' = \nu_r - \nu_0$ :

$$\begin{aligned} M_x(t) &= M_0 \exp(-t/T_2) \cos(2\pi\nu't) \\ M_y(t) &= M_0 \exp(-t/T_2) \sin(2\pi\nu't) \\ M_z(t) &= M_0 [1 - \exp(-t/T_1)] \end{aligned} \quad \text{équation 1.2}$$

Nous pouvons noter que les deux processus de relaxation, exponentiels l'un comme l'autre, sont disjoints, avec cependant  $T_2$  inférieur à  $T_1$  (nous justifierons cette inégalité dans la suite de l'exposé). Toutefois, il faut ajouter à  $T_2$  une contribution provenant des inhomogénéités du champ  $B_0$  et on doit substituer à  $T_2$  un temps de relaxation transversale effectif  $T_2^*$  tel que :

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \text{inhomogénéités} \quad \text{équation 1.3}$$

Il en résulte que le temps de relaxation effectif  $T_2^*$  est plus court que  $T_2$  ce qui contribue à accélérer la disparition des composantes transversales de l'aimantation nucléaire.

### 1.2. Interaction avec un champ local fluctuant

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'existence de la relaxation de spin est justifiée par la présence de petits champs locaux (notés  $b(t)$ ) dépendants du temps et agissant sur les différents spins considérés. Les propriétés de ces champs locaux proviennent de la nature aléatoire des mouvements moléculaires. Leur cohérence peut être évaluée au moyen d'une fonction de corrélation :

$$\overline{b(t)b(0)} \quad \text{équation 1.4}$$

Cette fonction reflète les propriétés de mémoire des champs locaux, elle est nulle si le champ local à l'instant  $t$  ne se "souvient" pas de ce qu'il était à l'instant zéro. On définit alors la *densité spectrale* qui quantifie l'efficacité en terme de relaxation de la quantité  $\overline{b(t)b(0)}$  à la fréquence  $\nu = \omega/2\pi$ . Elle correspond à la transformée de Fourier de la fonction de corrélation :

$$J(\omega) = \int_0^{+\infty} \overline{b(t)b(0)} \exp(-i\omega t) dt \quad \text{équation 1.5}$$

Les paramètres de relaxation de spin s'exprimeront sous la forme d'une combinaison linéaire de densités spectrales. Très souvent,  $\overline{b(t)b(0)}$  peut s'écrire sous la forme  $\overline{b^2} e^{-t/\tau_c}$  où  $\tau_c$  est un temps de corrélation associé à la réorientation moléculaire (temps nécessaire à une réorientation moléculaire de un radian). La transformée de Fourier de cette fonction conduit dans ce cas à une fonction lorentzienne du type  $\overline{b^2} \tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2)$ .



Il nous faut maintenant exprimer les paramètres d'autorelaxation  $T_1$  et  $T_2$  en fonction de ces densités spectrales. L'équation de départ est celle qui gouverne l'évolution d'un moment magnétique  $\vec{\mu}$  soumis à un champ local  $\vec{b}$  :

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \gamma \vec{\mu} \wedge \vec{b} \quad \text{équation 1.6}$$

A l'aide de calculs fondés sur la méthode des perturbations dépendant du temps (voir Canet et al., 2002), on aboutit à l'équation de l'aimantation nucléaire  $M_z$  (en ayant remarqué que  $M_z(t) = \overline{\mu_z(t)}$ , moyenne sur tout l'échantillon) :

$$\frac{dM_z}{dt} = -(M_z - M_0) \gamma^2 \int_0^{\infty} (\overline{b_x(t)b_x(0)} + \overline{b_y(t)b_y(0)}) e^{-i\omega t} dt \quad \text{équation 1.7}$$

qui n'est autre que la première équation de Bloch (équation 1.1) à condition d'identifier  $1/T_1$  à la quantité en facteur de  $-(M_z - M_0)$ . A l'aide d'une approche similaire pour les composantes transversales de l'aimantation nucléaire, on obtient:

$$(R_1)_{\text{champs aléatoires}} = (1/T_1)_{\text{champs aléatoires}} = \gamma^2 2 J_{\text{champs aléatoires}}(\omega_0) \quad \text{équation 1.8}$$

$$(R_2)_{\text{champs aléatoires}} = (1/T_2)_{\text{champs aléatoires}} = \gamma^2 [J_{\text{champs aléatoires}}(\omega_0) + J_{\text{champs aléatoires}}(0)] \quad \text{équation 1.9}$$

Il est à noter que les situations qui relèvent strictement du mécanisme dit de "champs aléatoires" sont les interactions dipolaires et les interactions de spin-rotation.

### 1.3. Relaxation par anisotropie du déplacement chimique

Désignons par X, Y, Z les axes du repère du laboratoire et supposons qu'une molécule soit soumise à un champ magnétique  $B_0$  orienté selon l'axe Z. Au niveau moléculaire, ce champ affecte les électrons de telle manière que le nuage électronique local peut apporter un effet perturbateur qui se traduit au niveau du noyau par une valeur du champ légèrement différente de  $B_0$ . Par conséquent, un noyau donné ressent un champ magnétique effectif noté  $B^{eff}$  possédant trois composantes :

$$\begin{aligned}
 B_X^{eff} &= \sigma_{XZ} B_0 \\
 B_Y^{eff} &= \sigma_{YZ} B_0 \\
 B_Z^{eff} &= (1 - \sigma_{ZZ}) B_0
 \end{aligned}
 \tag{équation 1.10}$$

où le terme  $(1 - \sigma_{ZZ})$  est purement formel et traduit la faible intensité de l'effet d'écran,  $B_Z^{eff}$  restant la composante majeure de  $B^{eff}$ . Ceci peut être réécrit sous forme matricielle :

$$\begin{bmatrix} B_X^{eff} \\ B_Y^{eff} \\ B_Z^{eff} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} (1 - \sigma_{XX}) & \sigma_{XY} & \sigma_{XZ} \\ \sigma_{YX} & (1 - \sigma_{YY}) & \sigma_{YZ} \\ \sigma_{ZX} & \sigma_{ZY} & (1 - \sigma_{ZZ}) \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ B_0 \end{bmatrix}
 \tag{équation 1.11}$$

ou bien  $\overrightarrow{B^{eff(k)}} = (\underline{\underline{1}} - \underline{\underline{\sigma}}_k) \overrightarrow{B_0}$  équation 1.12

où  $\underline{\underline{1}}$  est le tenseur unitaire et  $\underline{\underline{\sigma}}_k$  le tenseur d'écran du noyau k considéré dont l'expression est donnée par :

$$\underline{\underline{\sigma}} = \begin{bmatrix} \sigma_{XX} & \sigma_{XY} & \sigma_{XZ} \\ \sigma_{YX} & \sigma_{YY} & \sigma_{YZ} \\ \sigma_{ZX} & \sigma_{ZY} & \sigma_{ZZ} \end{bmatrix}
 \tag{équation 1.13}$$

Ainsi, l'effet d'écran implique neuf coefficients qui constituent un tenseur de rang deux associé à une matrice  $3 \times 3$ . Les éléments de ce tenseur fluctuent en fonction du temps en raison des mouvements moléculaires, ses composantes dépendent en effet de l'orientation du tenseur csa par rapport au repère du laboratoire. Le mécanisme csa est donc actif pour la relaxation de la même manière que les champs locaux décrits précédemment. On peut ainsi définir une nouvelle densité spectrale :

$$J_{csa}(\omega) = \int_0^{+\infty} \overline{\sigma_{ZZ}(t) \sigma_{ZZ}(0)} \exp(-i\omega t) dt
 \tag{équation 1.14}$$

Des calculs semblables au paragraphe 1.2 mèneront à :

$$(R_1)_{csa} = (1/T_1)_{csa} = \gamma^2 B_0^2 \left( \frac{3}{2} \right) J_{csa}(\omega_0) \quad \text{équation 1.15}$$

$$(R_2)_{csa} = (1/T_2)_{csa} = \gamma^2 B_0^2 \left[ \left( \frac{3}{4} \right) J_{csa}(\omega_0) + J_{csa}(0) \right] \quad \text{équation 1.16}$$

Les densités spectrales  $J_{csa}(\omega)$  peuvent être réécrites en fonction du tenseur d'écran exprimé dans le repère de ses axes principaux (repère moléculaire pour lequel le tenseur est diagonal). Dans ce repère et selon les notations usuelles, les quantités suivantes sont définies (Mason, 1993) :

$$\Delta\sigma = \sigma_{zz} - (\sigma_{xx} + \sigma_{yy})/2 \quad (\text{anisotropie}) \quad \text{équation 1.17}$$

$$\eta = (3/2)(\sigma_{yy} - \sigma_{xx})/\Delta\sigma \quad (\text{asymétrie}) \quad \text{équation 1.18}$$

$$(\text{avec } |\sigma_{xx}| \leq |\sigma_{yy}| \leq |\sigma_{zz}|).$$

Ces quantités caractérisent le tenseur d'écran d'un noyau. Trois situations peuvent être envisagées. La plus générale correspond à un tenseur d'écran ne possédant pas de symétrie ( $\sigma_{xx} \neq \sigma_{yy} \neq \sigma_{zz}$ ); la seconde correspond à un tenseur de symétrie axiale ( $\sigma_{xx} = \sigma_{yy}$ ), dans ce cas l'asymétrie  $\eta$  est nulle; enfin si  $\sigma_{xx} = \sigma_{yy} = \sigma_{zz}$ , l'anisotropie est nulle (cas de noyaux dans des environnements de symétrie élevée). Dans ce dernier cas, il n'y aura pas de contribution à la relaxation.

Les nouvelles équations obtenues dans ce repère sont alors :

$$(R_1)_{csa} = \frac{1}{15} (\gamma B_0)^2 (\Delta\sigma)^2 \left( 1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \tilde{J}(\omega_0) \quad \text{équation 1.19}$$

$$(R_2)_{csa} = \frac{1}{15} (\gamma B_0)^2 (\Delta\sigma)^2 \left( 1 + \frac{\eta^2}{3} \right) \left[ \frac{2\tilde{J}(0)}{3} + \frac{\tilde{J}(\omega_0)}{2} \right] \quad \text{équation 1.20}$$

où la densité spectrale normalisée  $\tilde{J}(\omega)$ , qui sera décrite plus précisément au paragraphe 1.4, ne contient que des informations dynamiques.

En phase liquide, le déplacement chimique isotrope  $\delta_{iso}$  est la seule information accessible directement dans le spectre, elle est reliée à l'effet d'écran par la relation :

$$\delta_{iso} = 10^6 (\sigma_{iso}^{ref} - \sigma_{iso}) \quad \text{équation 1.21}$$

où les différents termes rencontrés ont la signification suivante :  $\sigma_{iso} = \frac{1}{3} (\sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz})$  et

$\sigma_{iso}^{ref}$  est le terme isotrope d'un composé de référence (généralement le tétraméthylsilane TMS dans des études en proton et carbone-13).

#### 1.4. Densités spectrales normalisées

Pour évaluer une fonction de corrélation, il est préférable de passer du repère du laboratoire au repère moléculaire (Canet, 1996; Canet et Mutzenhardt, 2000; Canet et al., 2002). L'objectif est ici de séparer les propriétés structurales (qui correspondent au repère moléculaire) des propriétés dynamiques (contenues dans la fonction reliant le repère du laboratoire au repère moléculaire). Ceci est facilement réalisé si l'interaction considérée est représentée par une direction unique dans le repère moléculaire (on parlera alors de vecteur de relaxation). C'est le cas lorsque la réorientation moléculaire est isotrope ou si le tenseur d'interaction est de symétrie axiale (le vecteur de relaxation correspond alors à l'axe de symétrie du tenseur). Alors  $J(\omega)$  peut être exprimée en fonction d'une densité spectrale normalisée notée  $\tilde{J}$  :

$$\tilde{J}(\omega) = 4\pi \int_{-\infty}^{+\infty} \overline{Y_2^0(\Theta(t)) Y_2^0(\Theta(0))} e^{-i\omega t} dt \quad \text{équation 1.22}$$

où  $\Theta$  est l'angle entre le vecteur de relaxation et la direction du champ  $B_0$ , et l'harmonique sphérique de rang deux  $Y_2^0(\Theta)$  a la forme  $Y_2^0(\Theta) = \sqrt{5/16\pi} (3\cos^2 \Theta - 1)$ .

Dans le cas d'une réorientation isotrope décrite par un unique temps de corrélation  $\tau_c$ , on

obtient : 
$$\tilde{J}(\omega) = \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad \text{équation 1.23}$$

Ainsi, lorsqu'on traite de vecteurs de relaxation bien définis, on peut écrire les densités spectrales sous la forme :

$$J(\omega) = K^r K^{r'} \tilde{J}^{rr'}(\omega) \quad \text{équation 1.24}$$

pour lesquelles nous avons introduit : i) les facteurs d'échelle  $K^r$  et  $K^{r'}$  associés aux différents mécanismes de relaxation  $r$  et  $r'$ , et ii) les densités spectrales normalisées  $\tilde{J}^{rr'}(\omega)$  obtenues par

la transformée de Fourier de l'équation 1.22 ( $\tilde{J}^{rr'}(\omega) = 4\pi \int_{-\infty}^{+\infty} Y_2^0(\Theta^r(t)) Y_2^0(\Theta^{r'}(0)) e^{-i\omega t} dt$ ).

Nous pouvons définir dès à présent les facteurs d'échelle :

Dans le cas de l'interaction dipolaire entre deux noyaux A et X (le vecteur de relaxation est alors le vecteur formé par les deux dipôles magnétiques de A et de X):

$$K_d^{AX} = \frac{1}{2\sqrt{5}} \frac{\mu_0 \gamma_A \gamma_X \hbar}{4\pi r_{AX}^3} \quad \text{équation 1.25}$$

$r_{AX}$  étant la distance internucléaire, les autres symboles ayant leur signification habituelle.

Pour le mécanisme lié à l'anisotropie de déplacement chimique du noyau X et dans le cas d'un tenseur de symétrie axiale ( $\sigma_{xx} = \sigma_{yy}$ ) (le vecteur de relaxation est l'axe principal du tenseur de déplacement chimique):

$$K_{csa}^X = \frac{1}{\sqrt{15}} \Delta\sigma \gamma_X B_0 \quad \text{équation 1.26}$$

où  $\Delta\sigma$  est l'anisotropie du tenseur d'écran définie par  $\Delta\sigma = \sigma_{zz}^X - \sigma_{xx}^X = \sigma_{zz}^X - \sigma_{yy}^X$  (cf. équation 1.17), pour un tenseur de symétrie axiale dont l'axe principal est selon la direction z.

L'expression des densités spectrales n'est pas unique, elle dépend entre autres de la réorientation de la molécule considérée. Nous décrirons plus précisément les différents

modèles de mouvement que peut subir une molécule, et donc la forme de la densité spectrale normalisée correspondant à chaque cas, dans le paragraphe 3.2.

### 1.5. Relaxation dans les systèmes couplés – Equations de Redfield

Dés que le système de spin comporte plus de deux états, les composantes de l'aimantation macroscopique s'avèrent insuffisantes pour appréhender complètement son évolution et on doit alors se tourner vers la mécanique quantique. L'outil adapté à une telle situation est l'*opérateur-densité*. Soient  $|a\rangle$  et  $|a'\rangle$  deux états de spin, l'élément  $\sigma_{aa'}$  de l'opérateur-densité est défini par

$$\sigma_{aa'} = \overline{c_a c_{a'}^*} \quad \text{équation 1.27}$$

où  $c_a$  et  $c_{a'}$  sont les probabilités de trouver le système de spins dans l'état  $|a\rangle$  ou  $|a'\rangle$  respectivement (\* : conjugué complexe), et la barre se référant comme à l'accoutumée à une moyenne sur l'ensemble des systèmes constituant l'échantillon. L'élément diagonal  $\sigma_{aa}$  n'est autre que la population  $P_a$  du niveau d'énergie  $E_a$  et est donc associé à l'aimantation longitudinale:

$$P_a = \sigma_{aa} \quad \text{équation 1.28}$$

L'élément hors-diagonal  $\sigma_{aa'}$  est appelé cohérence. En effet, à l'équilibre, il n'y a aucune relation de phase entre  $|a\rangle$  et  $|a'\rangle$ , indiquant ainsi que  $\sigma_{aa'}$  est nul. L'évolution de la matrice densité obéit aux équations de Redfield (Redfield, 1965) :

$$\frac{d\sigma_{aa'}}{dt} = i(\omega_a - \omega_{a'})\sigma_{aa'} + \sum_{b,b'} R_{aa'bb'}\sigma_{bb'} \quad \text{équation 1.29}$$

Le premier terme qui dépend de  $(\omega_a - \omega_{a'})$  correspond à la précession ( $\omega_a$  et  $\omega_{a'}$  représentent l'énergie des états  $|a\rangle$  et  $|a'\rangle$  exprimée en  $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ ) tandis que le deuxième terme concerne exclusivement les phénomènes de relaxation ( $R$  correspond à la matrice de relaxation). La quantité  $R_{aa'bb'}$  n'est différente de zéro que si

$$|\omega_a - \omega_{a'}| \approx |\omega_b - \omega_{b'}| \quad \text{équation 1.30}$$

Les conséquences immédiates de la condition précédente peuvent s'énoncer comme suit.

### Relaxation longitudinale

$$\frac{d\sigma_{aa'}}{dt} = \sum_b R_{aabb} \sigma_{bb'} \quad \text{équation 1.31}$$

Cette équation peut se réécrire :

$$\frac{dP_a}{dt} = \sum_b W_{ab} P_b \quad \text{équation 1.32}$$

avec  $W_{ab} = R_{aabb}$ , qui n'est autre que la probabilité d'une transition, induite par relaxation entre les états  $|a\rangle$  et  $|a'\rangle$ . Comme la condition 1.30 fait que l'évolution d'un élément diagonal de la matrice densité ne fait intervenir que des éléments diagonaux (voir équation 1.31), il s'ensuit qu'il n'existe aucun lien entre la relaxation longitudinale (éléments diagonaux) et la relaxation transversale (éléments hors-diagonaux).

### Relaxation transversale

Considérons une transition entre  $|a\rangle$  et  $|a'\rangle$  correspondant à un pic isolé dans le spectre RMN, l'élément correspond de la matrice densité évolue selon :

$$\frac{d\sigma_{aa'}}{dt} = [i(\omega_a - \omega_{a'}) + R_{aa'aa'}] \sigma_{aa'} \quad \text{équation 1.33}$$

ce qui correspond à une largeur de raie égale à  $R_{aa'aa'}/\pi$  (si les inhomogénéités du champ  $B_0$  sont négligeables).

Relaxation longitudinale d'un système de deux spins 1/2

D'après la figure 1.2, il apparaît que :

$$\begin{aligned} \langle I_z^A \rangle &\propto (P_1 - P_3) + (P_2 - P_4) \\ \langle I_z^X \rangle &\propto (P_1 - P_2) + (P_3 - P_4) \end{aligned} \quad \text{équation 1.34}$$

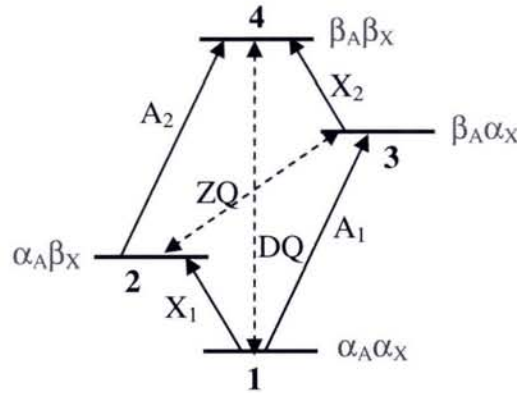


figure 1.2 diagramme d'énergie d'un système AX. Les flèches pleines correspondent aux transitions à un quantum, et les flèches en pointillés aux transitions à zéro quantum (ZQ) et deux quanta (DQ).

Le calcul de  $d\langle I_z^A \rangle/dt$  et  $d\langle I_z^X \rangle/dt$  fait donc appel à toutes les probabilités de transitions, à zéro quantum (ZQ, pulsation  $\omega_A - \omega_X$ ), à un quantum (1Q, pulsations  $\omega_A$  et  $\omega_X$ ) et à deux quanta (DQ, pulsation  $\omega_A + \omega_X$ ). Les équations de Solomon (Solomon, 1955) résultent de tels calculs :

$$\begin{aligned} \frac{dI_z^A}{dt} &= -R_1^A (I_z^A - I_{eq}^A) - \sigma (I_z^X - I_{eq}^X) \\ \frac{dI_z^X}{dt} &= -R_1^X (I_z^X - I_{eq}^X) - \sigma (I_z^A - I_{eq}^A) \end{aligned} \quad \text{équation 1.35}$$

$R_1^A$  et  $R_1^X$  sont les vitesses d'autorelaxation. Elles peuvent être exprimées de la façon suivante :

$$R_1^A = (R_1^A)_{dipolaire} + (R_1^A)_{autres} \quad \text{équation 1.36}$$



$$\text{avec } (R_1^A)_{\text{dipolaire}} = (K_d^{AX})^2 \left[ \underset{\text{DQ}}{\overset{\wedge}{6\tilde{J}(\omega_A + \omega_X)}} + 3\underset{\text{1Q}}{\overset{\wedge}{\tilde{J}(\omega_A)}} + \underset{\text{ZQ}}{\overset{\wedge}{\tilde{J}(\omega_A - \omega_X)}} \right] \quad \text{équation 1.37}$$

( $K_d^{AX}$  étant défini au paragraphe 1.4)

La vitesse de relaxation  $\sigma$  représente le couplage entre les aimantations longitudinales de A et de X, on parle alors de relaxation croisée, et elle ne dépend que d'une interaction dipolaire entre A et X:

$$\sigma = (K_d^{AX})^2 \left[ \underset{\text{DQ}}{\overset{\wedge}{6\tilde{J}(\omega_A + \omega_X)}} - \underset{\text{ZQ}}{\overset{\wedge}{\tilde{J}(\omega_A - \omega_X)}} \right] \quad \text{équation 1.38}$$

Du fait de la condition 1.30, il n'existe pas de terme de relaxation croisée transversale. En revanche, on peut évaluer, selon les mêmes méthodes, la contribution dipolaire à la vitesse de relaxation transversale :

$$(R_2^A)_{\text{dipolaire}} = (K_d^{AX})^2 \left[ 3\underset{\text{DQ}}{\overset{\wedge}{\tilde{J}(\omega_A + \omega_X)}} + 3\underset{\text{1Q}}{\overset{\wedge}{\tilde{J}(\omega_A)}/2} + 3\underset{\text{1Q}}{\overset{\wedge}{\tilde{J}(\omega_X)}/2} + \underset{\text{ZQ}}{\overset{\wedge}{\tilde{J}(\omega_A - \omega_X)}/2} + 2\underset{\text{ZQ}}{\overset{\wedge}{\tilde{J}(0)}} \right] \quad \text{équation 1.39}$$

### 1.6. L'effet Overhauser nucléaire

Nous considérons ici deux spins, notés A et X, couplés de manière dipolaire et dont l'évolution de l'aimantation ne peut plus être traitée individuellement (voir le paragraphe précédent). En effet, toute modification de l'aimantation de A entraîne une perturbation de l'aimantation de X et réciproquement, ceci par relaxation croisée. Lorsque ce couplage a pour origine une interaction entre moments magnétiques associés aux moments de spin, on ne peut parler en toute rigueur de couplage entre aimantations; il s'agit en fait de couplage entre polarisations, celles-ci ne dépendant que de la valeur des moments magnétiques et ne faisant pas intervenir, contrairement aux aimantations macroscopiques, les populations des niveaux d'énergie (au sens de la statistique de Boltzmann). Par abus de langage, nous continuerons à utiliser le terme aimantation, sachant que les quantités  $I_z^A$  et  $I_z^X$  utilisées ci-dessous ne se réfèrent pas simplement aux opérateurs de spin mais aux polarisations. Par conséquent, dans les équations de Solomon (Solomon, 1955) (équation 1.35) qui décrivent l'évolution des

polarisations (aimantations) longitudinales,  $I_z^A$  et  $I_z^X$  devraient être multipliés par les rapports gyromagnétiques de A et de X, respectivement. En fait, cette incohérence de notation disparaît en incluant implicitement le rapport gyromagnétique dans la polarisation à l'équilibre.

Comme décrit dans le paragraphe précédent, la vitesse de relaxation croisée tire son origine de l'interaction dipolaire entre les deux noyaux A et X, modulée par les mouvements moléculaires. Cette contribution présente un intérêt non négligeable dans le sens où elle varie en fonction de la proximité spatiale des deux noyaux considérés et plus précisément en  $1/\langle r^3 \rangle^2$  (r représente la distance internucléaire entre A et X, et  $\langle \rangle$  la moyenne sur les niveaux de vibration). Ce phénomène est appelé effet Overhauser nucléaire (eOn) (voir par exemple l'ouvrage de Neuhaus et Williamson, 1989), il est à l'origine des spectroscopies de corrélation par relaxation croisée: NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) (Jeener et al., 1979) pour les cas homonucléaires et HOESY (Heteronuclear Overhauser Effect Spectroscopy) (Rinaldi, 1983; Yu et Levy, 1983) dans les cas hétéronucléaires. Il s'agit là d'un des moyens d'investigation intéressants pour parvenir à des renseignements d'ordre géométrique ou dynamique dans des molécules de toute taille.

### 1.7. Interférence entre mécanismes de relaxation

Dans le paragraphe précédent, nous avons abordé le cas de deux spins pouvant interagir par l'intermédiaire d'un mécanisme de relaxation donné (on parle alors de fonctions d'auto-corrélation). Parallèlement, ils peuvent également mettre en jeu deux mécanismes de relaxation différents, ce qui est le cas si l'anisotropie de déplacement chimique d'un spin X est corrélée (du point de vue des mouvements des tenseurs considérés) avec l'interaction dipolaire entre les deux noyaux A et X (on parle alors de fonctions de corrélation croisée). Pour rendre compte de ce nouvel effet, il est nécessaire d'introduire un nouveau mode d'aimantation constitué du produit d'opérateurs  $2I_z^X I_z^A$  (Werbelow et Grant, 1975; Elbayed et Canet, 1989; Canet, 1996) communément appelé ordre longitudinal. Précédemment, nous avons considéré uniquement les quantités  $I_z^A$  et  $I_z^X$  pour deux raisons : i) l'ordre longitudinal désigné par  $2I_z^X I_z^A$  est impossible à observer directement puisque sa valeur à l'équilibre thermique est nulle ; ainsi, il conserve cette valeur jusqu'à ce qu'il soit créé par une séquence d'impulsions appropriée ou par relaxation de spin. ii)  $2I_z^X I_z^A$  ne pourra être observé (indirectement) que si il existe un chemin de couplage scalaire entre A et X. iii)  $2I_z^X I_z^A$  n'est

pas couplé par relaxation aux modes d'aimantation  $I_z^A$  et  $I_z^X$  si le tenseur de déplacement chimique de A ou de X est isotrope ou si son anisotropie est trop faible.

En revanche, si l'anisotropie de déplacement chimique (Chemical Shift Anisotropy ou csa en anglais) devient non négligeable, celle-ci donne naissance à un phénomène de relaxation qui, évidemment, contribue à l'autorelaxation, mais pourra également interférer avec le mécanisme de relaxation dipolaire. Il en résulte un terme de relaxation supplémentaire qui corrèle l'ordre longitudinal et les deux autres modes d'aimantation. Par conséquent, les équations de Solomon doivent être étendues et exprimées de la façon suivante :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d}{dt} I_z^X = -R_1^X (I_z^X - I_{eq}^X) - \sigma_{AX} (I_z^A - I_{eq}^A) - \eta_{zCSA(X),dip(AX)} (2I_z^X I_z^A) \\ \frac{d}{dt} I_z^A = -R_1^A (I_z^A - I_{eq}^A) - \sigma_{AX} (I_z^X - I_{eq}^X) - \eta_{zCSA(A),dip(AX)} (2I_z^X I_z^A) \\ \frac{d}{dt} (2I_z^X I_z^A) = -R_1^{AX} (2I_z^X I_z^A) - \eta_{zCSA(X),dip(AX)} (I_z^X - I_{eq}^X) - \eta_{zCSA(A),dip(AX)} (I_z^A - I_{eq}^A) \end{array} \right. \quad \text{équation 1.40}$$

où le terme  $R_1^{AX}$  représente la vitesse de relaxation propre de l'ordre longitudinal et les termes  $\eta_{zCSA(i),dip(AX)}$  (où  $i = A$  ou  $X$ ) représentent les vitesses de corrélation croisée longitudinale qui caractérisent l'interaction entre le mécanisme csa lié à l'anisotropie de déplacement chimique du noyau  $i$  considéré et le mécanisme dipolaire entre A et X représenté par le vecteur de relaxation AX.

Ce terme d'interférence prend la forme donnée ci-après (Goldman, 1984):

$$\eta_z = -\frac{6}{\sqrt{3}} K_d^{AX} K_{csa}^X \tilde{J}^{cc}(\omega_X) \quad \text{équation 1.41}$$

On retrouve bien évidemment les amplitudes des deux mécanismes de relaxation, csa ( $K_{csa}^X$ ) et dipolaire ( $K_d^{AX}$ ). Quant à la densité spectrale normalisée  $\tilde{J}^{cc}(\omega_X)$  (cc pour corrélation croisée), elle doit être évaluée en prenant en compte la corrélation de réorientation des deux vecteurs de relaxation, le vecteur joignant les deux noyaux A et X et l'axe de symétrie du tenseur d'écran du noyau X lorsqu'il existe (ou les axes principaux de ce tenseur dans le cas le plus général). Ce point sera traité plus en détail dans le paragraphe 3.2.

En ce qui concerne la relaxation transversale, le terme de corrélation croisée csa-dipolaire prend la forme (Goldman, 1984):

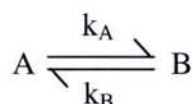
$$\eta_{x,y} = -\frac{1}{\sqrt{3}} K_d^{AX} K_{csa}^X \left[ 3\tilde{J}^{cc}(\omega_X) + 4\tilde{J}^{cc}(0) \right] \quad \text{équation 1.42}$$

De la même manière que la relaxation croisée, la corrélation croisée nous fournira des informations dynamiques et structurales auxquelles s'ajouteront des informations sur le tenseur d'écran.

### 1.8. Les phénomènes d'échange

La relaxation peut également être induite par les phénomènes d'échange (chimique ou conformationnel). En fait, ces phénomènes représentent un mécanisme efficace pour la relaxation transversale et ils ont lieu sur une large gamme de temps : de la nanoseconde jusqu'à plusieurs secondes (Günther, 1994; Canet et al., 2002; Wang et Palmer III, 2003).

Imaginons une réaction où un noyau ne reste pas dans un site magnétique déterminé, mais peut s'échanger entre deux (ou plusieurs) sites :



Le transfert d'aimantation entre les différents sites nucléaires est défini par deux temps moyens de résidence ( $\tau_A$  et  $\tau_B$ ) d'un noyau dans le site A et le site B. La vitesse d'échange sera notée :

$$k_{ex} = k_A + k_B = \frac{1}{\tau_{ex}} \quad \text{équation 1.43} \quad \text{avec } k_A = \frac{1}{\tau_A} \text{ et } k_B = \frac{1}{\tau_B} \quad \text{équation 1.44}$$

On notera également  $P_A$  et  $P_B$  les populations relatives des deux sites A et B respectivement.

$$P_A = \frac{k_B}{k_{ex}} \text{ et } P_B = \frac{k_A}{k_{ex}} \quad \text{équation 1.45}$$

Il existe plusieurs régimes d'échange en fonction de la valeur de la vitesse d'échange ( $k_{ex}$ ) par rapport à la différence des fréquences de résonance entre les sites A et B (notée  $\Delta\omega$ ) :

$$\begin{aligned} k_{ex} \gg \Delta\omega & \quad \text{échange rapide} \\ k_{ex} \sim \Delta\omega & \quad \text{échange intermédiaire} \\ k_{ex} \ll \Delta\omega & \quad \text{échange lent} \end{aligned}$$

En supposant que l'on puisse faire varier la vitesse de cet échange (dans la pratique, on joue sur des paramètres physiques et chimiques tels que température, pH, concentration...), l'observation expérimentale des spectres RMN (figure 1.3) sera la suivante :

- en l'absence d'échange entre A et B, chaque raie garde son individualité.
- en échange lent, les deux raies gardent leur individualité aux fréquences  $\nu_A$  et  $\nu_B$  mais s'élargissent.
- si la vitesse d'échange augmente, on obtient un cas limite (coalescence) où les deux raies se confondent en une raie large unique à la fréquence moyenne  $P_A\nu_A + P_B\nu_B$ .
- pour une vitesse d'échange plus rapide, cette raie unique s'affine.

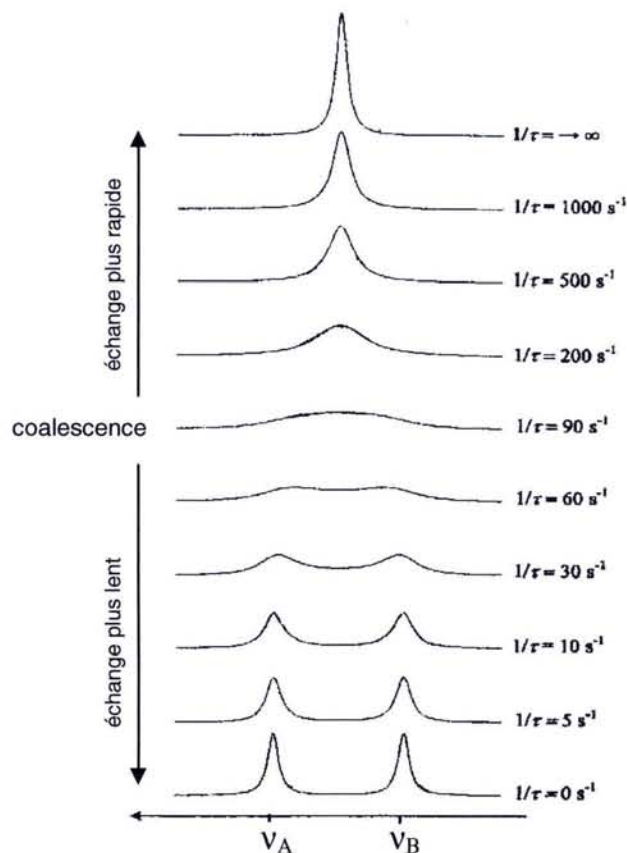


figure 1.3 Spectres de RMN théoriques d'un processus d'échange entre les sites A et B en fonction de la vitesse d'échange  $\tau_{ex}$  (repris du livre de Canet et al., 2002).  $\Delta\nu = 20\text{Hz}$ ,  $P_A = P_B = 0.5$ .

Les phénomènes d'échange sont responsables de l'augmentation de la relaxation transversale observée :

$$R_2^{obs} = R_2 + R_2^{ex}$$

**S.C.D. - U.H.P. NANCY 1**  
 BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
 Rue du Jardin Botanique  
 54600 VILLERS-LES-NANCY

équation 1.46

où la contribution de relaxation due à l'échange peut s'écrire (Sandström, 1982) :

$$R_2^{ex} = \frac{(\Delta\omega)^2 P_A P_B \tau_{ex}}{1 + (\omega_{eff} \tau_{ex})^2}$$

équation 1.47

$\omega_{eff}$  exprime l'amplitude du champ radiofréquence utilisé pour maintenir l'aimantation du noyau d'intérêt dans le plan (x,y) pendant les mesures (par exemple lors d'une mesure par un train d'impulsions CPMG pour la relaxation transversale, voir paragraphe 2.2).

Comme le montre l'équation 1.47, le terme d'échange  $R_2^{ex}$  est, par l'intermédiaire de  $(\Delta\omega)^2$ , fonction du carré du champ magnétique statique utilisé lors des mesures. Il sera également fonction de la façon dont on mesure le paramètre de relaxation transversale par l'intermédiaire du facteur  $\omega_{eff}$  (voir par exemple l'étude des paramètres de relaxation de la protéine p13<sup>MTCPI</sup> au paragraphe 3.3.2). Pour plus de détails sur l'échange, le lecteur pourra se référer à l'article de Wang et Palmer (2003) qui décrit l'art et la manière de mesurer ces phénomènes dans les protéines.

### 1.9. Résumé

Les paramètres de relaxation que nous allons étudier dans ce travail sont les vitesses d'autorelaxation longitudinale  $R_1$  et transversale  $R_2$  de l'azote-15, la vitesse de relaxation croisée  $\sigma_{NH}$  et les termes de corrélation croisée csa(<sup>15</sup>N)-dipolaire(<sup>1</sup>H<sup>15</sup>N) longitudinale  $\eta_z$  et transversale  $\eta_{x,y}$  dans des protéines marquées. Comme décrit précédemment, ces vitesses proviennent majoritairement des mécanismes dipolaires et csa (*chemical shift anisotropy*). Elles peuvent être décrites en terme de densités spectrales normalisées d'auto-corrélation (les deux mécanismes intervenant sont alors identiques, les densités spectrales sont  $\tilde{J}^{dip}(\omega)$  pour le mécanisme dipolaire et  $\tilde{J}^{csa}(\omega)$  pour le mécanisme csa) et de corrélation croisée (en nous limitant ici à la corrélation croisée csa(<sup>15</sup>N)-dipolaire(<sup>1</sup>H<sup>15</sup>N) pour laquelle on notera  $\tilde{J}^{cc}(\omega)$  la densité spectrale normalisée).

D'après les calculs menés précédemment, les équations des paramètres de relaxation pour un système NH sont :

$$R_1^N = \left(K_d^{NH}\right)^2 [3 \tilde{J}^{dip}(\omega_N) + 6 \tilde{J}^{dip}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}^{dip}(\omega_H - \omega_N)] + \left(K_{csa}^N\right)^2 \tilde{J}^{csa}(\omega_N) \quad \text{équation 1.48}$$

$$R_2^N = \left(K_d^{NH}\right)^2 [2 \tilde{J}^{dip}(0) + 3 \tilde{J}^{dip}(\omega_H) + \frac{3}{2} \tilde{J}^{dip}(\omega_N) + 3 \tilde{J}^{dip}(\omega_H + \omega_N) + \frac{1}{2} \tilde{J}^{dip}(\omega_H - \omega_N)] + \left(K_{csa}^N\right)^2 \left[\frac{2}{3} \tilde{J}^{csa}(0) + \frac{1}{2} \tilde{J}^{csa}(\omega_N)\right] + R_2^{ex} + \text{inhomogénéités} \quad \text{équation 1.49}$$

$$\sigma_{NH} = \left(K_d^{NH}\right)^2 [6 \tilde{J}^{dip}(\omega_H + \omega_N) - \tilde{J}^{dip}(\omega_H - \omega_N)] \quad \text{équation 1.50}$$

$$\eta_z = -\frac{6}{\sqrt{3}} K_d^{NH} K_{csa}^N \tilde{J}^{cc}(\omega_N) \quad \text{équation 1.51}$$

$$\eta_{x,y} = -\frac{1}{\sqrt{3}} K_d^{NH} K_{csa}^N [4 \tilde{J}^{cc}(0) + 3 \tilde{J}^{cc}(\omega_N)] \quad \text{équation 1.52}$$

avec les facteurs d'échelle :

$$K_d^{NH} = \frac{1}{2\sqrt{5}} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \left( \frac{\hbar \gamma_H \gamma_N}{r_{NH}^3} \right) \right) \quad \text{et} \quad K_{csa}^N = \frac{1}{\sqrt{15}} \omega_N (\sigma_{||}^N - \sigma_{\perp}^N) \quad \text{équation 1.53}$$

On peut remarquer que  $R_2$  et  $\eta_{x,y}$  comportent une densité spectrale à la fréquence zéro qui sera prépondérante si les mouvements moléculaires sont lents, comme c'est le cas dans les macromolécules. On ne peut alors pas appliquer les conditions du rétrécissement extrême ( $\omega\tau_c \ll 1$ , les densités spectrales, et donc les paramètres de relaxation, seraient indépendants du champ  $B_0$ ). Dans la suite de l'exposé nous allons exploiter cette dépendance des vitesses de relaxation en fonction du champ, pour décrire la dynamique des protéines en solution. La figure 1.4 présente ainsi évolution.

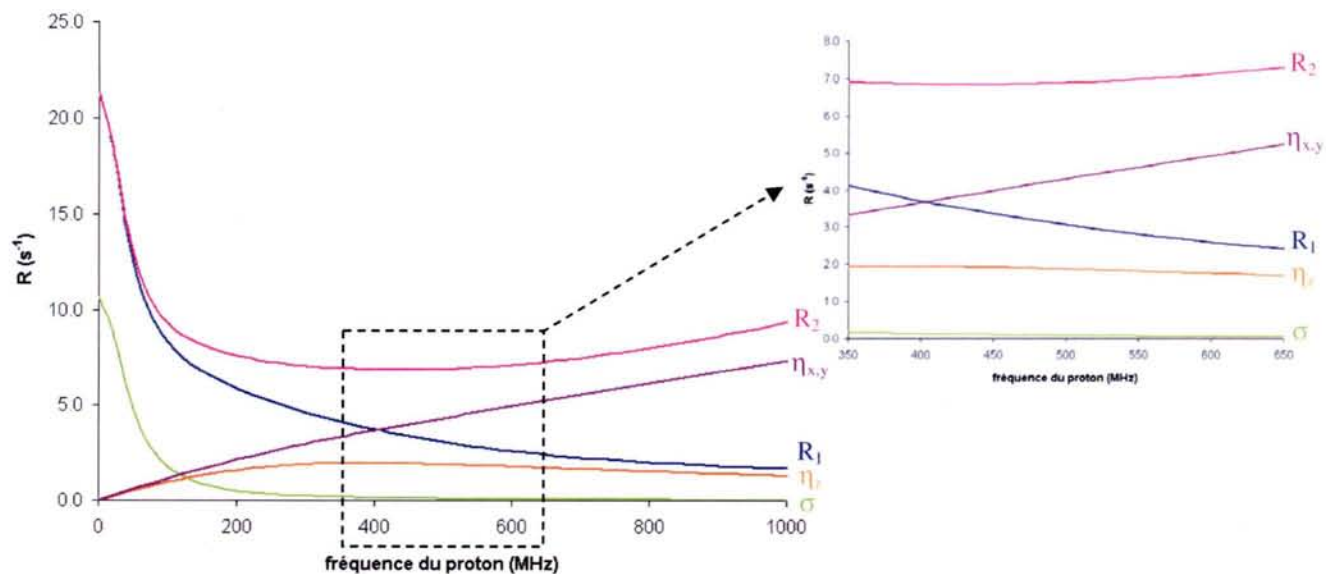


figure 1.4 Evolution des vitesses de relaxation avec la valeur du champ  $B_0$  (représenté par la fréquence de résonance du proton en MHz). Les paramètres sont calculés avec les équations 1.44 à 1.49. La densité spectrale utilisée correspond à un simple modèle isotrope avec  $\tau_c=4ns$ . On a fait abstraction de toute contribution d'échange dans  $R_2$ .

On peut ainsi remarquer que  $R_1$  et  $\eta_{x,y}$  sont les paramètres les plus sensibles à la variation de la valeur du champ magnétique dans la gamme que nous allons étudier (entre 400 et 600MHz).

NB : Dans cette introduction, nous nous sommes limités à exposer les paramètres de relaxation utiles pour la suite du manuscrit. Il existe d'autres variétés de termes de relaxation que nous n'avons pas décrites ici.



Bibliographie du chapitre 1

- Abragam A. (1961) "*The principles of Nuclear Magnetism*" Clarendon Press: Oxford.
- Bloch F. (1946) *Phys. Rev.* **70**, 460-474.
- Bloch F. (1956) *Phys. Rev.* **102**, 104-135.
- Bloembergen N., Purcell E.M. et Pound R.V. (1948) *Phys. Rev.* **73**, 679-712.
- Canet D. (1996) in "*Encyclopedia of NMR*" **6**, 4046-4053.
- Canet D. et Mutzenhardt P. (2000) in "*Encyclopedia of Analytical Chemistry*", R.A.Meyers (Ed.), Wiley, 12265-12291.
- Canet D., Boubel J.-C., Canet Soulas E. (2002) "*La RMN. Concepts, methods et applications*" 2<sup>e</sup> édition, Dunod: Paris.
- Elbayed K. et Canet D. (1989) *Mol. Phys* **68**, 1033-1046.
- Goldman M. (1984) *J.Magn.Reson.* **60**, 437-452.
- Günther H. (1994) "*La spectroscopie de RMN. Principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de RMN du proton et du carbone-13 en chimie*" édition Masson: Paris.
- Jeener J., Meyer B. H., Bachman P. et Ernst R. R. (1979) *J. Chem. Phys.* **71**, 4546-4563.
- Mason J. (1993) *Solid State Nuc. Magn. Reson.* **2**, 285-288.
- Neuhaus D. et Williamson M.P. (1989) "*The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis*", Verlag Chemie: New York.
- Redfield A.G. (1957) *IBM J. Res. Develop.* **1**, 19.
- Redfield A.G. (1965) *Adv. Magn. Reson.* **1**, 1.
- Rinaldi P. L. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 5167-5168.
- Sandström J. (1982) "*Dynamic NMR spectroscopy*" Academic Press: Londres.
- Solomon I. (1955) *Phys. Rev.* **99**, 559-565.
- Wang C. et Palmer III A.G. (2003) *Magn.Reson.Chem.* **41**, 866-876.
- Wangness R.K. et Bloch F. (1953) *Phys. Rev.* **89**, 728-739.
- Werbelow L. G. et Grant D. M. (1975) *J. Chem. Phys* **63**, 544-556.
- Yu C. et Levy G. C. (1983) *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 6994-6996.

## **Chapitre 2**

# **Nouvelles méthodes pour la mesure du terme de corrélation croisée csa-dipolaire dans les protéines**

## 2. Nouvelles méthodes pour la mesure du terme de corrélation croisée csa-dipolaire dans les protéines

Dans le premier chapitre, nous avons essayé d'apporter une description phénoménologique de la relaxation de spin. Nous avons constaté que la relaxation des systèmes de spins était gouvernée par différents paramètres et que ces systèmes évoluaient d'une manière clairement définie par le biais des équations de Solomon. Nous allons maintenant montrer qu'il est possible d'isoler et mesurer les paramètres de relaxation via des séquences impulsionnelles appropriées et nous nous attacherons plus particulièrement à la description de ces séquences.

Après une présentation du système de spin que nous avons à étudier et qui concerne précisément les protéines en solution, nous exposerons les différentes méthodes utilisées pour mesurer la relaxation (autorelaxations longitudinale  $R_1$  et transversale  $R_2$ , et relaxation croisée  $\sigma$ ) dans les macromolécules marquées. Enfin, nous présenterons les techniques que nous avons mises au point pour mesurer le terme d'interférence entre les mécanismes csa( $^{15}\text{N}$ ) et dipolaire( $^{15}\text{N}^1\text{H}$ ).

### 2.1. Le système de spins $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ dans les protéines

D'un point de vue physico-chimique, une protéine est un polymère qui peut adopter une structure tridimensionnelle définie, résultant de l'existence de nombreuses et faibles interactions non covalentes. Ces macromolécules biologiques sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés pour lesquels on utilise la nomenclature des atomes indiquée sur la figure 2.1.

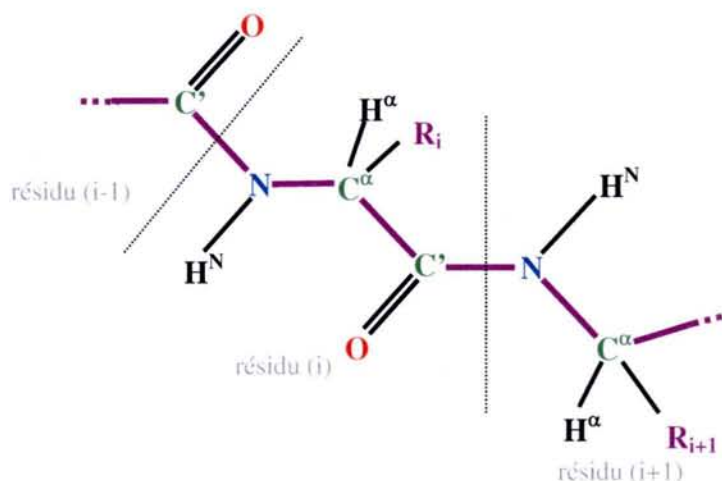


figure 2.1 Nomenclature des atomes constituant l'enchaînement des acides aminés dans une protéine.

Ce travail porte sur l'étude de la relaxation de l'isotope 15 de l'azote dans les protéines ( $^{15}\text{N}$ ), et plus précisément des noyaux  $^{15}\text{N}$  constituant le squelette. L'une des principales difficultés provient de la faible amplitude du rapport gyromagnétique  $\gamma_N$  de ce noyau qui entraîne des problèmes de sensibilité dans les mesures. Pour y remédier, on utilise des protéines uniformément enrichies en azote-15 et la plupart des séquences d'impulsions utilisées commencent par un bloc INEPT (*Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer*) (Morris et Freeman, 1979) qui permet un transfert de la polarisation du proton  $^1\text{H}$  vers les noyaux X peu sensibles (ici  $^{15}\text{N}$ ) pour autant qu'il existe un couplage scalaire entre eux. Ce bloc est schématisé sur la figure 2.2.

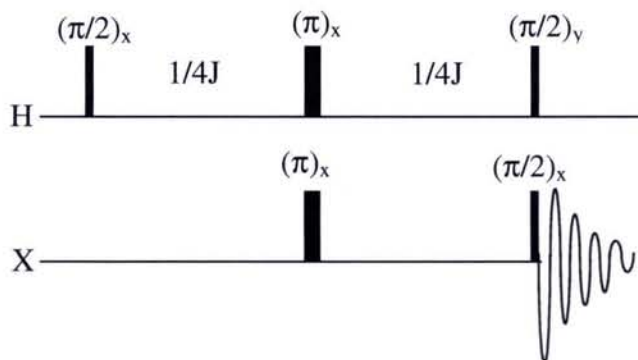


figure 2.2 Sous-séquence INEPT (Morris et Freeman, 1979).

La première impulsion à  $90^\circ$  sur le proton amène l'aimantation dans le plan de mesure. Celle-ci évolue ensuite selon la constante de couplage  $J_{XH}$  pendant un temps  $2 \times (1/(4J_{XH})) = 1/(2J_{XH})$  : on obtient ainsi un doublet antiphase sur le noyau H. Les deux impulsions centrales et simultanées à  $180^\circ$  permettent i) de laisser évoluer les deux branches du doublet sous l'effet du couplage, ii) de refocaliser le déplacement chimique en proton. Les deux impulsions finales à  $90^\circ$  permettent de transférer la configuration antiphase du proton en une configuration antiphase sur le noyau X, mais ici affectée de la polarisation du proton (facteur  $\gamma_H$ ); le gain en intensité est ainsi égal à  $\gamma_H/\gamma_X$ .

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
 BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
 Rue du Jardin Botanique  
 54600 VILLERS-LES-NANCY

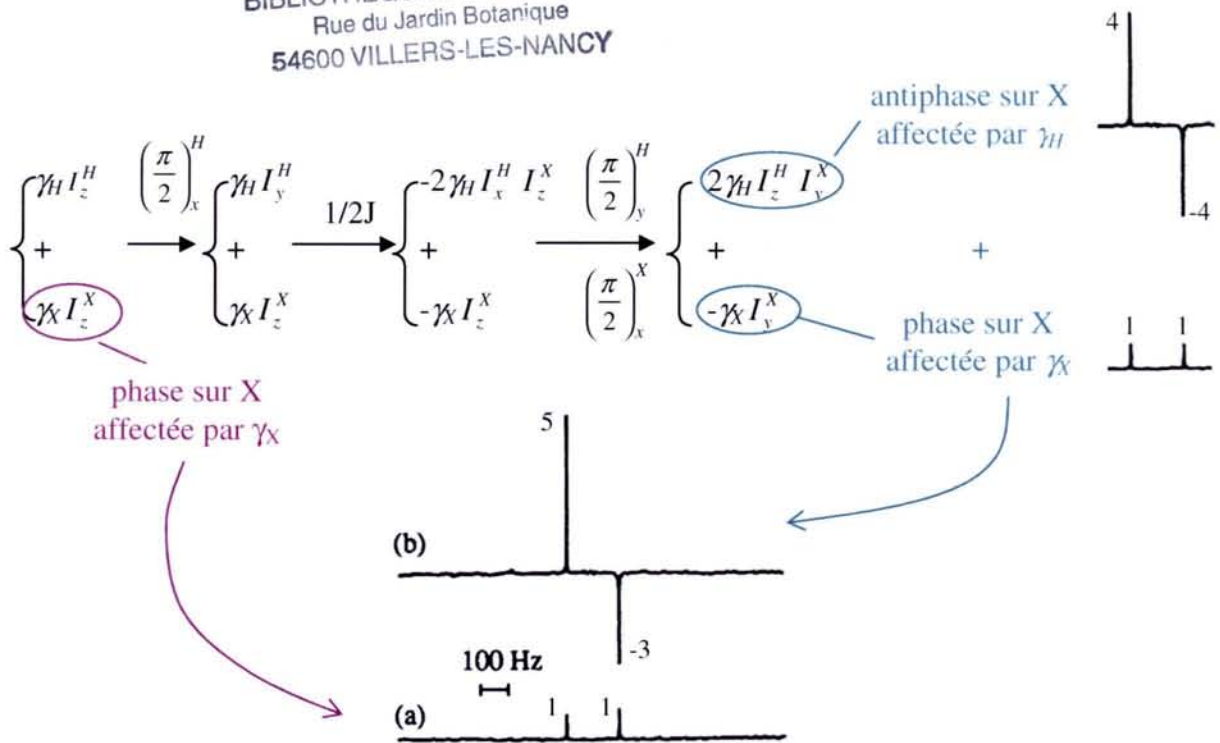


figure 2.3 Evolution des cohérences durant la sous-séquence INEPT et spectres  $^{13}\text{C}$  de l'acide formique (Canet et al., 2002). (a) spectre normal ; (b) spectre INEPT.

Dans la séquence INEPT simple, on ne peut pas appliquer de découplage pendant l'acquisition. En effet, les deux branches du doublet antiphase s'annihileraient mutuellement. Il convient donc dans un deuxième temps d'appliquer une nouvelle séquence de refocalisation qui permet au doublet antiphase de retrouver une configuration en phase, comme le montre la figure suivante :

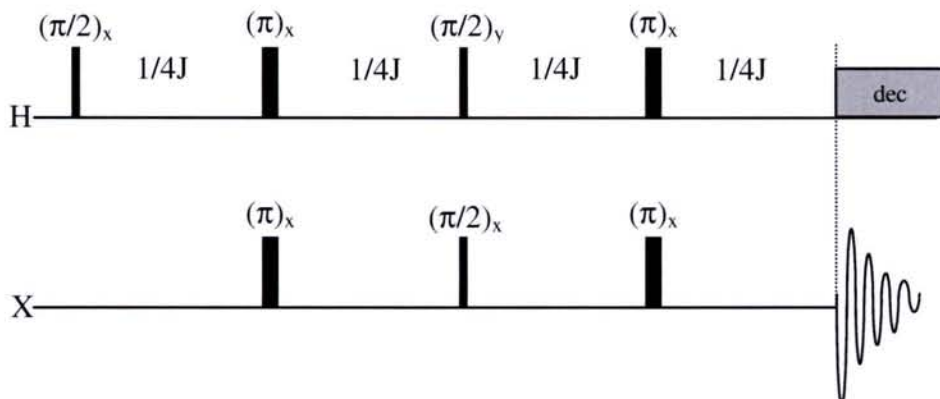


figure 2.4 Sous-séquence "INEPT refocalisé".

Ceci permet un découplage protonique sans hypothéquer le gain de sensibilité du au transfert de cohérence. On perd dans ce cas la contribution propre du noyau X (qui peut également être éliminée par cyclage de phase).

Les expériences hétéronucléaires de corrélation sont basées sur des sous-séquences INEPT et retro-INEPT qui assurent respectivement le transfert de polarisation du proton vers l'azote 15, et son retour de l'azote 15 vers le proton qui est détecté. On parle alors de détection inverse. De façon générale, la sensibilité d'une expérience de RMN est proportionnelle au cube du rapport gyromagnétique  $\gamma^3$ . Le transfert INEPT revient à travailler avec l'aimantation du proton (excitation initiale, mais aussi détection) donc avec un gain de  $(\gamma_H/\gamma_N)^3 \sim 1000$  par rapport à une mesure directe du spectre de l'azote-15. La valeur de la constante de couplage utilisée est une valeur moyenne obtenue sur tous les acides aminés :  $^1J^{^1H-^{15}N} = 91\text{Hz}$ .

Ainsi, l'expérience HSQC (*Heteronuclear Simple Quantum Correlation*) (Bodenhausen et Ruben, 1980) constitue l'ossature des expériences hétéronucléaires que nous avons développées. Elle permet de visualiser les corrélations scalaires entre  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$ . Cette expérience a connu de nombreuses modifications et améliorations, la figure 2.5 présente une version couramment utilisée.

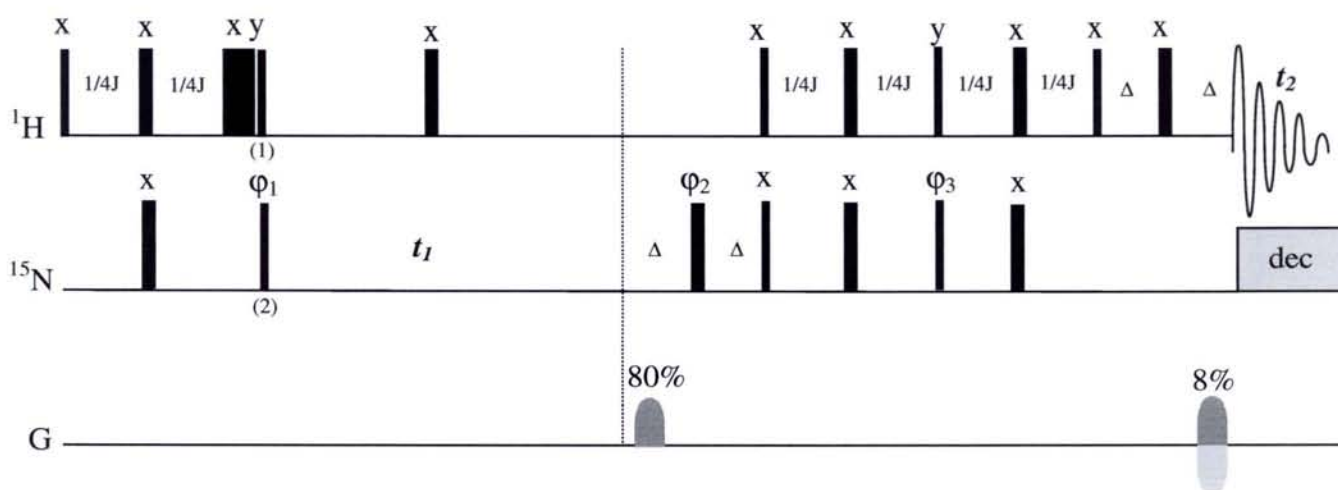


figure 2.5 Schéma de la séquence d'impulsions HSQC (Palmer III et al., 1991; Kay et al., 1992a; Scheuler et al., 1993). Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les traits fins correspondent à des impulsions à  $90^\circ$ , et les traits épais à des impulsions à  $180^\circ$ .  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique de l'azote-15, la modulation est obtenue par une procédure écho-antiécho (Davis et al., 1992; Boyd et al., 1992; Tolman et al., 1992). G correspond aux impulsions de gradient de champ statique. Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(x -x)$ ,  $\phi_2=(x x -x -x)$ ,  $\phi_3=(y y -y -y)$ ,  $\text{acqu}=(x -x -x x)$ . Le découplage est de type GARP (Shaka et al., 1985).

La première sous-séquence INEPT permet le transfert de polarisation; après une période d'évolution permettant le marquage en déplacement de l'azote ( $t_1$ , qui est incrémenté lors

d'une série de mesures pour satisfaire aux conditions d'une expérience à deux dimensions), la seconde sous-séquence INEPT transmet cette information vers le proton (rétro-INEPT). L'impulsion longue (typiquement 1ms) appliquée selon x dans le premier INEPT constitue une purge efficace (grâce à l'inhomogénéité du champ radio-fréquence) vis-à-vis de la composante selon y de toute aimantation protonique. Une autre solution consiste à inclure une impulsion de gradient entre les impulsions radiofréquence (1) et (2), ceci permet d'éliminer tout artefact provenant d'une aimantation parasite, non couplée au spin hétéronucléaire considéré (Bax et Pochapsky, 1992). La séquence d'impulsion présentée ici (figure 2.5) est "améliorée" ou "enhanced" en anglais (Cavanagh et al., 1991; Palmer III et al., 1991; Palmer III et al., 1994), c'est-à-dire que les deux composantes de l'aimantation transversale de l'azote (selon l'axe x, et selon l'axe y) sont transférées sur le proton pour une meilleure sensibilité (*Preservation of Equivalent Pathways*, gain par un facteur  $\sqrt{2}$ ). L'utilisation de la séquence HSQC est illustrée par l'exemple de la figure 2.6.

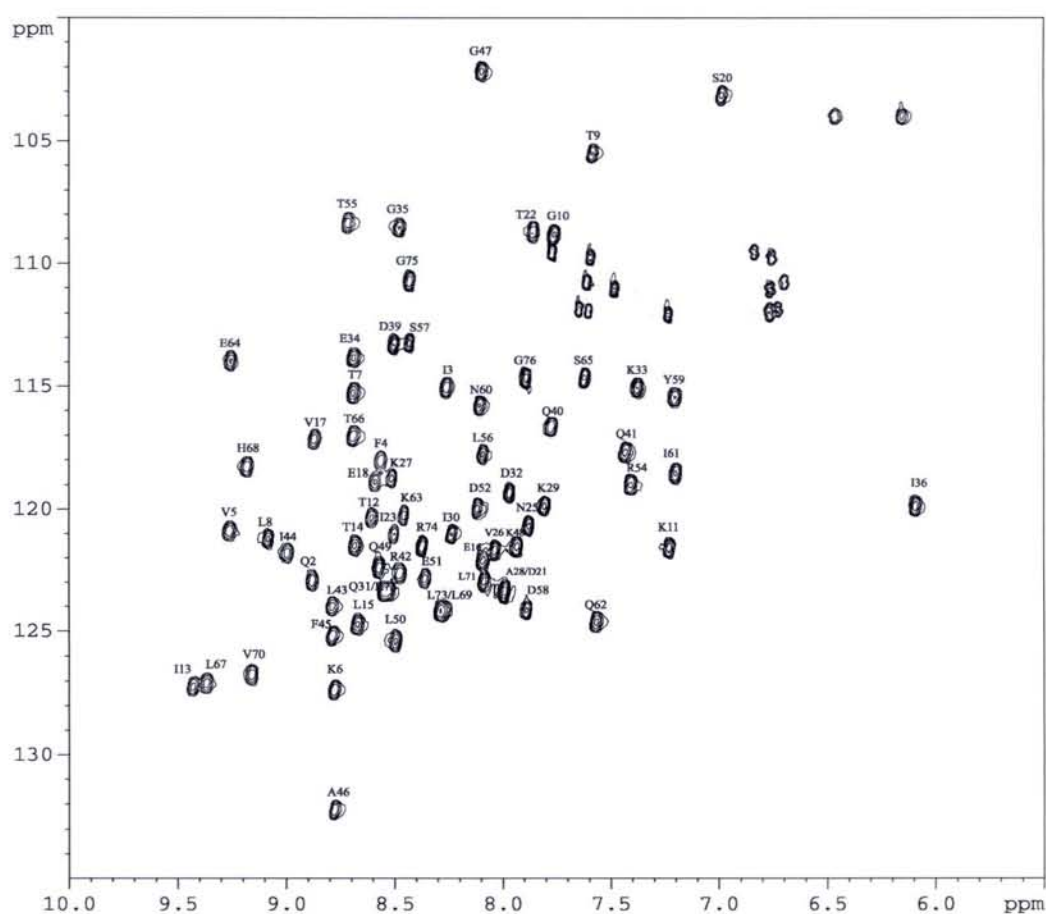
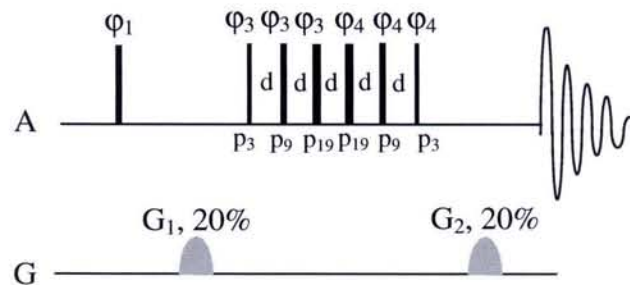


figure 2.6 Spectre HSQC  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  de l'ubiquitine à 600MHz et 300K (concentration 1.4mM). Nombre d'accumulations :16, nombre de "dummy scans" (qui ne sont pas enregistrés) : 4, temps de répétition : 2s, largeurs spectrales :14ppm $\times$ 30ppm, nombre de points : 2048 $\times$ 256. Les étiquettes des taches indiquent les résidus correspondants, l'absence d'étiquette correspond à des taches de NH ou NH<sub>2</sub> appartenant aux chaînes latérales de certains résidus.

Un problème inhérent à la RMN des biomolécules est l'élimination du signal des protons de l'eau. En effet, les macromolécules biologiques sont conservées dans de l'eau légère et ne peuvent être diluées totalement dans l'eau lourde ( $D_2O$ ) en raison de l'échange des protons amides. On utilise généralement un mélange 95% $H_2O$ -5% $D_2O$ . La concentration des protons de l'eau est de 111M alors que la concentration des protons de la macromolécule est typiquement de 1-2mM. Ainsi, le pic de solvant est environ  $10^5$  fois plus intense que les pics des protons de la biomolécule; ceci entraîne des problèmes de dynamique au niveau de la numérisation du signal. Cette forte concentration en protons est également à l'origine des phénomènes dits de *radiation damping* (Bloembergen et Pound, 1954; Abragam, 1961). La technique la plus simple pour atténuer le pic du solvant est la présaturation (Hore, 1989; Guéron et al., 1991). Cette technique est très simple à mettre en œuvre et très efficace, mais les signaux proches du pic du solvant sont touchés et des transferts d'aimantation entre soluté et solvant peuvent apparaître. D'autre part, les pics des protons amides en échange avec les protons de l'eau disparaissent également. Une autre technique très utilisée est la séquence *watergate* (*WATER suppression by GrAdient Tailored Excitation*) (Piotto et al., 1992; Sklenar et al., 1993; Saudek et al., 1994) (schématisée sur la figure 2.7).



**figure 2.7** Sous-séquence WATERGATE. G correspond aux impulsions de gradient de champ statique.  $p_3$ ,  $p_9$  et  $p_{19}$  correspondent à des impulsions d'angle  $90^\circ \cdot 0.231$ ,  $90^\circ \cdot 0.692$  et  $90^\circ \cdot 1.462$  respectivement. Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(x-x)$ ,  $\phi_3=(xxyy-xxyy)$ ,  $\phi_4=(-xyxyxyxy)$ ,  $acq=(xxyxyxy)$ . Voir le texte pour la signification de d.

La séquence est un écho dans lequel l'impulsion à  $180^\circ$  est encadrée par deux impulsions de gradient de champ statique. La première impulsion  $G_1$  défocalise toutes les cohérences, les impulsions suivantes ( $p_3$  à  $p_{19}$ , et  $p_{19}$  à  $p_3$ ) correspondent à une séquence binomiale (angles de basculement  $3\alpha$ ,  $9\alpha$ ,  $19\alpha$ ,  $19\alpha$ ,  $9\alpha$ ,  $3\alpha$ , avec  $26\alpha=180^\circ$ ) (Sklenar et al., 1993). Celle-ci inverse toutes les résonances, sauf celles situées sur la porteuse et aux positions  $\nu=k/(2d)$  où  $k$  est un entier et  $d$  un délai, on choisit généralement  $d=1/(2\nu_{max})$ . Ainsi, la seconde impulsion de



gradient de champ statique  $G_2$  refocalise toutes les résonances hormis celles situées sur la porteuse, c'est-à-dire celle de l'eau.

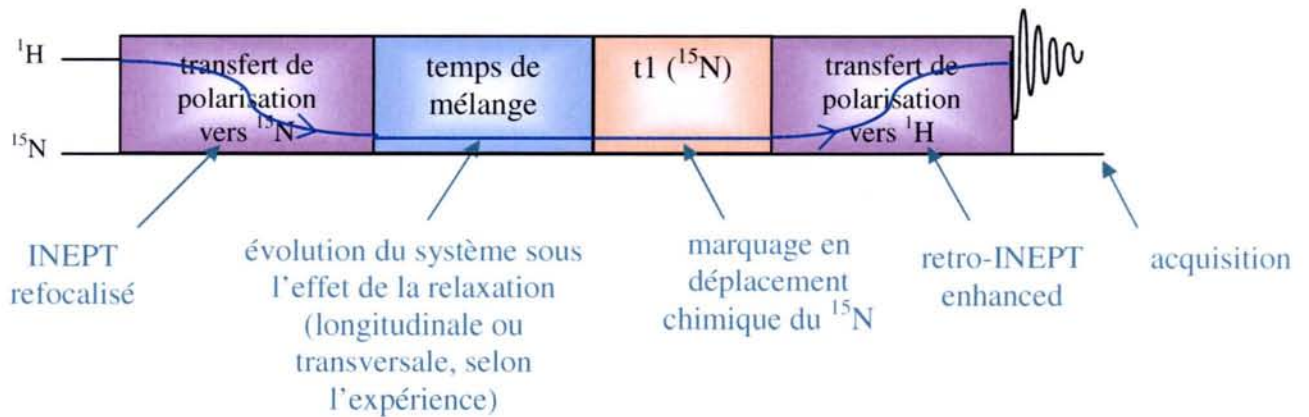
Une amélioration de la séquence *watergate* réside dans l'utilisation des techniques dites de flip-back (Guéron et Plateu, 1982; Grzesiek et Bax, 1993; Dalhuin et al., 1996) qui consistent à maintenir l'aimantation de l'eau selon  $z$  à l'aide d'impulsions sélectives. D'autres techniques existent mais nous ne les avons pas mises en œuvre (*Jump Return* (Guéron et Plateu, 1982), *WET* (Ogg et al., 1994)... le lecteur trouvera une revue des différentes techniques dans l'article de Price datant de 1999).

Enfin, la technique utilisée dans les séquences de corrélation  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  met en œuvre des impulsions de gradient de champ statique  $B_0$  (Bax et al., 1980; Barker et al., 1985; Davis et al., 1991; Vuister et al., 1991). Ces impulsions agissent comme des purges permettant d'éliminer l'aimantation de l'eau du plan de mesure, les autres permettant de sélectionner les protons directement liés à l'azote-15.

Les séquences utilisées dans ce chapitre utiliseront principalement les méthodes de marquage par le gradient de champ statique et la technique *watergate*.

## 2.2. Mesure des paramètres d'autorelaxation $T_1$ et $T_2$

La mesure des différents types de relaxation de l'azote-15 dans les protéines (autorelaxation longitudinale et autorelaxation transversale) a été largement détaillée dans la littérature (Peng et al, 1991a, 1991b; Peng et Wagner, 1992a, 1992b; Kay et al., 1989; Barbato et al., 1992). Les séquences d'impulsions sont basées sur la séquence HSQC décrite précédemment. Comme schématisée sur la figure 2.8, la séquence INEPT permet un transfert de polarisation du proton vers l'azote-15, l'aimantation est ensuite préparée dans l'état dont on désire mesurer la relaxation, un délai variable (appelé temps de mélange) permet de suivre son évolution temporelle, l'aimantation est ensuite marquée en déplacement chimique, puis remontée sur le proton grâce à un retro-INEPT. On opère donc par détection inverse de façon à avoir une sensibilité optimale. Les résonances indésirables sont éliminées à l'aide de l'arsenal classique du spectroscopiste (impulsions de gradient de champ  $B_0$ , purges, cyclage de phase).



**figure 2.8** Schématisation d'une mesure de relaxation (autorelaxation longitudinale ou transversale) dans les protéines.

Les séquences d'impulsions mises en œuvre pour les mesures d'autorelaxation de l'azote-15 sont représentées sur la figure 2.9. Les mesures permettant d'atteindre le temps de relaxation longitudinale  $T_1$  sont basées sur la méthode d'inversion-récupération (Vold et al., 1968) ; celles concernant la relaxation transversale  $T_2$  utilisent un train d'impulsions de type CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) (Carr et Purcell, 1954; Meiboom et Gill, 1958).

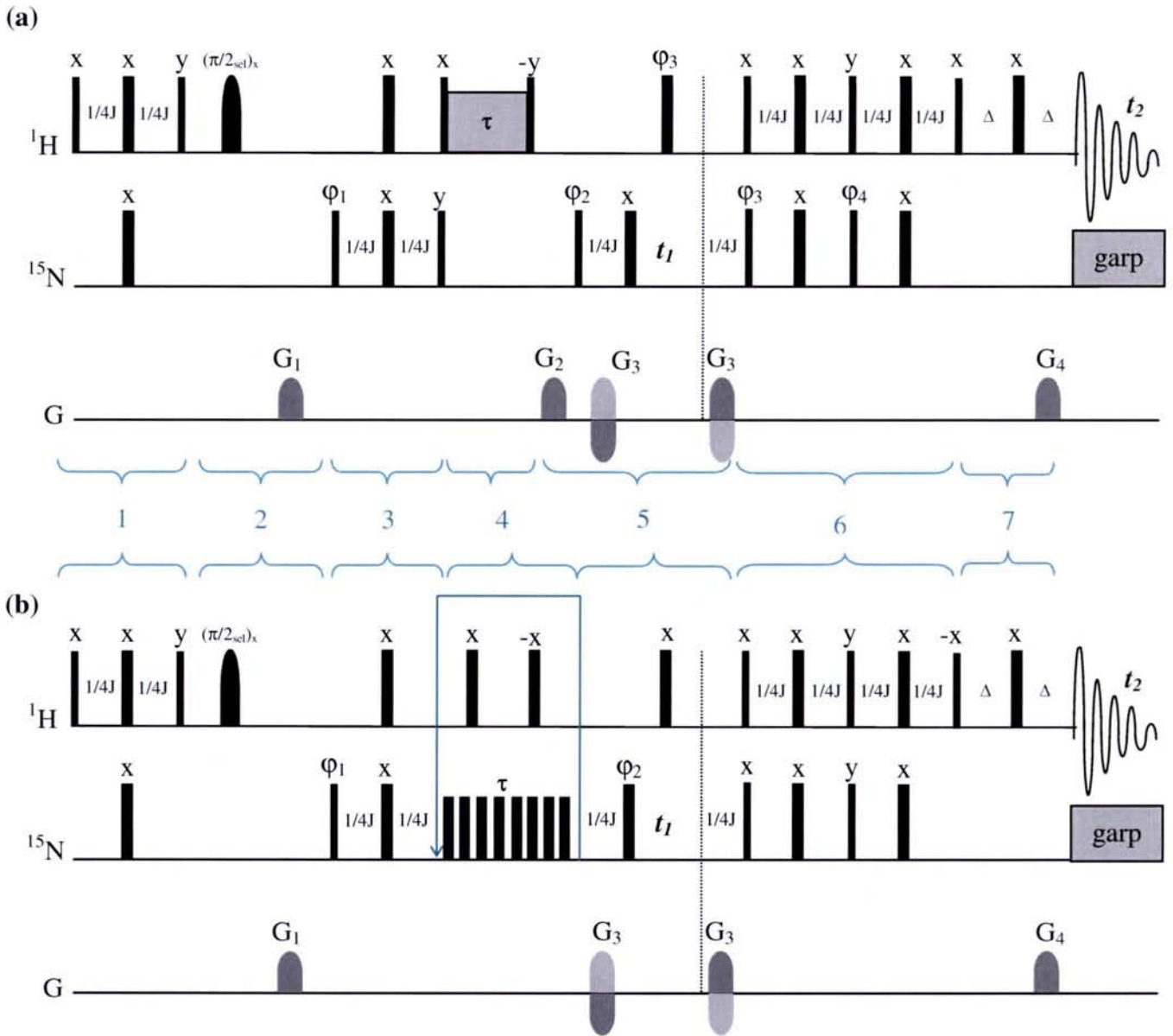


figure 2.9 Séquences permettant la mesure des temps de relaxation (a)longitudinale ( $T_1$ ) et (b)transversale ( $T_2$ ) du noyau  $^{15}\text{N}$ . Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à  $90^\circ$ , et les épais à des impulsions à  $180^\circ$ .  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique de l'azote-15 (modulation echo/antiecho (Davis et al., 1992; Boyd et al., 1992; Tolman et al., 1992)). G correspond aux impulsions de gradient de champ statique :  $G_1=50\%$ ,  $G_2=30\%$ ,  $G_3=80\%$ ,  $G_4=16.2\%$  ( $G_3/G_4=\gamma_H/2\gamma_N$ ). Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(x\ x\ x\ x\ -x\ -x\ -x\ -x)$ ,  $\phi_2=(y\ -y)$ ,  $\phi_3=(x\ x\ -x\ -x)$ ,  $\phi_4=(-y\ -y\ y\ y)$ ,  $\text{acqu}=(x\ -x\ -x\ x\ -x\ x\ x\ -x)$  (pour la mesure de  $T_1$ ), et  $\phi_1=(x\ -x)$ ,  $\phi_2=(x\ x\ y\ y\ -x\ -x\ -y\ -y)$ ,  $\text{acqu}=(x\ -x\ -x\ x)$  (pour la mesure de  $T_2$ ).  $J=91\text{Hz}$ .  $\tau$  est le temps de mélange. Le découplage est de type GARP (Shaka et al., 1985). Voir le texte pour la signification des différentes étapes 1 à 7.

Les impulsions appliquées au proton durant les temps de mélange  $\tau$  permettent de s'affranchir des effets indésirables dus à la corrélation croisée (Palmer III et al., 1991). Les étapes essentielles de l'expérience (mesure de  $T_1$  ou de  $T_2$ ) sont les suivantes :

étape 1 : création d'un doublet antiphase protonique puis d'un ordre longitudinal  $2\text{H}_z\text{N}_z$ .

étape 2 : première suppression du pic des protons non liés à l'azote-15 par défocalisation au moyen du gradient  $G_1$ .

étape 3 : transfert de polarisation de  $^1\text{H}$  vers  $^{15}\text{N}$  et retour de l'aimantation  $^{15}\text{N}$  en phase.

étape 4 : mesure de  $T_1$  : évolution de l'aimantation longitudinale  $^{15}\text{N}$  selon  $T_1^{\text{N}}$  (inversion) et défocalisation de l'aimantation du solvant au moyen du gradient  $G_2$ .

mesure de  $T_2$  : évolution de l'aimantation transversale  $^{15}\text{N}$  selon  $T_2^{\text{N}}$  (CPMG).

étape 5 : retour de l'aimantation  $^{15}\text{N}$  dans le plan de mesure (si nécessaire, c'est-à-dire dans le cas de la mesure du  $T_1$ ), marquage du déplacement chimique en  $^{15}\text{N}$  (pendant  $t_1$ ) et passage en configuration antiphase. L'impulsion protonique à  $180^\circ$  (centrée sur l'intervalle  $t_1$ ) découple le proton de l'azote-15 mais intervient également comme dans une séquence INEPT pour permettre la formation d'un doublet antiphase sur l'azote au début de l'étape 6. Les deux impulsions de gradient  $G_3$  permettent le marquage de l'aimantation de l'azote-15 ; appliquées d'une expérience à l'autre avec des polarités opposées, elles permettent une détection en mode écho-antiécho (Davis et al., 1992; Boyd et al., 1992; Tolman et al., 1992).

étape 6 : transfert des configurations antiphase  $N_yH_z$  et  $N_xH_z$  vers le proton avant refocalisation et détection ("sensitivity enhancement" (Cavanagh et al., 1991; Palmer III et al., 1991; Palmer III et al., 1994)).

étape 7 : lecture (refocalisation) des cohérences précédemment marquées par les gradients  $G_3$  et défocalisation finale des cohérences indésirables au moyen de  $G_4=2G_3(\gamma_N/\gamma_H)$  (cf annexe A2.2).

On peut faire remarquer que le cyclage de phase utilisé dans la mesure du temps de relaxation longitudinale  $T_1$  permet de transférer l'aimantation selon  $+z$  ou  $-z$  au début du temps de mélange (figure 2.10), ainsi la différence de ces deux expériences permet d'obtenir une évolution du signal en fonction de  $\tau$  qui décroît jusqu'à zéro (Freeman et Hill, 1971): on peut alors ajuster les données expérimentales avec seulement deux paramètres (au lieu de trois classiquement) :  $M_0$  et  $T_1$ ,  $M(\tau)=M_0 e^{-\tau/T_1}$ .

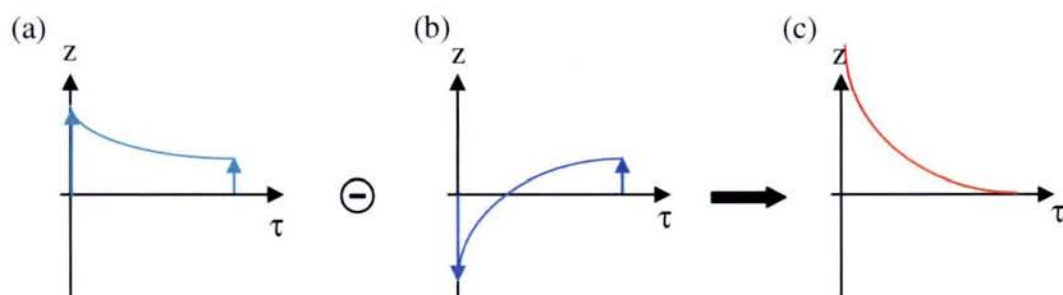


figure 2.10 Schéma de l'évolution de l'aimantation au cours de la mesure du temps de relaxation longitudinale  $T_1$ . (a) L'aimantation est selon  $+z$  ( $-\gamma_H N_z$ ) et tend vers la valeur d'équilibre ( $\gamma_N N_z$ ). (b) L'aimantation est selon  $-z$  ( $\gamma_H N_z$ ) et tend vers la valeur d'équilibre ( $\gamma_N N_z$ ). (c) La différence de ces deux expériences conduit à une évolution de l'aimantation de la forme  $M(\tau)=M_0 e^{-\tau/T_1}$  qui tend vers zéro.

Pour chaque mesure,  $T_1$  ou  $T_2$ , il est nécessaire d'enregistrer une série d'expériences bidimensionnelles avec des temps de mélange  $\tau$  variables. L'évolution mono-exponentielle des intensités en fonction de ces délais permet d'extraire les vitesses de relaxation longitudinale  $R_1=1/T_1$  ou transversale  $R_2=1/T_2$ .

### 2.3. Mesure de l'effet Overhauser nucléaire

#### 2.3.1. Mesure classique du facteur eOn

Comme rappelé dans le chapitre 1, dans le cas de systèmes à plusieurs spins, d'autres phénomènes peuvent intervenir : il s'agit de la *relaxation croisée* (la vitesse de relaxation associée est notée  $\sigma$ ). Ce terme traduit l'influence des autres noyaux sur le noyau étudié : toute modification de l'aimantation de A entraîne une modification de l'aimantation de X. Cet effet est connu sous le nom d'*effet Overhauser nucléaire* (eOn) (voir par exemple l'ouvrage de Neuhaus et Williamson, 1989), il est le reflet des couplages dipolaires qui ne sont pas visibles directement en RMN liquide en raison de l'annulation de leur moyenne temporelle du fait de la réorientation rapide des molécules (voir chap.1). Le retour à l'équilibre de l'aimantation des spins couplés par cet effet a alors lieu de façon multiexponentielle, ceci est décrit analytiquement par les équations différentielles de *Solomon* (Solomon, 1955). Dans le cas d'un système de deux spins notés A et X:

$$\begin{cases} \frac{dI_z^A}{dt} = -R_1^A (I_z^A - I_{eq}^A) - \sigma (I_z^X - I_{eq}^X) \\ \frac{dI_z^X}{dt} = -R_1^X (I_z^X - I_{eq}^X) - \sigma (I_z^A - I_{eq}^A) \end{cases} \quad \text{(équation 2.1)}$$

avec  $I_{eq}$  valeur de l'aimantation à l'équilibre

$R_1$  vitesse de relaxation longitudinale ( $R_1 = \frac{1}{T_1}$ )

$\sigma$  vitesse de relaxation croisée entre A et X

Les aimantations des deux spins, ici l'azote  $^{15}\text{N}$  et le proton  $^1\text{H}^{\text{N}}$  qui lui est directement lié, interagissent donc par l'intermédiaire de leurs couplages dipolaires. Les protons  $^1\text{H}^{\text{N}}$  peuvent être saturés (c'est-à-dire  $H_z^{\text{N}}(t)=0, \forall t$ ), on observe alors un transfert de polarisation du proton vers l'azote-15, celui-ci étant fonction de la vitesse de relaxation croisée  $\sigma$ . L'efficacité de ce transfert peut être mesuré en réalisant deux expériences (schématisées sur la figure 2.11) : l'une consiste à mesurer l'intensité des pics sans saturation des protons et sert de

référence, l'autre permet de mesurer leur intensité sous l'effet d'une saturation des protons. Dans la pratique et pour les biomolécules, celle-ci est réalisée grâce à une succession d'impulsions à 120°, séparées par des temps morts (Kay et al., 1989; Barbato et al., 1992). Cette saturation permet d'éviter les problèmes d'échauffement de l'échantillon (Markley et al., 1971).

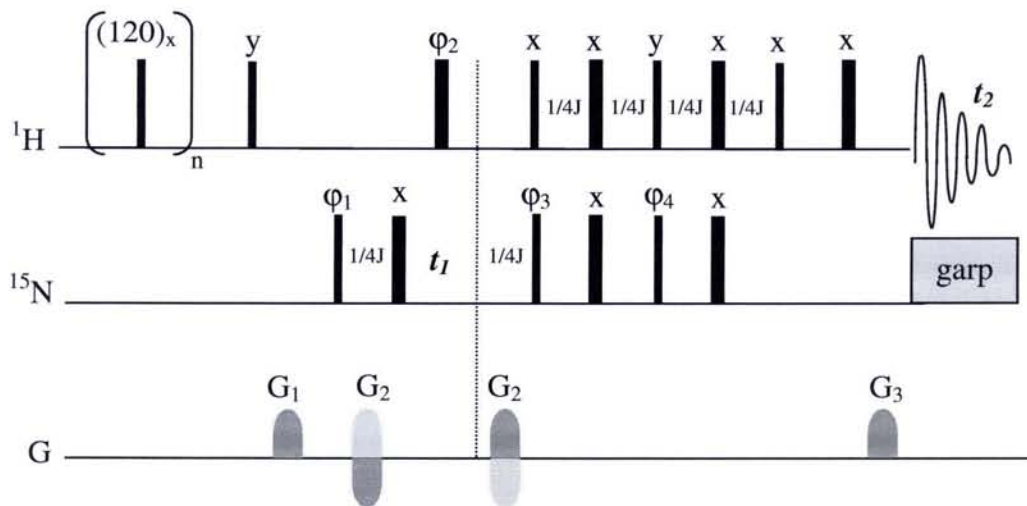
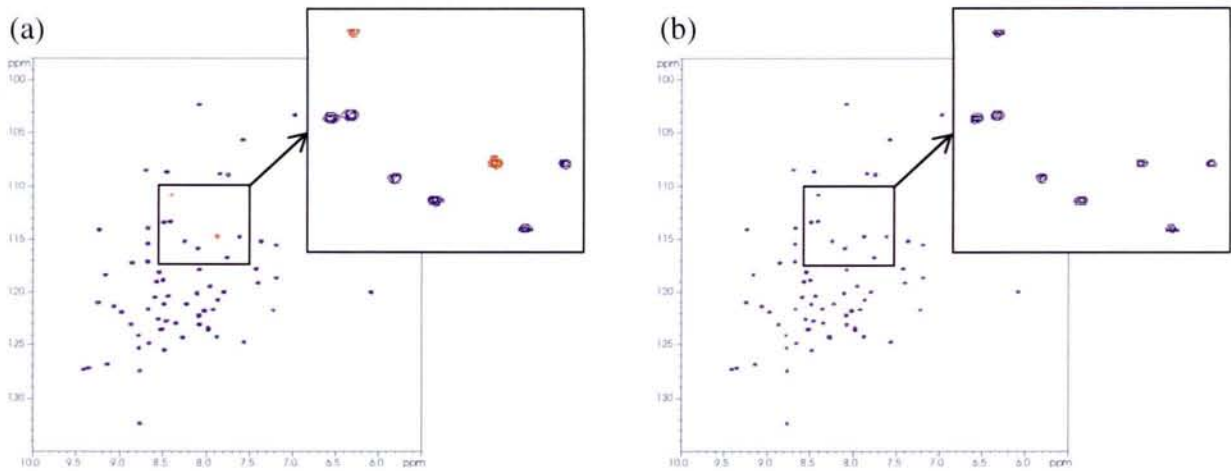


figure 2.11 Séquences de mesure des vitesses de relaxation croisée  $\sigma_{NH}$ . Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à 90°, et les épais à des impulsions à 180°.  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique de l'azote-15 (modulation echo/antiecho (Davis et al., 1992; Boyd et al., 1992; Tolman et al., 1992)). G correspond aux impulsions de gradient de champ statique :  $G_1=50\%$ ,  $G_2=80\%$ ,  $G_3=16.2\%$ . Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(y -y)$ ,  $\phi_2=(x x -x -x)$ ,  $\phi_3=(x x -x -x)$ ,  $\phi_4=(-y -y y y)$ ,  $acqu=(x -x -x x -x x -x)$ .  $J=91\text{Hz}$ . Le découplage est de type GARP (Shaka et al., 1985).

L'effet Overhauser est quantifié par la quantité NOE, qui, pour chaque résidu de la protéine, est calculée avec l'équation :

$$\text{NOE} = \frac{I}{I_0} \quad \text{avec} \quad \begin{array}{l} I_0 \text{ intensité d'une tache de corrélation dans le spectre de référence} \\ I \text{ intensité de cette tache pour une expérience avec saturation} \end{array}$$

(équation 2.2) (voir la figure 2.12)



**figure 2.12** Expériences de eOn hétéronucléaire avec (a) et sans (b) saturation des protons. Les pics positifs sont en bleu et les négatifs en rouge.

Dans le cas des systèmes  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ , le facteur NOE est inférieur à 1, négatif, ou même nul (voir la figure 2.12) en raison du rapport gyromagnétique négatif de l'azote-15, et de la valeur du rapport  $\sigma/R_1^N$  (équation 2.3). Lors de la mesure, le proton est saturé ( $I_z^H(t)=0 \forall t$ ), et si l'on considère qu'un état stationnaire est atteint ( $\frac{dI_z^N}{dt}=0$ ), les équations de Solomon (équation 2.1) pour le noyau  $^{15}\text{N}$  deviennent simplement :

$$0 = -R_1^N (I_{\text{stat}}^N - I_{\text{eq}}^N) + \sigma I_{\text{eq}}^H \Leftrightarrow \frac{I_{\text{stat}}^N}{I_{\text{eq}}^N} = 1 + \frac{\sigma}{R_1^N} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} = \text{NOE} < 1 \quad (\text{équation 2.3})$$

On notera que cette expérience est nettement moins sensible que celles utilisées pour la mesure des temps d'autorelaxation  $T_1$  et  $T_2$ , car le transfert de polarisation initial (du proton vers l'azote-15), réalisé par le bloc INEPT, ne peut évidemment pas être mis en oeuvre.

### 2.3.2. Une tentative de mesure de la relaxation croisée via la courbe d'édification de l'eOn

Du fait de la saturation non sélective des protons, la contribution du proton amide à la relaxation croisée ne peut pas être isolée de celle des autres protons dans l'expérience classique. En effet la structure de la protéine nous montre la présence de nombreux protons autour d'un azote donné (en plus du proton amide): les protons  $^1\text{H}^\alpha$  portés par le carbone voisin, et également ceux des chaînes latérales R. La structure secondaire (hélices  $\alpha$ , feuilletts

$\beta...$ ) met également en contact un noyau N donné avec des protons de résidus assez éloignés. Ainsi, la vitesse de relaxation croisée, que nous qualifierons de globale, peut s'écrire :

$$\sigma = \sigma\{N-H^N\} + \sum_i^{\text{autre}} \sigma\{N-H_i^{\text{autre}}\}$$

(équation 2.4)

Différentes composantes entrent donc en jeu dans la valeur de la relaxation croisée, et la mesure classique ne permet pas de dire quelle est leur part respective.

Par exemple, l'ubiquitine, protéine comptant 76 acides aminés soit 1231 atomes, contient près de 630 protons. En moyenne, 24 protons se trouvent à moins de 5Å d'un noyau azote donné.

Notre objectif initial était de séparer les différentes composantes (i.e. pour chaque proton) de la relaxation croisée entre les protons et un azote donné dans les protéines. Le laboratoire possède une expertise dans ce domaine mais concernant les molécules organiques (Mutzenhardt et al., 1998). Nous désirions étendre et adapter la méthodologie aux protéines. Pour ceci, nous avons utilisé une méthode impulsionnelle qui consiste à perturber le système puis à le laisser évoluer pendant une durée appelée temps de mélange avant de l'enregistrer (cf mesure des paramètres de relaxation propre  $T_1$  et  $T_2$ , §2.2). L'aimantation est ensuite marquée en déplacement chimique selon l'azote-15, puis est convertie en un état observable protonique afin d'obtenir des cartes bidimensionnelles. L'évolution de l'aimantation suivant la valeur du temps de mélange conduit à une courbe d'édification (*build-up* en anglais). La figure 2.13 présente les blocs (temps de mélange à acquisition) que nous avons utilisés dans toutes nos expériences : ils correspondent à l'observation d'un phénomène de relaxation évoluant durant le temps de mélange et qui est converti en une aimantation observable en proton (mesure inverse), ces blocs sont adaptés à l'observation d'une protéine marquée en azote-15.



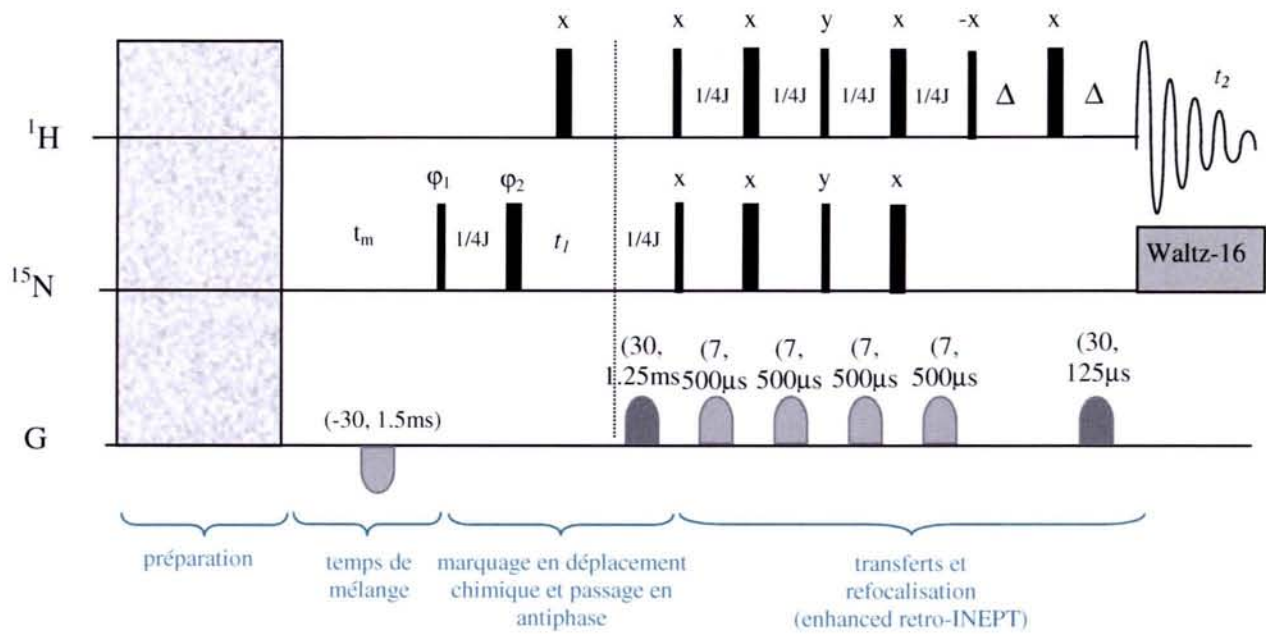


figure 2.13 Schéma général des séquences utilisées dans la mesure de l'eOn de l'ubiquitine. Les traits fins représentent des impulsions à  $90^\circ$  et les traits épais représentent des impulsions à  $180^\circ$ . Les annotations sur les impulsions de gradient signifient : (amplitude, durée d'impulsion).  $J=91\text{Hz}$ ,  $\Delta=500\mu\text{s}$ . Le cyclage de phase est tel que :  $\phi_1=(y,-y)$ ,  $\phi_2=(x,x,y,y,-x,-x,-y,-y)$ , et  $\text{acqu}=(x,-x,-x,x)$ . Les gradients représentés en gris clair sont utilisés ici pour détruire les aimantations transversales non souhaitées, les autres permettent de sélectionner les chemins de cohérence (rapport des longueurs d'impulsions correspondant au rapport des rapports gyromagnétiques). L'amplitude de ces derniers permet de sélectionner uniquement l'aimantation des protons directement liés à l'azote-15.

Nous avons utilisé trois préparations différentes : 1.) inversion de tous les protons de la protéine, 2.) inversion sélective des protons amides ( $H^N$ ), 3.) inversion sélective des protons non amides ( $H^{\text{autre}}$ ). Pour les inversions sélectives, on utilise des filtres X de type BIRD (*Bilinear Rotation Decoupling*) (Garbow et al., 1982; Bax, 1983; Furo et al., 1995; Vincent et al., 1996; Mutzenhardt et Bodenhausen, 1998): ces filtres, schématisés sur la figure 2.14, sont basés sur la valeur de la constante de couplage  $^1J^{^1H^N-^{15}N}$  (91Hz), ils permettent de différencier les protons amides  $^1H^N$  de la protéine (c'est-à-dire ceux directement liés à un noyau  $^{15}N$ ) des autres protons  $^1H^{\text{autre}}$ .

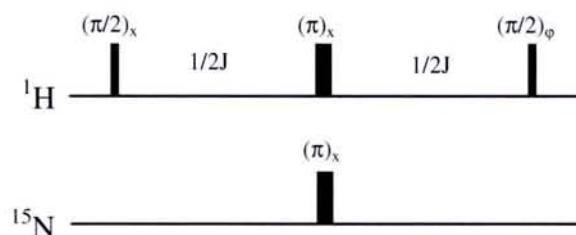


figure 2.14 Séquence BIRD (*Bilinear Rotation Decoupling*).

La figure 2.15 détaille cet élément de séquence en terme d'opérateurs et permet de visualiser leur évolution. La première impulsion à 90° sur le noyau  $^1\text{H}$  amène l'aimantation dans le plan de mesure. Celle-ci évolue ensuite selon la constante de couplage  $J_{\text{NH}}$  pendant un temps  $1/(2J)$  : on obtient ainsi un doublet antiphase pour les noyaux  $^1\text{H}^{\text{N}}$  représenté par l'opérateur  $2I_x^{\text{H}^{\text{N}}} I_z^{\text{N}}$ . L'impulsion centrale à 180° permet de refocaliser les effets de déplacement chimique. L'aimantation correspondant aux protons amides est refocalisée selon l'axe y, alors que celle correspondant aux protons non amides est refocalisée selon l'axe -y. La dernière impulsion à 90° sur le proton permet ainsi d'inverser l'aimantation des protons amides, et de rétablir celle des protons non amides selon +z (figure 2.15,  $\varphi=x$ ).

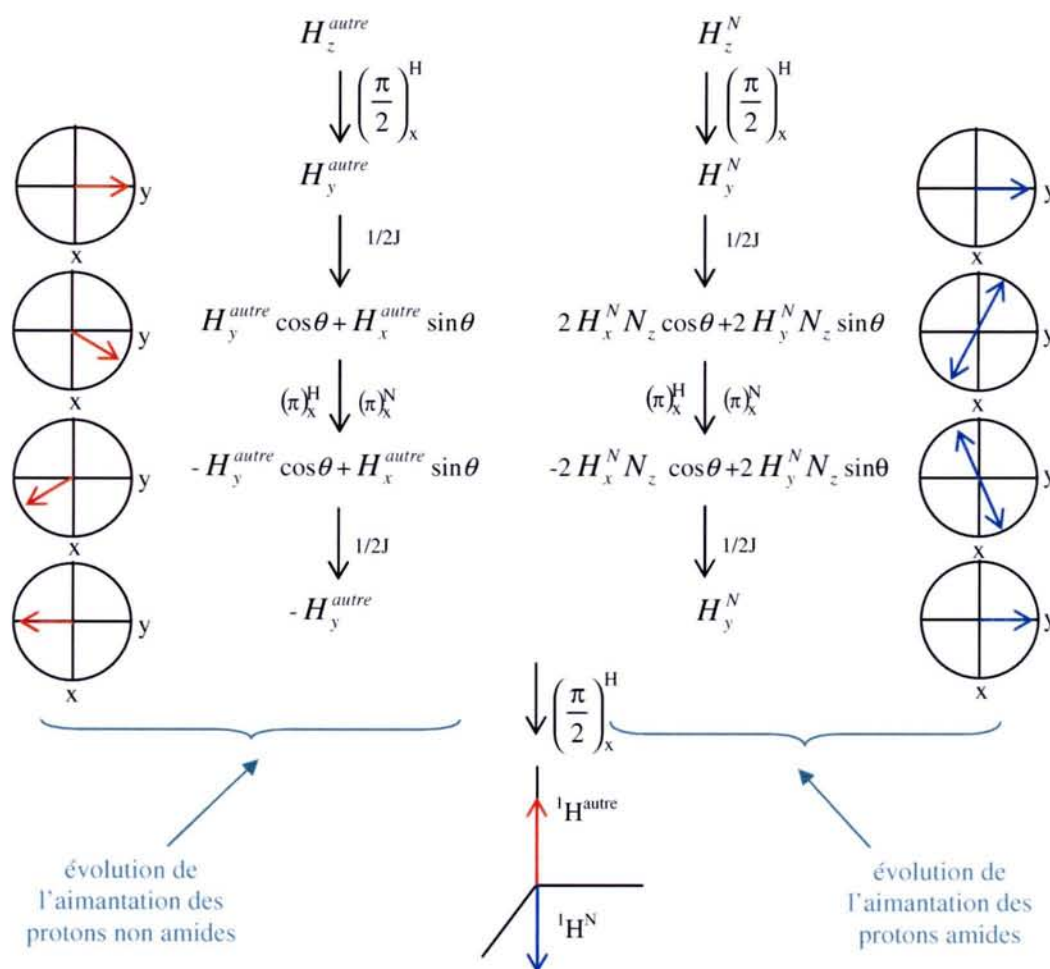
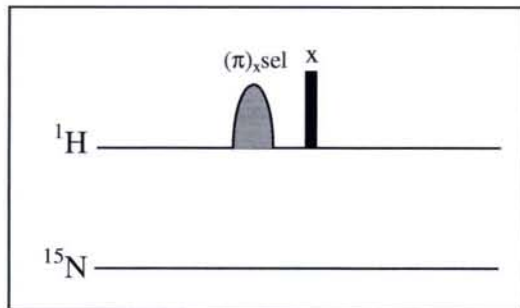


figure 2.15 Evolution de l'aimantation des protons amides (couplés par  $^1J$  à l'azote-15) et non amides (non couplé à l'azote-15) lors de la séquence BIRD.

Un simple changement de la phase  $\varphi$  permet de réaliser l'opération inverse, c'est-à-dire d'inverser l'aimantation des protons non amides, et de conserver celle des protons amides selon +z. Il est à noter que pour chacun de ces filtres, nous avons utilisé une sorte de

basculément-retour ("flip-back") appliquée sur la résonance de l'eau au moyen d'une impulsion sélective. Celle-ci est ajustée pour que l'angle de basculément total de l'aimantation de l'eau soit de 0 ou 360°. Le but recherché est de maintenir l'aimantation des protons de l'eau à sa position d'équilibre, ceci ayant deux effets : i) une meilleure élimination du signal de l'eau dans le spectre, ii) une minimisation des phénomènes de relaxation eau-soluté.

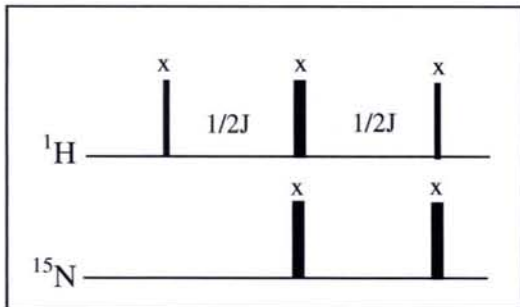
La figure 2.16 présente une comparaison des différentes préparations utilisées.



Inversion de tous les protons

$$\begin{cases} H_z^N(0) = -H_{eq}^N \\ H_z^{autre}(0) = -H_{eq}^{autre} \\ N_z(0) = N_{eq} \end{cases}$$

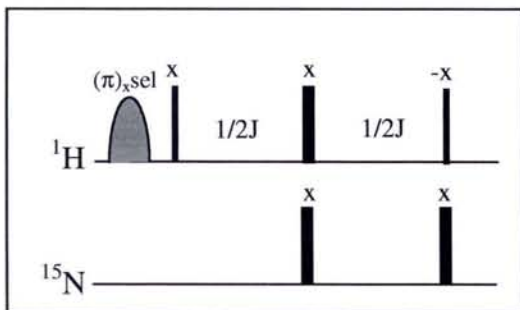
*Etat de l'aimantation de l'eau :*  
 $(180)_{xsel} + (180)_x \equiv (360)_x$   
 $\Rightarrow$  aimantation selon z



Inversion sélective des protons amides

$$\begin{cases} H_z^N(0) = -H_{eq}^N \\ H_z^{autre}(0) = H_{eq}^{autre} \\ N_z(0) = N_{eq} \end{cases}$$

*Etat de l'aimantation de l'eau :*  
 $(90)_x + (180)_x + (90)_x \equiv (360)_x$   
 $\Rightarrow$  aimantation selon z



Inversion sélective des protons non amides

$$\begin{cases} H_z^N(0) = H_{eq}^N \\ H_z^{autre}(0) = -H_{eq}^{autre} \\ N_z(0) = N_{eq} \end{cases}$$

*Etat de l'aimantation de l'eau :*  
 $(180)_{xsel} + (90)_x + (180)_x + (90)_{-x} \equiv (360)_x$   
 $\Rightarrow$  aimantation selon z

figure 2.16 préparations utilisées dans la mesure des eOns de l'ubiquitine : présentation des conditions initiales obtenues ( $\tau = 0s$ ) pour chaque aimantation du système (l'indice  $_{eq}$  désigne les aimantations à l'équilibre).

La résolution analytique des équations de Solomon pour un système à deux spins (équation 2.1) nous permet de simuler le comportement de l'aimantation durant de telles expériences (voir annexe 2.1). La figure 2.17 présente un exemple typique. Il s'agit d'un système à deux spins N et H pour lequel on a inversé l'aimantation du proton : l'aimantation de ce dernier évolue vers son état d'équilibre selon le terme de relaxation propre  $R_1^H$ , l'aimantation de l'azote subit une perte d'intensité en raison du terme de relaxation croisée  $\sigma_{NH}$  puis revient vers son état d'équilibre selon le terme de relaxation propre  $R_1^N$ .

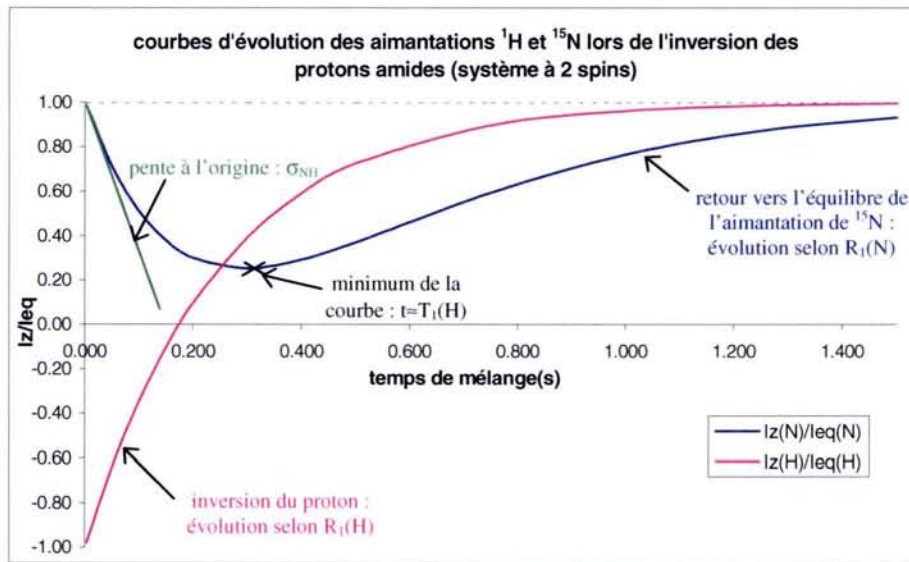


figure 2.17 Simulation des courbes attendues après inversion du proton amide pour un système NH. Paramètres utilisés dans la simulation :  $R_1^N = 3s^{-1}$ ,  $R_1^H = 4s^{-1}$ ,  $\sigma_{NH} = 0.3s^{-1}$  (valeurs typiques pour une protéine moyenne à  $B_0 = 9.4T$ ).

Dans notre cas, le système est composé de trois spins N,  $H^N$  et  $H^{autre}$ . En effet, l'ensemble des protons voisins d'un noyau azote-15 donné (autres que le proton amide) a été modélisé par un proton fictif unique  $H^{autre}$ . Le retour à l'équilibre des aimantations de ce système est gouverné par les équations de Solomon généralisées (Solomon, 1955) :

$$\begin{cases} \frac{dN_z}{dt} = -R_1^N (N_z(t) - N_{eq}) - \sigma_{N-H^N} (H_z^N(t) - H_{eq}^N) - \sigma_{N-H^{autre}} (H_z^{autre}(t) - H_{eq}^{autre}) \\ \frac{dH_z^N}{dt} = -\sigma_{N-H^N} (N_z(t) - N_{eq}) - R_1^{H^N} (H_z^N(t) - H_{eq}^N) - \sigma_{H^N-H^{autre}} (H_z^{autre}(t) - H_{eq}^{autre}) \\ \frac{dH_z^{autre}}{dt} = -\sigma_{N-H^{autre}} (N_z(t) - N_{eq}) - \sigma_{H^N-H^{autre}} (H_z^N(t) - H_{eq}^N) - R_1^{H^{autre}} (H_z^{autre}(t) - H_{eq}^{autre}) \end{cases} \quad (\text{équation 2.5})$$

avec  $I_{eq}$  la valeur de l'aimantation à l'équilibre,  $R_1$  la vitesse de relaxation longitudinale ( $R_1 = \frac{1}{T_1}$ ), et  $\sigma$  la vitesse de relaxation croisée.

Les courbes d'édification de l'aimantation de l'azote-15 peuvent être exploitées en première approximation par l'étude de leur comportement initial. Ceci permettrait de limiter le nombre d'expériences bidimensionnelles à réaliser. En considérant un temps  $t$  ( $\tau$ ) suffisamment petit,

on peut développer :  $I_z^N(t) = I_z^N(t=0) + t \left( \frac{dI_z^N}{dt} \right)_{t \rightarrow 0}$  (développement limité au premier ordre)  
(équation 2.6)

En reprenant l'exemple précédent, c'est-à-dire en inversant le proton dans un système N-H, l'état initial des aimantations est :

$$\begin{cases} I_z^N(0) = I_{eq}^N \\ I_z^H(0) = -I_{eq}^H \end{cases} \quad \text{soit} \quad \left( \frac{dI_z^N}{dt} \right)_{t=0} = -R_1^N (I_{eq}^N - I_{eq}^N) - \sigma (-I_{eq}^H - I_{eq}^H) = 2\sigma I_{eq}^H$$

ainsi  $\frac{I_z^N(t)}{I_{eq}^N} = 1 + 2\sigma \frac{\gamma_H}{\gamma_N} t$  (équation 2.7) ceci avec  $\frac{\gamma_H}{\gamma_N} = -9.87$  et pour un temps  $t$  court.

On constate donc que la mesure de la pente à l'origine des courbes permet de remonter à la valeur de la vitesse de relaxation croisée  $\sigma_{NH}$ .

Nous avons dans un premier temps réalisé les expériences correspondant aux trois préparations possibles de manière unidimensionnelle afin de suivre l'évolution globale de l'ensemble des protons dans un échantillon d'ubiquitine. Pour ce faire, nous avons utilisé les séquences précédentes en version unidimensionnelles (ceci correspond à avoir un  $t_1$  constant égal à 0). Les courbes obtenues sont présentées sur la figure 2.18.

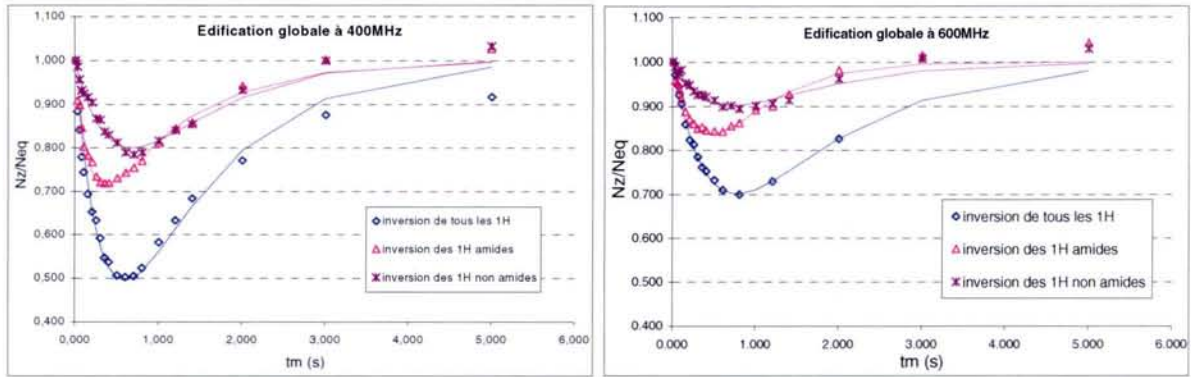


figure 2.18 Résultat global à 400 et à 600MHz. Le nombre d'accumulations est de 128 à 400MHz et de 96 à 600MHz, le temps d'attente étant de 5s. 21 temps de mélange ont été utilisés de 2ms à 5s.

Nous avons pu vérifier que la somme des courbes correspondant aux inversions sélectives (protons amides et autres, en rose et violet sur la figure 2.18) conduit à la courbe expérimentale correspondant à l'inversion non sélective (en bleu sur la figure 2.18). Ceci démontre i) la validité des mesures sélectives, ii) l'effet négligeable de phénomènes parasites durant les filtres (relaxation, imperfections des impulsions...)

En utilisant la démarche développée précédemment, nous avons dans un premier temps supposé que les pentes à l'origine des trois courbes correspondaient à  $2(\sigma_{N-H^N} + \sigma_{N-H^{autre}})(\gamma_H/\gamma_N)$  (pour l'inversion globale),  $2\sigma_{N-H^N}(\gamma_H/\gamma_N)$  (pour l'inversion sélective des  $^1H^N$ ), et  $2\sigma_{N-H^{autre}}(\gamma_H/\gamma_N)$  (pour l'inversion sélective des  $^1H^{autre}$ ) (développement limité au premier ordre, voir (équation 2.7)). On remarque, et ceci est déjà visible sur les courbes de la figure 2.18, que la somme des pentes initiales des courbes sélectives ne correspond pas à  $2(\sigma_{N-H^N} + \sigma_{N-H^{autre}})(\gamma_H/\gamma_N)$ , pente de la courbe non sélective (les pentes initiales conduisent à une valeur de la relaxation croisée  $\sigma_{N-H^{autre}}$  trop élevées qui ne peuvent correspondre à un cas réel). Ainsi, l'exploitation de l'ensemble de ces courbes ne peut pas être réalisée au premier ordre. Néanmoins, la pente initiale obtenue pour la courbe correspondant à l'inversion de tous les protons conduit à une valeur similaire à celle obtenue par la méthode classique (mesure de l'état quasi-stationnaire).

Nous nous sommes donc intéressés aux phénomènes de diffusion de spin, i.e. au terme de relaxation croisée proton-proton, que l'on suppose jouer ici un rôle important (figure 2.19). En effet  $\sigma_{H^N-H^{autre}}$  a une valeur assez élevée et est de signe négatif en raison de la densité spectrale à fréquence nulle  $\tilde{J}(0)$  qui intervient dans son expression mathématique (voir chap 1).

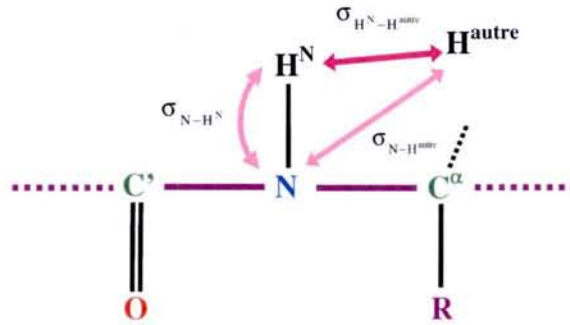


figure 2.19 Visualisation des différents termes de relaxation croisée dans la protéine.

L'évaluation théorique des vitesses de relaxation nous montre que l'on peut, dans ce système, négliger la vitesse de relaxation croisée  $\sigma_{N-H^{autre}}$  (3% de la relaxation croisée globale), les équations de Solomon pour notre système peuvent donc en première approximation être réduites à :

$$\begin{cases} \frac{dN_z}{dt} = -R_1^N (N_z(t) - N_{eq}) - \sigma_{N-H^N} (H_z^N(t) - H_{eq}^N) \\ \frac{dH_z^N}{dt} = -\sigma_{N-H^N} (N_z(t) - N_{eq}) - R_1^{H^N} (H_z^N(t) - H_{eq}^N) - \sigma_{H^N-H^{autre}} (H_z^{autre}(t) - H_{eq}^{autre}) \\ \frac{dH_z^{autre}}{dt} = -\sigma_{H^N-H^{autre}} (H_z^N(t) - H_{eq}^N) - R_1^{H^{autre}} (H_z^{autre}(t) - H_{eq}^{autre}) \end{cases} \quad (\text{équation 2.8})$$

Les simulations utilisant la résolution analytique de ces équations montrent également l'importance du terme de relaxation croisée proton-proton  $\sigma_{H^N-H^{autre}}$  (figure 2.20).

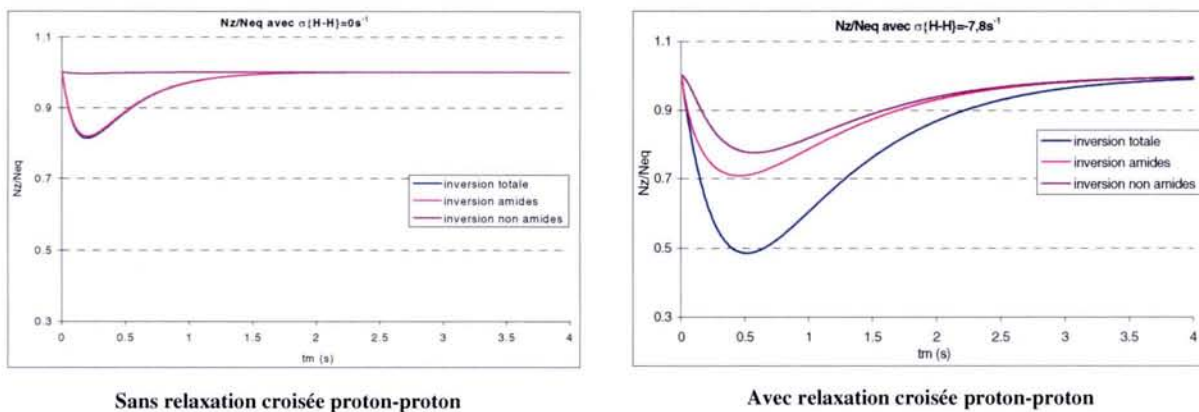


figure 2.20 Simulation des courbes d'édification: importance du paramètre  $\sigma_{H^N-H^{autre}}$ . Elles ont été réalisées en utilisant les paramètres de relaxation suivants :  $R_1^N = 2.8s^{-1}$ ,  $R_1^{H^N} = 8.3s^{-1}$ ,  $R_1^{H^{autre}} = 10s^{-1}$ ,  $\sigma_{N-H^N} = 0.13s^{-1}$ ,  $\sigma_{N-H^{autre}} = 0s^{-1}$ , et  $\sigma_{H^N-H^{autre}} = 0$  ou  $-7.8s^{-1}$  (valeurs typiques à 9.4T pour une petite protéine telle que l'ubiquitine).

Nous avons ainsi exploité nos résultats à 400 et à 600MHz en incluant la diffusion de spin, et ceci selon différents schémas. Nous avons tout d'abord ajusté les paramètres des équations de Solomon (équation 2.8) en utilisant la totalité des courbes d'édification obtenues dans les expériences unidimensionnelles (trois courbes expérimentales pour chaque valeur du champ magnétique). Pour cette résolution, nous avons fixé les valeurs de  $R_1^N$  mesurées par ailleurs, et réalisé un programme de simulation (logiciel Matlab (Hanselman et Littlefield, 2000)). Les résultats figurent dans le tableau 2.1.

	400MHz	600MHz
$R_1^N$ (s <sup>-1</sup> ) *	2.8	2.0
$R_1^{H^N}$ (s <sup>-1</sup> ) ‡	5.2	
$R_1^{H^{autre}}$ (s <sup>-1</sup> ) ‡	3.8	
$\sigma_{N-H^N}$ (s <sup>-1</sup> )	0.13	0.06
$\sigma_{N-H^{autre}}$ (s <sup>-1</sup> )	0.01	0.00
$\sigma_{H^N-H^{autre}}$ (s <sup>-1</sup> ) ‡	-3.4	

tableau 2.1 résultats de l'ajustement des courbes globales d'édification : \* paramètres mesurés par ailleurs, ‡ paramètres considérés comme invariants par rapport à la fréquence de mesure.

L'application de cette stratégie de mesure en utilisant des cartes bidimensionnelles (pour obtenir une mesure résidu par résidu) est rédhibitoire en temps d'expérimentation, sauf si l'on se limite à l'étude du comportement initial. On s'est donc intéressé à optimiser le traitement du comportement initial des courbes d'édification. Un développement limité, ici au deuxième ordre, permet ainsi de mettre en évidence l'importance des termes de relaxation du proton, l'expression analytique (équation 2.7) se transforme en :

$$N_z(t) = N_z(0) + t \left( \frac{dN_z}{dt} \right)_{t=0} + \frac{t^2}{2} \left( \frac{d^2 N_z}{dt^2} \right)_{t=0} \quad \text{donc :}$$

$$\frac{N_z(t)}{N_{eq}} = 1 - t \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \left[ \sigma_{N-H^N} \left( \frac{H_z^N(0)}{H_{eq}^N} - 1 \right) \right] + \frac{t^2}{2} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \left[ \sigma_{N-H^N} \left[ (R_1^N + R_1^{H^N}) \left( \frac{H_z^N(0)}{H_{eq}^N} - 1 \right) + \sigma_{H^N-H^{autre}} \left( \frac{H_z^{autre}(0)}{H_{eq}^{autre}} - 1 \right) \right] \right]$$

(équation 2.9)



Ce développement peut être linéarisé. En désignant les inconnues par  $x_1 = \sigma_{N-H^N}$ , par  $x_2 = \sigma_{N-H^N} (R_1^N + R_1^{H^N})$  et par  $x_3 = \sigma_{N-H^N} \sigma_{H^N-H^{autre}}$ , nous pouvons, à partir de l'équation 2.9, écrire les équations matricielles suivantes :

$$\begin{aligned}
 & a_{i1}x_1 + a_{i2}x_2 + a_{i3}x_3 = y_i \quad \text{avec} \\
 & \text{(équation 2.10)} \quad \left\{ \begin{array}{l} a_{i1} = -\frac{\gamma_H}{\gamma_N} \left( \frac{H_z^N(0)}{H_{eq}^N} - 1 \right) t \\ a_{i2} = -\frac{1}{2} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \left( \frac{H_z^N(0)}{H_{eq}^N} - 1 \right) t^2 \\ a_{i3} = -\frac{1}{2} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \left( \frac{H_z^{autre}(0)}{H_{eq}^{autre}} - 1 \right) t^2 \\ y_i = \frac{N_z(t)}{N_{eq}} - 1 \end{array} \right. \left. \begin{array}{l} \text{matrice } A(m,3) \\ \text{matrice } Y(m,1) \\ \text{données expérimentales} \end{array} \right.
 \end{aligned}$$

Ainsi :  $A X = Y \Leftrightarrow A^t A X = A^t Y$

Soit  $X = (A^t A)^{-1} A^t A X$

$= (A^t A)^{-1} A^t Y$  le système surdéterminé est ainsi résolu par la méthode des

(équation 2.11) moindres carrés linéaires.

On applique ce traitement jusqu'à une valeur du temps de mélange (t) égale à 100ms pour respecter l'hypothèse du comportement initial, ceci correspond à ne retenir que les cinq premiers points de chaque courbe, les résultats figurent dans le tableau ci-dessous.

	400MHz	600MHz
$R_1^N (s^{-1})^*$	2.8	2.0
$R_1^{H^N} (s^{-1})^{\ddagger}$	5.3	
$\sigma_{N-H^N} (s^{-1})$	0.17	0.06
$\sigma_{H^N-H^{autre}} (s^{-1})^{\ddagger}$	-3.4	

**tableau 2.2** Résultat de l'analyse du comportement initial des courbes globales d'édification (\* paramètres mesurés par ailleurs, ‡ paramètres considérés comme invariants par rapport à la fréquence de mesure). On retrouve des valeurs similaires à celles résultant d'un traitement complet des courbes (cf tableau 2.1).

L'exploitation du comportement initial est validée par le fait que nous retrouvons les mêmes résultats que ceux obtenus en considérant l'ensemble des courbes. On peut donc envisager d'appliquer ce traitement à des expériences bidimensionnelles pour obtenir les paramètres de relaxation résidu par résidu.

Tous ces traitements montrent que la relaxation du proton apparaît comme un élément très important dans les courbes d'édification de l'aimantation de  $^{15}N$  : elle intervient non

seulement par le terme de relaxation croisée entre protons  $\sigma_{H^N-H^{autre}}$ , mais aussi par le terme de relaxation propre  $R_1^{H^N}$ . Les traitements utilisant un développement limité au premier ordre (pente à l'origine) et ceux utilisant un développement limité au deuxième ordre donnent des résultats tout à fait comparables à la mesure classique en ce qui concerne l'obtention du paramètre de relaxation croisée  $\sigma_{N-H^N}$ . Cependant, le traitement au deuxième ordre permet d'accéder à des paramètres de relaxation supplémentaires (notamment protoniques).

Ces divers traitements nous ont permis d'obtenir des paramètres de relaxation moyens sur l'ensemble des résidus de l'ubiquitine. Néanmoins, la précision sur les termes de relaxation protonique n'est pas satisfaisante si l'on ne considère que le comportement à l'origine. Ceci provient certainement du manque de précision des expériences à des faibles temps de mélange. Le traitement complet est évidemment très fiable et fournit des résultats concrets.

Nous avons dans un deuxième temps construit les courbes d'édification pour chaque résidu à 600MHz en réalisant ces expériences de manière bidimensionnelle. Les mesures ont été enregistrées pour 5 temps de mélange (2ms, 25ms, 50ms, 75ms et 100ms) et ceci à la fois pour l'inversion de tous les protons et pour l'inversion sélective des protons amides; l'expérience d'inversion sélective des protons non amides n'a été réalisée qu'à 3 temps de mélange (2ms, 50ms et 100ms). Pour chaque point, nous avons réalisé 32 accumulations avec un temps d'attente de 5s, et un nombre d'incrémentes en  $t_1$  égal à 320. Chaque expérience durait ainsi environ 16h. Les cartes obtenues manquent beaucoup de sensibilité, notamment celles concernant l'inversion sélective des protons non amides et nous n'avons pas pu les inclure dans nos traitements. Les résultats obtenus après traitement sont du bon ordre de grandeur mais manquent de précision.

Ces expériences montrent la faisabilité des techniques impulsionnelles : elles peuvent être appliquées afin de déterminer les paramètres de relaxation de chaque résidu d'une protéine, y compris ceux concernant le proton. Il faut cependant prévoir un temps de mesure assez important en raison du manque de sensibilité et du nombre de spectres à enregistrer. Ceci est rédhitoire si l'on compare cette méthode avec la méthode classique.

Pour conclure, les expériences unidimensionnelles, qui présentent une bonne sensibilité en raison de la possibilité de procéder à un nombre important d'accumulations, ont montré qu'elles pouvaient être exploitées de façon fiable par un traitement global (résolution complète des équations de Solomon). On devrait ainsi pouvoir retrouver non seulement le

terme de relaxation croisée azote-proton  $\sigma_{N-H}$  mesuré classiquement, mais également les paramètres de relaxation du proton. A cette occasion, nous avons pu démontrer l'effet dévastateur de la relaxation protonique sur les courbes d'édification de l'aimantation de l'azote  $^{15}\text{N}$ . Celle-ci intervient fortement, même pour des temps de mélange relativement courts. Cette situation est propre aux macromolécules du fait de leur réorientation lente. Nos mesures ont montré par ailleurs que la mesure classique de la relaxation croisée (avec et sans irradiation) permettait d'accéder à une valeur de l'eOn qui n'est pas entachée par la relaxation croisée proton-proton.

Nous avons essayé d'utiliser le comportement initial des courbes dans le but de restreindre le nombre d'expériences bidimensionnelles à réaliser. Cette approche est un demi-succès certainement du au manque de précision des résultats. Les expériences bidimensionnelles dont nous disposons actuellement ne permettent pas d'appliquer les traitements proposés pour obtenir des résultats précis. Un nombre d'accumulations plus important permettrait de résoudre ce problème mais nous oblige à des temps de manipulation de plusieurs jours pour chaque point (si l'on réalise ces expériences à 400MHz, on doit réaliser au minimum 128 accumulations, ceci correspond à un temps de manipulation d'environ deux jours et demi par temps de mélange). A plus haut champ la situation est équivalente car l'eOn  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  s'affaiblit avec le champ. Nous avons renoncé à poursuivre dans cette voie, les disponibilités des différents spectromètres du laboratoire ne nous permettent pas d'envisager une étude à la fois complète et précise.

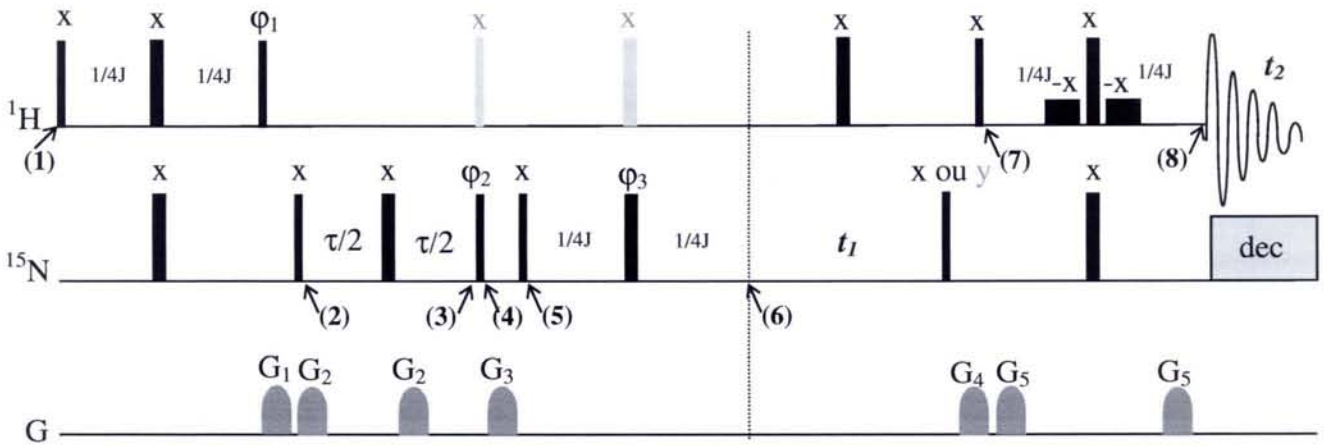
## 2.4. Mesure de la corrélation croisée csa( $^{15}\text{N}$ )-dipolaire( $^1\text{H}^{15}\text{N}$ )

### 2.4.1. Méthodes de mesure existantes

Depuis la fin des années 90, de nombreuses expériences ont été mises au point pour la mesure de la corrélation croisée dans les protéines. Comme nous l'avons vu au chapitre 1, ce paramètre provient de l'interférence entre deux mécanismes de relaxation: ici, nous nous sommes intéressés à l'interaction entre un mécanisme dipolaire, lié aux noyaux X et H, et un mécanisme lié à l'anisotropie du tenseur d'écran du noyau X (csa). Cet effet a longtemps été considéré comme une nuisance qui altère les mesures de relaxation si aucune précaution n'est prise pour l'éliminer (Boyd et al., 1990; Palmer III et al., 1992; Kay et al., 1992b). Mais la corrélation croisée apparaît aujourd'hui comme un paramètre de relaxation complémentaire, qui peut être mesuré avec précision et qui apporte des informations concernant la dynamique, la structure et les paramètres moléculaires (csa). Les différents types de mesure de la

corrélation croisée transversale peuvent être classés selon deux méthodologies. La première consiste à transférer un état A vers un état B par corrélation croisée, et de quantifier l'efficacité de ce transfert en utilisant une expérience de référence, afin d'atteindre la valeur du terme d'interférence. La deuxième consiste à suivre l'évolution des branches d'un multiplet pendant une période d'évolution ; leurs comportements différents permettent ensuite de remonter au terme de corrélation croisée (Goldman, 1984).

Les séquences développées sur le premier principe reposent sur la méthode introduite par Tjandra et al. en 1996. La mesure permet d'accéder au terme de corrélation croisée transversale  $\eta_{x,y}$  entre l'interaction dipolaire NH et le csa de l'azote dans les protéines. Elle est présentée sur la figure 2.21.



**figure 2.21** Séquence de mesure de la corrélation croisée csa( $^{15}\text{N}$ )-dip( $^1\text{H}^{15}\text{N}$ ) (Tjandra et al., 1996). Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à  $90^\circ$ , et les épaies à des impulsions à  $180^\circ$ . Les impulsions grisées ne sont utilisées que pour l'enregistrement de l'expérience du schéma A, elles sont omises pour le schéma B.  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique de l'azote-15 (modulation states-TPPI (Marion et al., 1989)). G correspond aux impulsions de gradient de champ statique :  $G_1=(25\%, 2.75\text{ms})$ ,  $G_2=(25\%, 2\text{ms})$ ,  $G_3=(25\%, 1\text{ms})$ ,  $G_4=(25\%, 1.5\text{ms})$  et  $G_5=(25\%, 0.4\text{ms})$ . Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(y-y)$ ,  $\phi_2=(x-x-x-x)$ ,  $\phi_3=(x-x-x-x-y-y-y-y-x-x-x-x-y-y-y-y)$ ,  $\text{acqu}=(x-x-x-x-x-x-x-x)$ .  $\tau$  est le temps de mélange. Les deux impulsions à faible puissance qui entourent la dernière impulsion en proton ont une longueur de 1ms et correspondent à des angles de basculement de  $90^\circ$  (watergate). Il est à noter qu'une omission sur le changement de phase (x ou y) est présente dans l'article initial de Tjandra et al.

Elle consiste en la création d'une configuration antiphase qui fait suite à un transfert INEPT, puis à laisser évoluer cette configuration pendant le temps de mélange  $\tau$ . Il se forme alors deux sortes de cohérence : l'une en phase ( $N_y$ ) et l'autre en antiphase ( $N_yH_z$ ). Les deux schémas de la séquence d'impulsions permettent de sélectionner  $N_y$  (schéma A) ou  $N_yH_z$  (schéma B) ; la comparaison de l'intensité de ces deux états permet ensuite de remonter à la

valeur de la corrélation croisée. La figure 2.22 permet de visualiser l'évolution des différentes cohérences selon le schéma utilisé.

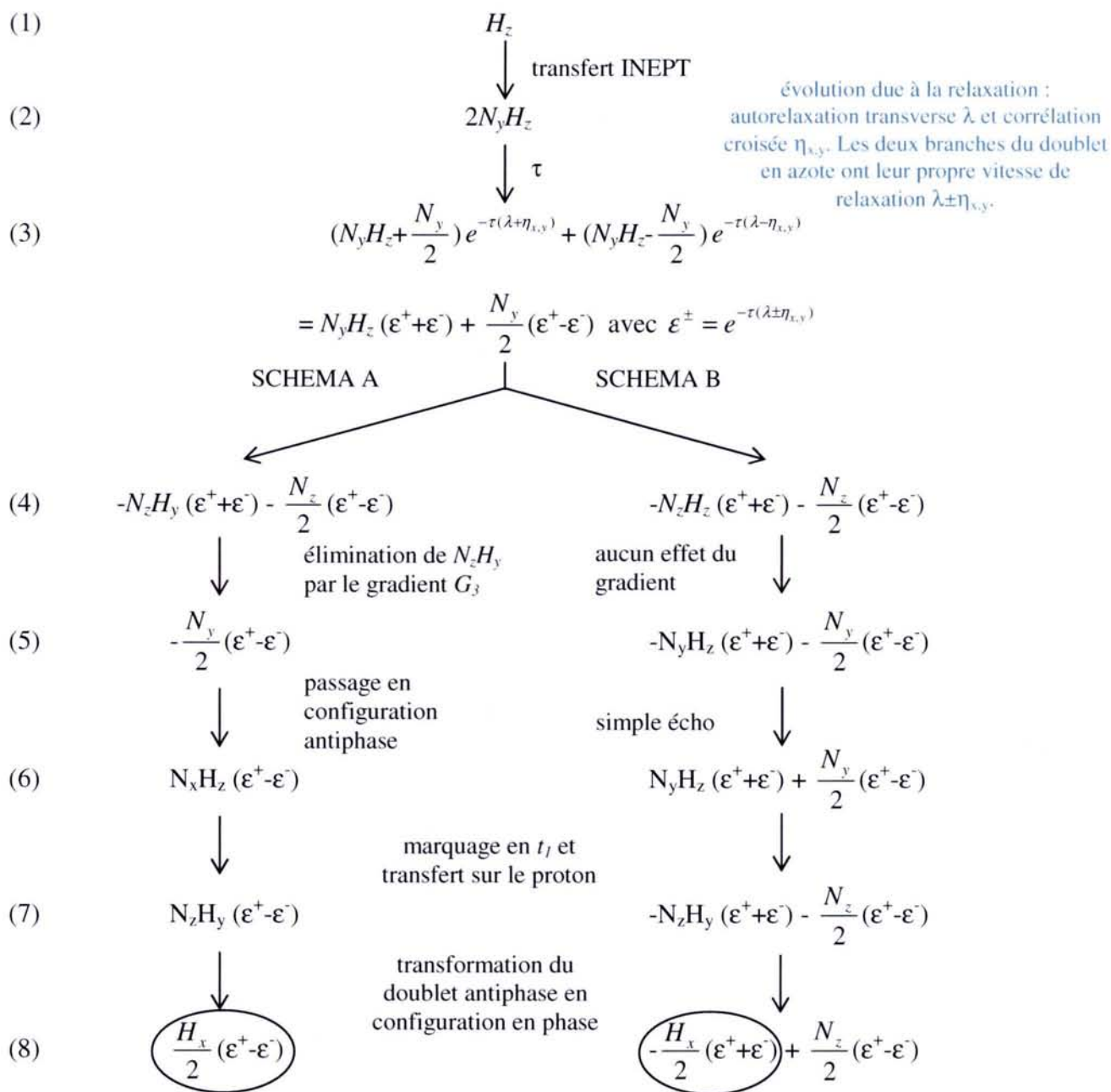


figure 2.22 Evolution des différentes cohérences lors des deux schémas de la séquence de la figure 2.21 (voir numérotation sur cette figure).

Ainsi, le rapport entre les intensités des deux quantités sélectionnées (par le schéma A et le schéma B) est égal à :

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{\epsilon^- - \epsilon^+}{\epsilon^- + \epsilon^+} = \frac{e^{-\tau(\lambda - \eta_{x,y})} - e^{-\tau(\lambda + \eta_{x,y})}}{e^{-\tau(\lambda - \eta_{x,y})} + e^{-\tau(\lambda + \eta_{x,y})}} = \frac{e^{\tau\eta_{x,y}} - e^{-\tau\eta_{x,y}}}{e^{\tau\eta_{x,y}} + e^{-\tau\eta_{x,y}}} = \tanh(\tau\eta_{x,y}) \quad (\text{équation 2.12})$$

où  $\eta_{x,y}$  correspond à la vitesse de corrélation croisée transversale. L'analyse se limite à des temps de mélange courts.

Cette méthode a ensuite connu de nombreuses modifications. L'une d'elle consiste à étudier le comportement initial de l'édification de la configuration en phase  $N_y$  à la suite de la création du doublet antiphase  $2N_yH_z$ , et d'utiliser une référence à temps de mélange nul (Tessari et al., 1997a; Tessari et al., 1997b). On obtient alors une évolution linéaire de l'aimantation en-phase en fonction du temps de mélange. La séquence est ici "enhanced" ou améliorée (Cavanagh et al., 1991; Palmer III et al., 1991; Palmer III et al., 1994), d'où un gain de sensibilité. Cette étude peut également être menée au deuxième ordre, ceci aussi bien pour la mesure de la corrélation croisée transversale que longitudinale (Köver et Batta, 2001). La méthode initiale a aussi été étendue à la mesure de la corrélation croisée longitudinale (Kroenke et al., 1998; Kojima et al., 1999).

Une approche plus complète, utilisée pour la mesure de la corrélation croisée longitudinale, consiste à enregistrer plusieurs observables (notamment la vitesse d'autorelaxation longitudinale de  $I_z$  et l'édification de  $I_z$  à partir  $2I_zH_z$ ) et à les ajuster simultanément. Ceci a été réalisé aussi bien en carbone-13 (Damberg et al., 1999) qu'en azote-15 (Wang et al., 2000).

Les séquences développées sur le deuxième principe reposent sur l'évaluation de la différence d'évolution entre les deux branches du doublet du noyau affecté d'une importante anisotropie de déplacement chimique. Boisbouvier et al. ont appliqué cette méthode en 1999 pour la mesure de la corrélation croisée transversale  $csa(^{13}C)$ -dipolaire( $^{13}C^1H$ ) dans des ARN. Ils ont utilisé le filtre  $S^3E$  développé par Sorensen (Meissner et al., 1997a) qui, placé juste avant l'acquisition dans une expérience de  $T_2$  conventionnelle, permet de suivre séparément chaque branche du doublet. Récemment, Fushman a également mis en œuvre cette technique en azote-15 (Hall et al, 2003a; Hall et Fushman, 2003b) en utilisant une sélection de type IPAP (Ottiger et al., 1998), cette méthode nécessitant la soustraction et l'addition de deux spectres pour isoler l'état de spin désiré (figure 2.23).

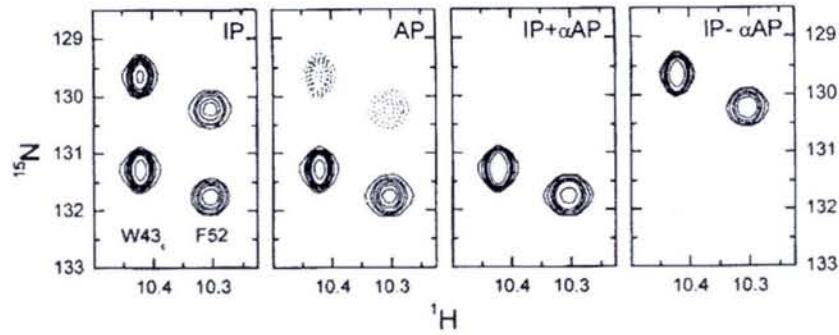


figure 2.23 Spectres illustrant l'utilisation de la méthode IPAP (repris de Hall et al, 2003a) : spectres IP (in-phase), AP (anti-phase) et spectres simplifiés résultant de la somme et de la différence des deux précédents. Les contours en traits pleins représentent les pics positifs, et ceux en pointillés les pics négatifs.

L'analyse de la différence d'évolution des deux branches du doublet peut être réalisée de deux manières. Pour expliquer les deux méthodes, rappelons que pour un signal d'amplitude  $a$ , la largeur à mi-hauteur du pic dans le spectre est égal à  $1/(\pi T_2^{app})$ , où  $T_2^{app}$  est le temps d'auto-relaxation transversale affecté des éventuelles inhomogénéités du champ magnétique statique et de la corrélation croisée ( $R_2^{app} = 1/T_2^{app} = R_2 + R_2'(inhomogénéités) \pm \eta_{x,y}$ ). En effet, de manière traditionnelle, le marquage en déplacement chimique s'effectue en incrémentant un temps  $t_1$  (figure 2.24, A), le signal avant transformée de Fourier contient ainsi un facteur exponentiel  $e^{-t_1/T_2^{app}}$ , et la largeur à mi-hauteur des pics sera différente pour les deux états composant le doublet ( $1/(\pi T_2^{\alpha,app})$  pour l'état  $\alpha$  de l'autre spin responsable du doublet, et  $1/(\pi T_2^{\beta,app})$  pour l'état  $\beta$ ), de même que leur hauteur ( $aT_2^{\alpha,app}$  et  $aT_2^{\beta,app}$  respectivement). Dans ce cas, la relaxation sera mesurée en utilisant l'évolution du **volume** (et non pas la hauteur) des pics en fonction du temps de mélange  $\tau$  (le signal est de la forme  $f(\tau) \propto a e^{-\tau/T_2^{app}} e^{-t_1/T_2^{app}} e^{-2i\pi\nu_1}$ , il n'est alors pas possible (ou difficilement) de séparer l'évolution durant  $t_1$  et  $\tau$ ). La seconde méthode permet de mesurer le terme d'interférence par des mesures d'intensités. Il s'agit d'une méthode à temps constant ("constant-time experiment") (Bodenhausen et Ernst, 1981; Bodenhausen et Ernst, 1982), le temps de mélange  $\tau$  (ou T sur figure 2.24) est alors décrémenté avec le temps d'évolution  $t_1$ . La largeur à mi-hauteur des deux branches du doublet est ainsi indépendante de la relaxation, mais dépend uniquement de l'apodisation du signal ou des éventuelles inhomogénéités de champ (figure 2.24, B). Le terme  $e^{-\tau/T_2^{app}}$  est en effet constant (indépendant de  $t_1$ ) et n'apparaît pas dans la largeur à mi-hauteur de la raie, mais dans sa hauteur (le signal est de la forme  $f(\tau) \propto a e^{-\tau/T_2^{app}} e^{-2i\pi\nu_1}$ ). La corrélation croisée peut donc être mesurée directement par les différences d'intensité des

composantes du doublet. Dans ce cas, il n'y a pas d'atténuation du signal durant  $t_I$  (ou peu), il est alors impératif d'utiliser une fenêtre d'apodisation qui amène les données à zéro pour les grandes valeurs de  $t_I$ .

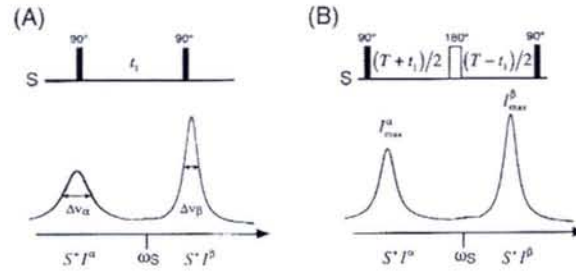


figure 2.24 Evolution des deux composantes d'un doublet (repris de Brutscher, 2000). (A) évolution libre des cohérences. (B) mode "constant-time".

C'est cette dernière technique qui a été mise à profit dans les expériences de Ghose et al. en 1998 et Hall et al. en 2003. De plus, l'intégration des taches de corrélation est plus précise si celles-ci sont de largeur égale.

#### 2.4.2. Une nouvelle méthode de mesure de la corrélation croisée longitudinale csa(X)-dipolaire(<sup>1</sup>HX) basée sur la courbe d'édification de l'ordre longitudinal

Cette méthode de mesure de la corrélation croisée csa-dipolaire longitudinale est basée sur les équations de Solomon étendues (Solomon, 1955; Canet, 1989) pour un système à deux spins H et X :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dH_z}{dt} = -R_1^H (H_z - H_{eq}) - \sigma_{HX} (X_z - X_{eq}) \\ \frac{dX_z}{dt} = -R_1^X (X_z - X_{eq}) - \sigma_{XH} (H_z - H_{eq}) - \eta_z 2X_z H_z \\ \frac{d(2X_z H_z)}{dt} = -R_1^{XH} (2X_z H_z) - \eta_z (X_z - X_{eq}) \end{array} \right. \quad (\text{équation 2.13})$$

où  $H_z$  et  $X_z$  sont les aimantations longitudinales respectivement de H et de X, et  $2H_z X_z$  est l'ordre longitudinal, nul à l'équilibre.  $R_1$  correspond à la vitesse de relaxation longitudinale propre,  $\sigma_{XH}$  à la relaxation croisée, et  $\eta_z$  à la corrélation croisée (longitudinale). Comme  $\eta_{csa(H),dip}$  est généralement faible (ceci en raison de la faible valeur de l'anisotropie de déplacement chimique en proton, et de l'expression des termes de corrélation croisée, cf. §1.7), il peut être négligé et a été omis dans ces équations.



D'après ce système, l'ordre longitudinal  $2X_zH_z$  peut être créé par relaxation, et plus précisément par corrélation croisée. La vitesse de relaxation associée peut donc être mesurée simplement en suivant l'évolution de l'ordre longitudinal créé suite à une perturbation du noyau X.

Le filtre schématisé sur la figure 2.25 (Leclerc et al., 2003) permet de sélectionner l'ordre longitudinal à l'aide de deux impulsions de gradients de champ statique (avec perte de la moitié de l'aimantation, cf. annexe 2.2) et de le convertir en doublet antiphase sur le proton.

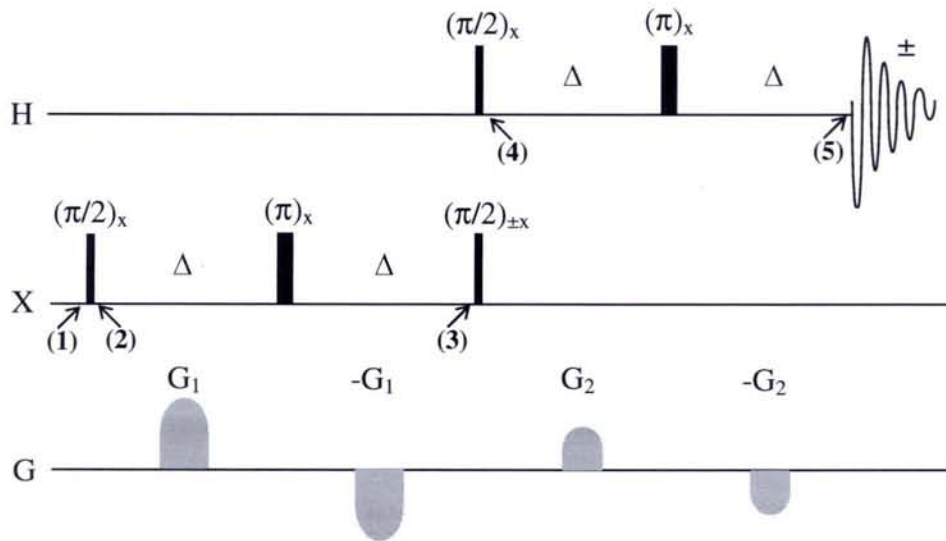


figure 2.25 Sous-séquence utilisée comme filtre de l'ordre longitudinal. Les gradients utilisés sont tels que  $G_1/G_2 = \gamma_H/\gamma_X$ .  $\Delta$  correspond à la somme des temps de montée, de durée et de descente des impulsions de gradients.

L'aimantation de l'ordre longitudinal est inversée une fois sur deux (avec alternance du signe de l'acquisition) pour améliorer l'élimination des parents et des autres aimantations longitudinales (notamment celles créées par relaxation croisée). Les impulsions de gradient de champ statique sont placées dans des échos afin d'annihiler toute évolution de l'aimantation liée au déplacement chimique et aux couplages scalaires durant leur application. La figure 2.26 détaille cette sous-séquence en terme d'opérateurs et permet de visualiser leur évolution (en notant que la moyenne sur tout l'échantillon de  $\cos^2\theta$  est égale à  $1/2$  et celle de  $\sin\theta\cos\theta$  est nulle, avec  $\theta$  l'angle de défocalisation du à une impulsion de gradient de champ statique, cf. annexe 2.2).

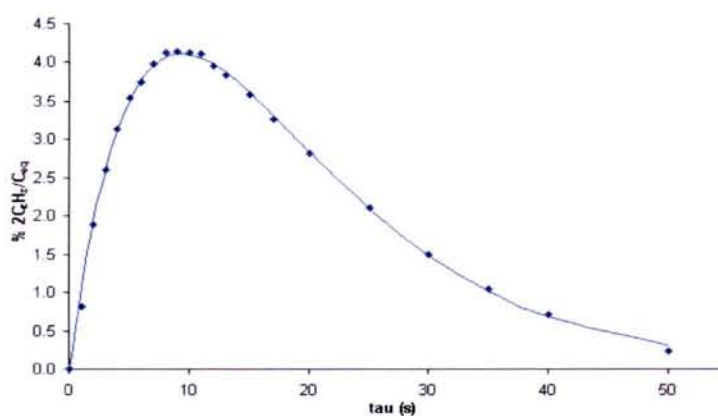
(1)	$X_z$	$H_z$	$2X_zH_z$
(2)	$X_y$	$H_z$	$2X_yH_z$
(3)	$X_y\cos\theta + X_x\sin\theta$	$H_z$	$2X_yH_z\cos\theta + 2X_xH_z\sin\theta$
(4)	$\mp X_z\cos\theta + X_x\sin\theta$	$H_y$	$\mp 2X_zH_y\cos\theta + 2X_xH_y\sin\theta$
(5)	$\mp X_z\cos\theta$ $+ (X_x\cos\theta - X_y\sin\theta)\sin\theta$	$H_y\cos\theta + H_x\sin\theta$	$\mp (2X_zH_y\cos\theta + 2X_xH_x\sin\theta)\cos\theta$ $+ 2X_xH_y\sin\theta$
<b>acquisition totale</b>	-	-	$\frac{1}{2} 2X_zH_y$

(moyenne sur  $\theta$  et sur les deux pas du cyclage de phase)

**figure 2.26** Evolution des différentes composantes longitudinales lors de la sous-séquence schématisée sur la figure 2.25 (cf numérotation sur cette figure).  $\theta$  est l'angle de défocalisation lié à l'application du gradient de champ statique.

Dans les séquences que nous avons utilisées, l'ordre longitudinal est créé par corrélation croisée à la suite de l'inversion de l'aimantation du noyau X. L'évolution de cet ordre longitudinal est suivie grâce à un temps de mélange, compris entre l'impulsion d'inversion sur le noyau X et le filtre décrit sur la figure 2.25. Ce principe de création de l'ordre longitudinal par relaxation n'est évidemment pas nouveau (Jaccard et al., 1987), ce sont les propriétés du filtre (et son efficacité) que nous présentons ici.

Nous avons dans un premier temps appliqué ce filtre à un échantillon d'acide méthanoïque enrichi en carbone-13 à 99%. Une sous-séquence  $[1/4J - \pi_{(H,X)} - 1/4J]$  a été ajoutée avant l'acquisition afin de refocaliser la configuration antiphase, ce qui a ainsi permis de découpler le proton du carbone-13 et donc d'améliorer la sensibilité de l'expérience.



**figure 2.27** Intensité de l'ordre longitudinal créé par corrélation croisée en fonction du temps de mélange (en s), obtenu à l'aide du filtre de la figure 2.25 ( $G_1/G_2=\gamma_H/\gamma_C$ ), sur un échantillon d'acide méthanoïque enrichi en  $^{13}\text{C}$  à 400MHz. Le nombre d'accumulations est de 16, le temps d'attente étant de 60s. 22 temps de mélange ont été utilisés de 2ms à 50s.

L'ajustement des résultats expérimentaux obtenus à 9.4T (figure 2.27) a été réalisé en utilisant toute la matrice de relaxation du système (voir (équation 2.13)). Les paramètres obtenus sont :  $R_1^C=0.107\text{s}^{-1}$ ,  $R_1^H=0.200\text{s}^{-1}$ ,  $R_1^{CH}=0.114\text{s}^{-1}$ ,  $\sigma_{CH}=0.032\text{s}^{-1}$  et  $\eta_z=0.013\text{s}^{-1}$  (tous les paramètres ayant été ajustés), ce qui est parfaitement en accord avec les mesures réalisées précédemment (Guenneau, 1999). Cette expérience utilisée comme test du filtre (figure 2.25) est très concluante, elle nous a permis d'obtenir le terme de corrélation croisée longitudinale de façon directe. Nous avons ici utilisé toute la courbe d'édification de l'ordre longitudinal (et ainsi ajusté toute la matrice de relaxation du système), mais il est à noter que la pente initiale de la courbe nous permet également d'accéder au terme de corrélation croisée (utilisation du développement limité au premier ordre, cf. paragraphe 2.3.2) : on obtient alors une valeur de  $0.013\text{s}^{-1}$ , identique à celle résultant de l'analyse complète.

Nous avons dans un deuxième temps utilisé le filtre de manière à obtenir des cartes bidimensionnelles. La séquence d'impulsion est présentée sur la figure 2.28, elle correspond à la séquence utilisée précédemment avec l'insertion d'un temps  $t_I$  pour le marquage en déplacement chimique du carbone-13. L'expérience a été réalisée sur un échantillon de 2,3-naphto-1,3-dioxole, noté nd11 dans la suite de l'exposé, et représenté sur la figure 2.29 (Walker, 2001).

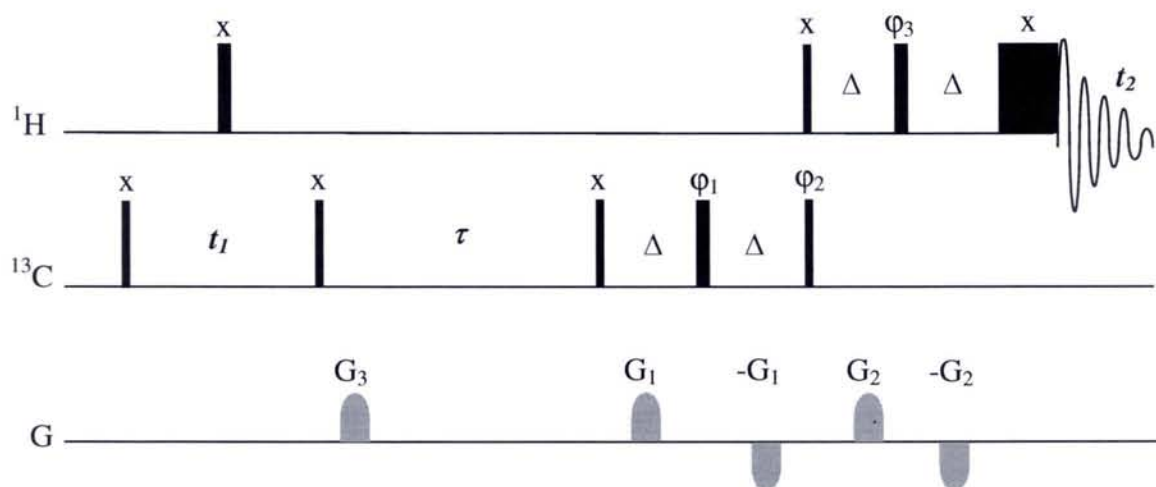


figure 2.28 Séquence bidimensionnelle de mesure de la corrélation croisée  $csa(^{13}C)$ - $dip(^1H^{13}C)$ . Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à  $90^\circ$ , et les épais à des impulsions à  $180^\circ$ .  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique du carbone-13 (modulation states-TPPI (Marion et al., 1989), première impulsion à  $\pi/2$  en  $^{13}C$ ). G correspond aux impulsions de gradient de champ statique :  $G_1=40\%$ ,  $G_2=10\%$ ,  $G_3=33\%$  pour des durées de 1ms ( $G_1/G_2=\gamma_H/\gamma_C$ ). Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(x \ x \ x \ x \ -x \ -x \ -x \ -x)$ ,  $\phi_2=(x \ -x)$ ,  $\phi_3=(x \ x \ -x \ -x)$ ,  $acqu=(x \ -x)$ .  $\tau$  est le temps de mélange. L'impulsion placée juste avant l'acquisition est une purge permettant d'éliminer les aimantations résiduelles indésirables.  $\Delta$  correspond à la somme des temps de montée, de durée et de descente des impulsions de gradients.

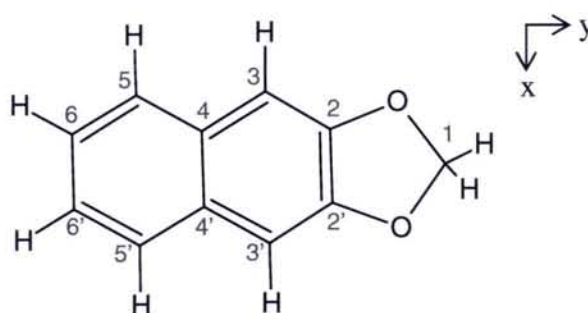
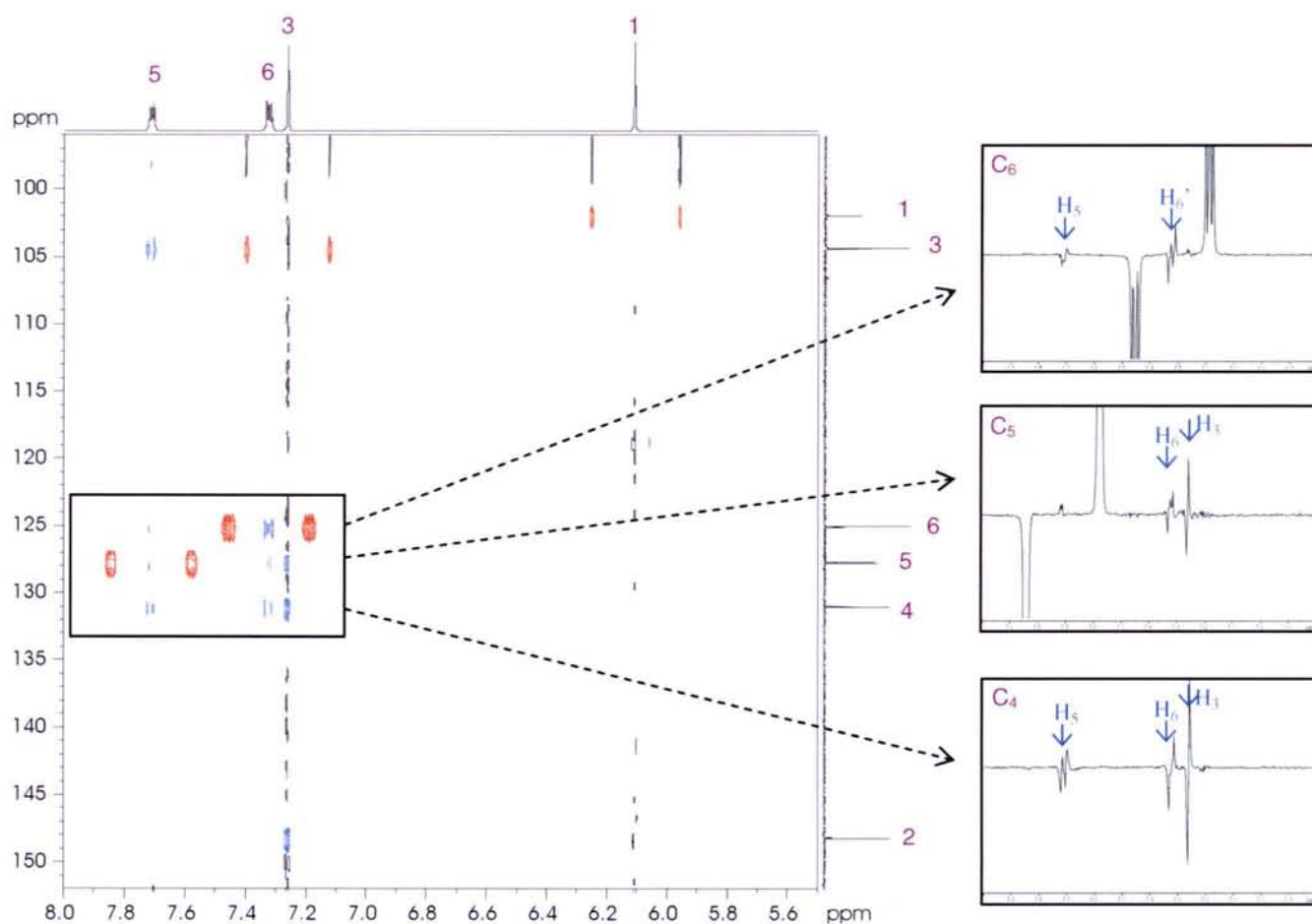


figure 2.29 2,3-naphto-1,3-dioxole, appelé nd11.

Les cartes à deux dimensions permettent d'étaler l'information selon la dimension du carbone-13. Nous avons donc cherché à exploiter cette propriété afin de visualiser des interactions entre noyaux chimiquement équivalents et non magnétiquement équivalents. Cette situation apparaît pour des molécules possédant un élément de symétrie comme le nd11 (symétrie  $C_{2v}$ ) (Walker et al., 2003). La sous-séquence utilisée précédemment (étude de l'acide méthanoïque) est basé sur la valeur de la seule constante de couplage entre le proton et le carbone de l'acide méthanoïque. Dans le cas du nd11, il existe évidemment des valeurs très différentes des constantes de couplage  $^1H$ - $^{13}C$  (par exemple des  $^1J$ ,  $^2J$  et  $^3J$ ), et on ne peut pas refocaliser toutes les configurations antiphases simultanément. Nous avons donc supprimé la sous-séquence de refocalisation du doublet antiphase introduite précédemment (ainsi que le

découplage du proton durant l'acquisition), il s'ensuit que chaque tache de corrélation apparaît sous la forme d'un doublet en configuration antiphase. La figure 2.30 correspond à la carte obtenue avec un temps de mélange égal à 1s.



**figure 2.30** Carte de corrélation permettant la visualisation directe de la corrélation croisée  $\text{csa}(^{13}\text{C})/\text{interaction dipolaire}(^1\text{H}-^{13}\text{C})$  obtenue sur un échantillon de nd11 (figure 2.29) et avec la séquence d'impulsions de la figure 2.28. La mesure a été réalisée à la température de 300K et à un champ magnétique de 14.1T (résonance du proton à 600MHz). Nombre d'accumulations: 32, nombre de "dummy scans" (qui ne sont pas enregistrés): 8, temps de répétition: 10s, largeurs spectrales: 7ppm $\times$ 72ppm, nombre de points: 2048 $\times$ 128, temps de mélange: 1s. Voir le texte pour la signification des couleurs utilisées. A droite figurent les coupes obtenues à partir de la carte à deux dimensions et correspondant aux carbones  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_5$  et  $\text{C}_4$ .

Cette carte fait bien entendu apparaître les corrélations (que l'on appellera directes) entre proton et carbone-13 proches (ici chimiquement liés). Il s'agit ainsi des taches correspondant aux couples  $\text{C}_3\text{-H}_3$  (superposé à  $\text{C}_3'\text{-H}_3'$ ),  $\text{C}_5\text{-H}_5$  (superposé à  $\text{C}_5'\text{-H}_5'$ ),  $\text{C}_6\text{-H}_6$  (superposé à  $\text{C}_6'\text{-H}_6'$ ), et  $\text{C}_1\text{-H}_1$ . Elles apparaissent en rouge dans le spectre (figure 2.30). Mais il est intéressant de remarquer également des taches de corrélation entre proton et carbone-13 plus éloignés (elles apparaissent en bleu dans le spectre). Nous avons donc cherché à justifier l'apparition de telles taches, ou l'absence de certaines. La molécule ayant été étudiée en

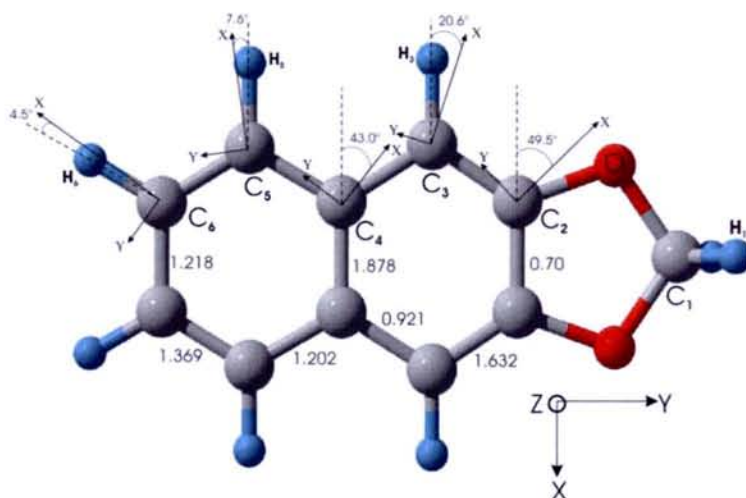
détails précédemment (Walker, 2001), nous connaissons parfaitement ses propriétés structurales et dynamiques (temps de corrélation pour un modèle totalement anisotrope :  $\tau_x=61.5\text{ps}$ ,  $\tau_y=22.2\text{ps}$ ,  $\tau_z=42.3\text{ps}$ , géométrie de la molécule, valeur et orientation de l'anisotropie de déplacement chimique de chaque carbone...). Nous avons alors pu effectuer des calculs théoriques de corrélation croisée (programme développé en langage java) à l'aide des formules présentées au chapitre 1. Les résultats figurent dans le tableau 2.3.

C	H	$\eta_{\text{csa(C)-dip(CH)}$ ( $10^{-2}\text{s}^{-1}$ )
1	1	5.68
2	3	0.81
2	3'	0.40
2	1	0.28
3	3	13.87
3	3'	0.30
3	5	0.12
3	5'	0.23
4	5	1.56
4	5'	0.42
4	3	2.11
4	3'	0.30
4	6	0.79
4	6'	0.52
5	5	24.98
5	5'	0.55
5	6	0.24
5	6'	0.31
5	3'	0.29
6	6	39.34
6	6'	0.89
6	5	0.82
6	5'	0.57

**tableau 2.3 Valeurs calculées des termes de corrélation croisée csa(C)/dip(CH) dans la molécule de nd11. Ces calculs sont basés sur les formules du chapitre 1 (équation 1.41) et avec les paramètres structuraux et dynamiques précédemment publiés (Walker, 2001; Walker et al., 2002). Ne figurent ici que les valeurs de corrélation croisée supérieures à  $0,1.10^{-2}\text{s}^{-1}$ .**

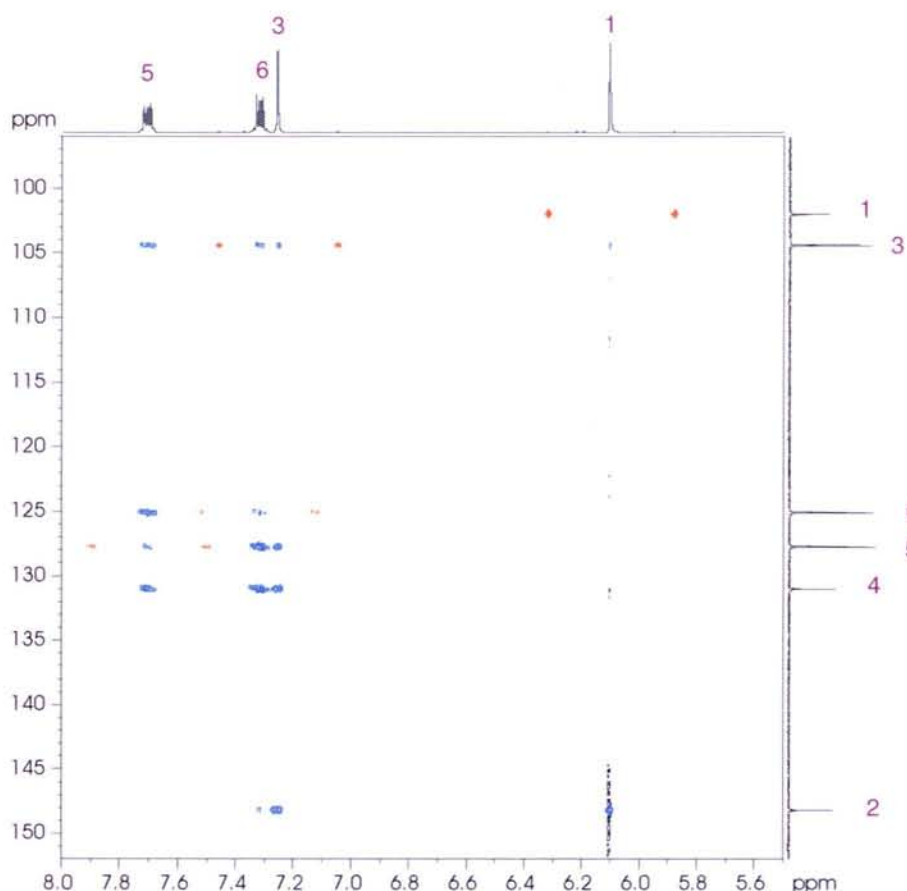
Dans ce tableau apparaissent en couleur les corrélations visibles dans le spectre (rouge pour les corrélations proches et bleu pour les corrélations éloignées). Ceci met bien en évidence

que le terme de corrélation croisée est non seulement fonction de la distance entre noyaux (mécanisme dipolaire) et de la valeur de l'anisotropie de déplacement chimique (csa), mais aussi de l'orientation relative des deux tenseurs concernés. Cette orientation (figure 2.31) intervient par le facteur  $\frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1)$  ( $\theta$  étant l'angle entre la direction du vecteur CH et l'axe principal du tenseur de déplacement chimique du carbone) qui peut prendre des valeurs de -0.5 à +1 en passant bien entendu par la valeur zéro (voir chapitre 3).



**figure 2.31** Orientation des tenseurs d'anisotropie de déplacement chimique dans la molécule nd11. La direction z est perpendiculaire au plan de la molécule, et les directions x et y sont représentées par des flèches sur chaque carbone. (repris de Walker et al., 2002). Les tenseurs d'inertie et de rotation-diffusion sont confondus pour des raisons de symétrie.

Par ailleurs, on peut faire remarquer que c'est l'existence d'un chemin de couplage scalaire entre le proton et le carbone-13 considéré qui permet de visualiser les configurations antiphase dans le spectre. En effet, l'ordre longitudinal  $2X_zH_z$  créé par corrélation croisée ne peut être transformé en une observable que s'il existe un couplage  $J$  non nul entre les noyaux X et H. Nous nous en sommes assurés à l'aide d'une expérience HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) (Bax et Summers, 1986) afin de visualiser les couplages scalaires entre proton et carbone-13 dans le nd11 (figure 2.32).



**figure 2.32** Spectre HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  du nd11 à 400MHz et 300K. Nombre d'accumulations: 8, nombre de "dummy scans" (qui ne sont pas enregistrés): 8, temps de répétition: 2s, largeurs spectrales: 3ppm $\times$ 70ppm, nombre de points : 4096 $\times$ 256. Voir le texte pour la signification des couleurs utilisées.

La carte de la figure 2.30 devrait faire apparaître les mêmes taches de corrélation que sur la figure 2.32, mais avec une intensité modulée par la corrélation croisée. Ainsi certaines taches ont disparu telles que la corrélation entre  $\text{C}_3$  et  $\text{H}_1$  (même pour une temps de mélange et un temps d'attente plus longs) parce que le terme de corrélation croisée csa-dipolaire a une valeur trop faible ( $0.02 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

D'autre part, l'évolution des taches de corrélation en fonction du temps de mélange  $\tau$  nous a permis de remonter à des valeurs du terme de corrélation croisée comparables à celles mesurées précédemment (Walker, 2001). Nous avons présenté ici une méthode simple qui permet de visualiser directement l'existence de corrélation croisée entre carbone et proton.

Nous avons ensuite adapté la mesure au cas des protéines. De façon à améliorer la sensibilité de l'expérience, nous avons implanté un transfert INEPT au début de la séquence d'impulsions (figure 2.33). La mesure ayant pour objectif d'atteindre la valeur de corrélation croisée csa-dipolaire entre un azote donné et le proton amide correspondant, nous avons pu ajouter l'étape de refocalisation ainsi que le découplage azote-15 à la fin de la séquence



(valeur moyenne  $^1J^{NH} = 91\text{Hz}$ ). L'élimination du pic de l'eau a été optimisée par l'insertion d'un bloc *watergate*, ainsi que par des impulsions de gradient de champ statique agissant comme des purges.

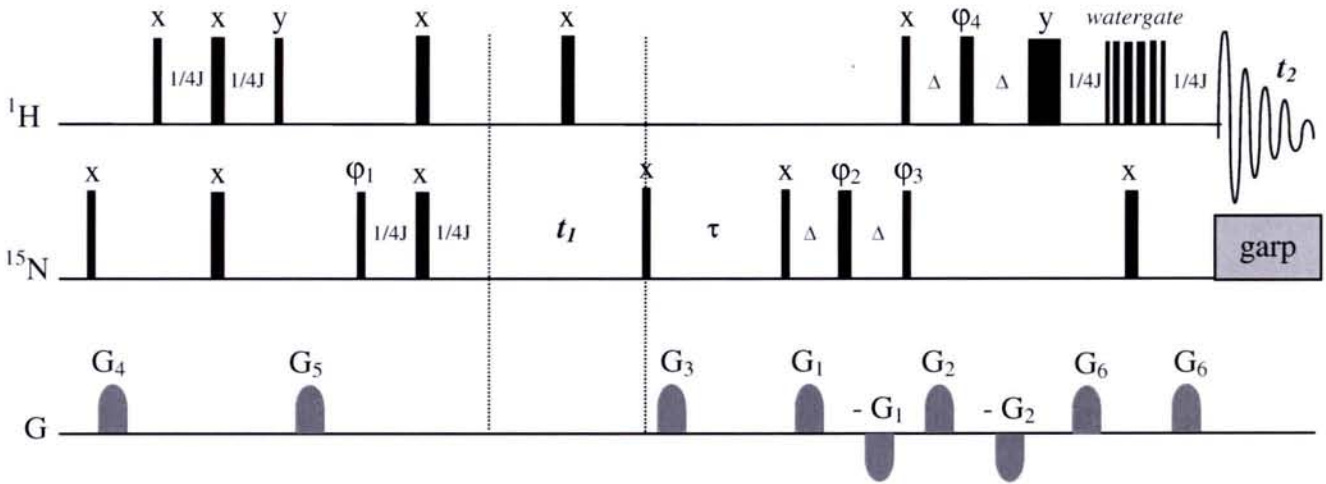


figure 2.33 Séquences permettant de suivre l'édification de l'ordre longitudinal  $2N_zH_z$  par corrélation croisée dans les protéines. Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à  $90^\circ$ , et les épais à des impulsions à  $180^\circ$ .  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique de l'azote-15 (modulation states-TPPI (Marion et al., 1989), phase  $\phi_1$ ). G correspond aux impulsions de gradient de champ statique :  $G_1=40\%$  (1ms),  $G_2=8\%$  (500 $\mu$ s),  $G_3=5\%$  (1ms),  $G_4=20\%$  (1ms),  $G_5=23\%$  (1ms),  $G_6=33\%$  (1ms). Le cyclage de phase utilisé est:  $\phi_1=(x)$ ,  $\phi_2=(x\ x\ x\ x\ -x\ -x\ -x\ -x)$ ,  $\phi_3=(x\ -x)$ ,  $\phi_4=(x\ x\ -x\ -x)$ ,  $acqu=(x\ -x)$ .  $J=91\text{Hz}$ .  $\tau$  est le temps de mélange. Le découplage est de type GARP (Shaka et al., 1985).  $\Delta$  correspond à la somme du temps de montée, de la longueur et du temps de descente des gradients.

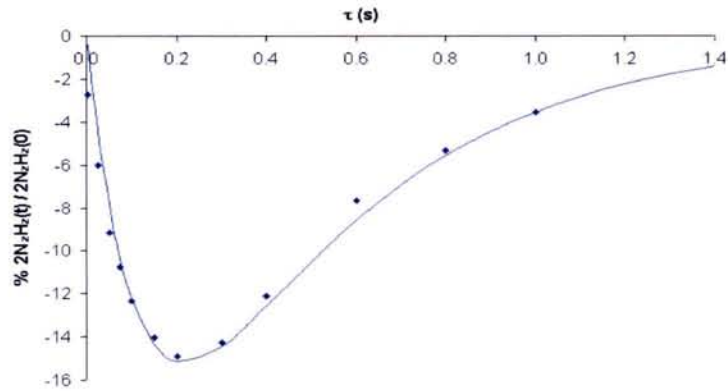


figure 2.34 Evolution de l'ordre longitudinal créé par corrélation croisée en fonction du temps de mélange, obtenu à l'aide du filtre de la figure 2.25 ( $G_1/G_2=\gamma_H/\gamma_N$ ), sur un échantillon d'ubiquitine enrichi en  $^{15}\text{N}$  à 400MHz (résidu S20). Le nombre d'accumulations est de 48, le temps d'attente étant de 2s. 12 temps de mélange ont été utilisés de 2ms à 1s.  $2N_zH_z(0)$  correspond à expérience de référence qui mesure la quantité d'aimantation protonique transférée vers l'azote-15 à l'issue de la sous-séquence INEPT initiale.

Les courbes d'édification obtenues (figure 2.34) ont été exploitées en négligeant la relaxation du proton, ce qui réduit le système de spins à  $N_z$  et  $2N_zH_z$ . Nous avons utilisé un développement limité au premier ordre pour l'étude du comportement initial des courbes (voir

le paragraphe 2.3.2). Les conditions initiales correspondent à une inversion de l'aimantation de l'azote-15 :

$$N_z(0) = -H_{eq} \quad (\text{avec } H_{eq} \text{ aimantation du proton à l'équilibre})$$

$$\text{et } 2N_zH_z(0) = 0$$

Ainsi la pente à l'origine des courbes d'édification est égale à  $-\eta_Z H_{eq} (1 - \gamma_N/\gamma_H)$ .

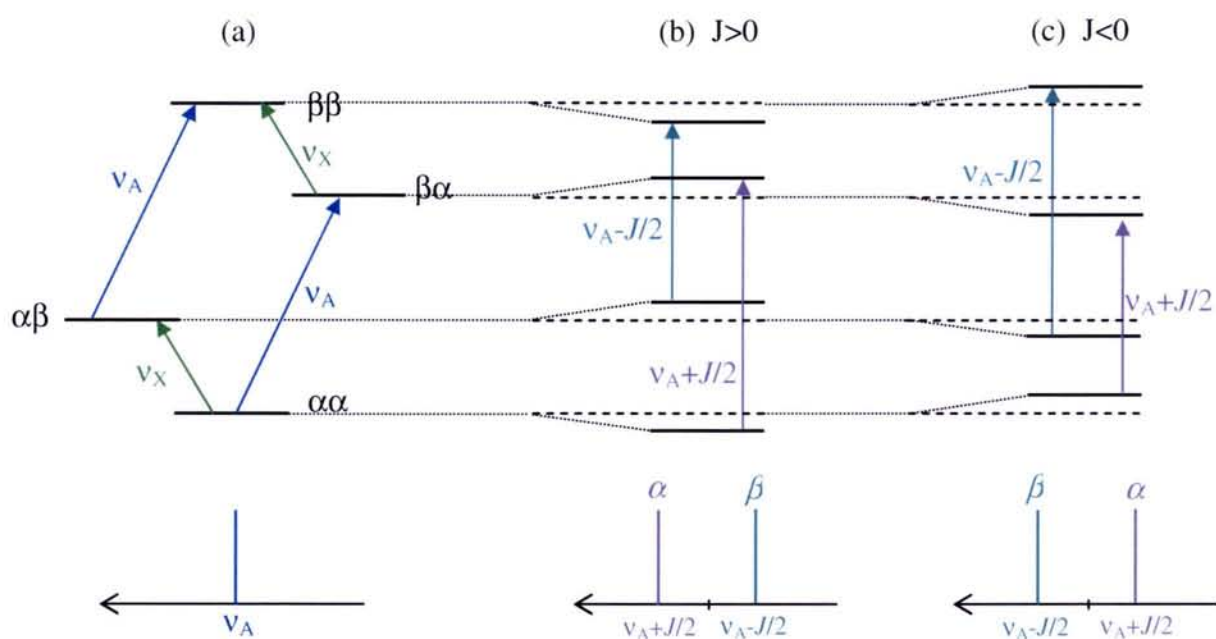
Les résultats obtenus sont en accord avec ceux publiés précédemment (Köver et Batta, 2001), et avec la deuxième méthode que nous avons développée et qui utilise une sélection des états de spin de l'azote (cf. paragraphe 2.4.3).

La méthode décrite ici permet de suivre directement l'évolution de l'ordre longitudinal créé par un processus de corrélation croisée à partir du noyau X. Les premiers essais sur des molécules de petite taille (acide méthanoïque et nd11) ont été très concluants, ils nous ont permis de comprendre quels étaient les mécanismes qui entraient en jeu lors de la mesure et donc de déterminer les différentes façon d'exploiter les courbes expérimentales. L'étude sur la molécule nd11 a montré que la méthode permettait de visualiser très facilement les interférences entre le mécanisme de relaxation dipolaire XH et l'anisotropie de déplacement chimique d'un noyau X. Nous avons ainsi développé la méthodologie en partant des petits édifices moléculaires jusqu'aux macromolécules, ce qui a nécessité de nombreuses modifications : passage en deux dimensions, transferts de polarisations permettant d'améliorer la sensibilité de la mesure, insertion de sous-séquences pour atténuer le pic de l'eau. Les mesures réalisées sur l'ubiquitine démontrent que la méthode permet d'accéder à des valeurs qui sont cohérentes avec celles de la littérature et celles obtenues par d'autres méthodes (voir le paragraphe 2.4.3).

#### 2.4.3. Nouvelles méthodes utilisant les états de spin

Cette nouvelle méthode est basée sur la différence de relaxation des deux composantes d'un doublet (ici  $N^\alpha$  et  $N^\beta$ ) aussi bien dans le plan transversal que longitudinalement (Goldman, 1984). L'évolution longitudinale des aimantations est suivie grâce à une expérience de type inversion-récupération (Vold et al., 1968; cf. paragraphe 2.2), et leur évolution dans le plan de mesure grâce à une expérience de type CPMG (Carr et Purcell, 1954; Meiboom et Gill, 1958; cf. paragraphe 2.2). On peut rappeler que pour un système de deux spins couplés, chaque spin se présente sous la forme d'un doublet d'éclatement  $J$  et centré sur la fréquence de résonance du spin considéré. Chaque branche correspond à un état

de l'autre spin,  $\alpha$  ou  $\beta$  (figure 2.35). Le couplage scalaire  $J$  peut être négatif, notamment pour des spins possédant des rapports gyromagnétiques de signes opposés et connectés par une liaison (c'est le cas pour le groupement amide NH des protéines) (Levitt, 2001). La contribution du couplage à l'énergie du système est alors négative si les polarisations des spins sont parallèles (positive si  $J>0$ ), et positive si les polarisations des spins sont anti-parallèles (négative si  $J<0$ ). Les positions des deux branches,  $\alpha$  et  $\beta$ , sont donc inversées selon que  $J$  est positif ou négatif (figure 2.35).



**figure 2.35** Effet du couplage scalaire  $J$  sur un système à deux spins A et X. (a) spins non couplés, (b) spins couplés par  $J$  avec  $J>0$ , (c) spins couplés par  $J$  avec  $J<0$ . En haut figurent les niveaux d'énergie (échelle non respectée), et en bas le spectre de A correspondant à chaque cas.

Le nombre de taches de corrélation apparaissant dans une carte à deux dimensions (édition du proton et de l'azote-15 de type HSQC) de protéines étant important, il n'est pas envisageable d'enregistrer ces expériences sans découplage du proton (pour visualiser simultanément les deux composantes de chaque doublet azote), cela reviendrait à multiplier le nombre de pics par deux. Il est donc nécessaire de réaliser une sélection physique des états de spin afin de suivre l'évolution de chacune des composantes du doublet de façon indépendante. Ceci a été rendu possible grâce à l'utilisation d'un filtre, noté  $S^2ED$  (*Spin State Echo Differentiation*), que nous avons développé au laboratoire (Bouguet-Bonnet et al., 2003). Il est basé sur le filtre  $S^3E$  (*Spin State Selective Excitation*) de Sørensen et collègues (Meissner et al., 1997a). La sélection est ici réalisée grâce à la phase particulière de l'impulsion d'angle  $\pi$  dans une

séquence d'écho de durée  $1/4J$ , au lieu d'une phase de  $45^\circ$  sur l'impulsion initiale à  $\pi/2$  dans le filtre de Sørensen (figure 2.36).

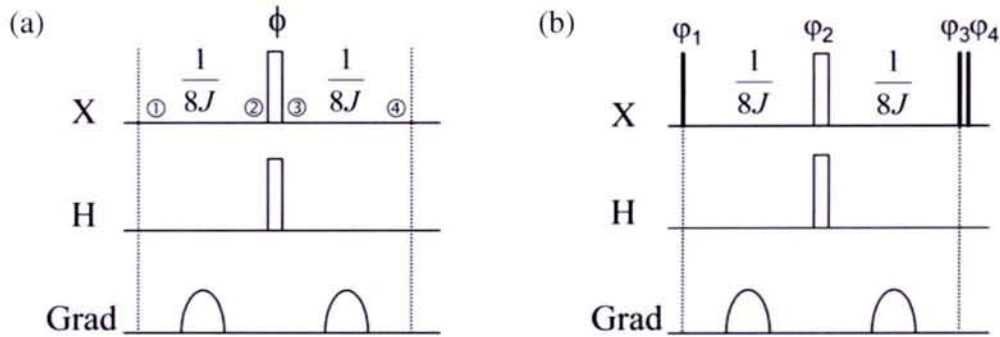


figure 2.36 Filtre  $S^2ED$  (*Spin State Echo Differentiation*) (a) et  $S^3E$  (*Spin State Selective Excitation*) (Meissner et al., 1997a) (b). Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à  $90^\circ$ , et les épais (vides) à des impulsions à  $180^\circ$ . Sauf indication contraire ( $\phi$ ,  $\phi_1$ ,  $\phi_2$ ,  $\phi_3$ ,  $\phi_4$ ), la phase des impulsions radio-fréquences est zéro (axe x du référentiel tournant). (a) La phase  $\phi$  est choisie de telle sorte ( $\phi=k\pi/8$  avec  $k$  entier et impair) que les deux branches du doublet sont facilement différenciées à la fin de l'écho (les deux vecteurs qui leur sont associés deviennent perpendiculaires). (b) Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(\pi/4 \ \pi/4 \ \pi/4 \ 5\pi/4)$ ,  $\phi_2=x$ ,  $\phi_3=(x \ y)$ ,  $\phi_4=(x \ y \ -x \ -y)$ ,  $acq_u=(x \ -x \ -x \ x)$  pour la sélection  $\alpha$  et  $acq_u=(x \ -x)$  pour la sélection  $\beta$ .

Le fonctionnement de ce filtre peut être décrit à l'aide d'une représentation vectorielle. On peut ainsi voir sur la figure 2.37 que les deux composantes ( $N^\alpha$  et  $N^\beta$ ) sont perpendiculaires à la fin de l'écho. Une simple impulsion d'angle  $\pi/2$  permet alors de discriminer les deux états en gardant l'un dans le plan de mesure, alors que l'autre est basculé selon  $\pm z$ .

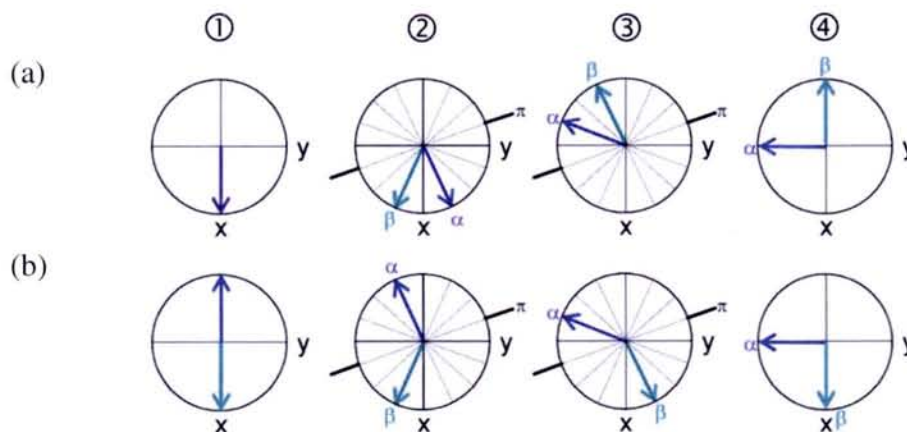


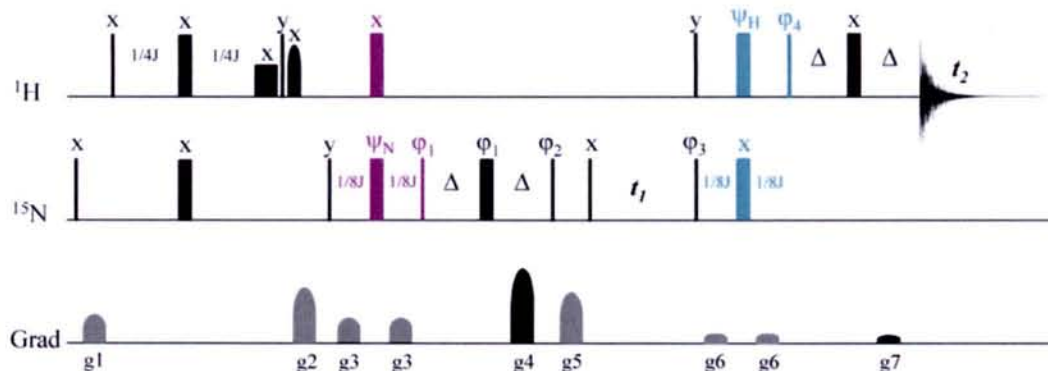
figure 2.37 Effet du filtre  $S^2ED$  sur des aimantations en configuration en-phase (a) et anti-phase (b). La numérotation correspond à celle présentée sur la figure 2.36a, le trait gras (étapes ② et ③) indique l'axe selon lequel a lieu l'impulsion d'angle  $\pi$  (ici la phase est égale à  $5\pi/8$ ) (cas où  $J$  est négatif, la branche  $\beta$  est en avance par rapport à la branche  $\alpha$ , cf figure 2.35).

Il est à noter que la phase particulière  $\phi$  à utiliser doit être égale à  $k\pi/8$ , où  $k$  est un nombre entier et impair. Le tableau 2.4 détaille les différentes possibilités de sélection en fonction de la phase  $\phi$  et de l'état de départ de l'aimantation.

		état initial	$\phi=3\pi/8$		$\phi=5\pi/8$	
			sélection selon x	sélection selon y	sélection selon x	sélection selon y
configuration en-phase	$X_x$	$-\alpha$	$\beta$	$-\beta$	$-\alpha$	
	$X_y$	$\beta$	$\alpha$	$-\alpha$	$\beta$	
	$-X_x$	$\alpha$	$-\beta$	$\beta$	$\alpha$	
	$-X_y$	$-\beta$	$-\alpha$	$\alpha$	$-\beta$	
configuration anti-phase	$2X_xH_z$	$\alpha$	$\beta$	$-\beta$	$\alpha$	
	$2X_yH_z$	$\beta$	$-\alpha$	$\alpha$	$\beta$	
	$-2X_xH_z$	$-\alpha$	$-\beta$	$\beta$	$-\alpha$	
	$-2X_yH_z$	$-\beta$	$\alpha$	$-\alpha$	$-\beta$	

tableau 2.4 Résultats de l'application du filtre  $S^2ED$  sur différents états initiaux et pour deux phases possibles de l'impulsion centrale (d'angle de basculement égal à  $180^\circ$ ).

Nous avons tout d'abord introduit ce filtre  $S^2ED$  dans une simple expérience de type HSQC (figure 2.38). La figure 2.39 montre le résultat de cette séquence utilisée sans découplage proton ni azote-15 (résultat obtenu le résidu G47 de l'ubiquitine). La corrélation entre proton et azote-15 apparaît alors sous la forme de quatre taches, dues à la formation d'un doublet aussi bien en proton qu'en azote. L'introduction de deux filtres  $S^2ED$  (en couleur sur la figure 2.38) dans la séquence notée  $\alpha/\beta$ -HSQC- $\alpha/\beta$  nous permet de sélectionner chacune de ces quatre taches en utilisant des phases appropriées. Le premier sélectionne les états de spin en azote ( $N^\alpha$  ou  $N^\beta$ ), et le deuxième en proton ( $H^\alpha$  ou  $H^\beta$ ).



**figure 2.38** Séquences  $\alpha/\beta$ -HSQC- $\alpha/\beta$ . Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à 90°, et les épaies à des impulsions à 180°. Les sous-séquences de sélection figurent en couleur : violet pour la sélection en azote-15, et vert pour la sélection en proton.  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique de l'azote-15 (modulation TPPI). G correspond aux impulsions de gradient de champ statique (en noir, ces impulsions sont utilisées pour la sélection des cohérences ; en gris, elles sont utilisées comme des purges) :  $g_1=7.5\%$ ,  $g_2=15\%$ ,  $g_3=6.5\%$ ,  $g_4=40\%$ ,  $g_5=13.5\%$ ,  $g_6=2.5\%$ ,  $g_7=4\%$  ( $g_7/g_4 = \gamma_N/\gamma_H$ ). Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(x\ x\ -x\ -x)$ ,  $\phi_2=8(-y)\ 8(y)$ ,  $\phi_3=(x\ -x)$ ,  $\phi_4=4(x)\ 4(-x)$ ,  $\text{acqu}=(x\ -x)$ , et sélection de l'état de spin avec  $\Psi_H$  et  $\Psi_N$  :  $\beta$ -HSQC- $\alpha$ , ( $\Psi_N=3\pi/8$ ,  $\Psi_H=5\pi/8$ ) ;  $\alpha$ -HSQC- $\alpha$ , ( $\Psi_N=3\pi/8$ ,  $\Psi_H=3\pi/8$ ) ;  $\beta$ -HSQC- $\beta$ , ( $\Psi_N=5\pi/8$ ,  $\Psi_H=5\pi/8$ ) ;  $\alpha$ -HSQC- $\beta$ , ( $\Psi_N=5\pi/8$ ,  $\Psi_H=3\pi/8$ ).  $J=91\text{Hz}$ .  $\Delta$  correspond à la somme du temps de montée, de la longueur et du temps de descente des gradients.

Cette sélection d'état de spin peut être utilisée pour la mesure de constantes de couplage scalaire homonucléaire (Sørensen et al., 1997a, 1997b; Meissner et al., 1997a, 1997b) et hétéronucléaire (Sørensen et al., 1997a; Meissner et al., 1997b; Meissner et Sørensen, 2000a, 2000b; Parella et Belloc, 2001), mais aussi pour des études de couplage dipolaire résiduel (Andersson et al., 1998a, 1998b; Ottiger et al., 1998; Lerche et al., 1999). Un autre champ d'applications important concerne les expériences TROSY (*Transverse Relaxation Optimised Spectroscopy*) (Pervushin et al., 1999 ; Riek et al., 2002). L'expérience consiste alors à sélectionner la branche du doublet qui relaxe le plus lentement (en raison de corrélation croisée), et donc qui est la plus fine, on obtient ainsi un gain important en résolution et en sensibilité pour les macromolécules de très grosse taille (ou plutôt possédant une dynamique de réorientation lente) et à haut champ (amplification du phénomène de corrélation croisée).

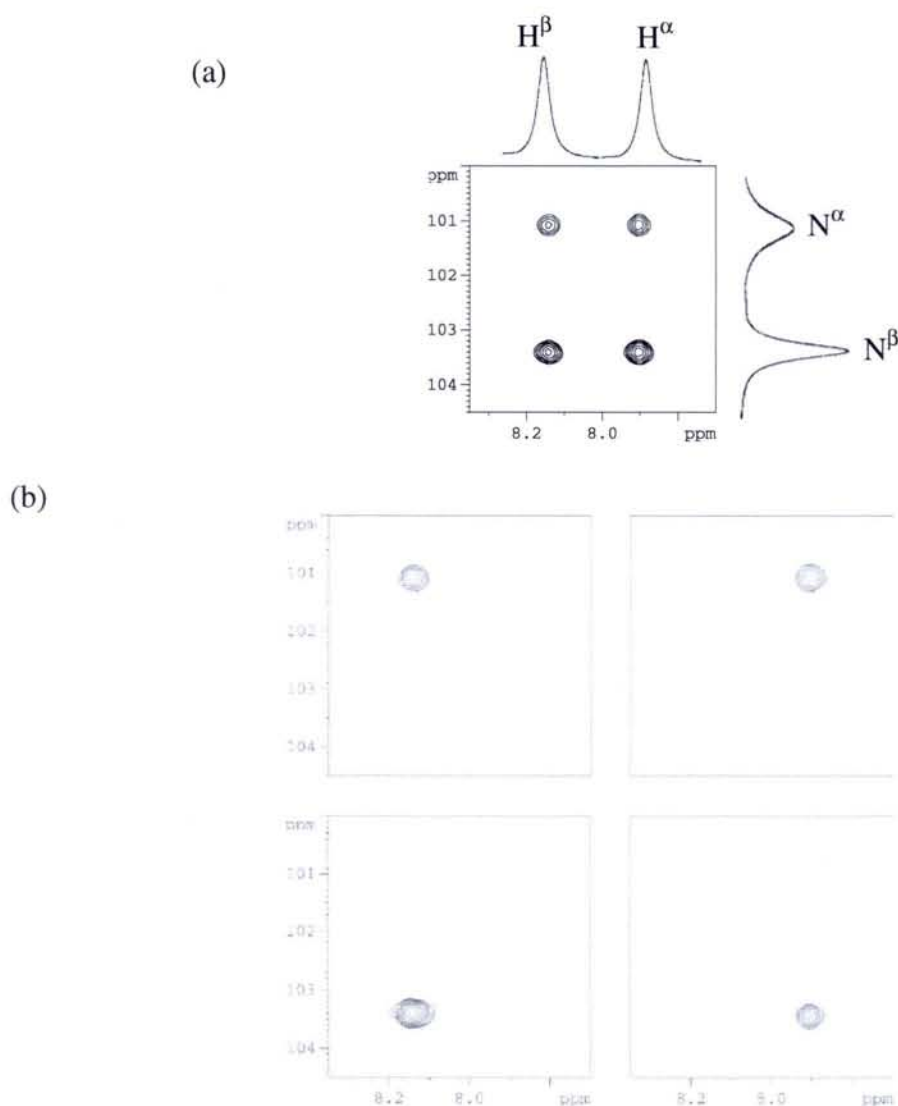


figure 2.39 Spectres obtenus sur le résidu G47 de l'ubiquitine (Bouguet-Bonnet et al., 2003). (a) HSQC usuelle sans découplage proton ni azote-15 (gauche), (b) spectres obtenus avec la séquence d'impulsions de la figure 2.38 :  $\beta$ -HSQC- $\alpha$  (en haut à gauche),  $\alpha$ -HSQC- $\alpha$  (en haut à droite),  $\beta$ -HSQC- $\beta$  (en bas à gauche), et  $\alpha$ -HSQC- $\beta$  (en bas à droite). Les mesures ont été effectuées à la température de 300K et à l'aide d'un spectromètre équipé d'un champ magnétique de 9.4T (résonance du proton à 400MHz). Nombre d'accumulations: 32, nombre de "dummy scans" (qui ne sont pas enregistrés): 8, temps de répétition: 1.5s, largeurs spectrales: 14ppm $\times$ 30ppm, nombre de points: 2048 $\times$ 256.

Les expériences décrites sur les figures 2.38 et 2.39 peuvent également être réalisées en découplant le proton (impulsion d'angle  $\pi$  en proton au milieu du temps d'évolution  $t_1$ ) et l'azote-15 (découplage CPD durant l'acquisition  $t_2$ ). Ceci permet d'obtenir les taches correspondant aux diverses sélections au même déplacement chimique que dans l'expérience HSQC classique. Cependant, cette sélection présente l'inconvénient d'être moins sensible (perte de la moitié du signal) que les expériences dans lesquelles on édite simultanément les deux états et pour lesquelles on recombine deux expériences (non découplées) entre elles (voir

par exemple la méthode IPAP, §2.4.1). Néanmoins, le fait de ne pas avoir recours à de telles recombinaisons est favorable dans le sens où il n'est pas nécessaire d'introduire d'éventuels facteurs de normation (voir par exemple l'article de Hall et al., 2003).

Nous avons inséré le filtre  $S^2ED$  dans les expériences standard de mesure d'autorelaxation longitudinale et transversale afin de suivre indépendamment l'évolution de  $N^\alpha$  et  $N^\beta$ . Marion et collègues ont également utilisé ce phénomène en éditant les branches  $\alpha$  et  $\beta$  des carbones-13,  $^{13}C^\alpha$  et  $^{13}C^\beta$ , dans deux expériences séparées (Boisbouvier et al., 1999). Cette technique permet de résoudre les problèmes de recouvrement que l'on rencontre dans des expériences sans découplage, et *ipso facto* d'éviter un traitement a posteriori des données. Les séquences utilisées sont présentées sur la figure 2.40. Le filtre  $S^2ED$  (en couleur sur la figure) est inséré après le transfert INEPT initial. L'impulsion à la fin de ce bloc permet :

- soit d'inverser une des composantes du doublet afin de suivre son évolution durant le temps de mélange  $\tau$ , l'autre composante est alors supprimée à l'aide de l'impulsion de gradients  $g_3$  (figure 2.40a, mesure de  $\eta_z$ ). Le cyclage de phase permet une décroissance de l'aimantation vers zéro (cf. mesure du T1, §2.2).
- soit de stocker une des composantes du doublet selon z pendant que l'autre est défocalisée par l'impulsion de gradients  $g_3$ , puis cette composante est ramenée dans le plan de mesure et sa décroissance est suivie durant un train d'impulsions CPMG.

La sélection est réalisée grâce à la phase de l'impulsion d'angle  $\pi$  en azote-15 au milieu du filtre :  $\Psi_N=5\pi/8$  (ou  $13\pi/8$ ) pour l'état  $\alpha$ , et  $\Psi_N=3\pi/8$  (ou  $11\pi/8$ ) pour l'état  $\beta$ .



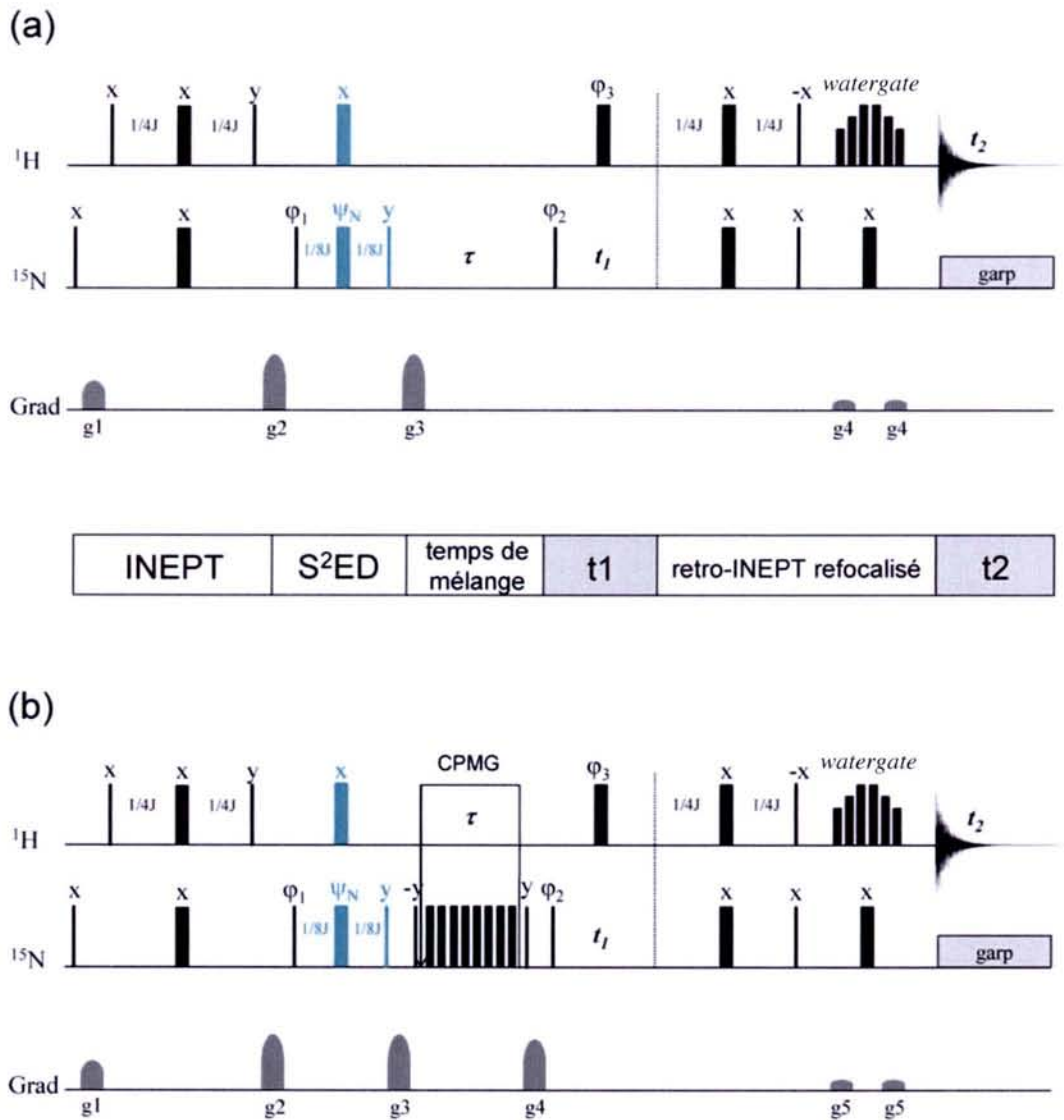


figure 2.40 Séquences de mesure de la corrélation croisée  $csa(^{15}N)/dipolaire(^{15}N^1H)$ . Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à  $90^\circ$ , et les épais à des impulsions à  $180^\circ$ .  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique de l'azote-15 (modulation States-TPPI, Marion et al., 1989).  $J=91\text{Hz}$ .  $G$  correspond aux impulsions de gradient de champ statique. (a) corrélation croisée longitudinale.  $g_1=40\%$  ( $800\mu\text{s}$ ),  $g_2=-40\%$  ( $800\mu\text{s}$ ),  $g_3=-13\%$  ( $1.6\text{ms}$ ),  $g_4=10\%$  ( $800\mu\text{s}$ ). Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(x-x)$ ,  $\phi_2=y$ ,  $\phi_3=(x-x-x-x)$ ,  $\Psi_N=4(13\pi/8)$ ,  $4(5\pi/8)$  ou  $\Psi_N=4(11\pi/8)$ ,  $4(3\pi/8)$  pour la sélection de  $N^\alpha$  ou  $N^\beta$  respectivement,  $acqu=(x-x)$ . (b) corrélation croisée transversale.  $g_1=40\%$  ( $800\mu\text{s}$ ),  $g_2=-40\%$  ( $800\mu\text{s}$ ),  $g_3=-13\%$  ( $1.6\text{ms}$ ),  $g_4=-26\%$  ( $1.6\text{ms}$ ),  $g_5=10\%$  ( $800\mu\text{s}$ ). Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(x-x)$ ,  $\phi_2=y$ ,  $\phi_3=(x-x-x-x)$ ,  $\Psi_N=4(13\pi/8)$ ,  $4(5\pi/8)$  ou  $\Psi_N=4(11\pi/8)$ ,  $4(3\pi/8)$  pour la sélection de  $N^\alpha$  ou  $N^\beta$  respectivement,  $acqu=(x-x)$ .

Après le marquage en déplacement chimique de l'azote-15, l'aimantation est convertie en une observable proton. Pour chaque mesure, deux séries d'expériences sont ainsi enregistrées : l'une correspond à l'évolution de  $N^\alpha$  et l'autre à  $N^\beta$ . Etant donné que les spectres peuvent être découplés dans les deux dimensions, l'analyse quantitative des pics est réalisée avec la même

carte d'intégration pour les deux séries d'expériences. Ceci assure un traitement identique des données.

### Corrélation croisée longitudinale

La figure 2.41 présente l'évolution typique de l'aimantation (amplitude des pics) longitudinale des deux états de spin en fonction du temps de mélange. Chaque point correspond à une expérience bidimensionnelle enregistrée à l'aide des séquences décrites précédemment (figure 2.40). Il apparaît clairement que leur comportement n'est pas monoexponentiel, notamment si l'on observe le comportement initial de la branche  $\beta$ .

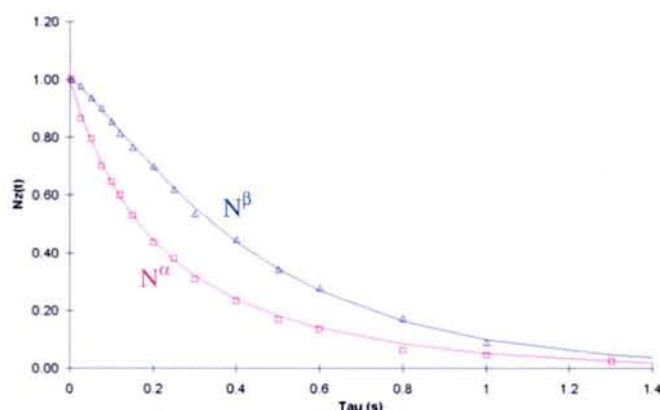


figure 2.41 Evolution des aimantations obtenues avec les séquences d'impulsion de la figure 2.40a, sur le résidu S20 de l'ubiquitine à 9.4T et 300K.

Pour décrire parfaitement cette évolution, il est nécessaire de tenir compte de plusieurs quantités :  $N_z$  (aimantation de l'azote-15),  $H_z^N$  (aimantation du proton amide, directement lié à l'azote) et  $H_z^{autre}$  (aimantation des autres protons situés dans l'environnement immédiat de l'azote, et qui sont modélisés par un proton fictif unique comme pour l'étude de l'effet Overhauser nucléaire, cf paragraphe 2.3.2). Ainsi, la base d'opérateurs est :

$$\{ N_z, H_z^N, H_z^{autre}, 2N_z H_z^N, 2N_z H_z^{autre}, 2H_z^N H_z^{autre}, 4N_z H_z^N H_z^{autre} \} \text{ (Wang et al., 2000).}$$

La matrice de relaxation "théorique" correspondante (calculée à l'aide des paramètres indiqués dans la légende du tableau) est présentée dans le tableau 2.5.

	$N_z$	$H_z^N$	$H_z^{autre}$	$2 N_z H_z^N$	$2 N_z H_z^{autre}$	$2 H_z^N H_z^{autre}$	$4 N_z H_z^N H_z^{autre}$
$N_z$	3.141	0.113	0.000	1.633	-0.014	0.000	-0.025
$H_z^N$		0.347	-0.139	-0.025	0.000	-0.003	0.004
$H_z^{autre}$			0.151	0.000	-0.001	0.006	0.000
$2 N_z H_z^N$				3.201	-0.164	0.004	-0.017
$2 N_z H_z^{autre}$					2.652	0.000	1.639
$2 H_z^N H_z^{autre}$						2.093	-0.025
$4 N_z H_z^N H_z^{autre}$							3.064

**tableau 2.5** Matrice de relaxation longitudinale complète du système à trois spins N,  $H^N$ , et  $H^{autre}$ . Les calculs sont menés avec les équations présentées au chapitre 1 et avec les données suivantes :  $B_0=9.4T$ , dynamique de réorientation dans un modèle Lipari-Szabo ( $\tau_s=4.5 \cdot 10^{-9}s$ ,  $\tau_f=3 \cdot 10^{-10}s$  et  $S^2=0.85$ ), anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15=-170ppm (angle de  $22^\circ$  par rapport au vecteur NH) et du proton=-10ppm. Les distances utilisées sont  $r_{NH^N}=1.02\text{\AA}$ ,  $r_{NH^{autre}}=3.3\text{\AA}$ ,  $r_{H^N H^{autre}}=3.4\text{\AA}$ . Voir l'annexe A2.4 pour un détail de ces calculs.

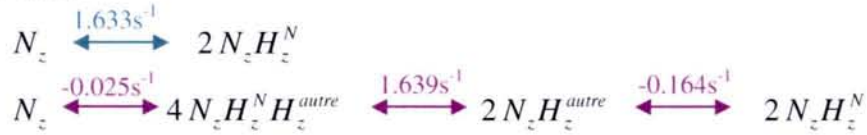
D'après cette matrice (tableau 2.5) et comme suggéré par Wang et al. en 2000, il apparaît clairement que l'on peut réduire le système à  $\{ N_z, 2 N_z H_z^N, 2 N_z H_z^{autre}, 4 N_z H_z^N H_z^{autre} \}$  (tableau 2.6). En effet, les termes croisés entre  $N_z$  et  $H_z^{autre}$ , et  $N_z$  et  $2 H_z^N H_z^{autre}$  sont négligeables.

	$N_z$	$2 N_z H_z^N$	$2 N_z H_z^{autre}$	$4 N_z H_z^N H_z^{autre}$
$N_z$	3.141	1.633	-0.014	-0.025
$2 N_z H_z^N$		3.201	-0.164	-0.017
$2 N_z H_z^{autre}$			2.652	1.639
$4 N_z H_z^N H_z^{autre}$				3.064

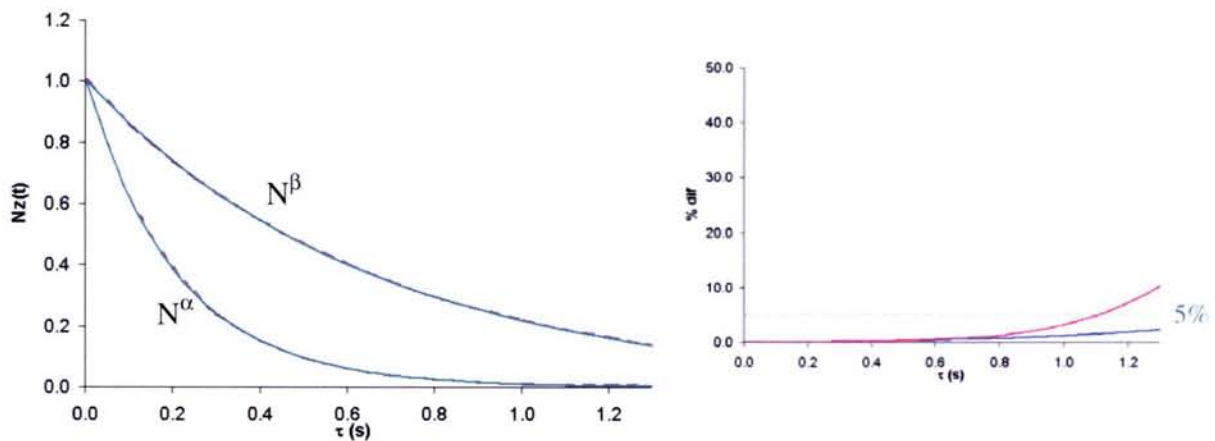
**tableau 2.6** Matrice de relaxation longitudinale pertinente du système à trois spins N,  $H^N$ , et  $H^{autre}$ , obtenue à partir des données du tableau 2.5.

Il apparaît alors que  $N_z$  et  $2 N_z H_z^N$  sont liés par deux processus de relaxation. Le premier correspond à la corrélation croisée entre l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 et l'interaction dipolaire NH (la valeur apparaît en vert dans le tableau 2.6). Et le deuxième correspond à un processus que nous qualifierons de diffusion de spin, les termes intervenant

ici apparaissent en violet dans le tableau 2.6. Les cheminements peuvent être visualisés comme suit :



Nous avons simulé l'évolution des grandeurs intervenant dans notre expérience (séquence d'impulsions de la figure 2.40a) à l'aide de deux systèmes : le premier correspond à  $\{N_z, 2N_zH_z^N\}$  (il ne fait donc intervenir que le terme de corrélation croisée entre  $N_z$  et  $2N_zH_z^N$ ), et le second correspond à  $\{N_z, H_z^N, H_z^{autre}, 2N_zH_z^N, 2N_zH_z^{autre}, 2H_z^N H_z^{autre}, 4N_zH_z^N H_z^{autre}\}$  (au terme d'interférence, se superpose alors la diffusion de spin décrite précédemment). Les courbes résultantes apparaissent dans la figure 2.42, elles ont été obtenues grâce à un programme écrit avec le logiciel Matlab (Hanselman et Littlefield, 2000).



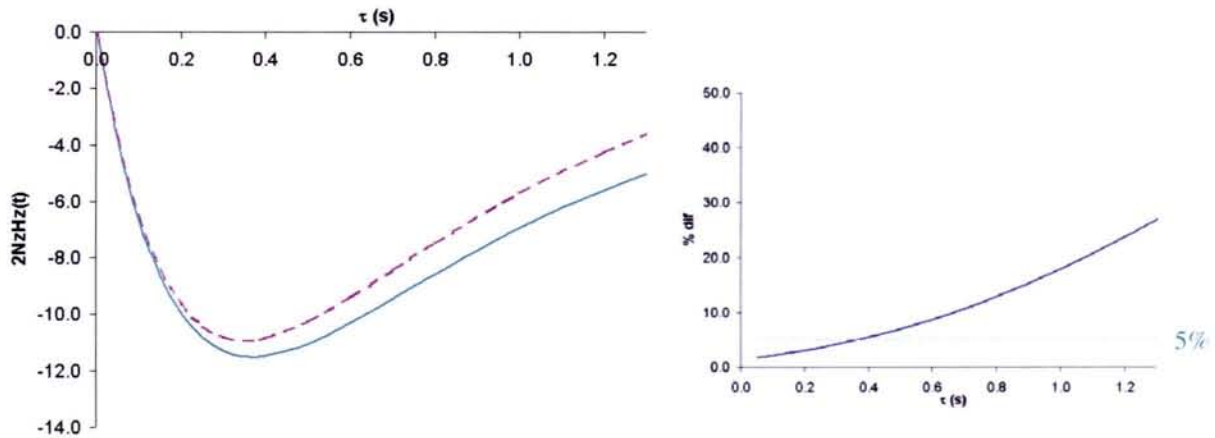
**figure 2.42** Simulations de l'évolution des aimantations obtenues avec la séquence de la figure 2.40a. En pointillés et violet apparaissent les courbes obtenues en utilisant le système complet de relaxation longitudinale (tableau 2.5), alors qu'en traits pleins et verts apparaissent les courbes obtenues avec le système réduit  $\{N_z, 2N_zH_z^N\}$ . La différence entre les courbes étant faible, la partie de droite présente les différences obtenues en utilisant les deux systèmes de spin (%): en rose pour la branche  $\alpha$  et en bleu pour la branche  $\beta$  (en pointillés verts est représentée la valeur 5%).

Il apparaît alors que le phénomène de diffusion de spin est négligeable lorsque la séquence de la figure 2.40a est utilisée. Ceci s'explique par les conditions initiales qui interviennent dans nos séquences :

$$N_z(0) = \frac{H_{eq}}{2} \quad \text{et} \quad 2N_zH_z(0) = \pm \frac{H_{eq}}{2} \quad \text{pour les branches } \alpha_{\beta}, \text{ respectivement.}$$

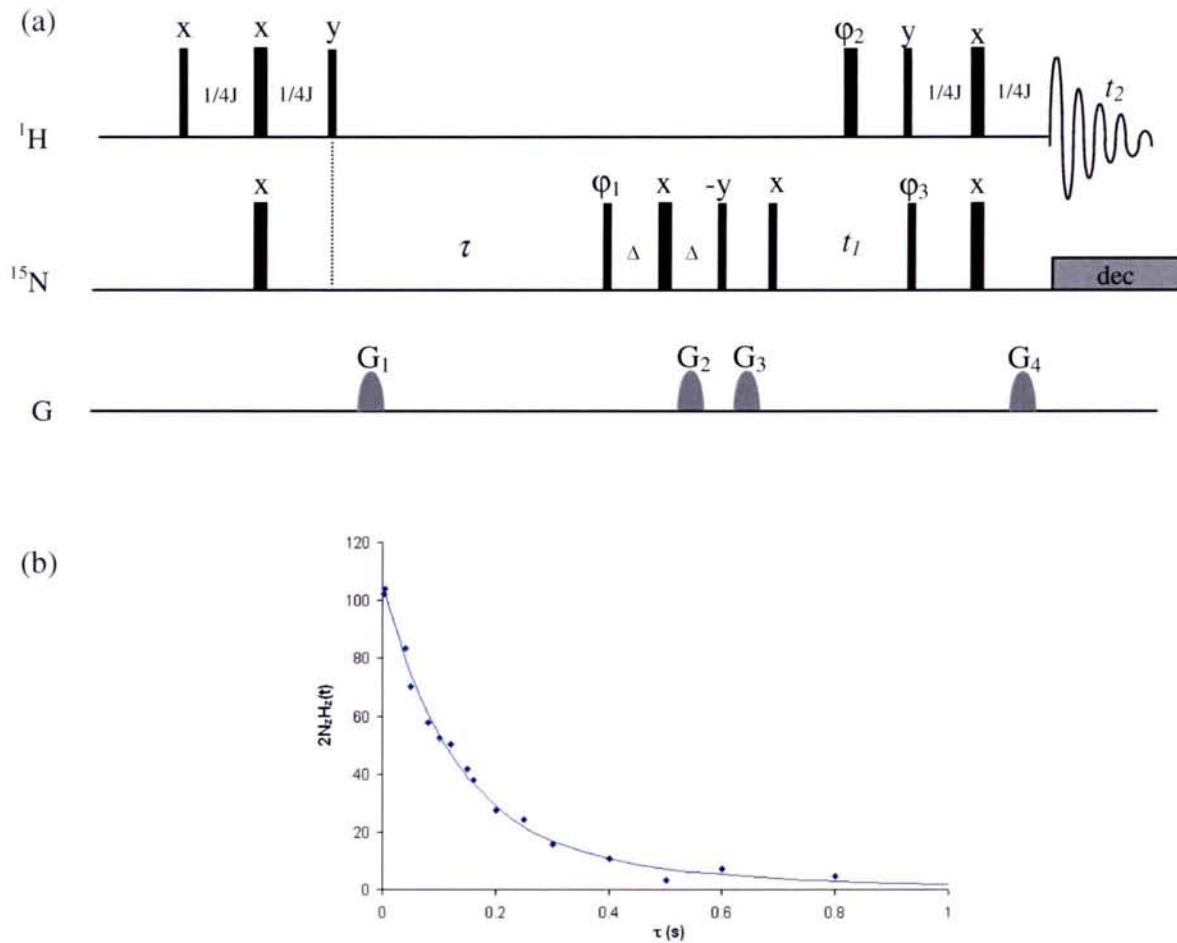
On peut remarquer que, pour les expériences correspondant à la création de  $2N_zH_z$  à partir de l'inversion de l'aimantation de l'azote-15 (voir le paragraphe 2.4.2 ou Wang et al., 2000), la diffusion de spin intervient de façon plus importante (figure 2.43). Les conditions initiales du système de spins sont alors :  $N_z(0)=-H_{eq}$  et  $2N_zH_z(0)=0$ .

Ce type d'expérience implique obligatoirement de limiter les mesures à des temps de mélange courts et d'exploiter celle-ci en terme de comportement initial.



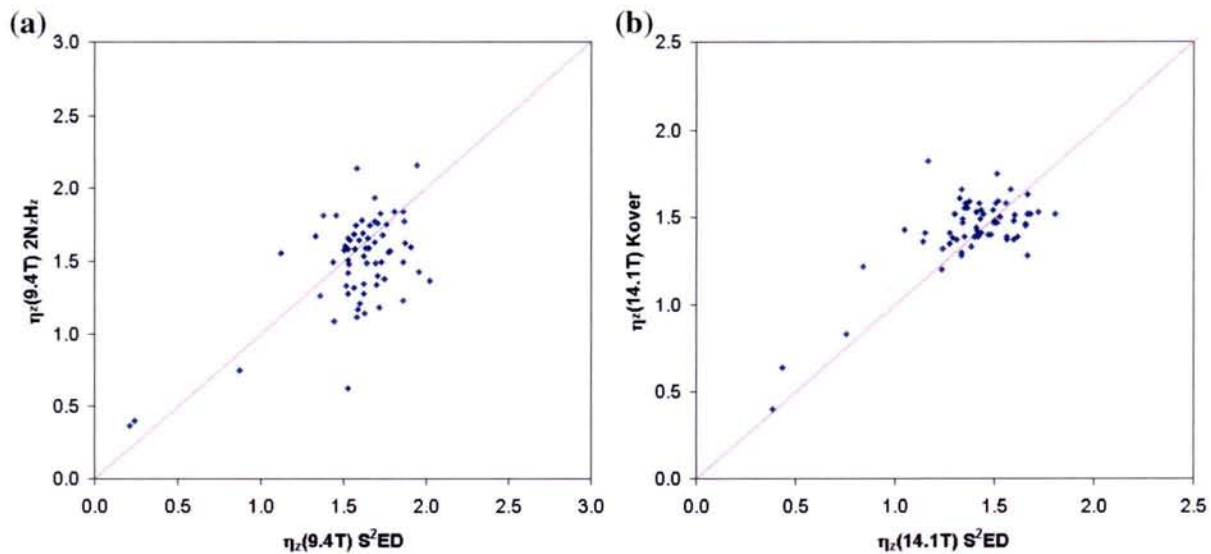
**figure 2.43** Simulations de l'évolution de l'ordre longitudinal obtenues avec la séquence de la figure 2.33. En pointillé et violet apparaît la courbe obtenue en utilisant le système complet de relaxation longitudinale (tableau 2.5), alors qu'en trait plein et vert apparaît la courbe obtenue avec le système réduit  $\{N_z, 2N_zH_z^N\}$ . A droite figure la différence obtenue en utilisant les deux systèmes de spin (%) (en pointillés verts est représentée la valeur 5%).

A contrario, l'exploitation des courbes d'édification obtenues ici (figure 2.41) a pu être réalisée en utilisant un système réduit à deux spins :  $N_z$  et  $2N_zH_z$ ; la résolution analytique est présentée en annexe de ce chapitre. Les vitesses d'autorelaxation de l'azote-15 ( $N_z$ ) ont été mesurées par ailleurs et fixées pour l'ajustement des données. Plutôt que d'introduire une valeur de l'autorelaxation de l'ordre longitudinal  $2N_zH_z$ , nous avons enregistré son évolution sans supprimer les effets de corrélation croisée. La séquence de la figure 2.44a ne présente donc pas d'impulsion d'angle  $\pi$  sur le proton au milieu du temps de mélange  $\tau$ . La courbe de relaxation de  $2N_zH_z$  avec corrélation croisée (figure 2.44b) est alors ajustée simultanément avec les courbes de la figure 2.41.



**figure 2.44 (a)** Séquence permettant de suivre le retour à l'équilibre de l'ordre longitudinal  $2N_z H_z$ . Les traits verticaux représentent les impulsions radiofréquence: les fins correspondent à des impulsions à  $90^\circ$ , et les épais à des impulsions à  $180^\circ$ .  $t_1$  est le temps incrémentable qui permet le marquage en déplacement chimique de l'azote-15 (modulation TPPI). G correspond aux impulsions de gradient de champ statique :  $G_1=13\%$ ,  $G_2=80\%$ ,  $G_3=30\%$ ,  $G_4=8.1\%$  ( $G_4/G_2 = \gamma_N/\gamma_H$ ). Le cyclage de phase utilisé est :  $\phi_1=(y y y y -y -y -y -y)$ ,  $\phi_2=(x x -x -x)$ ,  $\phi_3=(x -x)$ ,  $\text{acqu}=(x -x x -x -x x -x x)$ .  $J=91\text{Hz}$ .  $\tau$  est le temps de mélange. Le découplage est de type GARP (Shaka et al., 1985).  $\Delta$  correspond à la somme du temps de montée, de la longueur et du temps de descente des gradients. (b) Courbe d'évolution correspondante obtenue sur un échantillon d'ubiquitine enrichi en  $^{15}\text{N}$  à 400MHz (résidu S20). Le nombre d'accumulations est de 16, le temps d'attente étant de 2s. 16 temps de mélange ont été utilisés de 2ms à 0.8ms.

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux publiés précédemment (Köver et Batta, 2001), et avec ceux obtenus par la méthode présentée au paragraphe 2.4.2. La figure 2.45 montre les corrélations entre ces divers résultats à 9.4 et 14.1T.



**figure 2.45** Corrélation entre les valeurs de corrélation croisée longitudinale  $\text{csa } ^{15}\text{N}/\text{dipolaire } ^{15}\text{N}^1\text{H}$  obtenues avec différentes méthodes sur un échantillon d'ubiquitine. (a) valeurs obtenues par la méthode présentée au paragraphe 2.4.2 en fonction des valeurs obtenues par la sélection d'états de spins, à 9.4T. (b) valeurs présentées par Köver et Batta en 2001 en fonction des valeurs obtenues par la sélection d'états de spins, à 14.1T.

Cependant, la deuxième méthode que nous présentons ici pour la mesure de la corrélation croisée longitudinale (méthode par sélection d'états de spins) semble être plus sûre que la méthode présentée précédemment (étude du comportement initial de l'ordre longitudinal à la suite de l'inversion de l'aimantation du noyau X). En effet, nous avons montré que les phénomènes de diffusion de spin sont négligeables lors de l'utilisation du filtre  $\text{S}^2\text{ED}$ , alors qu'ils nous obligeaient à ne considérer que le comportement initial de l'ordre longitudinal, ces effets provenant des conditions initiales du système de spin. Nous avons ainsi choisi de garder les valeurs de corrélation croisée mesurées avec la méthode par sélection d'états de spins (séquence d'impulsions de la figure 2.40a) dans la suite de l'exposé.

### *Corrélation croisée transversale*

Les courbes obtenues pour la mesure de la corrélation croisée transversale (séquences d'impulsions de la figure 2.40b) sont présentées sur la figure 2.46.

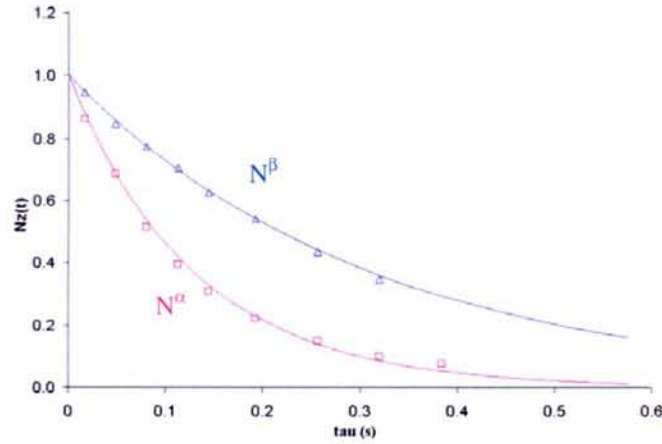


figure 2.46 Evolution des aimantations obtenues avec les séquences d'impulsion de la figure 2.40b, sur le résidu S20 de l'ubiquitine à 9.4T et 300K.

Comme cela a été précédemment décrit (Goldman, 1984; Boisbouvier et al., 1999), la relaxation dans le plan de mesure est gouvernée par :

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_+ \\ 2N_+H_z \end{pmatrix} = -R \begin{pmatrix} N_+ \\ 2N_+H_z \end{pmatrix} \quad \text{avec } R = \begin{pmatrix} R_2^N & \frac{\eta_{x,y}}{2} + i\pi J_{NH} \\ \frac{\eta_{x,y}}{2} + i\pi J_{NH} & R_2^{NH} \end{pmatrix}$$

$R_2^N$  et  $R_2^{NH}$  étant les vitesses d'autorelaxation transversale de  $N_+$  et  $2N_+H_z$  respectivement (où  $N_+$  indique la composante transversale de l'aimantation  $N$ ),  $\eta_{x,y}$  la corrélation croisée csa/dipolaire transversale, et  $J_{NH}$  la constante de couplage scalaire à une liaison entre le noyau azote et son proton amide.

Ces équations peuvent être exprimées sur la base des opérateurs  $N_+^\alpha = \frac{1}{2}(N_+ + 2N_+H_z)$  et

$$N_+^\beta = \frac{1}{2}(N_+ - 2N_+H_z):$$

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_+^\alpha \\ N_+^\beta \end{pmatrix} = -R' \begin{pmatrix} N_+^\alpha \\ N_+^\beta \end{pmatrix} \quad \text{avec } R' = \begin{pmatrix} \overline{R_2} + \frac{\eta_{x,y}}{2} - i\pi J_{NH} & \Delta R_2 \\ \Delta R_2 & \overline{R_2} - \frac{\eta_{x,y}}{2} + i\pi J_{NH} \end{pmatrix}$$

$$\text{et } \overline{R_2} = \frac{1}{2}(R_2^N + R_2^{NH}), \quad \Delta R_2 = \frac{1}{2}(R_2^N - R_2^{NH}).$$



Il apparaît alors que la différence entre les éléments diagonaux ( $\eta_{x,y} + 2i\pi J_{NH}$ ) est très supérieure à  $\Delta R_2$ , les éléments hors diagonaux peuvent donc être négligés (Goldman, 1984). L'évolution des deux branches du doublet  $N_+^\alpha$  et  $N_+^\beta$  est ainsi monoexponentielle dans le plan de mesure. Le système pouvant se simplifier en :

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} N_+^\alpha \\ N_+^\beta \end{pmatrix} = -R'' \begin{pmatrix} N_+^\alpha \\ N_+^\beta \end{pmatrix} \quad \text{avec } R'' = \begin{pmatrix} \overline{R}_2 + \frac{\eta_{x,y}}{2} & 0 \\ 0 & \overline{R}_2 - \frac{\eta_{x,y}}{2} \end{pmatrix}$$

Le terme d'interférence  $\eta_{xy}$  est obtenu par la différence entre les vitesses de relaxation apparente de chacune des composantes du doublet:

$$\left. \begin{aligned} R_2^\alpha &= \overline{R}_2 + \frac{\eta_{xy}}{2} \\ R_2^\beta &= \overline{R}_2 - \frac{\eta_{xy}}{2} \end{aligned} \right\} \eta_{xy} = R_2^\alpha - R_2^\beta$$

Il est important de remarquer que les deux expériences (mesures des vitesses de relaxation apparente de  $N_+^\alpha$  et de  $N_+^\beta$ ) sont indépendantes, aucun traitement particulier des spectres et aucune recombinaison des données ne sont nécessaires comme c'est le cas pour beaucoup d'autres méthodes de mesures (Tjandra et al., 1996; Tessari et al., 1997; Hall et al., 2003a; Pelupessy et al., 2003).

Comme le montre la figure 2.47, les résultats obtenus sont en bon accord avec ceux publiés précédemment (Köver et Batta, 2001).

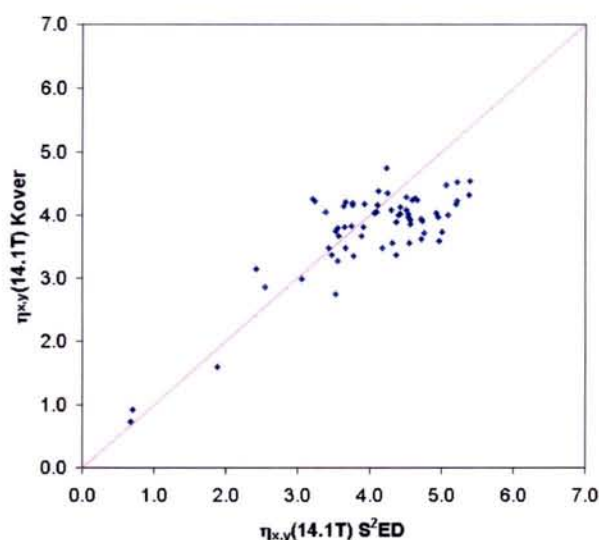


figure 2.47 Corrélation entre les valeurs de corrélation croisée transversale  $csa$   $^{15}\text{N}$ /dipolaire  $^{15}\text{N}^1\text{H}$  obtenues avec différentes méthodes sur un échantillon d'ubiquitine : valeurs présentées par Köver et Batta en 2001 en fonction des valeurs obtenues par la sélection d'états de spins, à 14.1T.

Comme nous l'avons présenté ci-dessus, les résultats obtenus à l'aide de la nouvelle méthode de mesure de la corrélation croisée par sélection d'état de spin sont cohérents avec ceux présentés dans la littérature. Il est également important de signaler que  $\eta_{x,y}$  est proportionnel à  $R_2$  (et  $\eta_z$  à  $R_1$ ) comme Fushman et Cowburn le prédisent (Fushman et Cowburn, 1998; Fushman et al., 1998).

La plupart des méthodes utilisées pour la mesure de la corrélation croisée  $csa$ /dipolaire nécessite l'enregistrement de deux expériences séparées : cette mesure dépend de nombreux facteurs comme cela a été mis en évidence dans de récents articles (Hall et al., 2003a, 2003b; Pelupessy et al., 2003). D'une part les deux séquences doivent être quasiment identiques pour éviter des facteurs d'échelles entre les deux expériences, d'autre part il faut pouvoir résoudre le problème de recouvrement des signaux dans les cartes à deux dimensions. Les séquences présentées ici satisfont entièrement à ces exigences. Seul le changement de la phase d'une impulsion à  $180^\circ$  permet de sélectionner l'état  $\alpha$  ou l'état  $\beta$  du noyau à étudier, de plus, cette sélection est directe et ne nécessite pas de recombinaisons de spectres.

Cependant, comme nous l'avons déjà précisé précédemment, cette sélection présente l'inconvénient d'être moins sensible (perte de la moitié du signal) que les expériences dans lesquelles on édite simultanément les deux états et pour lesquelles on recombine deux expériences (non découplées) entre elles (voir par exemple la méthode IPAP, paragraphe 2.4.1). Néanmoins, le fait de ne pas avoir recours à de telles recombinaisons est favorable

dans le sens où il n'est pas nécessaire d'introduire d'éventuels facteurs de normation (voir par exemple l'article de Hall et al., 2003).

### 2.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons introduit les différentes méthodes de mesure des paramètres de relaxation de l'azote-15 dans des protéines enrichies. Nous avons vu que les séquences d'impulsions comportent des particularités propres à l'étude de tels systèmes (transferts de polarisation, élimination du pic de l'eau). Pour chacune des expériences, nous avons détaillé l'art et la manière d'exploiter les courbes expérimentales traduisant le retour à l'équilibre du système après perturbation. Nous avons également pu appréhender le phénomène de diffusion de spin qui est très important dans les macromolécules, et prendre en compte ce paramètre dans l'exploitation des mesures. Mais la partie originale exposée dans ce chapitre concerne la détermination des paramètres de corrélation croisée. Nous avons présenté deux approches qui diffèrent de par la manière dont nous regardons la modification de l'ordre longitudinal dans un système XH. La première est basée sur l'édification de l'ordre longitudinal à partir de l'inversion de l'aimantation du noyau X et constitue une mesure directe de la corrélation croisée longitudinale. La seconde est basée sur la différence d'évolution des deux branches d'un doublet X. L'utilisation du filtre S<sup>2</sup>ED nous a permis de suivre séparément l'évolution de chacune des branches (longitudinalement et dans le plan transverse). Elle permet d'une part d'éviter les problèmes de recouvrement des signaux dans des spectres non découplés (ceci de manière directe, sans nécessiter de recombinaisons de spectres), et d'autre part assure l'utilisation de séquences quasiment identiques (nombres d'impulsions, délais...) et évite ainsi l'introduction de facteurs d'échelle entre les deux expériences. Enfin, nous verrons dans le chapitre 3 tout l'intérêt qu'apportent ces paramètres de corrélation croisée dans l'étude de la dynamique des protéines en solution.

Bibliographie du chapitre 2

- Abragam, A. (1961) "*The principles of nuclear magnetism*", Clarendon Press: Oxford.
- Andersson, P., Norstrand K., Sunnerhagen M., Liepinsh E., Turovskis I. et Otting G. (1998a) *J.Biomol.NMR* **11**, 445-450.
- Andersson, P., Weigelt J. et Otting G. (1998a) *J.Biomol.NMR* **12**, 435-441.
- Barbato G., Ikura M., Kay L.E., Pastor RW. et Bax A. (1992) *Biochem* **31**, 5269-5278.
- Barker P. et Freeman R. (1985) *J.Magn.Reson.* **64**, 334-338.
- Bax A., Jong P.G.D., Mehlkopf A.F. et Smidt J. (1980) *Chem.Phys.lett.* **69**, 567-570.
- Bax A. (1982) *J.Magn.Reson.* **53**, 517-520.
- Bax A. et Summers M.F. (1986) *J.Am.Chem.Soc.* **108**, 2093-2094.
- Bax A., Pochapsky S.S. (1992) *J.Magn.Reson.* **99**, 638-643.
- Bloembergen N. et Pound R.V. (1954) *Phys. Rev.* **95**, 8-12.
- Bodenhausen G. et Ruben D.J. (1980) *Chem.Phys.lett.* **69**, 185-189.
- Bodenhausen G. et Ernst R.R. (1981) *J.Magn.Reson.* **45**, 367-373.
- Bodenhausen G. et Ernst R.R. (1982) *J.Am.Chem.Soc.* **104**, 1304-1309.
- Boibouvier J., Brutscher B., Simorre J.P. et Marion D. (1999) *J.Biomol.NMR* **14**, 241-252.
- Bouguet-Bonnet S., Mutzenhardt P. et Canet D. (2003) *Magn.Reson.Chem* **41**, 1030-1033.
- Boyd J., Hommel U. et Campbell I.D. (1990) *Chem.Phys.lett.* **175**, 477-482.
- Boyd J., Soffe N., John B.K., Plant D. et Hurd R.E. (1992) *J.Magn.Reson.* **98**, 660-664.
- Brutscher B. (2000) *Concepts Magn.Reson. A* **12**, 207-229.
- Canet D. (1989) *Prog.NMR Spectrosc.* **21**, 237-291.
- Canet D., Python H., Grandclaude D. et Mutzenhardt P. (1996) *J.Magn.Reson. A* **122**, 204-208.
- Canet D., Boubel J.-C., Canet Soulas E. (2002) "*La RMN. Concepts, methods et applications*" 2<sup>e</sup> édition, Dunod: Paris.
- Carr H.Y. et Purcell E.M. (1954) *Phys.Rev.* **94**, 630-632.
- Cavanagh J., Palmer III A.G., Wright P.E. et Rance M. (1991) *J.Magn.Reson.* **91**, 429-436.
- Dalhuin C., Wieruszkeski J.M., Lippens G. (1996) *J.Magn.Reson.B* **111**, 168-170.
- Damberg P., Jarvet J., Allard P. et Graslund A. (1999) *J.Biomol.NMR* **15**, 27-37.
- Davis A.L., Laue E.D., Keeler J., Moskau D. et Lohman J. (1991) *J.Magn.Reson.* **94**, 637-644.
- Davis A.L., Keeler J. et Laue E.D. (1992) *J.Magn.Reson.* **98**, 207-216.
- Freeman R. et Hill H.D.W. (1971) *J.Chem.Phys.* **54**, 3367-3377.

- Furo I., Mutzenhardt P. et Canet D. (1995) *J.Am.Chem.Soc.* **117**, 10405-10406.
- Fushman D. et Cowburn D. (1998) *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 7109-7110.
- Fushman D., Tjandra N. et Cowburn D. (1998) *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 10947-10952.
- Garbow J.R., Weitekamp D.P. et Pines A. (1982) *Chem.Phys.lett.* **93**, 504-509.
- Ghose R., Huang K. et Prestegard J.H. (1998) *J.Magn.Reson.* **135**, 487-499.
- Goldman M. (1984) *J.Magn.Reson.* **60**, 437-452.
- Grzesiek S. et Bax A. (1993) *J.Am.Chem.Soc.* **115**, 12593-12594.
- Guenneau F. (1999) *thèse de doctorat* de l'université Henri Poincaré, Nancy, France.
- Guéron M. et Plateu P. (1982) *J.Am.Chem.Soc.* **104**, 7310-7311.
- Guéron M., Plateu P. et Decorps M. (1991) *Prog. NMR Spectrosc.* **23**, 135-209.
- Hall J.B., Dayie K.T. et Fushman D. (2003a) *J.Biomol.NMR* **26**, 181-186.
- Hall J.B. et Fushman D. (2003b) *Magn.Reson.Chem* **41**, 837-842.
- Hanselman D.C., Littlefield B.C. (2000) "*Mastering Matlab 6: A Comprehensive Tutorial and Reference*", Prentice Hall: New Jersey.
- Hore P.J. (1989) *Methods Enzym.* **176**, 64-89.
- Jaccard G., Winperis S., Bodenhausen G. (1987) *Chem. Phys. Lett.* **138**, 601-606.
- Kay L.E., Torchia D.A. et Bax A. (1989) *Biochem* **28**, 8972-8979.
- Kay L.E., Keifer P., Saarinen T. (1992a) *J.Am.Chem.Soc.* **114**, 10663-10665.
- Kay L.E., Nicholson L.K., Delaglio F., Bax A. et Torchia D.A. (1992b) *J.Magn.Reson.* **97**, 359-375.
- Kojima C., Ono A., Kainosho M. Et James T.L. (1999) *J.Magn.Reson.* **136**, 169-175.
- Köver K.E. et Batta G. (2001) *J.Magn.Reson.* **150**, 137-146.
- Kroenke C.D., Loria J.P., Lee L.K., Rance M. et Palmer III A.G. (1998) *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 7905-7915.
- Leclerc S., Bouguet-Bonnet S., Mutzenhardt P., Brondeau J., Canet D. (2003) *Magn.Reson.Chem* **41**, 769-775.
- Lerche M.H., Meissner A., Poulsen F.M. et Sørensen O.W. (1999) *J.Magn.Reson.* **140**, 259-263.
- Levitt M.H. (2001) "*Spin dynamics. Basics of Nuclear Magnetic Resonance*", Wiley: Chichester.
- Marion D., Ikura M., Tschudin R., Bax A. (1989) *J.Magn.Reson.* **85**, 393-399.
- Markley, J.L., Horsley, W.J. et Klein, M.P. (1971) *J. Chem. Phys.*, **55**, 3604-3605.
- Meiboom S. et Gill D. (1958) *Rev.Sci.Instrum.* **29**, 688-691.
- Meissner A., Duus J.Ø. et Sørensen O.W. (1997a) *J.Magn.Reson.* **128**, 92-97.

- Meissner A., Duus J.Ø. et Sørensen O.W. (1997b) *J.Biomol.NMR* **10**, 89-94.
- Meissner A. et Sørensen O.W. (2000a) *J.Magn.Reson.* **143**, 387-390.
- Meissner A. et Sørensen O.W. (2000a) *J.Magn.Reson.* **143**, 431-434.
- Morris G.A. et Freeman R. (1979) *J.Am.Chem.Soc.* **101**, 760-762.
- Mutzenhardt P. et Bodenhausen G. (1998) *J.Magn.Reson.* **132**, 159-161.
- Mutzenhardt P., Walker O., Canet D., Haloui E., Furo I. (1998) *Mol. Phys.* **94**, 565-569.
- Neuhaus D. et Williamson M.P. (1989) "The Nuclear Overhauser Effect in structural and conformational analysis", Verlag Chemie: New York.
- Ogg R.J., Kingsley P.B. et Taylor J.S. (1994) *J.Magn.Reson.B* **104**, 1-10.
- Ottiger M., Delaglio F. et Bax A. (1998) *J.Magn.Reson.* **131**, 373-378.
- Palmer III A.G., Cavanagh J., Wright P.E. et Rance M. (1991) *J.Magn.Reson.* **93**, 151-170.
- Palmer III A.G., Skelton N.J., Chazin W.J., Wright P.E. et Rance M. (1992) *Mol.Phys.* **75**, 699-711.
- Palmer III A.G., Cavanagh J., Byrd R.A. et Rance M. (1994) *J.Magn.Reson.* **96**, 416-424.
- Parella T. et Belloc, J. (2001) *J.Magn.Reson.* **148**, 78-87.
- Pelupessy P., Espallargas G.M. et Bodenhausen G. (2003) *J.Magn.Reson.* **161**, 259-264.
- Peng J.W., Thanabal V. et Wagner G. (1991a) *J.Magn.Reson.* **94**, 82-100.
- Peng J.W., Thanabal V. et Wagner G. (1991b) *J.Magn.Reson.* **95**, 421-427.
- Peng J.W. et Wagner G. (1992a) *Biochem.* **31**, 8571-8586.
- Peng J.W. et Wagner G. (1992b) *J.Magn.Reson.* **98**, 308-332.
- Pervushin K.V., Wider G., Riek R. et Wüthrich K. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**, 9607-9612.
- Piotto M., Saudek V. et Sklenar V. (1992) *J.Biomol.NMR* **2**, 661-666.
- Price W.S. (1999) *Ann.Rep.NMR spectrosc.* **38**, 289-354.
- Riek R., Fiaux J., Bertelsen E.B., Horwich A.L. et Wüthrich K. (2002) *J.Am.Chem.Soc.* **124**, 12144-12153.
- Saudek V., Piotto M. et Sklenar V. (1994) *Bruker Report* 6.
- Schleucher J., Sattler M. et Griesinger C. (1993) *Angew. Chem.* **105**, 1518-1521.
- Shaka A.J., Keeler J. et Freeman R. (1985) *J.Magn.Reson.* **64**, 547-552.
- Sklenar V., Piotto M., Leppik R. et Saudek V. (1993) *J.Magn.Reson.A* **102**, 241-245.
- Solomon I. (1955) *Phys.Rev* **99**, 559-565.
- Sørensen M.D., Meissner A. et Sørensen O.W. (1997a) *J.Biomol.NMR* **10**, 181-186.
- Sørensen M.D., Meissner A. et Sørensen O.W. (1997b) *J.Magn.Reson.* **137**, 237-242.
- Tessari M., Mulder F.A.A., Boelens R. et Vuister G.W. (1997a) *J.Magn.Reson.* **127**, 128-133.

- Tessari M., Vis H., Boelens R., Kaptein R. et Vuister G.W. (1997b) *J.Am.Chem.Soc.* **119**, 8985-8990.
- Tjandra N., Szabo A., Bax A. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 6986-6991.
- Tolman J.R., Chung J. et Prestegard J.P. (1992) *J.Magn.Reson.* **98**, 462-467.
- Vincent S.J.F., Zwahlen C., Bolton P.H., Logan T.M. et Bodenhausen G. (1996) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 3531-3532.
- Vold R.L., Waugh J.S., Klein M.P., Phelps D.E. (1968) *J.Chem.Phys.* **48**, 3831-3832.
- Vuister G.W., Boelens R., Kaptein R., Hund R.E., John B. et vanZijh P.C.M. (1991) *J.Am.Chem.Soc.* **113**, 9688-9690.
- Walker O. (2001) *thèse de doctorat* de l'université Henri Poincaré, Nancy, France.
- Walker O., Mutzenhardt P., Tekely P., Canet D. (2002) *J.Am.Chem.Soc.* **124**, 865-873.
- Walker O., Mutzenhardt P., Canet D. (2003) *Magn.Reson.Chem* **41**, 776-781.
- Wang L., Kurochkin A.V. et Zuiderweg E.R.P. (2000) *J.Magn.Reson.* **144**, 175-185.

## Annexes du chapitre 2

### A2.1 Résolution analytique des équations de Solomon pour deux spins couplés.

(Canet D., Boubel J.-C., Canet Soulas E. (2002) "La RMN. Concepts, methods et applications" 2<sup>e</sup> édition, Dunod: Paris, pp 125-126)

Les équations de Solomon décrivent le comportement de deux aimantations A et X couplées:

$$\begin{aligned} \frac{dI_z^A}{dt} &= -R_1^A (I_z^A - I_{eq}^A) - \sigma (I_z^X - I_{eq}^X) \\ \frac{dI_z^X}{dt} &= -R_1^X (I_z^X - I_{eq}^X) - \sigma (I_z^A - I_{eq}^A) \end{aligned} \quad [A. 1]$$

où  $R_1$  représente la vitesse de relaxation longitudinale et  $\sigma$  vitesse de relaxation croisée entre A et X,  $I_{eq}$  figurant la valeur de l'aimantation à l'équilibre.

Comme on se trouve en présence de deux équations différentielles couplées, l'évolution des aimantations A et X est biexponentielle. Une résolution analytique conduit à :

$$\begin{aligned} [I_{eq}^A - I_z^A(t)] / (2I_{eq}^A) &= a_1 \exp(\lambda_1 t) + a_2 \exp(\lambda_2 t) \\ [I_{eq}^X - I_z^X(t)] / (2I_{eq}^X) &= x_1 \exp(\lambda_1 t) + x_2 \exp(\lambda_2 t) \end{aligned} \quad [A. 2]$$

où  $\lambda_1$  et  $\lambda_2$  sont les solutions de l'équation caractéristique associée aux équations différentielles,  $\lambda_{1,2} = \frac{-R_{\pm} \pm X}{2}$ , avec :

$$R_{\pm} = R_1^A \pm R_1^X \text{ et } X = \sqrt{R_-^2 + 4\sigma^2} \quad [A. 3]$$

$$a_{1,2} = \left\{ \frac{I_{eq}^A - I_z^A(0)}{2I_{eq}^A} \right\} \left( \frac{1 \mp \frac{R_-}{2X}}{2} \right) \mp \left\{ \frac{I_{eq}^X - I_z^X(0)}{2I_{eq}^X} \right\} \left( \frac{I_{eq}^X}{I_{eq}^A} \right) \left( \frac{\sigma}{X} \right) \quad [A. 4]$$

$$x_{1,2} = \left\{ \frac{I_{eq}^X - I_z^X(0)}{2I_{eq}^X} \right\} \left( \frac{1 \pm \frac{R_-}{2X}}{2} \right) \mp \left\{ \frac{I_{eq}^A - I_z^A(0)}{2I_{eq}^A} \right\} \left( \frac{I_{eq}^A}{I_{eq}^X} \right) \left( \frac{\sigma}{X} \right) \quad [A. 5]$$

Pour la résolution analytique des équations dans le cas d'un système à trois spins, le lecteur pourra se référer à l'article de Canet et al., 1996.

### A2.2 Les impulsions de gradient champ statique en RMN

(Canet D., Boubel J.-C., Canet Soulas E. (2002) "La RMN. Concepts, methods et applications" 2<sup>e</sup> édition, Dunod: Paris, pp 74-83)

Les gradients de champs sont utilisés en RMN pour défocaliser ou refocaliser l'aimantation nucléaire. Dans notre cas ceux-ci sont utilisés pour l'élimination d'une résonance intense (pic du solvant) ou bien la sélection d'une quantité particulière (ce que l'on désigne souvent par la sélection de "chemin de cohérence"). De façon générale, l'application d'impulsions de gradient peut remplacer plusieurs pas de cyclage de phase et ainsi diminuer la durée des



expériences. Une seule impulsion de gradient produit une dispersion des fréquences de précession qui, si le gradient est suffisamment intense et l'échantillon homogène, se traduit par une disparition complète (bien que réversible) de l'aimantation nucléaire. En effet, en fonction de sa localisation spatiale, chaque spin ressent un champ différent (du au gradient). L'intégrale sur l'espace de l'ensemble des spins conduit à une aimantation macroscopique nulle. Cependant, ce processus est réversible et l'application d'une seconde impulsion de gradient permet la refocalisation du signal précédemment défocalisé, ceci sous certaines conditions. Sous l'effet d'un gradient de champ statique  $B_0$ , il est bien évident que  $I_z$  est inchangé alors que, pour une localisation donnée, correspondant à une précession d'angle  $\theta$ ,  $I_x$  et  $I_y$  se transforment comme indiqués ci-dessous :

$$\begin{aligned} I_x &\rightarrow I_x \cos \theta_i - I_y \sin \theta_i \\ I_y &\rightarrow I_y \cos \theta_i + I_x \sin \theta_i \end{aligned} \quad [\text{A. 6}]$$

avec  $\theta_i = \gamma_i \cdot g_i \cdot \tau_i \cdot s_i$  [A. 7] , où l'indice  $i$  est le spin auquel s'applique l'impulsion de gradient,  $s_i$  est la forme de l'impulsion,  $\gamma_i$  est le rapport gyromagnétique du spin  $i$ ,  $g_i$  est l'amplitude du gradient et  $\tau_i$  la longueur de l'impulsion.

De manière à prédire ce qu'est le signal détecté, il faut calculer une moyenne sur la totalité de l'échantillon, c'est-à-dire sur toutes les valeurs possibles de l'angle  $\theta$  comprises entre  $0$  et  $2\pi$ , ces valeurs étant supposées équiprobables. La moyenne d'une fonction trigonométrique simple telle que  $\langle \cos \theta \rangle$  ou  $\langle \sin \theta \rangle$  est nulle. L'application de ce calcul à l'équation [A.6] conduit bien à la défocalisation de  $I_x$  et  $I_y$ . Pour pouvoir refocaliser ou sélectionner l'aimantation, il faudra soit appliquer une seconde impulsion de gradient de signe opposé (i.e.  $\theta_j = -\theta_i$ ), soit appliquer une seconde fois la même impulsion en ayant préalablement inversé le sens de précession (dans le repère tournant) par une impulsion à  $180^\circ$ . Dans ce dernier cas, [A.6] se transforme en :

$$\begin{aligned} I_x \cos \theta_i - I_y \sin \theta_i &\xrightarrow{180^\circ} I_x \cos \theta_i + I_y \sin \theta_i \\ I_y \cos \theta_i + I_x \sin \theta_i &\xrightarrow{180^\circ} -I_y \cos \theta_i + I_x \sin \theta_i \end{aligned} \quad [\text{A. 8}]$$

en appliquant une seconde impulsion de gradient caractérisée par  $\theta_j$  :

$$\begin{aligned} &\xrightarrow{\theta_j} [I_x \cos \theta_j - I_y \sin \theta_j] \cos \theta_i + [I_y \cos \theta_j + I_x \sin \theta_j] \sin \theta_i \\ &\xrightarrow{\theta_j} -[I_y \cos \theta_j - I_x \sin \theta_j] \cos \theta_i + [I_x \cos \theta_j - I_y \sin \theta_j] \sin \theta_i \end{aligned} \quad [\text{A. 9}]$$

en regroupant les termes suivant  $I_x$  et  $I_y$  et en supposant que l'on respecte  $\theta_i = \theta_j$  (de manière contextuelle, on respectera cette relation en utilisant des amplitudes ( $g$ ) ou des longueurs d'impulsion ( $\tau$ ) adéquates), [A.8] est équivalent à :

$$\begin{aligned} I_x [\cos^2 \theta + \sin^2 \theta] + I_y [0] &= I_x \\ I_y [-\cos^2 \theta - \sin^2 \theta] + I_x [0] &= -I_y \end{aligned} \quad [\text{A. 10}]$$

Il n'est pas nécessaire de faire appel aux propriétés usuelles d'un gradient pour démontrer que  $I_x$  et  $-I_y$  réapparaissent.

Un résultat analogue est obtenu avec  $\langle \cos^2 \theta \rangle = \langle \sin^2 \theta \rangle = \frac{1}{2}$ , c'est-à-dire en appliquant une impulsion à  $90^\circ$  au lieu de  $180^\circ$ , on perd alors la moitié du signal. Cette méthode permet de déterminer la façon dont une cohérence est transformée à la suite d'application d'impulsions de gradient, il suffit pour cela de rechercher les aimantations affectées d'une moyenne non nulle du type  $\langle \cos^m \theta \cdot \sin^n \theta \rangle$  [A. 11].

### A2.3 Paramètres expérimentaux utilisés pour les mesures de relaxation.

Echantillon : ubiquitine marquée en azote-15, à 1.4mM, solvant H<sub>2</sub>O 95% : D<sub>2</sub>O 5%, pH 4.7 (VLI Research, Southeastern)

Spectromètres Avance Bruker

cryo : cryosonde

Mesure du temps d'autorelaxation longitudinale T <sub>1</sub> (figure 2.9)			
B <sub>0</sub>	9.4T	11.7T	14.1T
sonde	triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, X) gradients z	cryo, triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N) gradients z	triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N) gradients (x,y,z)
nb points <sup>1</sup> H	2048	2048	2048
fenêtre <sup>1</sup> H	14ppm	14ppm	14ppm
offset <sup>1</sup> H	4.7ppm	4.7ppm	4.7ppm
nb points <sup>15</sup> N	200	128	128
fenêtre <sup>15</sup> N	30ppm	30ppm	30ppm
offset <sup>15</sup> N	115ppm	115ppm	115ppm
accumulations	16	4	8
dummy scans	16	8	8
temps de répétition	4s	4s	4s
temps de mélange	2ms, 100ms, 200ms, 300ms, 400ms, 600ms, 800ms	2ms, 100ms, 200ms, 300ms, 400ms, 600ms, 800ms	2ms, 100ms, 200ms, 300ms, 400ms, 600ms, 800ms
G <sub>1</sub> : G <sub>2</sub> : G <sub>3</sub> : G <sub>4</sub> (%)	50 : 30 : 80 : 16.2	50 : 30 : 80 : 16.2	50 : 30 : 80 : 16.2
longueur gradients	1ms : 1ms : 1ms : 1ms	1ms : 1ms : 1ms : 1ms	1ms : 1ms : 1ms : 1ms
maximum du gradient	30Gauss.cm <sup>-1</sup>	30Gauss.cm <sup>-1</sup>	50Gauss.cm <sup>-1</sup>

Mesure du temps d'autorelaxation transversale $T_2$ (figure 2.9)			
$B_0$	9.4T	11.7T	14.1T
sonde	triple ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , X) gradients z	cryo, triple ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ) gradients z	triple ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ) gradients (x,y,z)
nb points $^1\text{H}$	2048	2048	2048
fenêtre $^1\text{H}$	14ppm	14ppm	14ppm
offset $^1\text{H}$	4.7ppm	4.7ppm	4.7ppm
nb points $^{15}\text{N}$	200	128	200
fenêtre $^{15}\text{N}$	30ppm	30ppm	30ppm
offset $^{15}\text{N}$	115ppm	115ppm	115ppm
accumulations	16	4	8
dummy scans	16	8	8
temps de répétition	4s	4s	4s
temps de mélange	16ms, 48ms, 80ms, 112ms, 144ms, 192ms, 256ms	16ms, 48ms, 80ms, 112ms, 144ms, 192ms, 256ms	16ms, 48ms, 80ms, 112ms, 144ms, 192ms, 256ms
$G_1 : G_2 : G_3$ (%)	-22 : 44 : 44	-15 : 30 : 30	-15 : 30 : 30
longueur gradients maximum du gradient	1ms : 1.25ms : 125 $\mu\text{s}$ 30Gauss.cm $^{-1}$	1ms : 1.25ms : 125 $\mu\text{s}$ 30Gauss.cm $^{-1}$	1ms : 1.25ms : 125 $\mu\text{s}$ 50Gauss.cm $^{-1}$

Mesure classique de la vitesse de relaxation croisée $\sigma_{\text{NH}}$ (figure 2.11)			
$B_0$	9.4T	11.7T	14.1T
sonde	triple ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , X) gradients z	cryo, triple ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ) gradients z	triple ( $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ ) gradients (x,y,z)
nb points $^1\text{H}$	2048	2048	2048
fenêtre $^1\text{H}$	14ppm	14ppm	14ppm
offset $^1\text{H}$	4.7ppm	4.7ppm	4.7ppm
nb points $^{15}\text{N}$	256	128	256
fenêtre $^{15}\text{N}$	30ppm	30ppm	30ppm
offset $^{15}\text{N}$	115ppm	115ppm	115ppm
accumulations	32	16	16
dummy scans	16	16	16
temps de répétition	5s	6s	5s

$G_1 : G_2 : G_3$ (%)	50 : 80 : 16.2	50 : 80 : 16.2	50 : 80 : 16.2
longueur gradients	1ms : 1ms : 1ms	1ms : 1ms : 1ms	1ms : 1ms : 1ms
maximum du gradient	30Gauss.cm <sup>-1</sup>	30Gauss.cm <sup>-1</sup>	50Gauss.cm <sup>-1</sup>

Mesure de la corrélation croisée longitudinale csa <sup>15</sup>N/dipolaire <sup>15</sup>N<sup>1</sup>H par S<sup>2</sup>ED (figure 2.40a)

$B_0$	9.4T	11.7T	14.1T
sonde	triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, X) gradients z	cryo, triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N) gradients z	triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N) gradients (x,y,z)
nb points <sup>1</sup> H	2048	2048	2048
fenêtre <sup>1</sup> H	14ppm	14ppm	14ppm
offset <sup>1</sup> H	4.7ppm	4.7ppm	4.7ppm
nb points <sup>15</sup> N	256	128	256
fenêtre <sup>15</sup> N	30ppm	30ppm	30ppm
offset <sup>15</sup> N	115ppm	115ppm	115ppm
accumulations	16	8	16
dummy scans	16	8	16
temps de répétition	5s	4s	5s
temps de mélange	4ms, 50ms, 100ms, 150ms, 200ms, 300ms, 400ms, 600ms, 800ms, 1s	4ms, 50ms, 100ms, 150ms, 200ms, 300ms, 400ms, 600ms, 800ms, 1s, 1.3s	4ms, 50ms, 100ms, 150ms, 200ms, 300ms, 400ms, 600ms, 800ms, 1s
$G_1:G_2:G_3:G_4:G_5:G_6$ (%)	-30 :40 :17 :-13 :-26 :20	-30 :40 :-40 :-13 :-26 :10	-30 :40 :17 :-13 :-26 :20
longueur gradients	1.6ms: 800μs:800μs:1.6ms: 1.6ms:800μs	1.6ms: 800μs:800μs:1.6ms: 1.6ms:800μs	1.6ms: 800μs:800μs:1.6ms: 1.6ms:800μs
maximum du gradient	30Gauss.cm <sup>-1</sup>	30Gauss.cm <sup>-1</sup>	50Gauss.cm <sup>-1</sup>

Mesure de la corrélation croisée transversale csa <sup>15</sup>N/dipolaire <sup>15</sup>N<sup>1</sup>H par S<sup>2</sup>ED (figure 2.40b)

$B_0$	9.4T	11.7T	14.1T
sonde	triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, X) gradients z	cryo, triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N) gradients z	triple ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N) gradients (x,y,z)
nb points <sup>1</sup> H	2048	2048	2048
fenêtre <sup>1</sup> H	14ppm	14ppm	14ppm
offset <sup>1</sup> H	4.7ppm	4.7ppm	4.7ppm
nb points <sup>15</sup> N	256	128	256

fenêtre $^{15}\text{N}$	30ppm	30ppm	30ppm
offset $^{15}\text{N}$	115ppm	115ppm	115ppm
accumulations	32	8	16
dummy scans	16	8	16
temps de répétition	5s	4s	5s
temps de mélange	16ms, 48ms, 80ms, 112ms, 144ms, 192ms, 256ms, 320ms	16ms, 32ms, 64ms, 96ms, 128ms, 192ms, 256ms, 384ms	16ms, 48ms, 80ms, 112ms, 144ms, 192ms, 256ms, 320ms
$G_1:G_2:G_3:G_4:G_5:G_6$ (%)	-30 :40 :-40 :-13 :-26 :10	-30 :40 :-40 :-13 :-26 :10	-30 :40 :-40 :-13 :-26 :10
longueur gradients	1.6ms: 800 $\mu\text{s}$ :800 $\mu\text{s}$ :1.6ms: 1.6ms:800 $\mu\text{s}$	1.6ms: 800 $\mu\text{s}$ :800 $\mu\text{s}$ :1.6ms: 1.6ms:800 $\mu\text{s}$	1.6ms: 800 $\mu\text{s}$ :800 $\mu\text{s}$ :1.6ms: 1.6ms:800 $\mu\text{s}$
maximum du gradient	30Gauss.cm $^{-1}$	30Gauss.cm $^{-1}$	50Gauss.cm $^{-1}$

#### A2.4 Paramètres utilisés pour la simulation des expériences de corrélation croisée (§2.4.3)

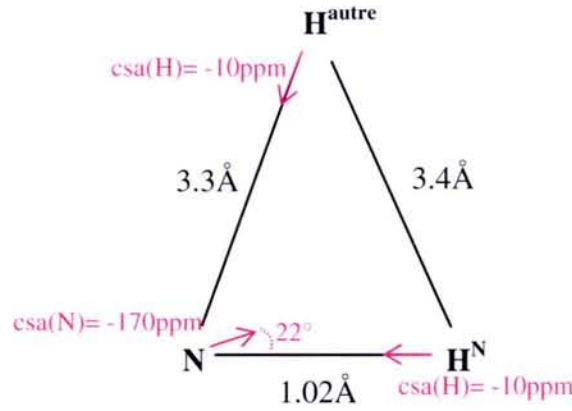
Référence : Wang L., Kurochkin A.V. et Zuiderweg E.R.P. (2000) *J.Magn.Reson.* **144**, 175-185.

La matrice complète de relaxation longitudinale est :

	$N_z$	$H_z^N$	$H_z^{\text{autre}}$	$2 N_z H_z^N$	$2 N_z H_z^{\text{autre}}$	$2 H_z^N H_z^{\text{autre}}$	$4 N_z H_z^N H_z^{\text{autre}}$
$N_z$	$R_1^N$	$\sigma_{NH^N}$	$\sigma_{NH^{\text{autre}}}$	$\eta_{N-NH^N}$	$\eta_{N-NH^{\text{autre}}}$	0	$\delta_{N-NH^N H^{\text{autre}}}$
$H_z^N$		$R_1^{H^N}$	$\sigma_{H^N H^{\text{autre}}}$	$\eta_{H^N-NH^N}$	0	$\eta_{H^N-H^N H^{\text{autre}}}$	$\delta_{H^N-NH^N H^{\text{autre}}}$
$H_z^{\text{autre}}$			$R_1^{H^{\text{autre}}}$	0	$\eta_{H^{\text{autre}}-NH^{\text{autre}}}$	$\eta_{H^{\text{autre}}-H^N H^{\text{autre}}}$	$\delta_{H^{\text{autre}}-NH^N H^{\text{autre}}}$
$2 N_z H_z^N$				$R_1^{2N_z H_z^N}$	$\delta_{N-NH^N H^{\text{autre}}} + \sigma_{H^N H^{\text{autre}}}$	$\delta_{H^N-NH^N H^{\text{autre}}} + \sigma_{NH^{\text{autre}}}$	$\eta_{N-NH^{\text{autre}}} + \eta_{H^N-H^N H^{\text{autre}}}$
$2 N_z H_z^{\text{autre}}$					$R_1^{2N_z H_z^{\text{autre}}}$	$\delta_{H^{\text{autre}}-NH^N H^{\text{autre}}} + \sigma_{NH^{\text{autre}}}$	$\eta_{N-NH^N} + \eta_{H^{\text{autre}}-H^N H^{\text{autre}}}$
$2 H_z^N H_z^{\text{autre}}$						$R_1^{2H_z^N H_z^{\text{autre}}}$	$\eta_{H^{\text{autre}}-NH^{\text{autre}}} + \eta_{H^N-NH^N}$
$4 N_z H_z^N H_z^{\text{autre}}$							$R_1^{4N_z H_z^N H_z^{\text{autre}}}$

Les calculs des paramètres de relaxation sont menés avec les valeurs suivantes :  $B_0=9.4\text{T}$ , dynamique de réorientation dans un modèle Lipari-Szabo ( $\tau_s=4.5.10^{-9}\text{s}$ ,  $\tau_f=3.10^{-10}\text{s}$  et  $S^2=0.85$ ), anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15=-170ppm (angle de  $22^\circ$  par rapport au vecteur NH) et du proton=-10ppm. Les distances utilisées sont  $r_{NH^N}=1.02\text{\AA}$ ,  $r_{NH^{\text{autre}}}=3.3\text{\AA}$ ,  $r_{H^N H^{\text{autre}}}=3.4\text{\AA}$ ,  $H^{\text{autre}}$  étant un proton fictif représentant les protons proches du noyau azote et autres que le proton amide (les distances correspondent à une moyenne (moyenne des interactions en  $1/r^3$ ) obtenue sur la structure 1D3Z.pdb de l'ubiquitine

(Cornilescu G., Marquardt J.L., Ottiger M. et Bax A. (1998) *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 6836-6837)).



Les constantes utilisées pour les calculs sont:

$P_2(\cos \theta) = \frac{1}{2}(3\cos^2\theta - 1)$  et  $\theta$  angle entre les vecteurs de relaxation concernés,

$$K_d^{NH^N} = \frac{1}{2\sqrt{5}} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \left( \frac{\hbar \gamma_H \gamma_N}{r_{NH^N}^3} \right) \quad \text{constantes d'interaction dipolaire,}$$

$$K_d^{NH^{\text{autre}}} = \frac{1}{2\sqrt{5}} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \left( \frac{\hbar \gamma_H \gamma_N}{r_{NH^{\text{autre}}}^3} \right)$$

$$K_d^{H^N H^{\text{autre}}} = \frac{1}{2\sqrt{5}} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \left( \frac{\hbar \gamma_H \gamma_H}{r_{H^N H^{\text{autre}}}^3} \right)$$

$$K_{csa}^N = \frac{1}{\sqrt{15}} \omega_N (\sigma_{||}^N - \sigma_{\perp}^N) \quad \text{constantes d'anisotropie de déplacement chimique,}$$

$$K_{csa}^H = \frac{1}{\sqrt{15}} \omega_H (\sigma_{||}^H - \sigma_{\perp}^H) \quad (\text{on suppose } K_{csa}^{H^N} = K_{csa}^{H^{\text{autre}}} = K_{csa}^H)$$

$$\tilde{J}(\omega) = (1-S^2)(2\tau_f) + \frac{S^2(2\tau_s)}{1+\omega^2\tau_s^2} \quad \text{densité spectrale normalisée.}$$

Les équations des paramètres de relaxation sont les suivantes :

$$\begin{aligned} R_1^N = & \left( K_d^{NH^N} \right)^2 [3\tilde{J}(\omega_N) + 6\tilde{J}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)] \quad \text{autorelaxation,} \\ & + \left( K_d^{NH^{\text{autre}}} \right)^2 [3\tilde{J}(\omega_N) + 6\tilde{J}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)] \\ & + \left( K_{csa}^N \right)^2 \tilde{J}(\omega_N) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R_1^{H^N} &= \left( K_d^{NH^N} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_H) + 6 \tilde{J}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)] \\
 &+ \left( K_d^{H^N H^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_H) + 6 \tilde{J}(2\omega_H) + \tilde{J}(0)] \\
 &+ \left( K_{csa}^H \right)^2 \tilde{J}(\omega_H)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R_1^{H^{autre}} &= \left( K_d^{NH^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_H) + 6 \tilde{J}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)] \\
 &+ \left( K_d^{H^N H^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_H) + 6 \tilde{J}(2\omega_H) + \tilde{J}(0)] \\
 &+ \left( K_{csa}^H \right)^2 \tilde{J}(\omega_H)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R_1^{2N_z H_z^N} &= \left( K_d^{NH^N} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_N) + 3 \tilde{J}(\omega_H)] \\
 &+ \left( K_{csa}^N \right)^2 \tilde{J}(\omega_N) \\
 &+ \left( K_{csa}^H \right)^2 \tilde{J}(\omega_H) \\
 &+ \left( K_d^{NH^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_N) + 6 \tilde{J}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)] \\
 &+ \left( K_d^{H^N H^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_H) + 6 \tilde{J}(2\omega_H) + \tilde{J}(0)]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R_1^{2N_z H_z^{autre}} &= \left( K_d^{NH^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_N) + 3 \tilde{J}(\omega_H)] \\
 &+ \left( K_{csa}^N \right)^2 \tilde{J}(\omega_N) \\
 &+ \left( K_{csa}^H \right)^2 \tilde{J}(\omega_H) \\
 &+ \left( K_d^{NH^N} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_N) + 6 \tilde{J}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)] \\
 &+ \left( K_d^{H^N H^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_H) + 6 \tilde{J}(2\omega_H) + \tilde{J}(0)]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R_1^{2H_z^N H_z^{autre}} &= \left( K_d^{H^N H^{autre}} \right)^2 [6 \tilde{J}(\omega_N)] \\
 &+ 2 \left( K_{csa}^H \right)^2 \tilde{J}(\omega_H) \\
 &+ \left( K_d^{NH^N} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_N) + 6 \tilde{J}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)] \\
 &+ \left( K_d^{NH^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_N) + 6 \tilde{J}(\omega_H + \omega_N) + \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)]
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R_1^{4N_z H_z^N H_z^{autre}} &= \left( K_d^{NH^N} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_N) + 3 \tilde{J}(\omega_H)] \\
 &+ \left( K_d^{NH^{autre}} \right)^2 [3 \tilde{J}(\omega_N) + 3 \tilde{J}(\omega_H)] \\
 &+ \left( K_d^{H^N H^{autre}} \right)^2 [6 \tilde{J}(\omega_N)] \\
 &+ \left( K_{csa}^N \right)^2 \tilde{J}(\omega_N) \\
 &+ 2 \left( K_{csa}^H \right)^2 \tilde{J}(\omega_H)
 \end{aligned}$$

$$\sigma_{NH^N} = \left( K_d^{NH^N} \right)^2 [6 \tilde{J}(\omega_H + \omega_N) - \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)]$$

$$\sigma_{NH^{autre}} = \left( K_d^{NH^{autre}} \right)^2 [6 \tilde{J}(\omega_H + \omega_N) - \tilde{J}(\omega_H - \omega_N)]$$

relaxation croisée,

$$\sigma_{H^N H^{autre}} = \left( K_d^{H^N H^{autre}} \right)^2 [6 \tilde{J}(2\omega_H) - \tilde{J}(0)]$$

$$\eta_{N-NH^N} = -\frac{6}{\sqrt{3}} K_d^{NH^N} K_{csa}^N \tilde{J}(\omega_N) P_2(\cos \theta_{N-NH^N}) \quad \text{corrélation croisée csa/dipolaire,}$$

$$\eta_{N-NH^{autre}} = -\frac{6}{\sqrt{3}} K_d^{NH^{autre}} K_{csa}^N \tilde{J}(\omega_N) P_2(\cos \theta_{N-NH^{autre}})$$

$$\eta_{H^N-NH^N} = -\frac{6}{\sqrt{3}} K_d^{NH^N} K_{csa}^H \tilde{J}(\omega_H) P_2(\cos \theta_{H^N-NH^N})$$

$$\eta_{H^N-H^N H^{autre}} = -\frac{6}{\sqrt{3}} K_d^{H^N H^{autre}} K_{csa}^H \tilde{J}(\omega_H) P_2(\cos \theta_{H^N-H^N H^{autre}})$$

$$\eta_{H^{autre}-NH^{autre}} = -\frac{6}{\sqrt{3}} K_d^{NH^{autre}} K_{csa}^H \tilde{J}(\omega_H) P_2(\cos \theta_{H^{autre}-NH^{autre}})$$

$$\eta_{H^{autre}-H^N H^{autre}} = -\frac{6}{\sqrt{3}} K_d^{H^N H^{autre}} K_{csa}^H \tilde{J}(\omega_H) P_2(\cos \theta_{H^{autre}-H^N H^{autre}})$$

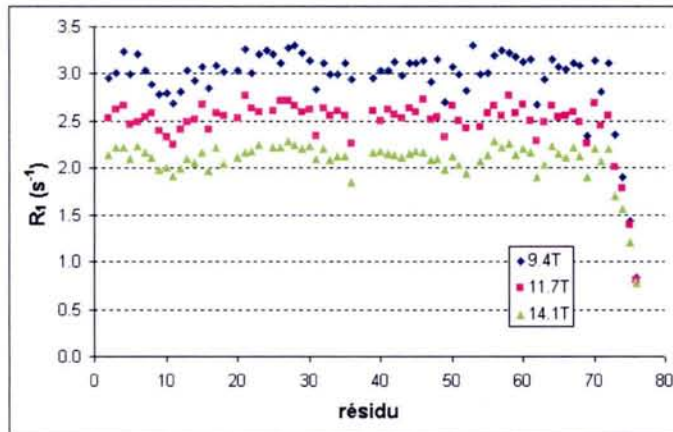
$$\delta_{N-NH^N H^{autre}} = 2 K_d^{NH^N} K_d^{NH^{autre}} \tilde{J}(\omega_N) P_2(\cos \theta_{NH^{autre}-NH^N}) \quad \text{corrélation croisée dipôle/dipôle.}$$

$$\delta_{H^N-NH^N H^{autre}} = 2 K_d^{NH^N} K_d^{H^N H^{autre}} \tilde{J}(\omega_H) P_2(\cos \theta_{H^N H^{autre}-NH^N})$$

$$\delta_{H^{autre}-NH^N H^{autre}} = 2 K_d^{H^N H^{autre}} K_d^{NH^{autre}} \tilde{J}(\omega_H) P_2(\cos \theta_{NH^{autre}-H^N H^{autre}})$$

### A2.5 Paramètres de relaxation obtenus sur un échantillon d'ubiquitine.

Echantillon : ubiquitine marquée en azote-15, à 1.4mM, solvant H<sub>2</sub>O 95% : D<sub>2</sub>O 5%, pH 4.7 (VLI Research, Southeastern)



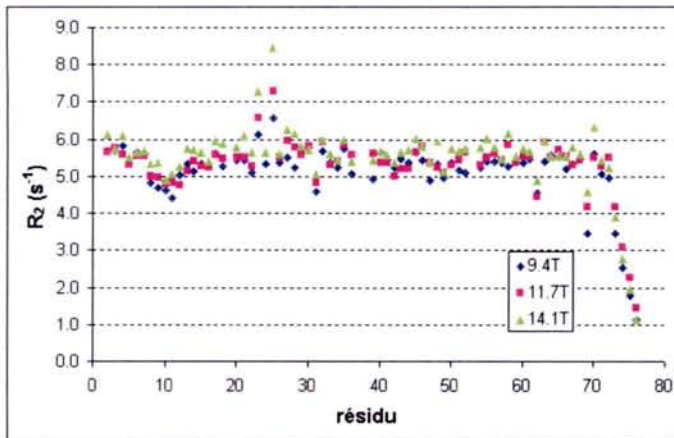
moyenne obtenue sur les résidus 2 à 70 :

$$R_1^N(9.4T) = 3.04 \text{ s}^{-1}$$

$$R_1^N(11.7T) = 2.54 \text{ s}^{-1}$$

$$R_1^N(14.1T) = 2.13 \text{ s}^{-1}$$



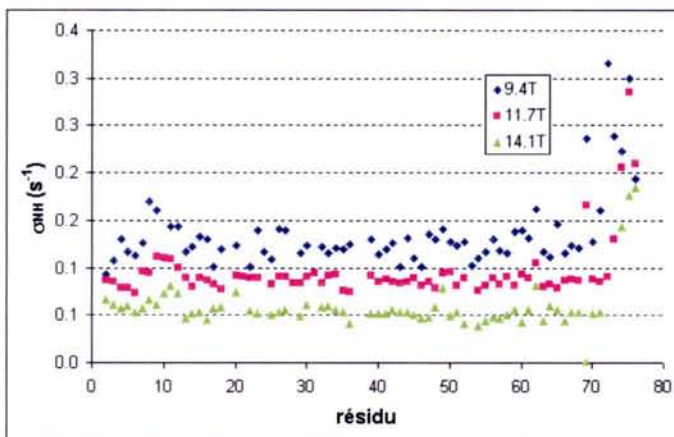


moyenne obtenue sur les résidus 2 à 70 :

$$R_2^N(9.4T) = 5.32 \text{ s}^{-1}$$

$$R_2^N(11.7T) = 5.44 \text{ s}^{-1}$$

$$R_2^N(14.1T) = 5.72 \text{ s}^{-1}$$

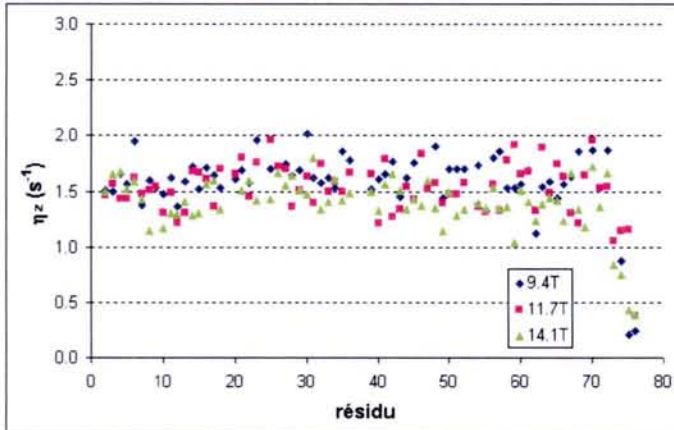


moyenne obtenue sur les résidus 2 à 70 :

$$\sigma_{NH}(9.4T) = 0.13 \text{ s}^{-1}$$

$$\sigma_{NH}(11.7T) = 0.09 \text{ s}^{-1}$$

$$\sigma_{NH}(14.1T) = 0.06 \text{ s}^{-1}$$

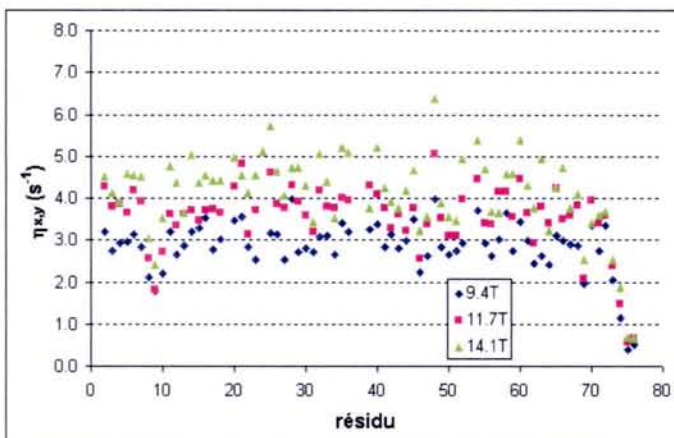


moyenne obtenue sur les résidus 2 à 70 :

$$\eta_z(9.4T) = 1.63 \text{ s}^{-1}$$

$$\eta_z(11.7T) = 1.55 \text{ s}^{-1}$$

$$\eta_z(14.1T) = 1.44 \text{ s}^{-1}$$



moyenne obtenue sur les résidus 2 à 70 :

$$\eta_{x,y}(9.4T) = 2.94 \text{ s}^{-1}$$

$$\eta_{x,y}(11.7T) = 3.68 \text{ s}^{-1}$$

$$\eta_{x,y}(14.1T) = 4.28 \text{ s}^{-1}$$

## **Chapitre 3**

# **Des paramètres de relaxation à la Dynamique des protéines**

### **3. Des paramètres de relaxation à la dynamique des protéines**

Après avoir décrit la relaxation de spin (chapitre 1) puis des méthodes permettant la mesure des paramètres de relaxation (chapitre 2), nous tenterons d'extraire de ces derniers les informations structurales et dynamiques qu'ils contiennent.

La première étape est de modéliser les mouvements moléculaires pour en déduire l'expression des densités spectrales intervenant dans l'expression de tout paramètre de relaxation. Après avoir exposé les méthodes couramment utilisées pour caractériser globalement la dynamique d'une protéine en solution, nous montrerons qu'il est possible, et parfois souhaitable, de considérer indépendamment la dynamique de chaque résidu (dans une première étape) pour atteindre (dans une seconde étape) la dynamique d'ensemble du système. La fin de ce chapitre sera consacrée à l'utilisation des paramètres de corrélation croisée en complément des mesures de relaxation classiques.

#### **3.1. Introduction**

Initialement, l'étude des protéines par RMN a eu pour objectif principal la connaissance des fondements de l'organisation architecturale de ces molécules, nécessaire à la compréhension des liens entre les motifs structuraux et les fonctions biologiques. Durant les vingt dernières années, les efforts (théoriques, méthodologiques, instrumentaux) se sont ainsi concentrés sur la détermination de structures de protéines de masse moléculaire de plus en plus élevée. Les possibilités offertes par le marquage à l'azote-15, au carbone-13 et au deutérium, ainsi que les techniques TROSY (Pervushin et al., 1999; Riek et al., 2002) combinées à des transferts de polarisation, permettent aujourd'hui l'analyse structurale par RMN de protéines solubles ayant des masses moléculaires de plus de 800kDa (Riek et al., 2002). Il est maintenant reconnu et admis que l'activité d'une protéine est liée non seulement à sa structure, mais également à sa dynamique. On peut penser qu'une fonction biologique donnée va nécessiter des mouvements relativement bien déterminés, tant dans le domaine spatial que temporel. L'objectif est donc de trouver le lien entre la structure, la dynamique et la fonction biologique des macromolécules.

La RMN constitue une méthode de choix pour l'étude des mouvements moléculaires. En effet, les mesures de relaxation donnent accès à de nombreuses informations dynamiques au niveau de chaque acide aminé de la protéine et sur une large gamme de temps. Les spins

azote-15 constituent des sondes idéales de par leur répartition uniforme le long du squelette protéique.

Les premières études de relaxation sur les protéines ont été menées dès les années 80. Wagner et collègues ont tout d'abord travaillé sur la relaxation du carbone-13 en abondance naturelle sur la molécule BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) (Nirmala et Wagner, 1988). Etant donné que la majorité des protéines ne peuvent pas être concentrées suffisamment pour permettre une étude via le carbone-13 (ou l'azote-15) en abondance naturelle, des techniques de plus en plus élaborées ont été mises au point par les biologistes pour marquer ces molécules complètement, partiellement ou sélectivement avec différents isotopes. Une conséquence directe a été de faciliter considérablement l'étude de leur relaxation, les premières investigations ont été menées par Kay et al. en 1989, Clore et al. en 1990, Palmer III et al. en 1991a, Wagner et al. en 1992 et Schneider et al. en 1992.

Les mouvements moléculaires peuvent ainsi être caractérisés par la mesure de paramètres de relaxation hétéronucléaire qui seront ensuite traduits en paramètres dynamiques grâce à l'utilisation de modèles plus ou moins complexes. Si l'interprétation des paramètres de relaxation en terme de dynamique n'est pas unique, la plupart des analyses proposées reposent essentiellement sur trois observables : les vitesses d'autorelaxation longitudinale  $R_1$  et transversale  $R_2$ , et l'eOn. Evidemment, la possibilité de multiplier le nombre de paramètres a également été envisagée, notamment pour améliorer l'échantillonnage de la fonction de densité spectrale (Peng et Wagner, 1992; Devaux et Goldman, 1994; Ishima et Nagayama, 1995; Farrow et al., 1995; Lefèvre et al., 1996).

### 3.2. Les modèles de dynamique dans les protéines

Dans le chapitre 1, nous avons introduit la relaxation de spin en justifiant son existence par la présence de petits champs locaux agissant sur les différents spins considérés, et nous avons défini la fonction densité spectrale que nous rappelons ici :

$J(\omega) = K^r K^{r'} \tilde{J}^{rr'}(\omega)$  avec r et r' les mécanismes de relaxation entrant en jeu,

$$\text{et } \tilde{J}^{rr'}(\omega) = 4\pi \int_{-\infty}^{+\infty} Y_2^{0^r}(\Omega^r(t)) Y_2^0(\Omega^{r'}(0)) e^{-i\omega t} dt, \text{ la densité spectrale normalisée.}$$

La forme de ces densités spectrales dépend de la réorientation de la molécule considérée. Les expressions que nous développerons dans les paragraphes suivants nous placent dans le cadre

de la théorie de la diffusion rotationnelle (Woessner, 1962; Hubbard, 1970) pour laquelle nous envisagerons plusieurs modèles distincts de réorientation.

### 3.2.1. La réorientation isotrope

C'est le modèle de réorientation le plus simple pour lequel la molécule est assimilée à une sphère. Sa réorientation est identique quelles que soient les directions de l'espace envisagées. Elle est caractérisée par un seul temps de corrélation  $\tau_c$  qui peut être défini comme le temps que met un vecteur associé à la molécule pour se réorienter de un radian. L'expression de la densité spectrale normalisée de corrélation croisée est alors :

$$\tilde{J}^{rr'}(\omega) = (1/2)(3\cos^2 \alpha - 1) \left[ 2\tau_c / (1 + \omega^2 \tau_c^2) \right] \quad \text{équation 3.1}$$

où  $\alpha$  est l'angle formé entre les deux vecteurs de relaxation associés respectivement aux mécanismes de relaxation  $r$  et  $r'$ . Si  $r = r'$ , nous retrouvons l'expression de la densité spectrale d'auto-corrélation ( $\alpha = 0$ ). A ce niveau de l'exposé, il est bon de rappeler ce que nous entendons par vecteur de relaxation. Dans le cas de la relaxation dipolaire, il s'agit du vecteur joignant les deux noyaux en interaction. Pour d'autres mécanismes, comme le csa par exemple, il s'agit du vecteur définissant la direction de l'axe de symétrie du tenseur si celui-ci est de symétrie axiale. Si le tenseur d'écran ne possède pas de symétrie particulière, il pourra être décomposé en deux tenseurs de symétrie axiale. Chacun des tenseurs sera associé à un vecteur de relaxation différent (Canet, 1998).

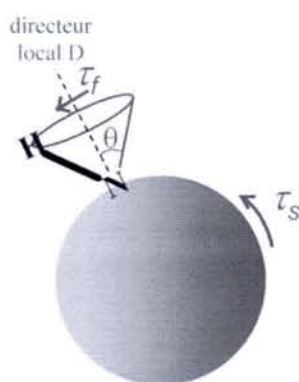
Nous pouvons également constater que si le mouvement considéré est rapide, c'est-à-dire si  $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ , la densité spectrale devient indépendante de la fréquence. Il s'agit de la condition dite du rétrécissement extrême qui s'applique généralement aux molécules de petite masse moléculaire.

### 3.2.2. Les macromolécules et le modèle Lipari-Szabo

Le modèle décrit précédemment est adapté à des objets rigides (molécules ou parties de molécules). Dans le cas de molécules présentant des mouvements internes, il n'est plus possible de l'utiliser tel quel. Nous devons donc retourner à l'expression générale de la densité spectrale normalisée :

$$\tilde{J}^{rr'}(\omega) = 4\pi \int_{-\infty}^{+\infty} Y_2^{0*}(\Omega^r(t)) Y_2^0(\Omega^{r'}(0)) e^{-i\omega t} dt \quad \text{équation 3.2}$$

Le terme  $\Omega$  correspond aux angles polaires  $(\theta, \phi)$  qui définissent une direction particulière dans le repère du laboratoire  $(X, Y, Z)$  : cette direction correspond ici à celle des vecteurs de relaxation concernés. Pour évaluer cette densité spectrale, on peut s'appuyer sur les travaux de Lipari et Szabo (Lipari et Szabo, 1982a, 1982b), ou, de façon équivalente sur le modèle à deux paliers de Wennerström (Wennerström et al., 1979). Dans cette approche, le vecteur de relaxation considéré ressent deux mouvements moléculaires à des échelles de temps très différentes. Ce modèle ne s'appuie pas sur la connaissance de l'orientation du vecteur de relaxation par rapport au tenseur de rotation-diffusion mais introduit la notion de directeur local. On parle alors d'approche exempte de modèle ("Model free approach" en anglais). Comme le représente la figure 3.1, le directeur local  $D$  se réoriente avec le mouvement moléculaire global (lent), alors que des mouvements locaux (rapides et restreints) ont lieu autour de ce directeur.



**figure 3.1** Représentation du modèle de mouvement Lipari-Szabo (Lipari et Szabo, 1982). Le directeur local  $D$  se réoriente avec le mouvement moléculaire global (mouvement lent caractérisé par  $\tau_c$ ), alors que des mouvements locaux ont lieu autour de ce directeur (mouvement rapide caractérisé par  $\tau_f$ , et restreint avec l'angle  $\theta$ ).

Soient  $g$  les angles d'Euler permettant de passer au repère moléculaire  $(x, y, z)$  défini tel que  $z$  coïncide avec  $D$ . Nous noterons  $\Omega_D$  l'orientation du vecteur de relaxation dans ce nouveau repère (figure 3.2).

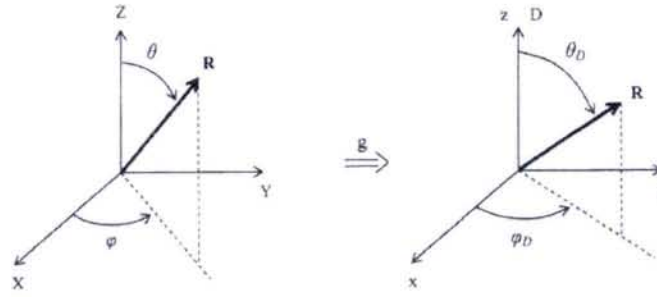


figure 3.2 Définition des deux repères utilisés pour le calcul des densités spectrales.  $R$  représente le vecteur de relaxation (axe de symétrie du tenseur considéré).  $\Omega=(\theta,\varphi)$  définit l'orientation de ce vecteur  $R$  dans le repère  $(X,Y,Z)$ , et  $\Omega_D=(\theta_D,\varphi_D)$  définit son orientation dans le nouveau repère  $(x,y,z)$ , pour lequel  $z$  coïncide avec le directeur local.

On peut alors réécrire l'équation 3.2 au moyen des matrices de Wigner  $D^{(2)}$  (Rose, 1957) :

$$\overline{Y_2^{0*}(\Omega^r(t))Y_2^0(\Omega^r(0))} = \sum_{\mu,\nu=-2}^{+2} \overline{D_{\mu 0}^{(2)*}(g(t))D_{\nu 0}^{(2)}(g(0))Y_2^{\mu*}(\Omega_D^r(t))Y_2^\nu(\Omega_D^r(0))} \quad \text{équation 3.3}$$

Si l'on suppose qu'il existe une symétrie d'ordre supérieur ou égal à 3 par rapport à  $D$ , on a  $u = \nu = 0$ . De plus, si l'on suppose que les deux mouvements décrits précédemment sont indépendants (non corrélés), le seul terme restant dans la sommation 3.3 se décompose comme un simple produit (Canet et al., 2003):

$$\overline{Y_2^0(\Omega^r(t))Y_2^0(\Omega^r(0))} = \overline{D_{00}^{(2)}(g(t))D_{00}^{(2)}(g(0))} \overline{Y_2^0(\Omega_D^r(t))Y_2^0(\Omega_D^r(0))} \quad \text{équation 3.4}$$

↑ mouvement lent par rapport à  $(X,Y,Z)$ 
↑ mouvement rapide par rapport à  $(x,y,z)$

L'absence de conjugué complexe dans l'équation précédente provient du fait que  $Y_2^0$  et  $D_{00}^{(2)}$  sont des fonctions réelles exprimées comme suit:

$$\begin{aligned} Y_2^0(\theta) &= \sqrt{5/4\pi} (1/2) (3\cos^2\theta - 1) \\ D_{00}^{(2)}(\psi) &= (1/2)(3\cos^2\psi - 1) \end{aligned} \quad \text{équation 3.5}$$

Lorsque  $t$  tend vers l'infini, la corrélation entre le mouvement à l'instant 0 et celui à l'instant  $t$  est perdue et l'on peut écrire:

$$\begin{array}{ccc} \text{corr\u00e9lation} & & \text{absence de corr\u00e9lation} \\ \downarrow & & \downarrow \\ \overline{Y_2^0(\Omega_D^r(t))Y_2^0(\Omega_D^r(0))} & \xrightarrow{t \rightarrow \infty} & \overline{Y_2^0(\Omega_D^r)} \overline{Y_2^0(\Omega_D^r)} = (5/4\pi)SS' \end{array} \quad \text{\u00e9quation 3.6}$$

o\u00f9 l'on a introduit les param\u00e8tres d'ordre associ\u00e9s aux deux vecteurs de relaxation :

$$\begin{aligned} S &= \overline{(1/2)(3\cos^2\theta^r - 1)} \\ S' &= \overline{(1/2)(3\cos^2\theta^{r'} - 1)} \end{aligned} \quad \text{\u00e9quation 3.7}$$

Ainsi, la quantit\u00e9  $\overline{Y_2^0(\Omega_D^r(t))Y_2^0(\Omega_D^r(0))}$ , repr\u00e9sentative des mouvements locaux rapides, d\u00e9cro\u00eet vers l'asymptote  $(5/4\pi)SS'$  (figure 3.3).

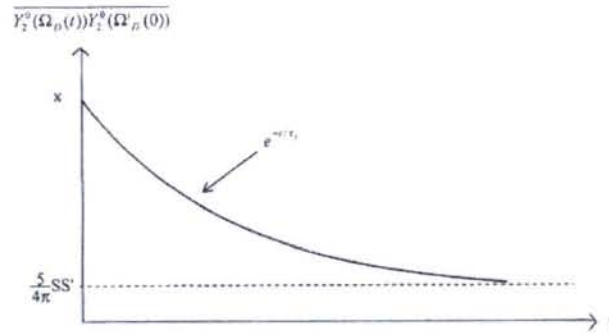


figure 3.3 D\u00e9croissance de la fonction de corr\u00e9lation d\u00e9crivant les mouvements locaux (rapides). La signification des diff\u00e9rents symboles est donn\u00e9e dans le texte (Canet et al., 2003).

Le fait que l'asymptote soit non nulle indique l'organisation locale ou plus exactement une certaine restriction des mouvements qui est refl\u00e9t\u00e9e par le param\u00e8tre d'ordre. En supposant que la d\u00e9croissance est monoexponentielle (mouvement d\u00e9fini par un seul temps de corr\u00e9lation  $\tau_j$ ), on obtient :

$$\overline{Y_2^0(\Omega_D^r(t))Y_2^0(\Omega_D^r(0))} = xe^{-t/\tau_j} + (5/4\pi)SS' \quad \text{\u00e9quation 3.8}$$

Pour d\u00e9terminer le facteur d'amplitude,  $x$ , il faut d\u00e9terminer la valeur de la fonction de corr\u00e9lation pour  $t=0$ . On peut exprimer  $Y_2^0(\Omega^r)$  comme  $(1/2)(3\cos^2\alpha - 1)Y_2^0(\Omega^r)$  o\u00f9  $\alpha$  est l'angle entre les deux vecteurs de relaxation (ceci en raison de la sym\u00e9trie d'ordre trois); de mani\u00e8re \u00e9quivalente, nous aurions pu choisir  $Y_2^0(\Omega^r) = (1/2)(3\cos^2\alpha - 1)Y_2^0(\Omega^r)$ . De plus, la



probabilité est uniforme pour toutes les orientations (milieu isotrope), c'est-à-dire qu'elle est égale à  $(1/4\pi)$  par unité d'angle solide, l'expression détaillée de la fonction pour une moyenne d'ensemble devient:

$$\overline{Y_2^0(\Omega^r(0))Y_2^0(\Omega^{r'}(0))} = (1/4\pi)(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) \int_0^\pi \int_0^{2\pi} |Y_2^0(\Omega)|^2 \sin\theta \, d\theta \, d\varphi \quad \text{équation 3.9,}$$

Et étant donné que les harmoniques sphériques sont normées, on obtient :

$$\overline{Y_2^0(\Omega^r(0))Y_2^0(\Omega^{r'}(0))} = (1/4\pi)(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) \quad \text{équation 3.10}$$

En identifiant les valeurs obtenues avec les équations 3.8 et 3.10 dans 3.4 pour  $t=0$ , et en

utilisant le fait que  $\overline{D_{00}^{(2)}(g(0))D_{00}^{(2)}(g(0))} = \frac{1}{4\pi} \int_0^\pi \int_0^{2\pi} \frac{1}{4} (3\cos^2\psi - 1)^2 \sin\psi \, d\psi \, d\varphi = 1/5$ , on

trouve alors que :

$$(1/4\pi)(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) = (1/5)[x + (5/4\pi)SS'] \quad \text{équation 3.11}$$

$$\text{soit } x = (5/4\pi)(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) - (5/4\pi)SS' \quad \text{équation 3.12}$$

l'équation 3.8 peut ainsi s'écrire :

$$\overline{Y_2^0(\Omega_D^r(t))Y_2^0(\Omega_D^{r'}(0))} = (5/4\pi)[(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) - SS']e^{-t/\tau_f} + (5/4\pi)SS' \quad \text{équation 3.13}$$

Maintenant, l'équation 3.13 peut être réinsérée dans 3.4

$$\begin{aligned} \overline{Y_2^0(\Omega^r(t))Y_2^0(\Omega^{r'}(0))} &= (5/4\pi)[(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) - SS']e^{-t/\tau_f} \overline{D_{00}^{(2)}(g(t))D_{00}^{(2)}(g(0))} \\ &\quad + (5/4\pi)SS' \overline{D_{00}^{(2)}(g(t))D_{00}^{(2)}(g(0))} \end{aligned}$$

$$\text{équation 3.14}$$

qui peut être réécrit :

$$\overline{Y_2^0(\Omega^r(t))Y_2^0(\Omega^r(0))} = \left\{ [(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) - SS']e^{-t/\tau_f} + SS' \right\} \overline{Y_2^0(\psi(t))Y_2^0(\psi(0))}$$

équation 3.15

en notant que  $Y_2^0$  et  $D_{00}^{(2)}$  diffèrent d'un facteur  $\sqrt{5/4\pi}$ .

On peut alors simplifier l'expression précédente en se basant sur le fait que le facteur  $\overline{Y_2^0(\psi(t))Y_2^0(\psi(0))}$  (qui représente le mouvement lent ressenti par le directeur local D) peut être omis par rapport à  $e^{-t/\tau_f}$  qui est associé aux mouvements rapides locaux. En effet, si l'on considère une réorientation du directeur isotrope,  $\overline{Y_2^0(\psi(t))Y_2^0(\psi(0))}$  peut être mis sous la forme  $e^{-t/\tau_c}$ , et on obtient alors le produit  $e^{-t/\tau_f} e^{-t/\tau_c} = e^{-t(1/\tau_f + 1/\tau_c)}$  qui peut être considéré comme très proche de  $e^{-t/\tau_f}$ . On admettra que cette simplification reste valable pour une réorientation anisotrope du directeur, et on peut donc écrire :

$$\overline{Y_2^0(\Omega^r(t))Y_2^0(\Omega^r(0))} = (1/4\pi)[(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) - SS']e^{-t/\tau_f} + SS' \overline{Y_2^0(\psi(t))Y_2^0(\psi(0))}$$

équation 3.16

Le dernier terme de l'équation précédente est la fonction d'autocorrélation correspondant au mouvement du directeur ( $\Psi$  est l'angle de ce directeur avec l'axe Z du repère du laboratoire), et on peut donc écrire la fonction de corrélation croisée normalisée comme :

$$\tilde{J}^{rr'}(\omega) = [(1/2)(3\cos^2\alpha - 1) - SS'] \frac{2\tau_f}{1 + \omega^2\tau_f^2} + SS' \tilde{J}^{auto,D}(\omega)$$

équation 3.17

$\tilde{J}^{auto,D}(\omega)$  étant la densité spectrale d'autocorrélation associée avec le mouvement lent du directeur local.

Rappelons les hypothèses qui permettent d'obtenir ce résultat assez simple (Canet et al., 2003):

- un milieu isotrope,
- une direction préférentielle (directeur local) présentant une symétrie d'ordre supérieur ou égal à trois,
- une décomposition en deux mouvements indépendants avec des échelles de temps significativement différentes : mouvement global lent et mouvements locaux rapides,

- et un tenseur de symétrie axiale pour les deux interactions considérées.

On peut remarquer que les paramètres d'ordre  $S$  et  $S'$  décrivent l'organisation autour du *même* directeur local. En raison de la symétrie d'ordre trois nécessaire à l'approche décrite précédemment, on peut écrire :

$$Y_2^0(\theta') = (1/2)(3\cos^2\alpha - 1)Y_2^0(\theta) \quad \text{équation 3.18}$$

Par conséquent, et étant donné que les paramètres d'ordre correspondent à une moyenne d'ensemble des harmoniques sphériques, une relation similaire peut être écrite pour les paramètres d'ordre :

$$S' = (1/2)(3\cos^2\alpha - 1)S \quad \text{équation 3.19}$$

On peut ainsi réécrire l'équation 3.17 de façon plus simple (Canet et al., 2003):

$$\tilde{J}^{rr'}(\omega) = (1/2)(3\cos^2\alpha - 1)[(1 - S^2)\frac{2\tau_f}{1 + \omega^2\tau_f^2} + S^2\tilde{J}^{auto,D}(\omega)] \quad \text{équation 3.20}$$

Concernant les densités spectrales d'autocorrélation,  $\alpha$  est égal à zéro, et les paramètres d'ordre correspondant à des interactions différentes sont nécessairement différents. Par exemple, si l'on considère les deux mécanismes d'interaction dipolaire et csa, et une réorientation globale isotrope, les trois densités spectrales possibles s'écrivent:

$$\begin{aligned} \tilde{J}_{auto}^{dip}(\omega) &= (1 - S^2)\frac{2\tau_f}{1 + \omega^2\tau_f^2} + S^2\frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \\ \tilde{J}_{auto}^{csa}(\omega) &= \left[1 - (1/4)(3\cos^2\alpha - 1)^2 S^2\right]\frac{2\tau_f}{1 + \omega^2\tau_f^2} + (1/4)(3\cos^2\alpha - 1)^2 S^2\frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \\ \tilde{J}_{cross}^{dip,csa}(\omega) &= (1/2)(3\cos^2\alpha - 1)[(1 - S^2)\frac{2\tau_f}{1 + \omega^2\tau_f^2} + S^2\frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2}] \end{aligned} \quad \text{équation 3.21}$$

$S$  étant le paramètre d'ordre pour l'interaction dipolaire, et  $\alpha$  l'angle entre les vecteurs de relaxation csa et dipolaire, c'est-à-dire entre l'axe de symétrie du tenseur d'écran du noyau considéré et un vecteur formé par deux spins.

L'expression de  $\tilde{J}(\omega) = (1-S^2) \frac{2\tau_f}{1+\omega^2\tau_f^2} + S^2 \frac{2\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2}$  en fonction de la fréquence  $\omega/2\pi$  est

représentée sur la figure 3.4.

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1  
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES  
Rue du Jardin Botanique  
54600 VILLERS-LES-NANCY

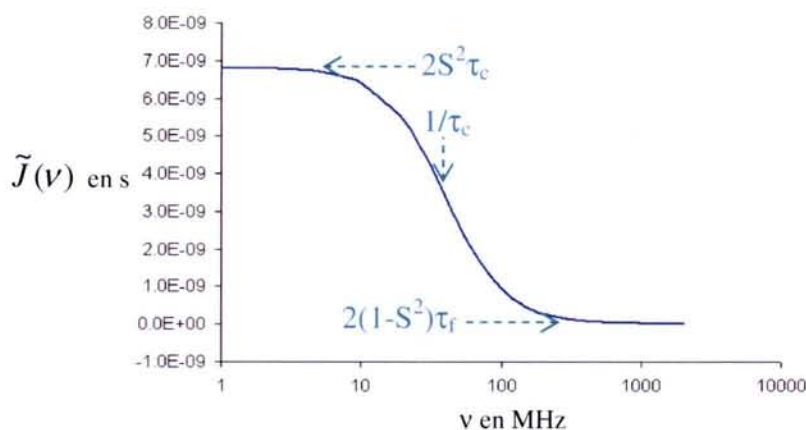


figure 3.4 Evolution de la densité spectrale normalisée dans un modèle de mouvement Lipari-Szabo (réorientation globale isotrope,  $\tau_c=4.10^{-9}$ s,  $\tau_f=3.10^{-11}$ s et  $S^2=0.85$ ) en fonction de la fréquence de mesure. On remarquera l'existence de deux paliers associés aux deux régimes de mouvement.

### 3.2.3. Le modèle de Lipari-Szabo étendu

Dans certains cas, le modèle de Lipari-Szabo s'est avéré insuffisant et les résultats ont conduit à étendre ce modèle en introduisant deux types de mouvements internes (Clare et al., 1990a, 1990b). Les mouvements internes sont alors caractérisés par deux temps de corrélation,  $\tau_f$  et  $\tau_s$ , et deux paramètres d'ordre,  $S_f^2$  et  $S_s^2$  ( $\tau_f$  et  $S_f^2$  pour les mouvements internes très rapides, et  $\tau_s$  et  $S_s^2$  pour les mouvements internes moins rapides). Les deux paramètres d'ordre  $S_f^2$  et  $S_s^2$  sont reliés entre eux par la relation  $S^2 = S_f^2 S_s^2$ , où  $S^2$  représente le paramètre d'ordre de l'ensemble des mouvements internes. La fonction densité spectrale devient :

$$\tilde{J}_{auto}(\omega) = (1-S_f^2) \frac{2\tau_f}{1+\omega^2\tau_f^2} + S_f^2(1-S_s^2) \frac{2\tau_s}{1+\omega^2\tau_s^2} + S_f^2 S_s^2 \frac{2\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2} \quad \text{équation 3.22}$$

Plus récemment, des formes fonctionnelles de la densité spectrale ont été introduites (Halle et al., 1998) et généralisent l'expression 3.22 en :

$$J(\omega) = \sum_{n=1}^N c_n \frac{\tau_n}{1 + \omega^2 \tau_n^2}$$

Où N est le nombre de fonctions lorentziennes à utiliser (déterminé dans l'ajustement par moindres carrés non linéaires). Les paramètres de cette expression pris individuellement n'ont pas de sens physique, mais le temps de corrélation d'intérêt peut être obtenu par une combinaison des termes  $c_n$  et  $\tau_n$ .

### 3.2.4. L'anisotropie de réorientation

La réorientation isotrope s'applique à une molécule dont la réorientation est assimilable à celle d'une sphère. Si cela n'est pas le cas, au lieu d'un seul coefficient de diffusion, il faudra envisager une représentation tensorielle du phénomène. Le tenseur de diffusion peut s'exprimer dans son système d'axes propres :

$$\begin{pmatrix} D_x & 0 & 0 \\ 0 & D_y & 0 \\ 0 & 0 & D_z \end{pmatrix} \quad \text{avec} \quad \begin{cases} D_x = \frac{1}{6\tau_x} \\ D_y = \frac{1}{6\tau_y} \\ D_z = \frac{1}{6\tau_z} \end{cases} \quad \text{équation 3.23}$$

Désignons par X, Y, Z les axes principaux du tenseur de diffusion rotationnelle, Z étant l'axe de plus haute symétrie si il y en a une. Les coefficients de diffusion  $D_i = 1/\tau_i$  décrivent ainsi le mouvement autour des axes i. A priori, l'orientation du tenseur de diffusion est inconnue, exception faite pour les molécules possédant un nombre suffisant d'éléments de symétrie (Huntress, 1968). Nous noterons  $\theta_r$  et  $\varphi_r$  les angles polaires formés par le vecteur associé au mécanisme de relaxation considéré dans le repère de diffusion (figure 3.5).

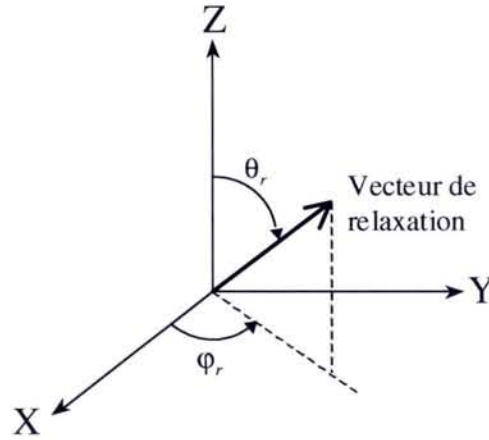


figure 3.5 Définition des angles polaires  $\theta_r$  et  $\varphi_r$  par rapport aux axes principaux (X,Y,Z) du tenseur de rotation-diffusion.

On pourra distinguer plusieurs cas particuliers : si  $D_X=D_Y=D_Z$ , nous retrouvons le mouvement isotrope; si  $D_X=D_Y$ , la réorientation est de symétrie axiale; et enfin si  $D_X \neq D_Y \neq D_Z$ , la réorientation est totalement anisotrope.

*Expression des densités spectrales normalisées pour une diffusion rotationnelle de symétrie axiale*

Dans le cas d'une symétrie axiale, on utilise les notations  $D_{\perp} = D_X = D_Y$ ,  $D_{\parallel} = D_Z$ , et on quantifie l'écart au mouvement isotrope par un coefficient appelé anisotropie de réorientation et noté  $a = D_Z/D_X = \tau_{\perp} / \tau_{\parallel}$ .

Pour simplifier l'expression des densités spectrales, il est commode de définir trois temps de corrélation effectifs :

$$1/\tau_1 = 6D_{\perp} ; 1/\tau_2 = 5D_{\perp} + D_{\parallel} ; 1/\tau_3 = 2D_{\perp} + 4D_{\parallel} \quad \text{équation 3.24}$$

Avec ces notations, les densités spectrales normalisées de corrélation croisée peuvent être calculées à partir des travaux de Woessner (Woessner, 1962), Hubbard (Hubbard, 1970) et Huntress (Huntress, 1968):

$$\begin{aligned}
 \tilde{J}^{rr'}(\omega) &= (1/2)(3\cos^2\theta_r - 1)(1/2)(3\cos^2\theta_{r'} - 1) \frac{2\tau_1}{1 + \omega^2\tau_1^2} \\
 &+ (3/4)\sin(2\theta_r)\sin(2\theta_{r'}) \cdot \cos(\varphi_r - \varphi_{r'}) \frac{2\tau_2}{1 + \omega^2\tau_2^2} \\
 &+ (3/4)\sin^2\theta_r \sin^2\theta_{r'} \cdot \cos 2(\varphi_r - \varphi_{r'}) \frac{2\tau_3}{1 + \omega^2\tau_3^2}
 \end{aligned}
 \tag{équation 3.25}$$

Pour obtenir les densités spectrales d'autocorrélation, il suffit d'égaliser les deux mécanismes  $r$  et  $r'$  ce qui implique  $\theta_r = \theta_{r'}$  et  $\varphi_r = \varphi_{r'}$ . Ce modèle de réorientation a été notamment utilisé dans des travaux antérieurs du laboratoire pour rendre compte de la dynamique de molécules telles que le benzène (Python et al., 1997), l'hexafluorobenzène (Guenneau et al., 1998), ou le nd11 (Walker et al., 2002a) puisque, de par l'existence d'un plan de symétrie horizontal, on peut raisonnablement penser que la réorientation de ces molécules est axiale.

*Expression des densités spectrales normalisées pour une diffusion rotationnelle totalement anisotrope*

Lorsque la réorientation des molécules ne présente pas de symétrie particulière, on est amené à utiliser trois coefficients de diffusion différents pour décrire les mouvements moléculaires. Il est pertinent d'introduire les notations suivantes :  $D_{\pm} = (D_x \pm D_y)/2$ . Les densités spectrales normalisées prennent alors la forme suivante :

$$\tilde{J}^{rr'}(\omega) = \sum_{k=-2}^2 a_k \frac{(2/\lambda_k)}{1 + \omega^2/\lambda_k^2}
 \tag{équation 3.26}$$

avec  $\lambda_0 = 4D_z + 2D_+$

$$\lambda_{\pm 1} = D_z + 5D_+ \pm 3D_-
 \tag{équation 3.27}$$

$$\lambda_{\pm 2} = 2D_z + 4D_+ \pm [4(D_z - D_+)^2 + 12D_-^2]^{1/2}
 \tag{équation 3.28}$$

$$a_0 = (3/4)\sin^2\theta_r \sin^2\theta_{r'} \sin 2\varphi_r \sin 2\varphi_{r'}
 \tag{équation 3.29}$$

$$a_1 = (3/4)\sin 2\theta_r \sin 2\theta_{r'} \sin \varphi_r \sin \varphi_{r'}
 \tag{équation 3.30}$$

$$a_{-1} = (3/4)\sin 2\theta_r \sin 2\theta_{r'} \cos \varphi_r \cos \varphi_{r'}
 \tag{équation 3.31}$$

$$\begin{aligned}
a_{\pm 2} = & \frac{1}{12D_-^2 + d_{\pm}^2} \\
& \cdot \left\{ (9D_-^2) \sin^2 \theta_r \cos 2\varphi_r \sin^2 \theta_r \cos 2\varphi_r - (3D_- d_{\pm}) \left[ \sin^2 \theta_r \cos 2\varphi_r (1/2) \right. \right. \\
& \cdot (3 \cos^2 \theta_r - 1) + (1/2)(3 \cos^2 \theta_r - 1) \\
& \cdot \sin^2 \theta_r \cos 2\varphi_r \left. \right] + (d_{\pm}^2)(1/2) \\
& \left. (3 \cos^2 \theta_r - 1)(1/2)(3 \cos^2 \theta_r - 1) \right\}
\end{aligned}
\tag{équation 3.32}$$

$$\text{et } d_{\pm} = 2(D_z - D_+) \mp \left[ 4(D_z - D_+)^2 + 12D_-^2 \right]^{1/2}
\tag{équation 3.33}$$

Ce modèle de réorientation a été utilisé dans des travaux antérieurs du laboratoire pour rendre compte de la dynamique de molécules telles que le  $\alpha, \alpha, 2, 6$  tétrachlorotoluène (Walker et al., 2002b). Bien entendu, lorsque  $D_x$  tend vers  $D_y$  nous retrouvons le cas axial. Néanmoins, il s'agit d'un cas limite et il n'est pas possible d'utiliser numériquement ces expressions pour  $D_x = D_y$ . Dans la pratique cela implique le choix a priori du modèle de rotation-diffusion.

### 3.3. Analyse des données de relaxation en terme de dynamique

#### 3.3.1. Analyse classique

Comme nous l'avons vu, les phénomènes de relaxation sont une manifestation directe des mouvements moléculaires, les paramètres de relaxation dépendant en effet des valeurs particulières prises par la fonction de densité spectrale  $J(\omega)$ .

L'approche dite du "model-free" (Lipari et Szabo, 1982) permet de séparer le mouvement global de la protéine de ses mouvements internes, plus rapides. Elle constitue la méthode la plus usitée pour l'étude de la relaxation des noyaux azote-15 contenus dans le squelette d'une protéine (Clare et al., 1990a; Stone et al., 1992; Fischer et al., 1998; Mandel et al., 1995; Korzhnev et al., 2000). L'analyse fait intervenir deux étapes principales : 1) sélection du modèle (isotrope, axial, anisotrope) et détermination des paramètres du mouvement global, 2) détermination des paramètres des mouvements internes au niveau de chaque résidu. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour estimer le temps de corrélation pour le mouvement lent. Sous certaines conditions ( $\tau_c < 100$ ps et  $\tau_c > 1$ ns), le rapport  $R_2/R_1$  est une fonction monotone de  $\tau_c$ , indépendante (en première approximation) des mouvements internes (Kay et al., 1989; Clare et al., 1990a; Stone et al., 1992). Ainsi  $\tau_c$  est obtenu par la



moyenne des rapports  $R_2/R_1$  (Stone et al., 1992; Clore et al., 1990a), ou en moyennant les temps de corrélation obtenu pour chaque rapport  $R_2/R_1$  de chaque résidu de la protéine (Farrow et al., 1994), ou encore par un ajustement simultané des rapports  $R_2/R_1$  de chaque résidu (Barchi et al., 1994). Les noyaux pour lesquels le rapport  $R_2/R_1$  est en dehors de la déviation standard sont exclus des calculs (Clore et al., 1990a), ainsi que ceux pour lesquels l'ordonnée mesurée est faible (Stone et al., 1992). La prise en compte d'une anisotropie du mouvement global peut également être nécessaire, ceci sera développé plus en détails au paragraphe 3.4.1. En effet, le fait de négliger cette anisotropie peut fausser l'analyse des données (Schurr et al., 1994; Tjandra et al., 1996a; Hall et Fushman, 2003). Un autre problème provient des constantes utilisées dans les divers ajustements : l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 et la distance  $r_{NH}$  sont fixées et constantes pour tous les résidus, ces contraintes augmentent le risque de mauvaise interprétation des données (Tjandra et al., 1996a; Lee et Wand, 1999; Orekhov et al., 1999).

Une autre démarche consiste à échantillonner directement les fonctions de densité spectrale, ceci sans introduire à priori de modèle de mouvement. Il suffit d'exprimer ces densités spectrales en fonction des paramètres de relaxation, les équations peuvent s'écrire sous la forme d'un produit matriciel tel que :

$$\underline{J} = \underline{C} \underline{R} \quad \text{équation 3.34}$$

avec  $\underline{J}$  représentant la matrice des densités spectrales,  $\underline{C}$  la matrice des coefficients permettant de quantifier les contributions des interactions dipolaires et d'anisotropie de déplacement chimique, et  $\underline{R}$  la matrice des vitesses de relaxation.

Peng et Wagner ont proposé le calcul direct des densités spectrales aux cinq fréquences ( $0$ ,  $\omega_N$ ,  $\omega_H$ ,  $\omega_X \pm \omega_N$ ) grâce à la détermination de cinq vitesses de relaxation hétéronucléaire  $R_N(N_z)$ ,  $R_N(N_{x,y})$ ,  $R_N(H_z \leftrightarrow N_z)$ ,  $R_N(2H_z N_z)$  et  $R_N(2H_z N_{x,y})$ . On parle de "cartographie de la fonction densité spectrale" ("spectral density mapping" en anglais) (Peng et Wagner, 1992a, 1992b).

$$\begin{bmatrix} J(0) \\ J(\omega_N) \\ J(\omega_H - \omega_N) \\ J(\omega_H) \\ J(\omega_H + \omega_N) \\ \rho_{HH} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{-3}{8e} & \frac{3}{4e} & 0 & \frac{-3}{8e} & \frac{3}{4e} & \frac{-3}{8e} \\ \frac{1}{2e} & 0 & 0 & \frac{1}{2e} & 0 & \frac{-1}{2e} \\ \frac{1}{4d} & 0 & \frac{-1}{2d} & \frac{1}{4d} & 0 & \frac{1}{4d} \\ \frac{-1}{12d} & \frac{1}{6d} & 0 & \frac{1}{12d} & \frac{-1}{6d} & \frac{1}{12d} \\ \frac{12d}{1} & \frac{6d}{6d} & 0 & \frac{12d}{-1} & \frac{6d}{6d} & \frac{12d}{1} \\ \frac{1}{24d} & 0 & \frac{1}{12d} & \frac{-1}{24d} & 0 & \frac{1}{24d} \\ \frac{-1}{4} & \frac{-1}{2} & 0 & \frac{1}{4} & \frac{1}{2} & \frac{1}{4} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R_N(N_z) \\ R_N(N_{x,y}) \\ R_N(H_z \leftrightarrow N_z) \\ R_N(2H_z N_z) \\ R_N(2H_z N_{x,y}) \\ R_H(H_z) \end{bmatrix} \quad \text{équation 3.35}$$

$$\text{avec } d = \frac{1}{2} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2 \left( \frac{\hbar \gamma_H \gamma_N}{r_{NH}^3} \right)^2, \quad c = \left( \frac{\Delta\sigma_N \omega_N}{\sqrt{3}} \right)^2 \text{ et } e = 3d + c$$

où  $r_{NH}$  est la longueur de liaison NH dans la fonction amide et  $\Delta\sigma_N$  l'anisotropie du tenseur d'écran (supposée de symétrie axiale).

Dans cette approche, il est également nécessaire de mesurer  $\rho_{HH}$ , la contribution des interactions dipolaires proton-proton à la relaxation de l'azote-15. Cette contribution peut être estimée à partir de la mesure de la vitesse de relaxation longitudinale du proton  $R_H(H_z)$ .

La figure 3.6 montre comment la fonction de densité spectrale d'un acide aminé est échantillonnée en cinq points différents par cette méthode. Les fréquences d'échantillonnage sont évidemment fonction du champ magnétique  $B_0$  utilisé, d'où la possibilité d'améliorer la cartographie en procédant à des mesures à différents champs magnétiques (Peng et Wagner, 1995).

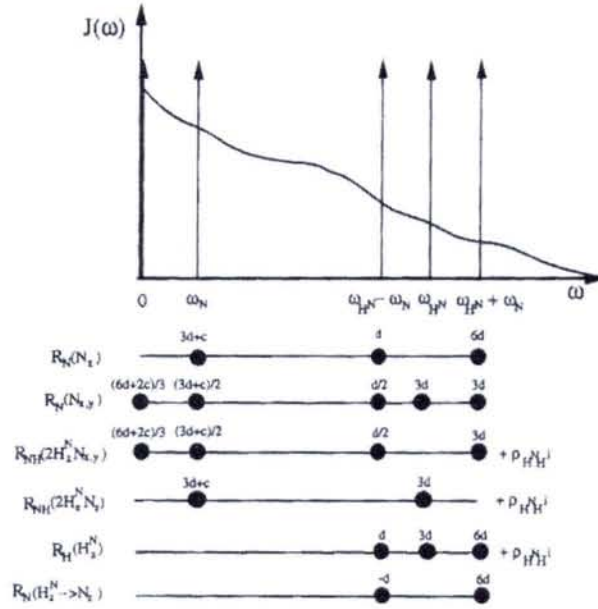


figure 3.6 Représentation schématique de l'échantillonnage de la fonction densité spectrale  $J(\omega)$  à partir de la mesure de six paramètres de relaxation à une seule valeur du champ magnétique (repris de Peng et Wagner, 1992a).  $d = 1/2(\mu_0/4\pi)^2 (\gamma_H^2 \gamma_N^2 \hbar^2 / r_{NH}^6)$  et  $c = (\Delta\sigma_N)^2 \omega_N^2 / 3$ .

Un inconvénient de cette méthode réside dans le fait que les fonctions de densité spectrale aux trois hautes fréquences ( $\omega_H + \omega_N$ ,  $\omega_H$  et  $\omega_H - \omega_N$ ) sont extrêmement "bruitées" (Peng et Wagner, 1995; Markus et al., 1996). En effet, plusieurs études ont montré que la fonction de densité spectrale est quasiment constante autour de la fréquence du proton, ceci de 400 à 600MHz et au-delà (Peng et Wagner, 1995; Lefevre et al., 1996), on pourra se référer à la figure 3.4. Il est donc possible de considérer la valeur de  $J(\omega)$  aux trois fréquences,  $\omega_H + \omega_N$ ,  $\omega_H$  et  $\omega_H - \omega_N$ , comme égale à une valeur unique  $\langle J(\omega_H) \rangle$  (Lefevre et al., 1996). La moyenne  $\langle J(\omega_H) \rangle$  est en général assimilée à  $J(\omega_H + \omega_N)$  (Ishima et Nagayama, 1995) ou à  $J(0.87\omega_H)$  (Farrow et al., 1995). L'équation matricielle n°3.35 se simplifie alors en :

$$\underline{J}_{red} = \underline{C}_{red} \underline{R}_{red} \quad \text{équation 3.36}$$

soit :

$$\begin{bmatrix} J(0) \\ J(\omega_N) \\ \langle J(\omega_H) \rangle \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -3 & 3 & -9 \\ 4e & 2e & 10e \\ 1 & 0 & -7 \\ e & & 5e \\ 0 & 0 & 1 \\ & & 5d \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R_N(N_z) \\ R_N(N_{x,y}) \\ R_N(H_z \leftrightarrow N_z) \end{bmatrix} \quad \text{équation 3.37}$$

Si l'on se restreint à la mesure des paramètres  $R_1$ ,  $R_2$  et  $eOn$ , la contribution de la relaxation dipolaire proton-proton devient négligeable (Lefevre et al., 1996). Mais si l'on mesure un quatrième paramètre de relaxation ( $R_M(2N_zH_z)$ ), cette contribution peut être calculée avec précision.

La cartographie des densités spectrales permet de mettre en évidence des zones flexibles et des zones rigides dans une protéine. Cependant, elle ne permet pas de caractériser les mouvements mis en jeu dans ces différentes zones. Pour cela, il faut recourir à des modèles physiques de ces densités spectrales.

Il est également un autre paramètre dont il faut tenir compte lors des analyses de relaxation. En effet, la relaxation transversale  $R_2$  peut contenir des contributions provenant de l'échange de sorte que sa valeur observée sera supérieure à sa "vraie" valeur (Clore et al., 1990a; Szyperski et al., 1993; Orekov et al., 1994; Akke et al., 1998; Wang et Palmer III, 2003).

$$R_2^{obs} = R_2 + R_2^{ex} \quad \text{équation 3.38}$$

La contribution d'échange variant avec le carré du champ magnétique statique, elle peut être modélisée en première approximation par :  $R_2^{ex} = \Phi \omega_N^2$ . équation 3.39

### 3.3.2. Analyse résidu par résidu

Il peut apparaître qu'un temps de corrélation unique n'est pas suffisant pour décrire les mouvements lents ressentis par un vecteur NH. Comme nous l'avons vu précédemment, ceci mène par exemple à une extension du modèle (Clore et al., 1990). Une autre approche consiste à prendre en compte une anisotropie de réorientation globale dans le modèle Lipari-Szabo. Tjandra et collègues (Tjandra et al., 1995) ont par exemple inséré une fonction de corrélation de type Woessner (Woessner, 1962) à la place de la simple exponentielle décrivant les mouvements lents. Canet et collègues (Canet et al., 2001) ont montré qu'aucune de ces approches n'est apparue satisfaisante pour l'étude des données de relaxation à cinq champs de la protéine C12A-p8<sup>MTCPI</sup>. Ils se sont donc tournés vers la définition d'un temps de corrélation *effectif* défini pour chaque résidu de la protéine. Une approche similaire a été introduite par Ochsenbein et al. en 2001. Les mouvements lents ressentis par chaque vecteur NH sont en effet certainement très compliqués et non limités au mouvement global pour lequel, de toute

manière, il faut tenir compte d'une certaine anisotropie. On suppose ainsi que la superposition de différents mouvements mène approximativement à une fonction de corrélation exponentielle différente d'un résidu à l'autre. Ce concept n'est pas nouveau, mais a toujours servi à caractériser l'anisotropie de rotation-diffusion (Barbato et al., 1992; Schurr et al., 1994; Bruschweiler et al., 1995; Andrec et al., 2000). Nous avons repris cette notion de temps de corrélation effectif en cherchant à affiner les contributions de l'échange et de l'anisotropie de déplacement chimique à la relaxation. Pour ce faire nous proposons d'utiliser les densités spectrales sous une forme fonctionnelle :

$$J(\omega) = A + \frac{B}{1 + \omega^2 \tau_{eff}^2} \quad \text{équation 3.40}$$

où A est associé aux mouvements rapides (A est indépendant de la fréquence dans la mesure où le mouvement est suffisamment rapide, on rejoint ainsi les conditions dites du rétrécissement extrême), B est associé aux mouvements lents et pourra être exprimé comme  $2\tau_{eff} S^2$  dans une approche à deux paliers (Lipari et Szabo, 1982a, 1982b), S étant le paramètre d'ordre qui décrit la restriction des mouvements rapides. A l'aide des relations du chapitre 1, et en différenciant les densités spectrales impliquant un mécanisme dipolaire et celles impliquant un mécanisme csa, on peut alors exprimer les paramètres de relaxation  $R_1$ ,  $R_2$  et  $\sigma$  comme suit :

$$R_1 = 10 a_d + G_1^d(\tau_{eff}, \omega_H, \omega_N) b_d + G_1^{csa}(\tau_{eff}, \omega_H, \omega_N) b_{csa} \quad \text{équation 3.41}$$

$$R_2 = 10 a_d + G_2^d(\tau_{eff}, \omega_H, \omega_N) b_d + G_2^{csa}(\tau_{eff}, \omega_H, \omega_N) b_{csa} + R_2^{ex} \quad \text{équation 3.42}$$

$$\sigma_{NH} = 5 a_d + G_\sigma^d(\tau_{eff}, \omega_H, \omega_N) b_d \quad \text{équation 3.43}$$

$$\text{avec } G_1^d(\tau_{eff}, \omega_H, \omega_N) = \frac{6}{1 + (\omega_H + \omega_N)^2 \tau_{eff}^2} + \frac{3}{1 + \omega_N^2 \tau_{eff}^2} + \frac{1}{1 + (\omega_H - \omega_N)^2 \tau_{eff}^2} \quad \text{équation 3.44}$$

$$G_1^{csa}(\tau_{eff}, \omega_N) = \frac{\omega_N^2}{1 + \omega_N^2 \tau_{eff}^2} \quad \text{équation 3.45}$$

$$G_2^d(\tau_{eff}, \omega_H, \omega_N) = 2 + \frac{3}{1 + (\omega_H + \omega_N)^2 \tau_{eff}^2} + \frac{3/2}{1 + \omega_N^2 \tau_{eff}^2} + \frac{1/2}{1 + (\omega_H - \omega_N)^2 \tau_{eff}^2} + \frac{3}{1 + \omega_H^2 \tau_{eff}^2} \quad \text{équation 3.46}$$

$$G_2^{csa}(\tau_{eff}, \omega_N) = (2/3)\omega_N^2 + \frac{(1/2)\omega_N^2}{1 + \omega_N^2 \tau_{eff}^2} \quad \text{équation 3.47}$$

$$G_\sigma^d(\tau_{eff}, \omega_H, \omega_N) = \frac{6}{1 + (\omega_H + \omega_N)^2 \tau_{eff}^2} - \frac{1}{1 + (\omega_H - \omega_N)^2 \tau_{eff}^2} \quad \text{équation 3.48}$$

et  $R_2^{ex}$  étant la contribution de l'échange.

On identifie  $a_d$  à  $A$ , et  $b_d$  et  $b_{csa}$  à  $B$  pour les mécanismes dipolaires et csa respectivement. On peut remarquer que l'on a négligé  $A$  dans les densités spectrales impliquant le mécanisme csa, en effet le terme qui contient  $B$  devient largement prépondérant du fait des fréquences faibles qui interviennent alors (fréquence zéro et fréquence de l'azote-15).

Si  $\tau_{eff}$  et  $R_2^{ex}$  sont connus (il seront en fait déterminés et fixés par une procédure d'optimisation décrite dans la suite), les seules inconnues sont  $a_d$ ,  $b_d$  et  $b_{csa}$ . Ces dernières peuvent être alors obtenues par une simple méthode des moindres carrés linéaire et donc de façon non ambiguë puisque le recours à un jeu de valeurs initiales est inutile. Les équations 3.41 à 3.48 peuvent être exprimées sous la forme :

$$R_i^{exp} = \sum_{j=1}^3 a_{ij} x_j \quad \text{avec } x_1=a_d, x_2=b_d \text{ et } x_3=b_{csa} \quad \text{équation 3.49}$$

On peut alors mettre le système sous forme matricielle :

$$\underline{R} = \underline{A}\underline{X} \quad \text{équation 3.50}$$

où  $\underline{A}$  est la matrice des coefficients (de taille  $n \times 3$ ),  $\underline{X}$  la matrice des inconnues (3 par résidu) et  $\underline{R}$  la matrice des paramètres de relaxation (de taille  $n$ , soit 3 par valeur du champ magnétique). Pour chacun des résidus de la protéine, ceci peut par exemple s'écrire :

$$\begin{pmatrix} R_1^{champ1} \\ R_2^{champ1} \\ \sigma^{champ1} \\ R_1^{champ2} \\ \dots \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 10 & G_1^{dchamp1} & G_1^{csachamp1} \\ 10 & G_2^{dchamp1} & G_2^{csachamp1} \\ 5 & G_\sigma^{dchamp1} & 0 \\ 10 & G_1^{dchamp2} & G_1^{csachamp2} \\ \dots & \dots & \dots \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a_d \\ b_d \\ b_{csa} \end{pmatrix} \quad \text{équation 3.51}$$

La résolution de ce système est directe. Les quantités  $a_d$ ,  $b_d$  et  $b_{csa}$  peuvent ensuite être reliées à des quantités moléculaires. Il nous faut tout d'abord rappeler la définition des facteurs d'échelle  $K_d$  (pour l'interaction dipolaire) et  $K_{csa}$  (pour le mécanisme d'anisotropie de déplacement chimique) :

$$K_d = \frac{1}{2\sqrt{5}} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \left( \frac{\gamma_H \gamma_N \hbar}{r_{NH}^3} \right) \quad \text{équation 3.52}$$

$$K_{csa} = \frac{1}{\sqrt{15}} (\Delta\sigma_N) (1/2)(3\cos^2\alpha - 1) \quad \text{équation 3.53}$$

où  $r_{NH}$  est la longueur de liaison amide NH et  $\Delta\sigma_N$  l'anisotropie du tenseur d'écran (supposée de symétrie axiale). D'après les développements du paragraphe 3.2.2 (Canet et al., 2003),  $K_{csa}$  fait intervenir le facteur  $(1/2)(3\cos^2\alpha - 1)$  où  $\alpha$  est l'angle entre le vecteur NH et l'axe de symétrie du tenseur d'écran de l'azote. Ceci revient à exprimer le paramètre d'ordre  $S^{csa}$  comme  $1/2(3\cos^2\alpha - 1)S^{dip}$ . D'après des travaux antérieurs, notamment en RMN du solide, cet angle  $\alpha$  est compris entre  $20^\circ$  et  $24^\circ$  (Oas et al., 1987; Hiyama et al., 1988; Shoji et al., 1989; Lumsder et al., 1994).

Avec ces notations et en utilisant un modèle à deux paliers ( $\tau_f$  étant le temps de corrélation associé aux mouvements locaux rapides, et  $S$  le paramètre d'ordre décrivant leur restriction), nous pouvons identifier :

$$a_d = K_d^2 (1 - S^2) (2\tau_f) \quad \text{équation 3.54}$$

$$b_d = K_d^2 S^2 (2\tau_{eff}) \quad \text{équation 3.55}$$

$$b_{csa} = K_{csa}^2 S^2 (2\tau_{eff}) \quad \text{équation 3.56}$$

En supposant que la longueur de la liaison NH est connue et identique pour tous les résidus de la protéine (1.02Å), le paramètre d'ordre peut être obtenu à partir de  $b_d$  (equation 3.55) et réinséré dans les équations 3.53 et 3.56 afin d'évaluer la quantité  $(\Delta\sigma_N) (1/2)(3\cos^2\alpha-1)$ .

Le temps de corrélation effectif  $\tau_{eff}$  est déterminé grâce à la dépendance en fréquence des paramètres de relaxation. Il est obtenu par une optimisation non linéaire (du type SIMPLEX), où l'on minimise la quantité  $\chi^2$  définie comme :

$$\chi^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{R_i^{exp} - R_i^{calc}}{\Delta R_i} \right)^2 \quad \text{équation 3.57}$$

où  $R_i$  est le paramètre de relaxation utilisé dans l'ajustement et  $\Delta R_i$  son incertitude expérimentale. Ainsi,  $a_d$ ,  $b_d$  et  $b_{csa}$  doivent être calculés (méthode linéaire) à chaque pas de la procédure d'optimisation (Canet et al., 2001).

Pour l'estimation de  $R_2^{ex}$ , nous utilisons l'expression de Habazettl et Wagner (Habazettl et Wagner, 1995; Phan et al., 1996) selon laquelle la contribution de l'échange est proportionnelle au carré de la fréquence de mesure de l'azote-15, et peut être exprimée comme  $\Phi\omega_N^2$ . Ainsi, on peut écrire :

$$2R_2 - R_1 \approx 4b_d + [(4/3)b_{csa} + 2\Phi] \omega_N^2, \quad \text{équation 3.58}$$

L'ordonnée à l'origine de  $2R_2 - R_1$  en fonction de  $\omega_N^2$  correspond à  $4b_d$ , et la pente de la droite à  $[(4/3)b_{csa} + 2\Phi]$ . Nous pouvons ainsi évaluer le terme  $\Phi$  en utilisant le fait que  $b_{csa} = b_d \frac{K_{csa}^2}{K_d^2}$ .

Le processus global correspond à une succession d'itérations (figure 3.7) : on utilise une valeur initiale pour  $K_{csa}$  (obtenue avec une valeur de -170ppm pour  $[(\Delta\sigma_N) (1/2)(3\cos^2\alpha-1)]$ ). Le terme d'échange est ainsi calculé à l'aide de l'équation 3.58 et nous sert à corriger les vitesses expérimentales d'autorelaxation  $R_2$ . Les paramètres expérimentaux,  $R_1$ ,  $\sigma$  et  $R_2$  corrigés de l'échange ( $R_2 - R_2^{ex}$ ), nous permettent ensuite de calculer  $a_d$ ,  $b_d$ ,  $b_{csa}$  et  $\tau_{eff}$  comme



décrit précédemment (Canet et al., 2001). Enfin, à partir des valeurs de  $b_{csa}$  et  $b_d$  obtenues, on calcule une nouvelle valeur de  $K_{csa}$ , et tout le processus est répété jusqu'à ce que  $K_{csa}$  ne varie plus (variation inférieure à 0.5%).

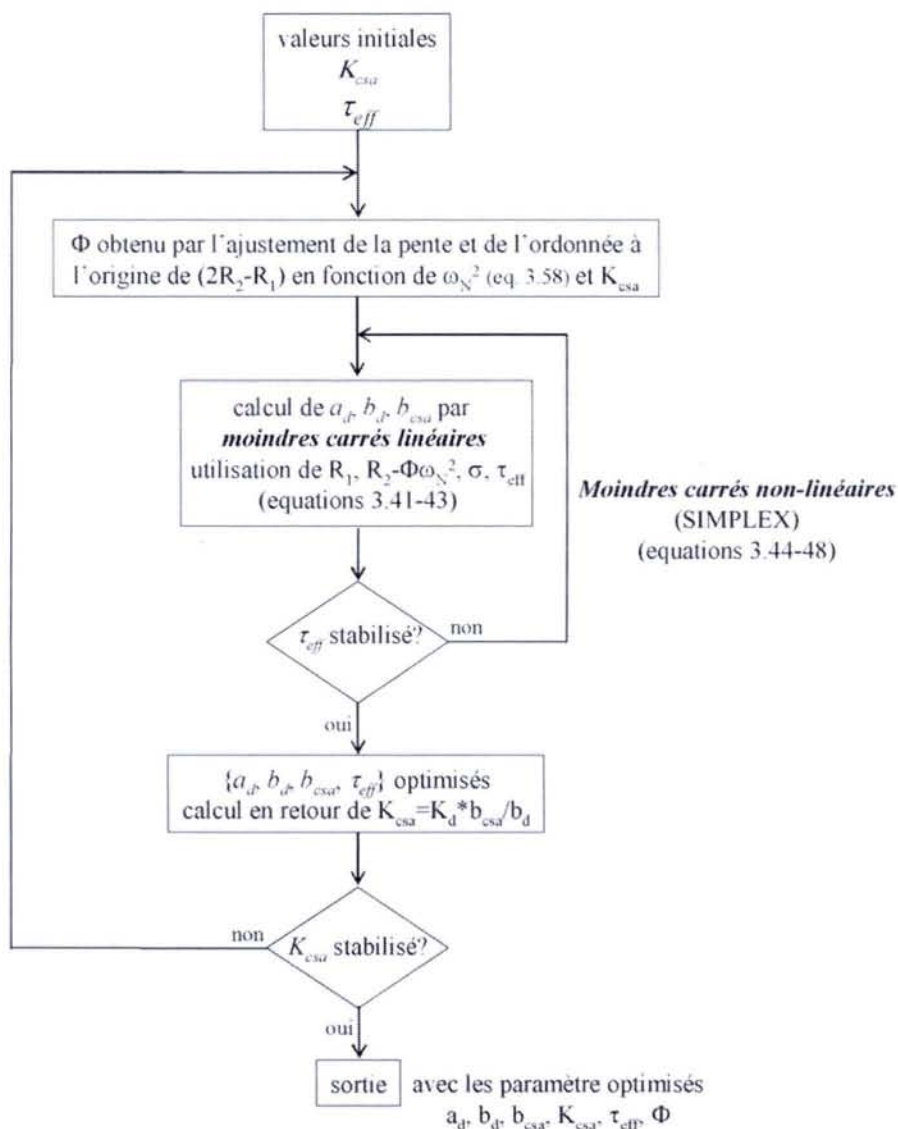
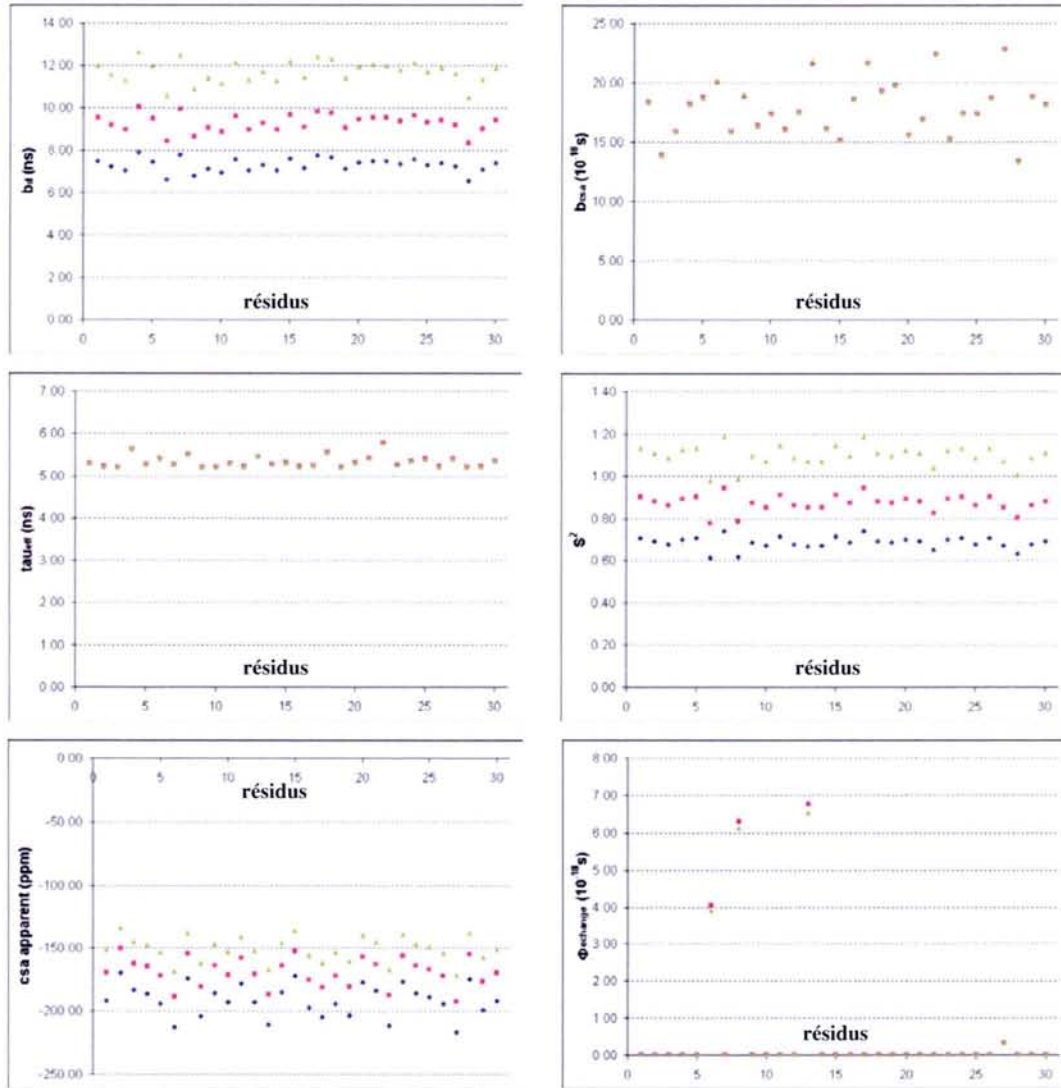


figure 3.7 Diagramme décrivant tout le processus d'ajustement.  $K_d$  est supposé constant durant toute la procédure ( $r_{NH}=1.02\text{\AA}$ ).

Cette méthode est auto-cohérente et nous donne accès non seulement aux contributions d'échange mais aussi à la meilleure valeur de  $K_{csa}$  compatible avec les trois paramètres de relaxation mesurés à au moins deux valeurs différentes du champ magnétique. La seule hypothèse du processus concerne la distance NH que nous avons fixée à  $1.02\text{\AA}$  (ce qui revient à fixer le facteur d'échelle  $K_d$  à  $1.611 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ). Dans le but d'évaluer l'influence de cette distance sur les quantités à déterminer, nous avons utilisé un jeu de données de relaxation

synthétiques qui a été analysé en prenant trois valeurs différentes pour la longueur de la liaison NH (figure 3.8).



**figure 3.8** Influence de la valeur  $r_{NH}$  dans la procédure d'ajustement décrite sur la figure 3.7. Les calculs sont menés sur des données synthétiques calculées à trois valeurs du champ magnétique (9.4T, 11.7T et 14.1T) (voir l'annexe A3.1 pour le détail des calculs). Trois valeurs ont été utilisées pour le paramètre  $K_d$  lors de l'ajustement:  $K_d=1.8164 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$  ( $r_{NH}=0.98\text{\AA}$ , losanges bleus),  $K_d=1.6110 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$  ( $r_{NH}=1.02\text{\AA}$ , carrés roses) et  $K_d=1.4354 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$  ( $r_{NH}=1.06\text{\AA}$ , triangles verts). Le csa apparent correspond au paramètre  $(\Delta\sigma_N) \cdot (1/2)(3\cos^2\alpha-1)$ .

Ces calculs illustrent les points suivants :

- le paramètre  $b_d$  (ainsi que  $a_d$ ) est fonction de  $K_d$ ; or les paramètres d'ordre  $S$  sont déterminés à partir de cette valeur, ils sont donc fonction eux aussi de la valeur de la distance  $r_{NH}$ ,
- la détermination de  $b_{csa}$ , quant à elle, est totalement indépendante de  $r_{NH}$ ,

- l'anisotropie de déplacement chimique apparente étant calculée à partir des grandeurs  $b_d$  et  $b_{csa}$ , elle est fonction de la distance  $r_{NH}$ ,
- le temps de corrélation effectif  $\tau_{eff}$  est lui indépendant de la distance  $r_{NH}$ , il est en fait indépendant de  $K_{csa}$  et de  $K_d$ , sa détermination relevant essentiellement de l'analyse des paramètres de relaxation en fonction de la valeur du champ magnétique,
- le terme d'échange est peu sensible à la distance  $r_{NH}$ .

Nous avons appliqué cette méthode aux données de relaxation mesurées à cinq champs magnétiques sur un échantillon de C12A-p8<sup>MTCPI</sup>. La validité de la méthode peut être appréciée en comparant les données expérimentales et recalculées (figure 3.9).

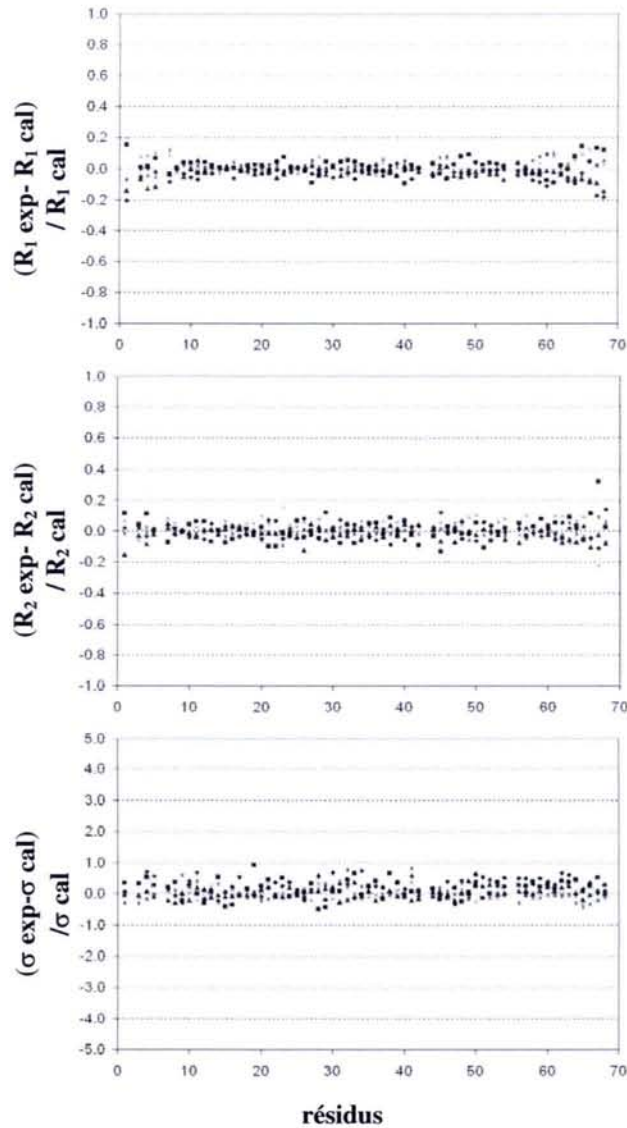
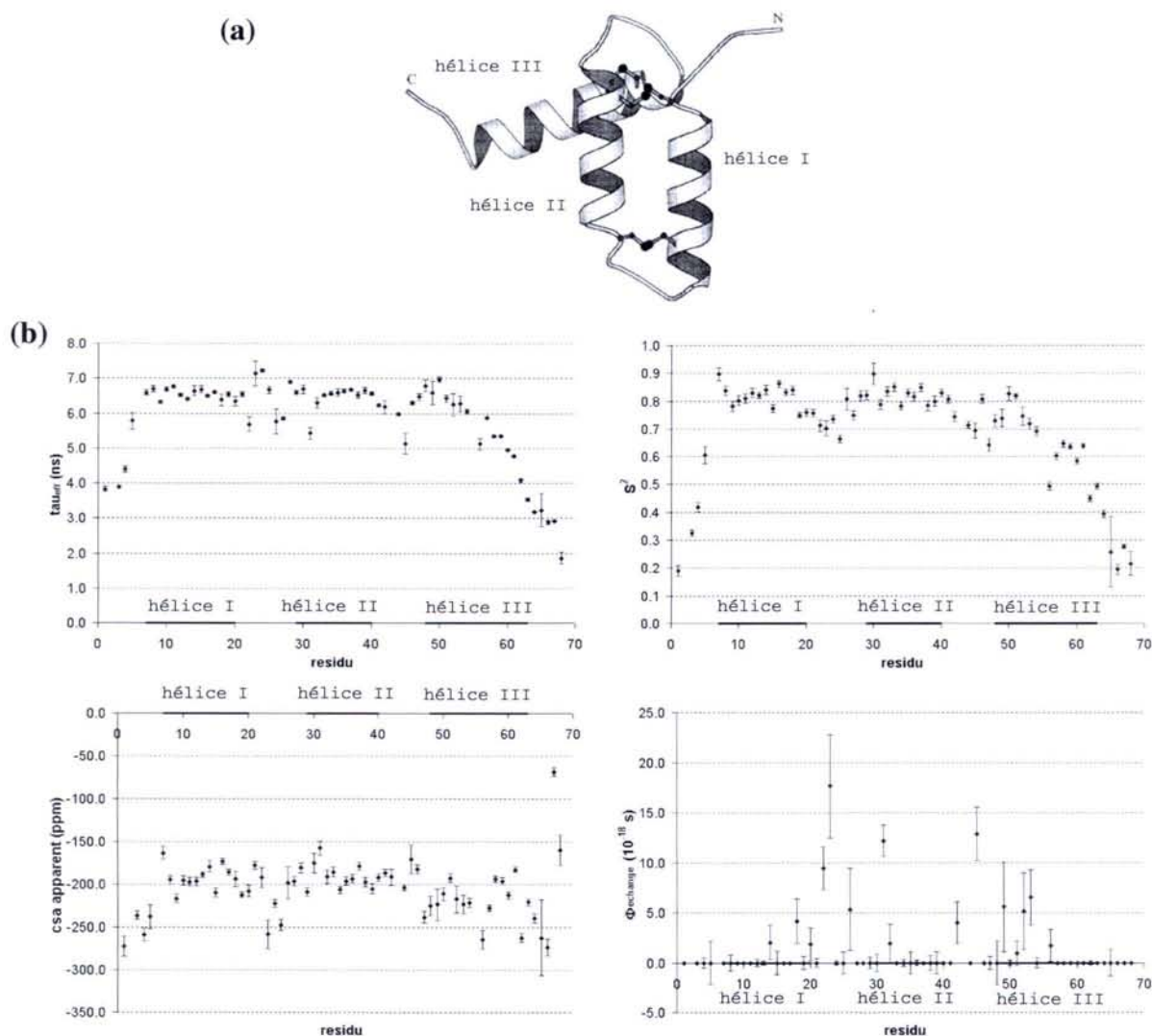


figure 3.9 Ecarts relatifs entre les valeurs expérimentales et recalculées de  $R_1$ ,  $R_2$  et  $\sigma_{NH}$ .  $\tau_{eff}$  est ajusté résidu par résidu à partir de tous les paramètres de relaxation. Losanges: données à 9.4 T; carrés: données à 11.75 T; triangles: données à 14.1 T; croix: données à 16.45 T; et étoiles: données à 18.8 T.

La figure 3.10 présente l'interprétation des résultats ( $b_d$ ,  $b_{csa}$ ,  $\tau_{eff}$ ) obtenus sur cette protéine pour un modèle Lipari-Szabo.

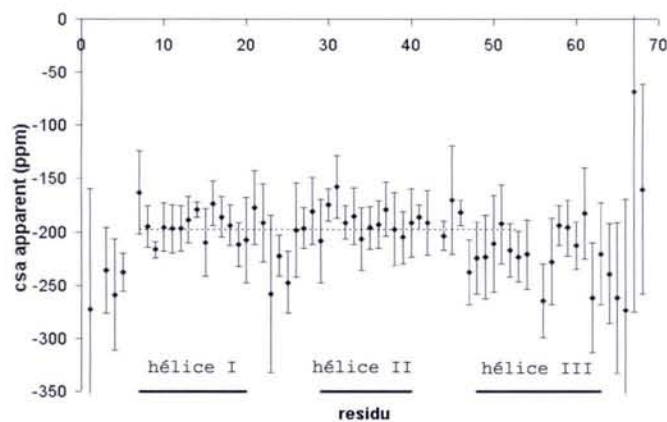


**figure 3.10** (a) Vue schématique de la protéine p8<sup>MTCPI</sup>. (b) Résultats obtenus en fonction des résidus de la protéine : temps de corrélation effectifs (en haut à gauche), paramètres d'ordre (en haut à droite), anisotropie de déplacement chimique (en bas à gauche) et contribution de l'échange (en bas à droite). Le csa est exprimé à l'aide du paramètre ( $\Delta\sigma_N$ )  $(1/2)(3\cos^2\alpha-1)$  (équation 3.53) et l'échange avec  $\Phi$  (équation 3.58). Les barres d'erreur proviennent d'un calcul de type Monte Carlo.

L'interprétation des temps de corrélation effectifs  $\tau_{eff}$  sera discutée au paragraphe 3.4. En ce qui concerne les paramètres d'ordre, on peut visualiser directement la structure secondaire de la protéine sur la figure 3.10. Les hélices I et II, qui sont liées par des ponts disulfures, sont très rigides, alors que la troisième hélice semble plus flexible.

Les termes d'échange et l'anisotropie de déplacement chimique obtenus sont également présentés sur la figure 3.10. On peut ainsi remarquer que seuls quelques résidus sont affectés par les phénomènes d'échange (contrairement à ce qui est obtenu en réalisant un calcul direct

avec l'équation 3.58 et en supposant une valeur constante pour  $\Delta\sigma_N$ ). En fait seuls quatre résidus montrent une contribution de l'échange significative (supérieure à 10% du  $R_2$  mesuré) : les résidus Ser22, Tyr23, Val31, et Gly45. Les valeurs de l'anisotropie de déplacement chimique (rappelons qu'elles correspondent à  $(\Delta\sigma_N) (1/2)(3\cos^2\alpha-1)$ ) montrent des variations relativement importantes. Cependant, aucune relation n'a pu être établie avec la nature de l'acide aminé correspondant. En fait, Canet et collègues (Canet et al., 2001) ont préconisé un calcul d'erreur statistique car les calculs d'erreur Monte Carlo ne tiennent pas compte des erreurs systématiques (notamment instrumentales). Les incertitudes obtenues avec cette méthode sont présentées sur la figure 3.11. Il apparaît alors difficile de détecter une variation significative de l'anisotropie de déplacement chimique le long du squelette de la protéine. On peut notamment remarquer que les très grandes valeurs absolues de csa apparaissant pour les résidus situés aux extrémités de la protéine sont affectées de barres d'erreur telles que l'on se situe à nouveau dans la gamme attendue.



**figure 3.11** Valeurs du csa apparent (voir figure 3.10) avec des barres d'erreur résultant d'un calcul statistique. La ligne pointillée représente la valeur moyenne (-199ppm) obtenue sur le cœur de la protéine (résidus 7 à 53).

De plus, concernant les résidus qui montrent une contribution de l'échange significative, la quantitativité des résultats obtenus est à prendre avec précaution en raison de l'hypothèse utilisée pour modéliser l'échange (équation 3.58) (Millet et al., 2000); néanmoins, on distingue clairement et qualitativement ces résidus.

La méthode a également été appliquée sur les paramètres de relaxation de l'ubiquitine mesurés à trois valeurs du champ magnétique. Les résultats, qui conduisent aux mêmes conclusions, sont présentés en annexe A3.2.

Enfin, nous avons étudié les données de relaxation de la protéine p13<sup>MTCP1</sup> (mesurées à trois champs, et fournies par C.Roumestand). La figure 3.12 présente les résultats obtenus sur cette protéine et pour trois températures différentes : 293K, 298K et 303K.

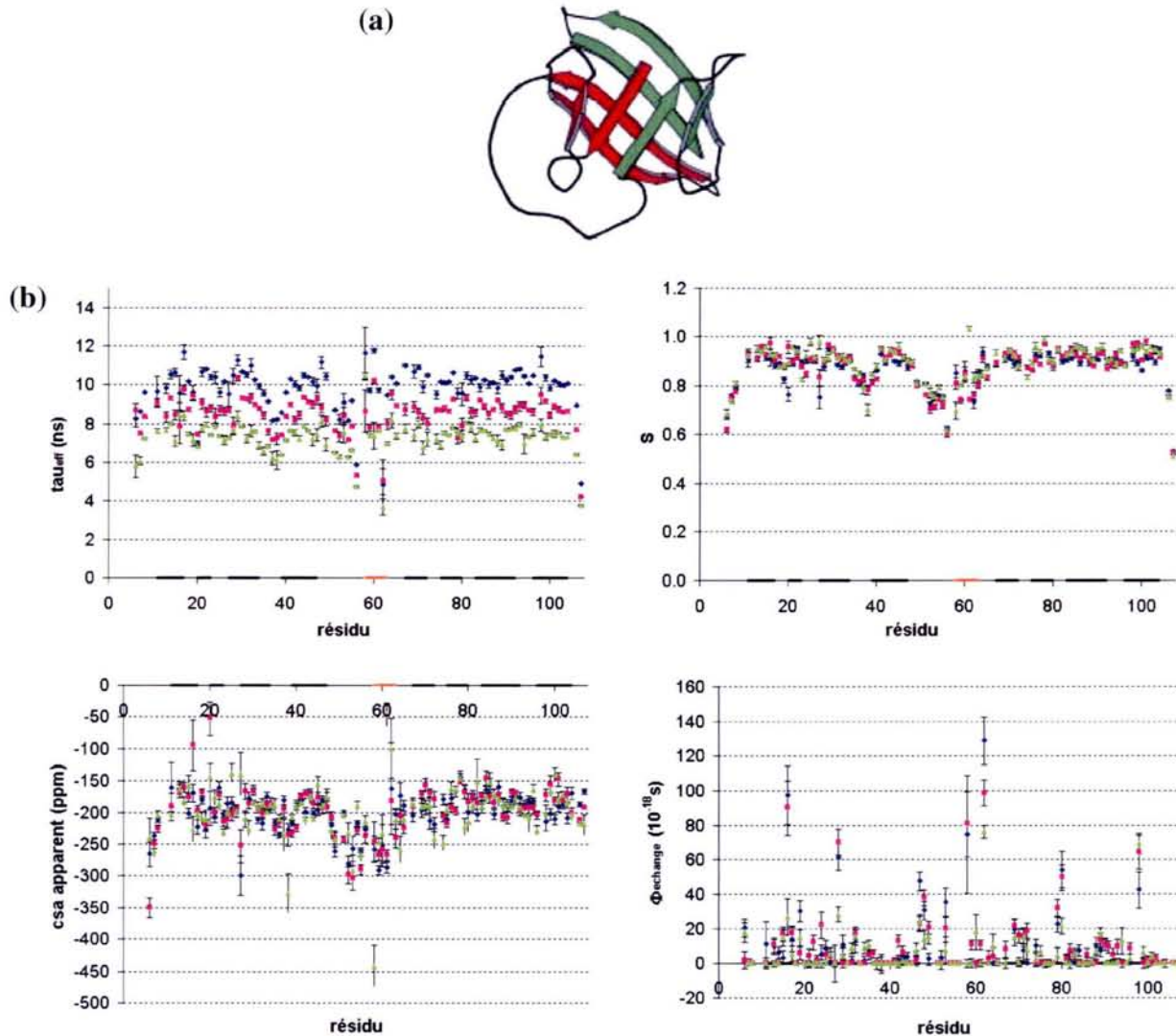
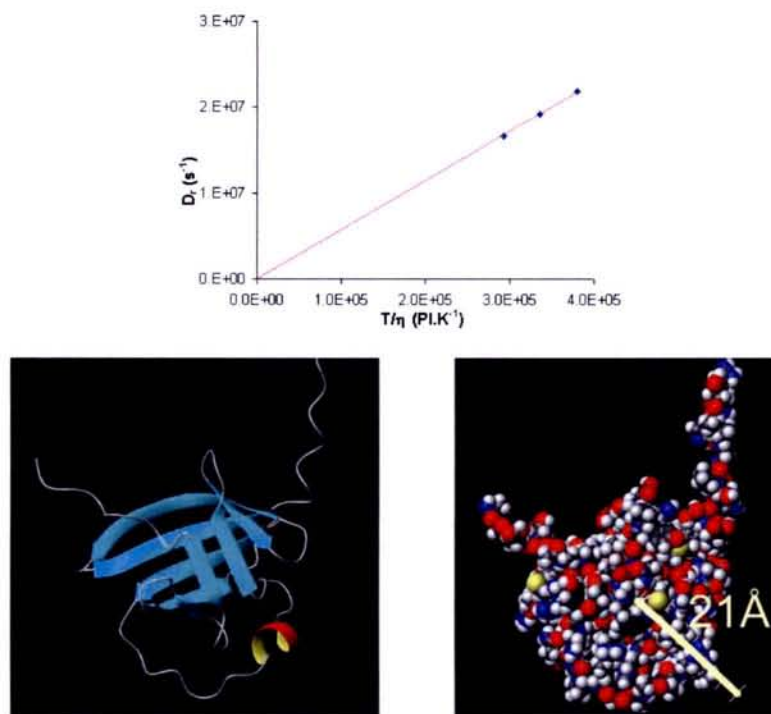


figure 3.12 (a) Vue schématique de la protéine p13<sup>MTCP1</sup> (Yang et al., 1998). Les brins appartenant à chaque feuillet- $\beta$  sont représentés en verts et rouge, respectivement. (b) Résultats obtenus en fonction des résidus de la protéine : temps de corrélation effectifs (en haut à gauche), paramètres d'ordre (en haut à droite), anisotropie de déplacement chimique (en bas à gauche) et contribution de l'échange (en bas à droite). Les barres d'erreur proviennent d'un calcul Monte Carlo. Losanges bleus : données à 293K, carrés rose : données à 298K, et triangles verts : données à 303K.

On peut remarquer l'influence importante d'une faible variation de température sur le temps de corrélation : plus la température augmente, plus le mouvement global est rapide ce qui se traduit par une diminution du temps de corrélation. Par ailleurs, la restriction des mouvements internes (paramètre d'ordre  $S$ ) ne semble pas (ou très peu) affectée par les modifications de

température, comme le prédisent des travaux antérieurs (Wang et al., 2003). L'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 n'est pas non plus sensible à la température, quant à l'échange, les barres d'erreur ne nous permettent pas de conclure. Ces résultats indiquent que la structure de la protéine n'est pas affectée par les faibles variations de la température, seule sa relation avec le solvant est modifiée entraînant ainsi une variation de la rotation-diffusion.

L'utilisation de la loi de Stokes-Einstein ( $D_r = \frac{1}{6\tau_c} = \frac{k_B T}{8\pi r_h^3 \eta}$ , avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue,  $r_h$  le rayon hydrodynamique de la molécule et  $\eta$  la viscosité du milieu, ici l'eau) nous permet de confirmer cette analyse. En effet, il apparaît d'après cette relation que la modification des temps de corrélation effectifs en fonction de la température provient essentiellement de la modification de la viscosité du milieu, le rayon hydrodynamique de la protéine restant constant (21.3Å, figure 3.13).



**figure 3.13** Haut : évolution du coefficient de diffusion  $D_r$  de la protéine p13 en fonction de la température. Bas : représentation du rayon hydrodynamique obtenu à partir de la relation de Stokes-Einstein.

Les mesures des temps de relaxation transversale de l'azote-15 ont pu être effectuées de deux manières différentes à 293K. Nous disposons donc de deux jeux de données (à trois champs chacun) : l'un correspond à des  $R_2$  mesurés avec un train d'impulsions CPMG classique (temps entre les impulsions d'angle  $\pi$  égal à 1ms, voir §2.2), et l'autre à des  $R_2$  mesurés avec un "simple" écho de Hahn. Des études ont montré que l'utilisation d'un  $\tau_{cp}$  petit (temps entre

les impulsions d'angle  $\pi$  pendant le train d'impulsions) permettait d'atténuer les effets de l'échange sur le temps de relaxation transversale (Carr et Purcell, 1954; Meiboom et Gill, 1958 ; Millet et al., 2000; Palmer III et al., 2001). La figure 3.14 montre une courbe de dispersion de relaxation ( $R_2^{ex}$  en fonction de  $\omega_{cp} \propto 1/\tau_{cp}$ ) : la mesure par simple écho devrait donc donner des  $R_2$  incluant une contribution de l'échange significativement plus importante par rapport à la mesure par CPMG.

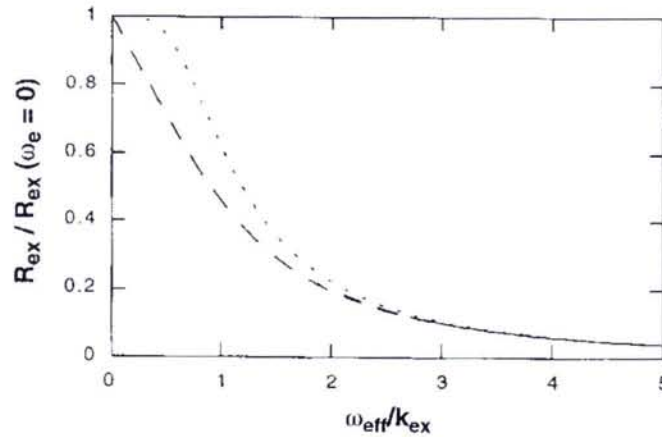


figure 3.14 Comparaison de la dispersion en relaxation lors des expériences CPMG (repris de Palmer III et al., 2001). Les pointillés correspondent à un échange lent et les tirets à un échange rapide.  $\omega_{eff} \propto 1/\tau_{cp}$ , le lecteur pourra se référer à l'article de Palmer III et al. pour une description plus détaillée des paramètres entrant en jeu. Plus  $\omega_{eff}$  est petit (plus  $\tau_{cp}$  est grand), plus la contribution d'échange est importante.

La figure 3.15 montre les différences entre les temps de relaxation transversale mesurés par simple écho et ceux mesurés par CPMG. On peut ainsi identifier quelques résidus qui semblent affectés par l'échange : les résidus Asp11, His12, His16, Thr28, Ser58, Leu60, Thr62, Met68, Asn80, Gln97, Glu98, et Leu99. Nous avons ensuite appliqué la procédure d'ajustement décrite précédemment aux deux jeux de données.



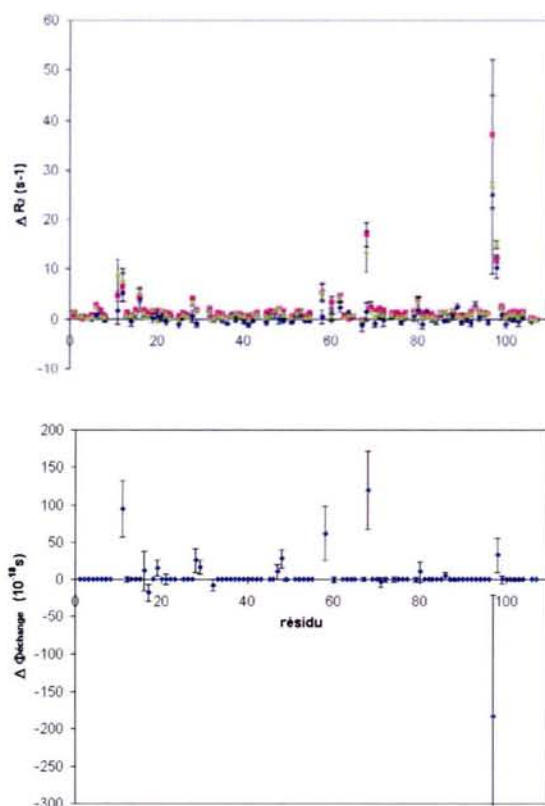


figure 3.15 Données et résultats obtenus en fonction des résidus de la protéine p13<sup>MTCPI</sup>. Haut : différences absolues entre les  $R_2$  mesurés par un simple écho et les  $R_2$  mesurés avec un train d'impulsions CPMG aux trois champs : Losanges bleus : données à 9.4T, carrés rose : données à 11.5T, et triangles verts : données à 14.1T. Bas : différences absolues entre les contributions d'échange résultant de l'analyse des données, 1) en utilisant les  $R_2$  mesurés par un simple écho, 2) en utilisant les  $R_2$  mesurés par un train d'impulsions CPMG. Les barres d'erreur proviennent d'un calcul de type Monte Carlo.

Les contributions d'échange que l'on trouve après ajustement confirment les observations précédentes, elles sont significativement supérieures avec les données mesurées par un simple écho (figure 3.15), hormis pour le résidu Gln97 qui présente cependant une très grande barre d'erreur. Cette interprétation nous permet encore une fois de valider la méthode d'ajustement décrite précédemment. Hall et Fushman (2003) ont montré que l'analyse des contributions d'échange pouvait être biaisée si le modèle de réorientation envisagé n'était pas le bon, la présente analyse évite ces problèmes grâce à l'utilisation des temps de corrélation effectifs et donc sans choisir de modèle de réorientation à priori.

Cette analyse des paramètres de relaxation ( $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ ) à plusieurs champs permet de tenir compte à la fois des phénomènes d'échange et de la variation de l'anisotropie de déplacement chimique du noyau azote-15 le long du squelette de la protéine. La méthode permet d'obtenir des paramètres dynamiques (temps de corrélation et paramètres d'ordre) indépendants du modèle de réorientation. Les divers exemples d'application présentés ici ont

validé la démarche utilisée. Il nous reste maintenant à donner une interprétation des temps de corrélation effectifs, obtenus au niveau de chaque résidu de la protéine.

### 3.4. Interprétation du temps de corrélation effectif associé aux mouvements lents de la protéine

#### 3.4.1. Représentation quadratique des temps de corrélation effectifs

Dans le cas d'une réorientation de la protéine totalement anisotrope, les valeurs des temps de corrélation effectifs dépendent de la direction relative des vecteurs NH par rapport au tenseur de rotation-diffusion. L'objectif est d'utiliser cette information géométrique pour décrire les orientations préférentielles des mouvements de la protéine. Plusieurs approches ont servi à déterminer les caractéristiques du tenseur de rotation-diffusion : la plupart consiste en une analyse directe des rapports  $R_2/R_1$  (Tjandra et al., 1995; Zeng et al., 1995; Markay et al., 1996; Luginbühl et al., 1997; Blackledge et al., 1998; Andrec et al., 2000) ou de ces rapports corrigés des contributions à hautes fréquence (Ghose et al., 2001). Des programmes d'ajustement ont d'ailleurs été mis au point et sont aujourd'hui utilisés de façon routinière (programme Tensor : Dosset et al., 2000). Une autre approche concerne une analyse locale des paramètres de relaxation et donc la définition de temps de corrélation effectifs, de façon explicite ou non (Brüschweiler et al., 1995; Lee et al., 1997). Brüschweiler et collègues (Brüschweiler et al., 1995) ont montré que, pour des petites anisotropies de rotation-diffusion, les temps de corrélation effectifs peuvent être exprimés sous forme quadratique :

$$1/6\tau_{eff}^i = \underline{e}_i' \underline{Q} \underline{e}_i \quad \text{équation 3.59}$$

avec  $\underline{e}_i$  le vecteur NH normé (coordonnées x,y,z), et  $\underline{Q}$  la matrice des vecteurs propres correspondant aux axes principaux du tenseur de rotation-diffusion.

Dans le cas d'un modèle de réorientation totalement anisotrope, ceci peut être réécrit comme :

$$1/6\tau_{eff}^i = Q_{11}x_i^2 + Q_{22}y_i^2 + Q_{33}z_i^2 + 2Q_{12}x_iy_i + 2Q_{13}x_iz_i + 2Q_{23}y_iz_i \quad \text{équation 3.60}$$

Soit, si l'on tient compte de tous les résidus (n résidus) de la protéine :

$$\begin{bmatrix} 1/6\tau_{eff}^1 \\ 1/6\tau_{eff}^2 \\ 1/6\tau_{eff}^3 \\ \dots \\ \dots \\ 1/6\tau_{eff}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1^2 & y_1^2 & z_1^2 & 2x_1y_1 & 2x_1z_1 & 2y_1z_1 \\ x_2^2 & y_2^2 & z_2^2 & 2x_2y_2 & 2x_2z_2 & 2y_2z_2 \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_n^2 & y_n^2 & z_n^2 & 2x_ny_n & 2x_nz_n & 2y_nz_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Q_{11} \\ Q_{22} \\ Q_{33} \\ Q_{12} \\ Q_{13} \\ Q_{23} \end{bmatrix} \quad \text{équation 3.61}$$

La matrice  $\underline{Q}$  peut ainsi être déterminée par un ajustement des moindres carrés linéaire.

$$\underline{Q} = \begin{bmatrix} Q_{11} & Q_{12} & Q_{13} \\ Q_{12} & Q_{22} & Q_{23} \\ Q_{13} & Q_{23} & Q_{33} \end{bmatrix} \quad \text{équation 3.62}$$

Elle est ensuite diagonalisée.

$$\underline{Q} = \underline{P} \underline{Q}^{diag} \underline{P}^{-1} \quad \text{équation 3.63}$$

Les valeurs propres permettent de remonter aux coefficients de diffusion rotationnelle  $D_X$ ,  $D_Y$  et  $D_Z$ .

$$\begin{aligned} D_X &= Q_{yy}^{diag} + Q_{zz}^{diag} - Q_{xx}^{diag} \\ D_Y &= Q_{xx}^{diag} + Q_{zz}^{diag} - Q_{yy}^{diag} \\ D_Z &= Q_{xx}^{diag} + Q_{yy}^{diag} - Q_{zz}^{diag} \end{aligned} \quad \text{équation 3.64} \quad \text{avec } D_X \leq D_Y \leq D_Z \quad \text{équation 3.65}$$

La matrice de passage  $\underline{P}$  permet de calculer les angles d'Euler  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  définissant l'orientation du tenseur de rotation-diffusion par rapport à un repère moléculaire.

$$\underline{P} = \begin{bmatrix} \cos \alpha \cos \beta \cos \gamma - \sin \alpha \sin \gamma & -\cos \alpha \cos \beta \sin \gamma - \sin \alpha \sin \gamma & \cos \alpha \sin \beta \\ \sin \alpha \cos \beta \cos \gamma + \cos \alpha \sin \gamma & -\sin \alpha \cos \beta \sin \gamma - \cos \alpha \cos \gamma & \sin \alpha \sin \beta \\ -\sin \beta \cos \gamma & \sin \beta \sin \gamma & \cos \beta \end{bmatrix} \quad \text{équation 3.66}$$

On peut remarquer l'indétermination obtenue sur les angles  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . La matrice  $\underline{P}$  peut en effet correspondre à quatre combinaisons de  $(\alpha, \beta, \gamma)$  car les vecteurs propres sont déterminés au signe près.

$$\left\{ \begin{array}{l} \alpha, \beta, \gamma \\ \alpha, \beta, \gamma + \pi \\ \alpha + \pi, -\beta, \pi - \gamma \\ \alpha + \pi, -\beta, -\gamma \end{array} \right. \quad \text{équation 3.67} \quad \text{avec} \quad \left\{ \begin{array}{l} 0^\circ < \alpha < 360^\circ \\ 0^\circ < \beta < 180^\circ \\ 0^\circ < \gamma < 360^\circ \end{array} \right. \quad \text{équation 3.68}$$

Cependant cette indétermination n'a pas d'influence sur la définition spatiale du repère de rotation-diffusion puisqu'elle concerne le sens des axes et non leur direction (le trièdre restant néanmoins direct).

#### 3.4.2. Interprétation du temps de corrélation effectif dans un modèle de réorientation globale de symétrie axiale

Nous pouvons rappeler qu'un temps de corrélation est la constante d'une fonction de corrélation exponentielle, et que la somme de deux exponentielles avec des constantes du même ordre de grandeur apparaît comme une simple fonction monoexponentielle. Ainsi, si l'on considère une réorientation globale de symétrie axiale (qui correspond à deux temps de corrélation :  $\tau_{\parallel}$ , réorientation par rapport à l'axe de symétrie du tenseur de rotation-diffusion, et  $\tau_{\perp}$ , réorientation par rapport à une direction perpendiculaire), on peut supposer que la définition d'un temps de corrélation effectif défini pour chaque résidu revient à prendre en compte ces deux temps de corrélation. Nous nous sommes concentrés sur ce modèle de réorientation car il semble adapté à l'étude de la protéine C12A-p8<sup>MTCP1</sup>. L'hypothèse précédente revient à identifier l'expression de Woessner (Woessner, 1962) à celle contenant le temps de corrélation effectif :

$$\frac{2\tau_{eff}^{(i)}}{1 + \omega^2 \tau_{eff}^{(i)2}} \leftarrow a_1^{(i)} \frac{2\tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} + a_2^{(i)} \frac{2\tau_2}{1 + \omega^2 \tau_2^2} + a_3^{(i)} \frac{2\tau_3}{1 + \omega^2 \tau_3^2} \quad \text{équation 3.69}$$

où  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ , et  $\tau_3$  sont exprimés en fonction de  $\tau_{\perp}$  et  $\tau_{\parallel}$ , alors que  $a_1^{(i)}$ ,  $a_2^{(i)}$ ,  $a_3^{(i)}$  sont fonction de l'angle  $\beta$  entre le vecteur NH et l'axe de symétrie du tenseur de rotation-diffusion (voir paragraphe 3.2.4) :

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{\tau_1} = \frac{1}{\tau_{\perp}} \\ \frac{1}{\tau_2} = \frac{5}{6\tau_{\perp}} + \frac{1}{6\tau_{\parallel}} \\ \frac{1}{\tau_3} = \frac{1}{3\tau_{\perp}} + \frac{2}{3\tau_{\parallel}} \end{array} \right. \quad \text{équation 3.70}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} a_1^{(i)} = \frac{1}{4}(3\cos^2 \beta_{(i)} - 1) \\ a_2^{(i)} = \frac{3}{4}\sin^2(2\beta_{(i)}) \\ a_3^{(i)} = \frac{3}{4}\sin^4 \beta_{(i)} \end{array} \right. \quad \text{équation 3.71}$$

et on peut alors exprimer le temps de corrélation effectif comme:

$$\frac{1}{\tau_{eff}^{(i)}} \approx \sum_{j=1}^3 \frac{a_j^{(i)}}{\tau_j^{(i)}} \quad \text{équation 3.72}$$

ou encore:

$$\frac{1}{\tau_{eff}^{(i)}} \approx \frac{a_{\perp}^{(i)}}{\tau_{\perp}} + \frac{a_{\parallel}^{(i)}}{\tau_{\parallel}} \quad \text{équation 3.73}$$

$$\text{avec } \left\{ \begin{array}{l} a_{\perp}^{(i)} = \frac{1}{2}(1 + \cos^2 \beta_{(i)}) \\ a_{\parallel}^{(i)} = \frac{1}{2}(1 - \cos^2 \beta_{(i)}) \end{array} \right. \quad \text{équation 3.74}$$

Il est nécessaire de savoir jusqu'à quelle valeur de l'anisotropie de réorientation (et ceci en fonction de la valeur du champ magnétique) il est possible d'utiliser un tel modèle. Dans ce but, nous avons réalisé des simulations et la figure 3.16 montre l'erreur entre les paramètres de relaxation ( $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ ) calculés avec un modèle de réorientation de symétrie axiale d'une part et ceux calculés avec un temps de corrélation effectif égal à la somme pondérée des temps de corrélation  $\tau_{\perp}$  et  $\tau_{\parallel}$  d'autre part (équation 3.69).

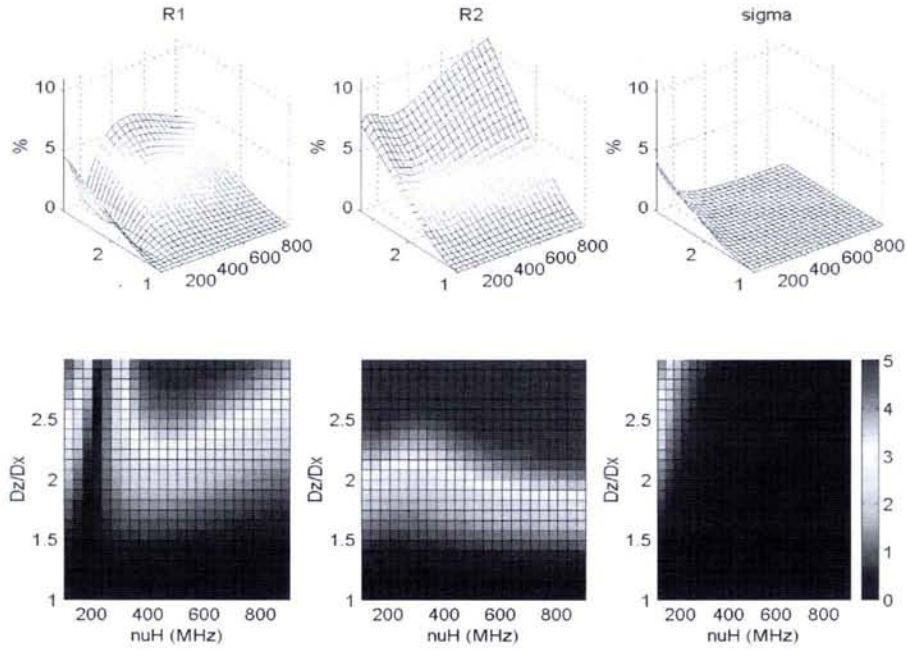


figure 3.16 erreur (en %) entre les paramètres de relaxation ( $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ ) calculés avec un modèle de réorientation de symétrie axiale d'une part et ceux calculés avec un temps de corrélation effectif égal à la somme pondérée des temps de corrélation  $\tau_{\perp}$  et  $\tau_{\parallel}$  (équation 3.69) d'autre part. Ces écarts sont calculés pour une fréquence du proton allant de 100 à 900MHz, une anisotropie  $a=D_z/D_x$  allant de 1 à 3,  $D_x=2.5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ , et  $\beta=90^\circ$  (ce qui correspond au maximum d'erreur possible).

Ces simulations montrent qu'une telle hypothèse (équation 3.73) reste largement acceptable jusqu'à une anisotropie  $a$  égale à 2 ( $a = D_z/D_x = \tau_{\perp}/\tau_{\parallel}$ ). De plus, les expressions de  $a_{\perp}$  et  $a_{\parallel}$  (équations 3.74) sont tout à fait cohérentes avec les deux conditions limites: i)  $\beta=0^\circ$  (le vecteur NH coïncide avec l'axe de symétrie du tenseur de rotation-diffusion),  $a_{\perp}=1$  et  $a_{\parallel}=0$ , ii)  $\beta=90^\circ$  (le vecteur NH est perpendiculaire à l'axe de symétrie du tenseur de rotation-diffusion),  $a_{\perp} = a_{\parallel} = 1/2$ .

Il reste maintenant à exprimer l'angle  $\beta$  pour chaque résidu de la protéine. Soient  $(x,y,z)$  les coordonnées du vecteur NH d'intérêt dans un repère moléculaire fixe (pour la protéine considérée, C12A-p8<sup>MTCPI</sup>, ces données sont disponibles avec le fichier pdb 2HP8 (Barthe et al., 1999)), et  $(\theta,\varphi)$  les angles polaires définissant l'orientation du tenseur de rotation-diffusion dans ce repère (figure 3.17).

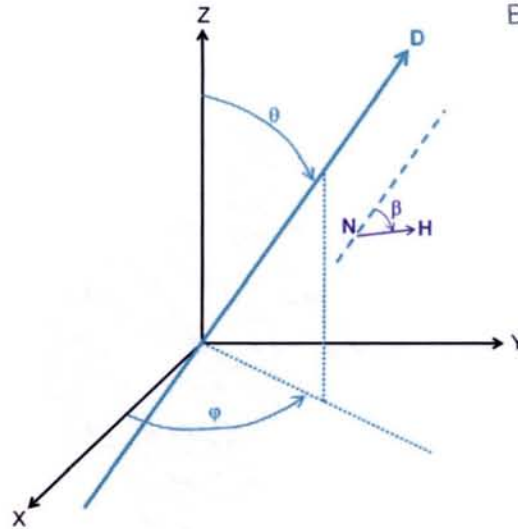


figure 3.17 Définition du tenseur de rotation-diffusion  $D$  (de symétrie axiale, représenté en vert) dans le repère moléculaire fixe  $(X, Y, Z)$ . Chacun de vecteurs  $NH$  de la protéine est défini par ses coordonnées  $(x, y, z)$  dans ce repère fixe, et l'orientation du tenseur de rotation-diffusion est définie par les angles polaires  $(\theta, \varphi)$ .  $\beta$  correspond à l'angle entre le vecteur  $NH$  et l'axe principal du tenseur de rotation-diffusion.

Avec ces notations, nous pouvons écrire :

$$\cos \beta = \sin \theta \cos \varphi \frac{x}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} + \sin \theta \sin \varphi \frac{y}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} + \cos \theta \frac{z}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}}$$

équation 3.75

Nous avons ainsi quatre inconnues à déterminer,  $\theta$ ,  $\varphi$ ,  $\tau_{\parallel}$  et  $\tau_{\perp}$ , à partir des temps de corrélation effectifs  $\tau_{eff}$  obtenus précédemment (paragraphe 3.3.2).  $\tau_{\parallel}$  et  $\tau_{\perp}$  sont déterminés par moindres carrés linéaires (à partir de l'équation 3.73) pour chaque paire  $(\theta, \varphi)$  possible ( $\theta$  et  $\varphi$  sont scrutés par pas de  $1^\circ$  dans l'intervalle  $0^\circ$ - $180^\circ$ , figure 3.18 obtenue sur des données synthétiques, voir la suite de l'exposé). On retiendra le jeu de  $(\theta, \varphi, \tau_{\parallel}, \tau_{\perp})$  conduisant à un minimum de différences entre les valeurs calculées et expérimentales.

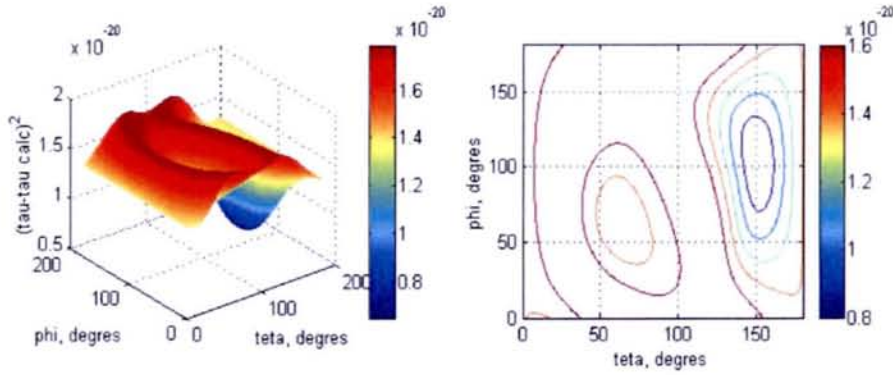


figure 3.18 Exemple de cartographie en fonction de  $\theta$  et  $\varphi$  (obtenu sur des données synthétiques, les temps de corrélation effectifs utilisés correspondent à ceux obtenus au paragraphe 3.3.2 (le lecteur peut se référer à l'annexe A3.1 pour le détail du calcul des paramètres de relaxation)). Valeurs des écarts entre les temps de corrélation effectifs expérimentaux et recalculés. Le minimum correspond aux valeurs  $\theta=151^\circ$ ,  $\varphi=104^\circ$ .

La méthode appliquée à des données synthétiques donne des résultats très encourageants en faisant apparaître un minimum caractéristique. Cependant, la surface étant complexe, nous avons choisi de scruter les valeurs de  $\theta$  et  $\varphi$  plutôt que d'utiliser une méthode plus élaborée pour la recherche du minimum. Les valeurs obtenues correspondent bien à ce qui a été simulé :  $\theta=151^\circ \pm 23^\circ$ ,  $\varphi=104^\circ \pm 28^\circ$ ,  $Dz=3.57 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \pm 0.18 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  et  $a=1.19 \pm 0.11$  (ceci en considérant des erreurs de 5% sur les paramètres de relaxation, voir l'annexe A3.1). Cette validation de la méthode permet d'envisager sereinement l'étude de cas réels.

Nous avons tout d'abord appliqué la procédure en incluant l'ensemble des résidus de la protéine p8<sup>MTCPI</sup>. Les résultats obtenus semblent irréalistes et incohérents, les écarts entre les données expérimentales et recalculées sont importants comme le montre la partie gauche de la figure 3.19. Néanmoins, on peut constater que les régions supposées rigides dans la protéine se démarquent des régions flexibles.



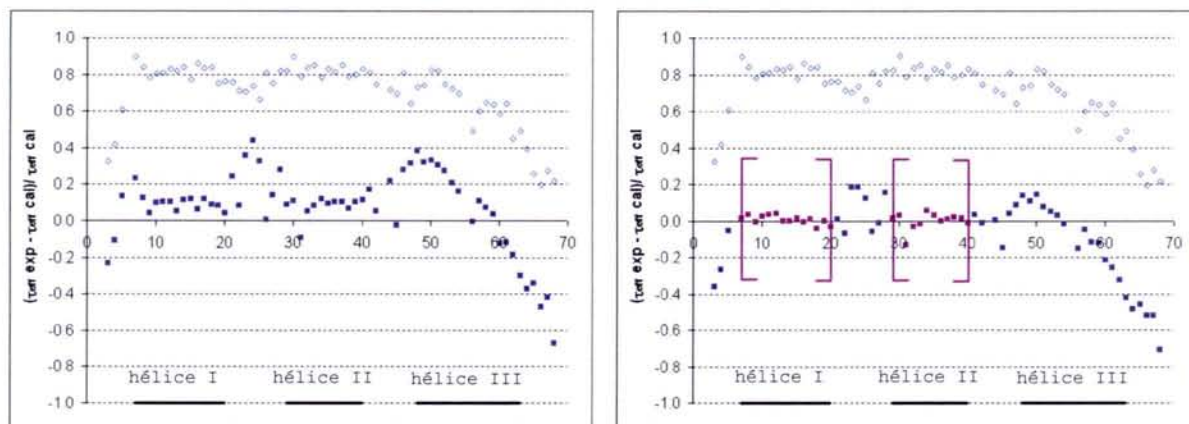


figure 3.19 Différences relatives entre les temps de corrélation expérimentaux et recalculés (carrés). Gauche : procédure appliquée à tous les résidus de la protéine  $p8^{\text{MTCPI}}$ . Droite : procédure appliquée aux résidus appartenant aux hélices I et II. Pour comparaison, les paramètres d'ordre sont également représentés (losanges vides). (la même échelle s'applique dans les deux cas).

Ceci nous a incité à nous limiter aux parties rigides correspondant aux hélices I et II de la protéine. Le résultat obtenu est bien meilleur (figure 3.19, droite) et correspond à des angles  $\theta = 100^\circ \pm 4^\circ$  et  $\varphi = 87^\circ \pm 27^\circ$ . L'orientation de l'axe principal du tenseur de rotation-diffusion est presque parallèle à la direction des hélices I et II, elles-mêmes quasiment parallèles. Ce résultat est en accord avec de simples considérations géométriques qui conduiraient à placer un pseudo axe de symétrie dans la direction des deux hélices.

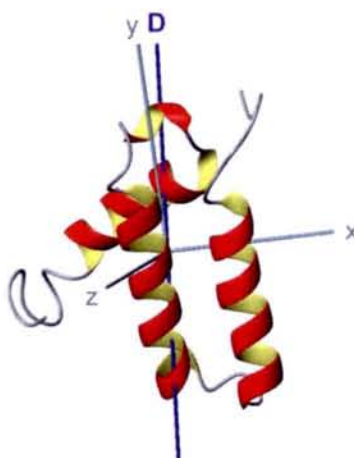


figure 3.20 Schéma de la protéine C12A- $p8^{\text{MTCPI}}$  (fichier pdb 2HP8 (Barthe et al., 1999)). Les axes (x,y,z) correspondent au repère moléculaire utilisé pour le calcul des coordonnées de chaque vecteur NH. D représente l'axe de symétrie du tenseur de rotation-diffusion obtenu avec la procédure décrite dans le texte.

L'anisotropie trouvée pour cette orientation est égale à  $a = D_z/D_x = \tau_{\perp}/\tau_{\parallel} = 1.24 \pm 0.43$  ( $D_z = 3.1 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \pm 0.2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ ) et se situe donc dans la gamme d'anisotropie accessible par la méthode. On peut remarquer sur la figure 3.19 que l'écart entre les temps de corrélation

expérimentaux et recalculés est très faible pour les hélices I et II, ce qui confirme la validité du modèle de rotation-diffusion, mais surtout l'unicité de ce mouvement lent pour cette partie rigide de la protéine. Au contraire, de grandes différences apparaissent pour l'hélice III, ainsi que pour les résidus compris entre les hélices I et II. Ceci indique sûrement que d'autre(s) mouvement(s) se superpose(nt), pour ces régions, au mouvement global de la protéine. Ils peuvent correspondre à des mouvements intermédiaires comme suggérés par Clore et al. (1990); nous avons pu atteindre cette conclusion sans avoir recours à plusieurs temps de corrélation. Les temps de corrélation ne suivent pas tous la même tendance : entre les hélices I et II d'une part et pour le début de l'hélice III d'autre part, les temps de corrélation expérimentaux sont supérieurs à ceux recalculés. Ceci peut signifier que la réorientation dans ces zones est plus lente, ce qui indiquerait des entraves aux mouvements.

La procédure appliquée à l'ubiquitine donne des résultats similaires à ceux obtenus par Tjandra et al. (Tjandra et al., 1995). En effet la figure 3.21 montre l'orientation des tenseurs de rotation-diffusion obtenus avec les différentes méthodes : la méthode présentée ici (symétrie axiale), la représentation quadratique des temps de corrélation effectifs (Brüschweiler et al. en 1995) et celle de Tjandra et al. (Tjandra et al., 1995). Les orientations sont sensiblement les mêmes. Notre résultat correspond à des angles  $\theta = 154^\circ \pm 38^\circ$  et  $\varphi = 106^\circ \pm 28^\circ$ . L'anisotropie trouvée pour cette orientation est égale à  $a = D_z/D_x = \tau_\perp / \tau_\parallel = 1.13 \pm 0.09$  ( $D_z = 5.4 \cdot 10^7 \text{s}^{-1} \pm 0.2 \cdot 10^7 \text{s}^{-1}$ ). Les données de Tjandra montrent que la réorientation de l'ubiquitine est de symétrie axiale ( $a = 1.17$ ), et qu'il n'y pas d'amélioration significative dans l'analyse des données en utilisant un modèle de réorientation totalement anisotrope. Ceci renforce les résultats que nous présentons ici. L'utilisation de la méthode de Brüschweiler conduit à un résultat qui va dans ce sens également. En effet les coefficients de diffusion obtenus sont  $D_z = 5.08 \cdot 10^7 \text{s}^{-1}$ ,  $D_y = 4.64 \cdot 10^7 \text{s}^{-1}$  et  $D_x = 4.57 \cdot 10^7 \text{s}^{-1}$ .  $D_x$  et  $D_y$  étant très proches, la réorientation peut être assimilée à une réorientation de symétrie axiale avec une anisotropie  $a = 1.11$ .

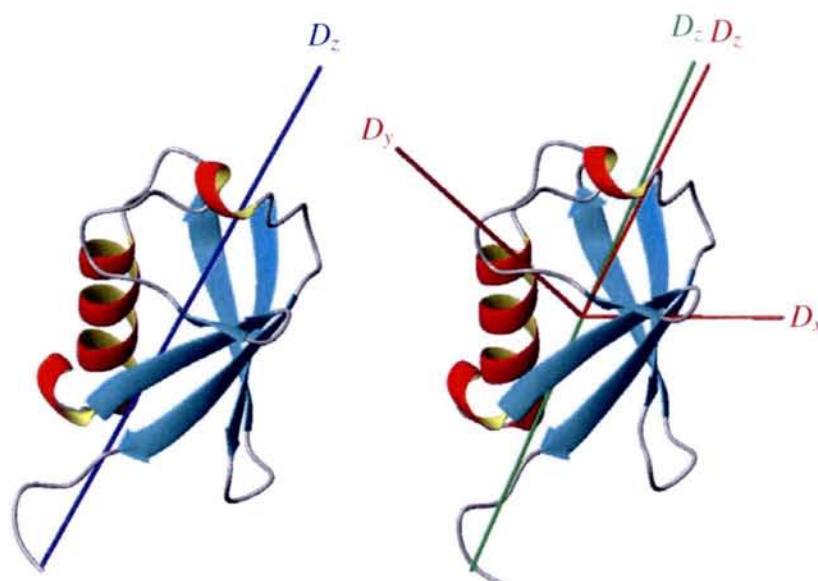


figure 3.21 Schéma de l'ubiquitine : à droite fichier 1D3Z.pdb (Cornilescu et al., 1998) et à gauche fichier 1UBQ.pdb (Vijay-Kumar et al., 1987). A droite :  $D_z$  (vert) représente l'axe de symétrie du tenseur de rotation-diffusion obtenu avec la procédure décrite dans le texte, et  $(D_x, D_y, D_z)$  (rouge) représente le repère de rotation-diffusion obtenu avec la méthode de Brüschweiler (Brüschweiler et al., 1995). A gauche :  $D_z$  (bleu) représente l'axe de symétrie du tenseur de rotation-diffusion obtenu par Tjandra et al. (Tjandra et al., 1995).

Les calculs menés avec le programme Tensor 2.0 (Dosset et al., 2000) ne donnent pas de résultats satisfaisants avec les molécules testées ici. En effet, ce programme analyse les données à une seule valeur du champ magnétique, et les résultats obtenus diffèrent pour chacun des champs.

La validité du concept de temps de corrélation effectif est ici validée. Nous avons pu montrer que les temps de corrélation variant d'un résidu à l'autre de la protéine permettaient de prendre en compte les anisotropies du mouvement lent. Il est de plus possible de retrouver les caractéristiques des mouvements (jusqu'à des anisotropies de rotation-diffusion égales à 2) par une simple analyse de la dépendance du temps de corrélation effectif en fonction de la direction relative des vecteurs NH par rapport au tenseur de rotation-diffusion.

### 3.5. Les paramètres de corrélation croisée

Les paramètres de corrélation croisée csa/dipolaire sont depuis plusieurs années apparus comme des observables très intéressantes dans les protéines en raison des informations qu'ils peuvent apporter. La principale application concerne la détermination de l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 (Tjandra et al., 1996b; Fushman et

Cowburn, 1998), mais aussi du carbone-13 (Tjandra et Bax, 1997a; Boisbouvier et al., 1999) ou du proton (Tessari et al., 1997a, 1997b, Tjandra et Bax, 1997b). Les paramètres de corrélation croisée permettent non seulement de déterminer l'amplitude du csa mais aussi son orientation (Fushman et al., 1998; Damberg et al., 1999). Une autre propriété importante des paramètres de corrélation croisée provient du fait qu'ils sont indépendants de l'échange. Leur comparaison avec les paramètres d'autorelaxation (notamment la relaxation transversale) permet ainsi de caractériser les résidus avec échange dans une protéine (Kroenke et al., 1998; Kroenke et al., 1999). Il est également à noter que le rapport entre le paramètre de corrélation croisée transversale et le paramètre de corrélation croisée longitudinale,  $\eta_{x,y}/\eta_z$ , étant indépendant de l'échange et du csa, il est directement proportionnel à  $\tau_c$  (ou  $D_i$ ) (Kroenke et al., 1998; Kojima et al., 1999). Après avoir vu comment mesurer les paramètres de corrélation croisée (chapitre 2), nous avons donc décidé de pousser notre étude de la dynamique des protéines en insérant ces termes d'interférences dans nos ajustements. Nous présentons ici deux méthodes que nous avons développées pour extraire les informations que contiennent ces paramètres.

### 3.5.1. Anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 et analyse dynamique résidu par résidu

Au paragraphe 3.3.2, les ajustements que nous avons réalisés étaient basés sur une distinction des densités spectrales d'autocorrélation mettant en jeu un mécanisme csa d'une part et un mécanisme dipolaire d'autre part :

$$J^d(\omega) = a_d + \frac{b_d}{1 + \omega^2 \tau_{eff}^2}$$

$$J^{csa}(\omega) = \frac{b_{csa}}{1 + \omega^2 \tau_{eff}^2}$$

**équation 3.76**

La corrélation croisée prenant son origine dans l'interaction entre ces deux mécanismes, nous pouvons écrire les densités spectrales de corrélation croisée csa/dipolaire comme :

$$J^{cd}(\omega) = \frac{b_{cd}}{1 + \omega^2 \tau_{eff}^2}$$

**équation 3.77**

En identifiant ces densités spectrales à un modèle Lipari-Szabo (Lipari et Szabo, 1982a, 1982b), et en tenant compte des démonstrations du paragraphe 3.2.2, on peut écrire :

$$\begin{aligned} b_d &= K_d^2 S^2 (2\tau_{eff}) \\ b_{csa} &= K_{csa}^2 S^2 (2\tau_{eff}) \\ b_{cd} &= K_d K_{csa} S^2 (2\tau_{eff}) \end{aligned} \quad \text{équation 3.78}$$

avec 
$$K_d = \frac{1}{2\sqrt{5}} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \left( \frac{\gamma_H \gamma_N \hbar}{r_{NH}^3} \right) \quad \text{équation 3.79}$$

$$K_{csa} = \frac{1}{\sqrt{15}} (\Delta\sigma_N) (1/2) (3\cos^2 \alpha - 1) \quad \text{équation 3.80}$$

Rappelons ici que  $\alpha$  représente l'angle entre le rayon vecteur NH d'une part et l'axe de symétrie du tenseur csa de l'azote-15 d'autre part. L'obtention du paramètre  $b_{cd}$  nous permet donc d'affiner les résultats obtenus précédemment sur l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15. Les paramètres expérimentaux (corrélations croisées transversale et longitudinale, mesurées à trois valeurs du champ magnétique sur un échantillon d'ubiquitine, voir le paragraphe 2.4) sont ajustés par moindres carrés linéaires à l'aide des temps de corrélation  $\tau_{eff}$  calculés précédemment (paragraphe 3.3.2).

$$\eta_z = G_{\eta_z}^{cd}(\tau_{eff}, \omega_N) b_{cd} \quad \text{équation 3.81}$$

$$\eta_{x,y} = G_{\eta_{xy}}^{cd}(\tau_{eff}, \omega_N) b_{cd} \quad \text{équation 3.82}$$

avec 
$$G_{\eta_z}^{cd}(\tau_{eff}, \omega_N) = \frac{2\sqrt{3} \omega_N}{1 + \omega_N^2 \tau_{eff}^2} \quad \text{équation 3.83}$$

$$G_{\eta_{xy}}^{cd}(\tau_{eff}, \omega_N) = \frac{4}{\sqrt{3}} + \frac{\sqrt{3} \omega_N}{1 + \omega_N^2 \tau_{eff}^2} \quad \text{équation 3.84}$$

Le paramètre  $b_{cd}$  est présenté sur la figure 3.22 avec les paramètres  $b_d$  et  $b_{csa}$  calculés précédemment. On remarque la grande dispersion de  $b_{csa}$  par rapport à  $b_d$  et  $b_{cd}$  dans le cas de nos données sur l'ubiquitine.

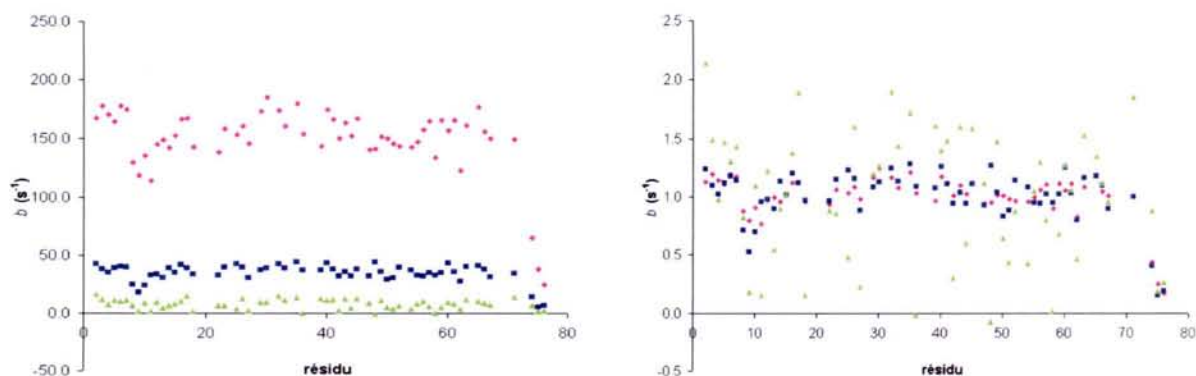


figure 3.22 Gauche : paramètres  $b_d$  (en  $s^{-1}$ , losanges rose),  $b_{csa}$  (en  $10^{-18} s^{-1}$ , triangles verts) et  $b_{cd}$  (en  $10^{-10} s^{-1}$ , carrés bleus) en fonction du résidu dans l'ubiquitine. Droite : sont représentés les mêmes paramètres avec une normation telle que  $\langle b \rangle = 1$  pour chacun (moyenne sur tous les résidus de la protéine) dans le but de faciliter la comparaison.

D'après les équations 3.78, on dispose ainsi de trois possibilités pour calculer l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15. Trois rapports permettent en effet d'atteindre cette valeur :  $b_{csa}/b_d$  (ceci correspond à ce qui a été décrit précédemment, paragraphe 3.3.2),  $b_{csa}/b_{cd}$  et  $b_{cd}/b_d$ . Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 3.23.

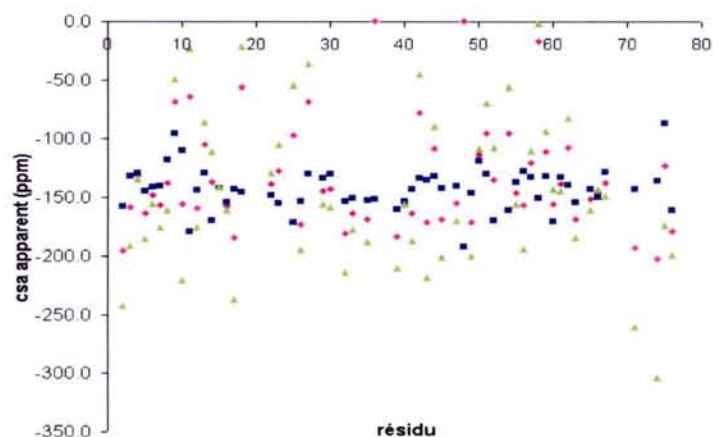


figure 3.23 Anisotropie de déplacement chimique ( $(\Delta\sigma_N) (1/2)(3\cos^2\alpha-1)$ ) du noyau azote-15 dans un échantillon d'ubiquitine : calculée à partir du rapport  $b_{csa}/b_d$  (losanges rose),  $b_{csa}/b_{cd}$  (triangles verts) ou  $b_{cd}/b_d$  (carrés bleus).

Comme le suggérait la figure 3.22, le minimum de variation est obtenu pour le rapport  $b_{cd}/b_d$ . La mesure des paramètres de corrélation croisée permet ainsi d'affiner la détermination de l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15. S'il n'est pas étonnant d'affiner la détermination du csa en incluant deux paramètres expérimentaux supplémentaires ( $\eta_{x,y}$  et  $\eta_z$ ), on peut s'interroger sur la validité des résultats obtenus quand on évalue le csa uniquement avec les paramètres  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ . Il semble difficile de séparer les contributions csa et

dipolaire dans  $R_1$  et  $R_2$ ; en effet celles-ci apparaissent sous forme d'une somme dans les deux cas et  $R_2$  peut posséder d'autres termes (échange). De plus, l'échange et le terme csa dépendent du carré du champ magnétique statique tous les deux. Ces simples considérations expliquent la dispersion des csa apparents obtenus en considérant le terme  $b_{csa}$  issu d'une analyse de  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ . Les paramètres de corrélation croisée font apparaître un produit entre les termes csa et dipolaire et permettent ainsi de bien mieux séparer les deux mécanismes. La figure 3.23 nous montre que les variations du csa le long du squelette de l'ubiquitine existent mais que l'amplitude de variation est moyenne (carrés bleus). Ce résultat est en accord avec la dispersion moyenne des déplacements chimiques isotropes en azote-15 (environ 40ppm).

Les calculs menés avec d'autres données (notamment celles publiées par Kroenke et al. en 1999 concernant la Ribonucléase, voir paragraphe 3.5.2, ou avec la protéine p8<sup>MTCP1</sup>) ne montrent cependant pas autant de variations entre les paramètres  $b_d$  et  $b_{csa}$ . Ceci indique des variations moins importantes pour l'anisotropie de déplacement chimique, ou bien que les contributions d'échange sont mieux prises en compte avec ces dernières données. On peut en conclure qu'il est nécessaire de compléter les traditionnelles mesures de  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$  par des mesures de corrélation croisée, surtout pour les résidus affectés par un phénomène d'échange.

### 3.5.2. Evaluation de l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 et des contributions de l'échange

Comme décrit précédemment, l'expression de Habazettl et Wagner (Habazettl et Wagner, 1995; Phan et al., 1996) permet d'exprimer  $2R_2 - R_1$  en fonction du carré de la fréquence de mesure de l'azote-15, et ceci de façon linéaire.

$$2R_2 - R_1 = K_d^2 \left[ 6\tilde{J}^d(\omega_H) + 4\tilde{J}^d(0) \right] + \left[ \frac{4}{45}(\Delta\sigma_N)^2 \tilde{J}^{csa}(0) + 2\Phi \right] \omega_N^2 \quad \text{équation 3.85}$$

On notera  $a_R$  et  $b_R$  l'ordonnée à l'origine et la pente de la droite obtenue, respectivement.

$$\begin{aligned} a_R &= K_d^2 \left[ 6\tilde{J}^d(\omega_H) + 4\tilde{J}^d(0) \right] \\ b_R &= \frac{4}{45}(\Delta\sigma_N)^2 \tilde{J}^{csa}(0) + 2\Phi \end{aligned} \quad \text{équation 3.86}$$

D'autre part, de la même façon, on peut exprimer la différence  $2\eta_{x,y} - \eta_z$  linéairement en fonction de la fréquence de mesure de l'azote-15 :

$$2\eta_{x,y} - \eta_z = \frac{8K_d}{3\sqrt{5}}(\Delta\sigma_N) \tilde{J}^{cd}(0) \omega_N \quad \text{équation 3.87}$$

On notera ici  $b_\eta$  la pente de cette droite et on pourra utiliser le fait que l'ordonnée à l'origine est nulle.

$$b_\eta = \frac{8K_d}{3\sqrt{5}}(\Delta\sigma_N) \tilde{J}^{cd}(0) \quad \text{équation 3.88}$$

L'évaluation des paramètres  $b_\eta$  et  $a_R$  permet alors d'extraire la contribution de l'anisotropie de déplacement chimique, ceci en supposant  $K_d$  connu (ceci implique uniquement de fixer la distance NH à une valeur donnée, ici  $1.02\text{\AA}$ , soit  $K_d = 1.611 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$ ). On supposera également que la contribution à haute fréquence,  $6\tilde{J}^d(\omega_H)$ , est négligeable devant  $4\tilde{J}^d(0)$ . Ainsi :

$$\frac{b_\eta}{a_R} = \frac{2}{3\sqrt{5}}(\Delta\sigma_N) \tilde{J}^{cd}(0) / K_d \tilde{J}^d(0) \quad \text{équation 3.89}$$

Cette expression peut être simplifiée en utilisant le fait que

$$\tilde{J}^{cd}(\omega) = \frac{1}{2}(3\cos^2 \alpha - 1)\tilde{J}^d(\omega) \quad \text{équation 3.90}$$

où  $\alpha$  est l'angle entre le vecteur NH et l'axe de symétrie du tenseur csa (voir le paragraphe 3.2.2).

$$\text{On peut donc écrire } (\Delta\sigma_N)^{app} = (\Delta\sigma_N) \frac{1}{2}(3\cos^2 \alpha - 1) = \frac{3\sqrt{5}K_d}{2} \frac{b_\eta}{a_R} \quad \text{équation 3.91}$$

La contribution d'échange est également accessible avec ces paramètres. En effet, d'après l'équation 3.86 :



$$\Phi = \frac{1}{2} \left[ b_R - \frac{4}{45} (\Delta\sigma_N)^2 \tilde{J}^{csa}(0) \right] \quad \text{équation 3.92}$$

De plus,  $\tilde{J}^{csa}(\omega) = \frac{1}{4} (3 \cos^2 \alpha - 1)^2 \tilde{J}^d(\omega)$  (paragraphe 3.2.2), donc :

$$\Phi = \frac{1}{2} \left[ b_R - \frac{4}{45} \left[ (\Delta\sigma_N) \frac{1}{2} (3 \cos^2 \alpha - 1) \right]^2 \tilde{J}^d(0) \right] = \frac{1}{2} \left[ b_R - \frac{1}{4} \frac{b_\eta^2}{a_R} \right] \quad \text{équation 3.93}$$

Les résultats de ces calculs (équations 3.91 et 3.93) sont présentés sur la figure 3.24. Une très bonne adéquation est obtenue entre nos différentes approches.

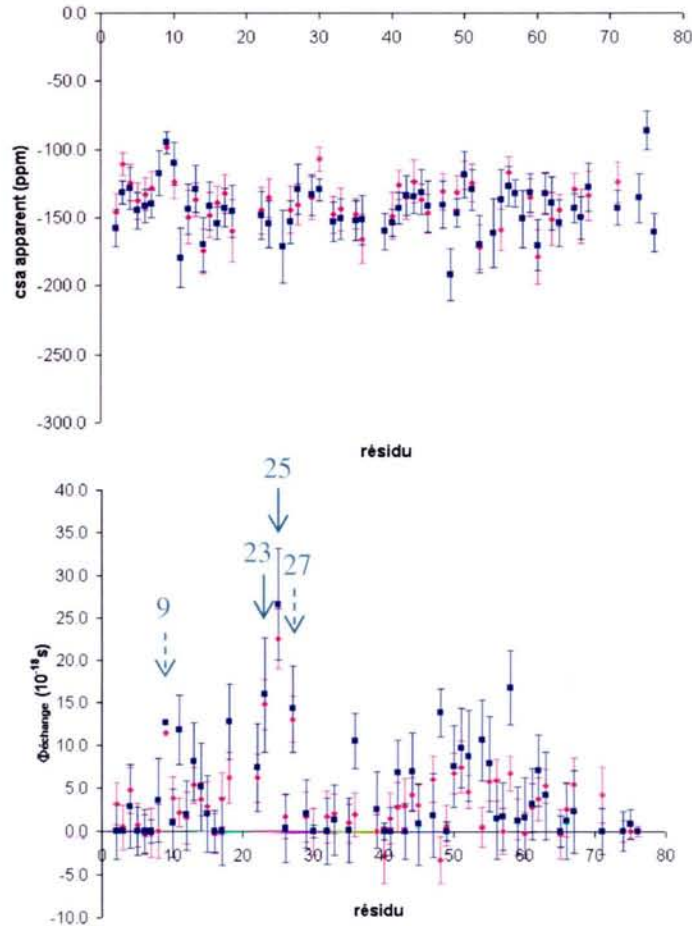
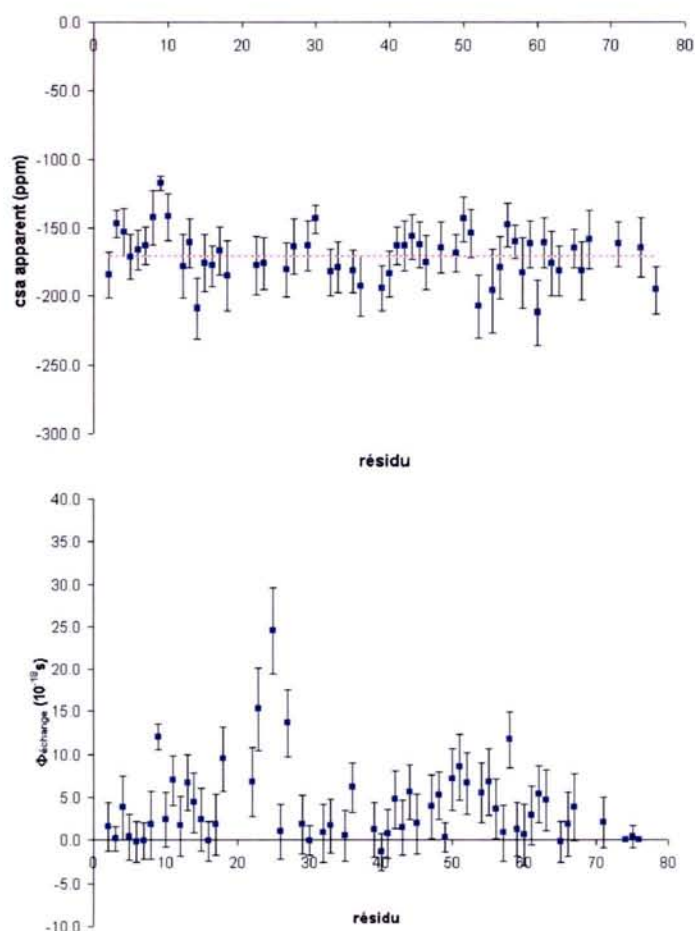


figure 3.24 Haut : anisotropie de déplacement chimique  $((\Delta\sigma_N) (1/2)(3\cos^2\alpha-1))$  du noyau azote-15 dans un échantillon d'ubiquitine : calculée (à partir de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $\eta_z$  et  $\eta_{x,y}$ ) à l'aide de la méthode décrite ici (losanges rose) et à l'aide de la méthode décrite précédemment (à partir de  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ ,  $\eta_z$  et  $\eta_{x,y}$ , paragraphe 3.5.1, carrés bleus). Bas : contributions d'échange ( $\Phi$ ) : calculées (à partir de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $\eta_z$  et  $\eta_{x,y}$ ) à l'aide de la méthode décrite ici (losanges rose) et à l'aide de la méthode décrite au paragraphe 3.3.2 (à partir de  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ ,  $\eta_z$  et  $\eta_{x,y}$ , carrés bleus). Les barres d'erreur résultent d'un calcul de type Monte Carlo.

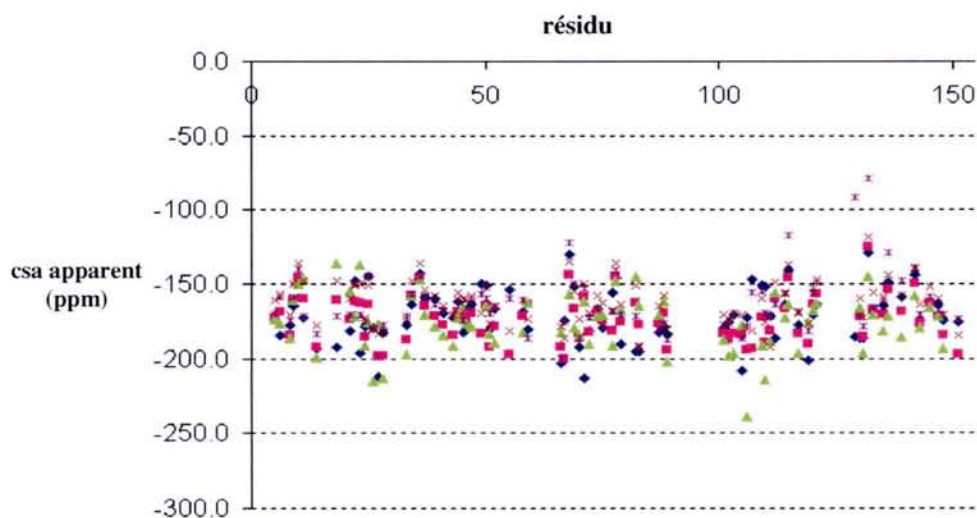
Les valeurs de l'anisotropie de déplacement chimique sont globalement inchangées et confirment les résultats précédents (paragraphe 3.5.1). Les contributions de l'échange montrent également la même tendance. Comme décrit dans la littérature (Tjandra et al., 1995; Fushman et Cowburn, 1998; Fushman et al., 1999), il apparaît clairement que les résidus Ile23 et Asn25 comportent une part non négligeable due à l'échange. On peut également remarquer les résidus Thr9 et Lys27 qui présentent une contribution de l'échange, ceci avec les deux méthodes décrites ici. Ces deux méthodes, indépendantes l'une de l'autre, nous permettent d'évaluer une plage réaliste de variations de l'anisotropie de déplacement chimique et de l'échange. La figure 3.25 montre ainsi les variations moyennes obtenues sur l'échantillon d'ubiquitine. L'anisotropie de déplacement chimique moyenne sur tous les résidus de la protéine est de  $-171 \pm 18$  ppm.



**figure 3.25** Valeurs moyennes obtenues avec les différentes méthodes présentées dans ce mémoire sur un échantillon d'ubiquitine. Haut : anisotropie de déplacement chimique ( $(\Delta\sigma_N)$  obtenu avec un angle entre le rayon vecteur NH et l'axe de symétrie du tenseur cas égal à  $20^\circ$ ) du noyau azote-15. En pointillés roses est représentée la valeur moyenne obtenue sur tous les résidus ( $-171$  ppm). Bas : contributions d'échange ( $\Phi$ ). Les barres d'erreur résultent d'un calcul de type Monte Carlo.

Nous avons également appliqué la méthode aux données de la protéine Ribonucléase H (*Escherichia coli*) publiées par Kroenke et al. ( $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$  à 11.7T, 14.1T et 18.7T,  $\eta_z$  et  $\eta_{x,y}$ , à 11.7T et 14.1T, Kroenke et al., 1999). La figure 3.26 montre les résultats obtenus ici pour l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15. Figurent également :

- les valeurs publiées par Kroenke et al. (Kroenke et al., 1999) qui correspondent à une comparaison des quantités  $2R_2-R_1$  et  $\eta_z/\eta_{x,y}$  corrigées des composantes à haute fréquence à l'aide de la vitesse de relaxation croisée  $\sigma_{NH}$  (approche multichamp),
- les valeurs obtenues avec la méthode de Fushman et Cowburn (Fushman et Cowburn, 1998) qui consiste en l'étude des rapports  $\eta_{x,y}/R_2$  corrigés des composantes à haute fréquence à l'aide de la vitesse de relaxation croisée  $\sigma_{NH}$ . (on utilise une valeur fixe pour l'angle entre le vecteur NH et l'axe principal du tenseur csa :  $\alpha=20^\circ$  (Oas et al., 1987; Hiyama et al., 1988; Shoji et al., 1989; Lumsder et al., 1994)) (analyse à un champ),
- les valeurs obtenues par une analyse résidu par résidu des paramètres  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$  (§3.3.2),
- les valeurs obtenues par une analyse résidu par résidu en ajoutant les paramètres de corrélation croisée (§3.5.1).



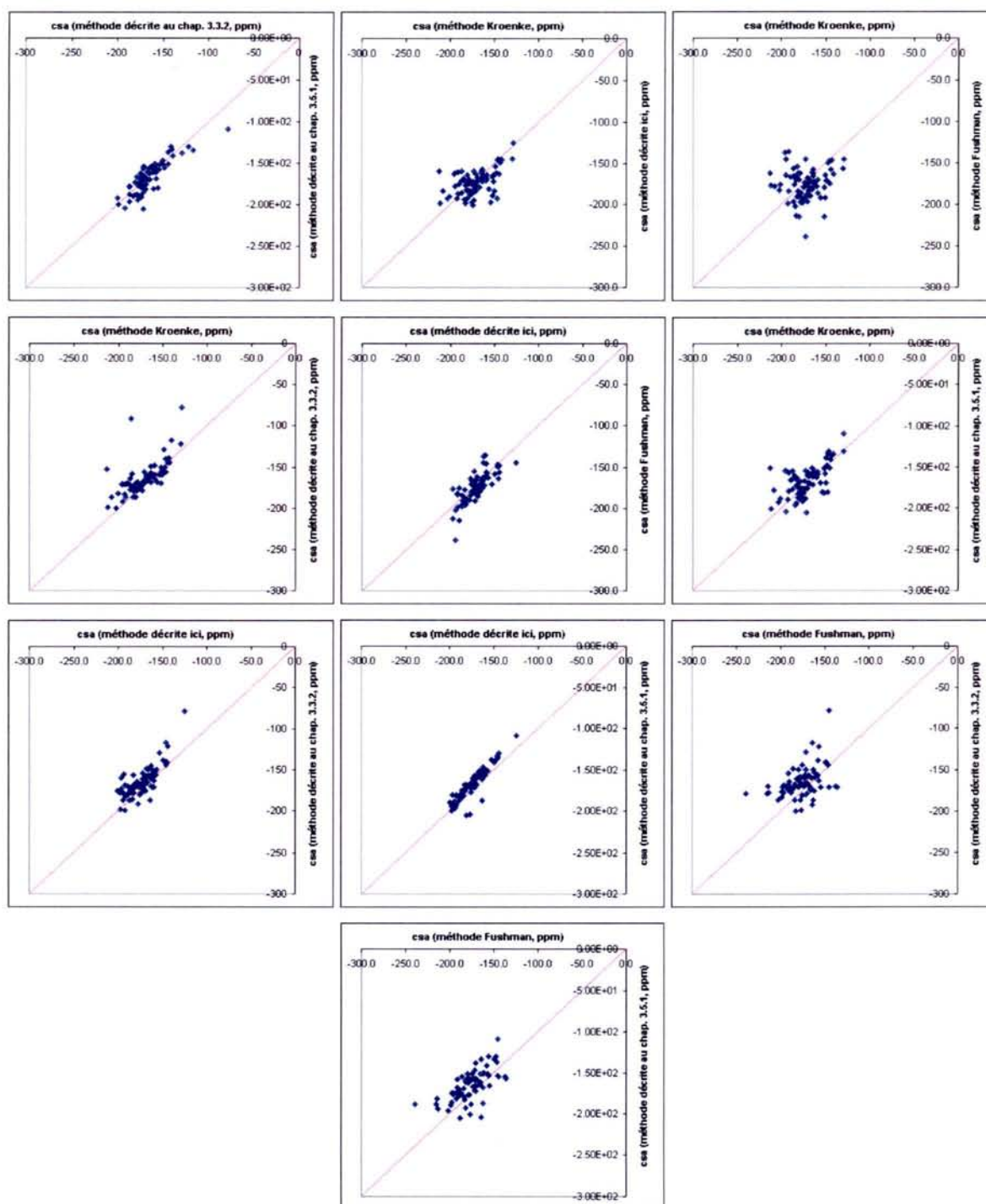


figure 3.26 Haut : anisotropie de déplacement chimique ( $(\Delta\sigma_N) (1/2)(3\cos^2\alpha-1)$ ) du noyau azote-15 dans un échantillon de Ribonucléase : calculée (à partir de  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $\eta_z$  et  $\eta_{x,y}$ ) à l'aide de la méthode décrite ici (carrés rose), à l'aide la méthode de Fushman et al. (Fushman et al., 1998, triangles verts), à l'aide de la méthode de Kroenke et al. (Kroenke et al., 1999, losanges bleus), à l'aide de l'analyse résidu par résidu (à partir de  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ , §3.3.2, étoiles violettes) et à l'aide de la méthode décrite précédemment (à partir de  $R_1$ ,  $R_2$ , et  $\sigma_{NH}$ ,  $\eta_z$  et  $\eta_{x,y}$ , §3.5.1, croix rouge). Bas : Corrélation entre les valeurs du csa apparent obtenues avec les différentes méthodes.

On peut apprécier la cohérence obtenue entre les diverses méthodes. Les données publiées sont telles que les résidus comportant une contribution importante de l'échange sont

supprimés (Kroenke et al., 1998). Nos calculs confirment ces résultats puisque les contributions de l'échange obtenues sont faibles. Par rapport à la méthode de Kroenke ou à celle de Fushman et Cowburn, notre méthode ne nécessite pas la mesure de  $\sigma_{NH}$  et ne fait aucune supposition sur la valeur de l'angle  $\alpha$ . Elle apparaît également comme plus directe que la méthode présentée précédemment (paragraphe 3.3.2). De plus, les méthodes précédentes ne s'appliquent qu'à des résidus ne présentant pas de contribution d'échange. Notre méthode apparaît donc comme plus générale.

L'étude de ces jeux de données permet non seulement de valider cette dernière approche, mais également l'ensemble des méthodes d'analyse présentées dans ce mémoire. Il est important de rappeler que les résultats présentés sont obtenus sans aucune hypothèse sur le modèle de mouvement lent de la protéine (isotrope, axial ou autre).

### 3.6. Conclusion

La relaxation de spin est directement reliée aux mouvements des molécules en solution. En effet, la dynamique est modélisée sous forme de densités spectrales (à l'aide de temps de corrélation) qui interviennent dans l'expression de tout paramètre de relaxation. Nous avons pu voir que chacun des mécanismes de relaxation (dipolaire ou par anisotropie de déplacement chimique, par exemple) est modélisé différemment avec notamment la définition de paramètres d'ordre propres à chacun des mécanismes. Nous avons vu dans ce chapitre que l'étude des paramètres de relaxation ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $\sigma$ , mais aussi  $\eta_z$  et  $\eta_{x,y}$ ) permettait non seulement d'accéder aux temps de corrélation et paramètres d'ordre définissant le mouvement de la macromolécule en solution, mais aussi à des paramètres tels que la contribution d'échange ou l'anisotropie de déplacement chimique. Nous avons montré que la définition d'un temps de corrélation effectif (au niveau de chaque résidu de la protéine) permettait de prendre en compte l'anisotropie du mouvement global de la protéine, et que, subséquemment, il est possible de caractériser cette anisotropie si la structure en trois dimensions de la protéine est connue. Finalement, les paramètres de corrélation croisée apparaissent comme des paramètres complémentaires importants car ils permettent une évaluation réaliste de l'anisotropie de déplacement chimique et des contributions d'échange.

Bibliographie du chapitre 3

- Akke M., Liu J., Cavanagh J., Erickson H.P. et Palmer III A.G. (1998) *Nat.Struct.Biol.* **5**, 55-59.
- Andrec M., Imman K.G., Weber D.J., Levy R.M. et Montelione G.T. (2000) *J. Magn. Reson.* **146**, 66-80.
- Barbato G., Ikura M., Kay L.E., Pastor R.W. et Bax A. (1992) *Biochemistry* **31**, 5269-5278.
- Barchi J.J., Grasberger A.M., Gronenborn A.M. et Clore G.M. (1994) *Protein.Sci.* **3**, 15-21.
- Barthe, P., Chiche, L., Declerck, N., Delsuc, M.A., Lefevre, J.F., Malliavin, T., Mispelter, J., Stern, M.H., Lhoste, J.M. et Roumestand, C. (1999) *J. Biomol. NMR*, **15**, 271-288.
- Blackledge M., Cordier F., Dosset P. et Marion D. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 4538-4539.
- Boibouvier J., Brutscher B., Simorre J.P. et Marion D. (1999) *J.Biomol.NMR* **14**, 241-252.
- Brüschweiler R., Liao X. et Wright P.E. (1995) *Science* **268**, 886-889.
- Canet D. (1998) *Concepts Magn.Reson.* **10**, 291-297.
- Canet D., Barthe P., Mutzenhardt P. et Roumestand C. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4567-4576.
- Canet D., Bouguet-Bonnet S., Mutzenhardt P. (2003) *Concepts Magn.Reson. A* **19**, 65-70.
- Carr N.Y. et Purcell E.M. (1954) *Phys.Rev.* **94**, 630-632.
- Clore G.M., Driscoll P.C., Wingfield P.T. et Gronenborn A.M. (1990a) *Biochem.* **289**, 7387-7401.
- Clore G.M., Szabo A., Bax A., Kay L.E., Driscoll P.C. et Gronenborn A.M. (1990b) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 4989-4991.
- Cornilescu G., Marquardt J.L., Ottiger M. et Bax, A. (1998) *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 6836-6837.
- Damberg P., Jarvet J., Allard P. et Graslund A. (1999) *J.Biomol.NMR* **15**, 27-37.
- Desvaux H. et Goldman M. (1994) *Mol. Phys.* **81**, 955-974.
- Dosset P., Hus J.-C., Blackledge M. et Marion D. (1998) *J. Biomol.NMR* **16**, 23-28.
- Farrow N.A., Muhandiram R., Singer A.U., Pascal S.M., Kay C.M., Gish G., Shoelson S.E., Pawson J.D., Forman-Kay J.D. et Kay L.E. (1994) *Biochemistry* **33**, 5984-6003.
- Farrow N.A., Zhang O.W., Forman-Kay J.D. et Kay L.E. (1995a) *Biochemistry* **34**, 868-878.
- Farrow N.A., Zhang O.W., Szabo A., Torchia D.A. et Kay, L.E. (1995b) *J. Biomol. NMR.* **6**, 153-162.
- Fischer M.W.F., Majumdar A. et Zuiderweg E.R.P. (1998) *Prog.NMR Spectrosc.* **33**, 207-272.
- Fushman D. et Cowburn D. (1998) *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 7109-7110.
- Fushman D., Tjandra N. et Cowburn D. (1998) *J.Am.Chem.Soc.* **120**, 10947-10952.

- Fushman D., Tjandra N. et Cowburn D. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 8577-8582.
- Ghose R., Fushman D. et Cowburn D. (2001) *J. Magn. Reson.* **149**, 204-217.
- Guenneau F., Mutzenhardt P., Assfeld X. et Canet D. (1998) *J. Phys. Chem. A* **102**, 7199-7205.
- Habazettl, J. and Wagner, G. (1995) *J. Magn. Reson. B*, **109**, 100-104.
- Hall J.B. et Fushman D. (2003) *J. Biomol. NMR* **27**, 261-275.
- Halle B., Johannesson H. et Venu K. (1998) *J. Magn. Reson.* **135**, 1-13.
- Hiyama Y., Niu C.H., Silverton J.V., Bawso A. et Torchia D.A. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 2378-2383.
- Hubbard P. S. (1970) *J. Chem. Phys.* **52**, 985-987.
- Huntress W. T. Jr. (1968) *J. Chem. Phys.* **48**, 3524-3533.
- Ishima R. et Nagayama, K. (1995a) *J. Magn. Reson. B* **108**, 73-76.
- Ishima R. et Nagayama, K. (1995b) *Biochemistry* **34**, 3162-3171.
- Kay L.E., Torchia D.A. et Bax A. (1989) *Biochemistry* **28**, 8972-8979.
- Kojima C., Ono A., Kainosho M. Et James T.L. (1999) *J. Magn. Reson.* **136**, 169-175.
- Korzhnev D.M., Billeter M., Arseniev A.S. et Orekhov V.Y. (2001) *Prog. NMR Spectrosc.* **38**, 197-266.
- Kroenke C.D., Loria J.P., Lee L.K., Rance M. et Palmer III A.G. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 7905-7915.
- Kroenke C.D., Rance M. et Palmer III A.G. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 10119-10125.
- Lee K.L., Rance M., Chazin W. et Palmer III A.G. (1997) *J. Biomol. NMR* **9**, 287-298.
- Lee A.L. et Wand A.J. (1999) *J. Biomol. NMR* **13**, 101-112.
- Lefèvre J-F., Dayie K.T., Peng J.W. et Wagner G. (1996) *Biochemistry* **35**, 2674-2686.
- Lipari G. et Szabo A. (1982a) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546-4559.
- Lipari G. et Szabo A. (1982b) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4559-4570.
- Lumsden M.D., Wasylichen R.E., Eichelen K., Schindler M., Penner G.H., Power W.P. et Curtis R.D. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1403-1413.
- Luginbühl P., Pervushin K.V., Iwai H. et Wüthrich K. (1997) *Biochemistry* **36**, 7305-7312.
- Mackay J.P., Shaw G.L. et King G.F. (1996) *Biochemistry* **35**, 4867-4877.
- Mandel A.M., Akke M. et Palmer III A.G. (1995) *J. Mol. Biol.* **246**, 144-163.
- Markus J.L., Dayie K.T., Matsudaira P. et Wagner G. (1996) *Biochemistry* **35**, 1722-1732.
- Meiboom S. et Gill D. (1958) *Rev. Sci. Instrum.* **29**, 688-691.
- Millet O., Loria J.P., Kroenke C.D., Pons M. et Palmer III A.G. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2867-2877.

- Nirmala N.R. et Wagner G. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7557-7558.
- Oas T.G., Hartzell C.J., Dahlquist S.W. et Drobny G.P. (1987) *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 5962-5966.
- Ochsenbein T., Guerois R., Neumann J.-M., Sanson A., Guittet E. Et van Heijenoort C. (2001) *J.Biomol.NMR* **19**, 3-18.
- Orekhov V.Y., Pervushin K.V. et Arseniev A.S. (1994) *Eur.J.Biochem.* **219**, 887-896.
- Orekhov V.Y., Korzhnev D.M., Diercks T., Kessler H. et Arseniev A.S. (1999) *J.Biomol.NMR* **14**, 345-356.
- Palmer III A.G., Rance M. et Wright P.E. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 4371-4380.
- Palmer III A.G., Kroenke C.D. et Loria J.P. (2001) *Methods. Enzymol.* **339**, 204-238.
- Peng J.W. et Wagner G. (1992a) *J. Magn. Reson.* **98**, 308-332.
- Peng J.W. et Wagner G. (1992b) *Biochem.* **31**, 8571-8586.
- Peng J.W. et Wagner G. (1995) *Biochem.* **34**, 16733-16752.
- Pervushin K.V., Wider G., Riek R. et Wüthrich K. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**, 9607-9612.
- Phan I.Q.H., Boyd J. et Campbell I.D. (1996) *J.Biomol.NMR* **8**, 369-378.
- Python H., Mutzenhardt P. et Canet D. (1997) *J. Phys. Chem.* **101**, 1793-1797.
- Riek R., Fiaux J., Bertelsen E.B., Horwich A.L. et Wüthrich K. (2002) *J.Am.Chem.Soc.* **124**, 12144-12153.
- Rose M.E. (1957) "*Elementary theory of angular momentum*", Wiley: New York, p.48-75.
- Schneider D.M., Dellwo M.J. et Wand A.J. (1992) *Biochem.* **31**, 3645-3652.
- Schurr J.M., Babcock H.P. et Fujimoto B.S. (1994) *J. Magn. Reson. B* **105**, 211-224.
- Shoji A., Ozaki T., Fujito T., Deguchi K., Ando S. et Ando I. (1989) *Macromolecules* **22**, 2860-2863.
- Stone M.J., Fairbrother W.J., Palmer III A.G., Reizer J., Saier M.H. et Wright P.E. (1992) *Biochemistry* **31**, 4394-4406.
- Szyperski T., Luginbühl P., Otting G., Güntert P. et Wüthrich K. (1993) *J.Biomol.NMR* **3**, 151-164.
- Tessari M., Mulder F.A.A., Boelens R. et Vuister G.W. (1997a) *J.Magn.Reson.* **127**, 128-133.
- Tessari M., Vis H., Boelens R., Kaptein R. et Vuister G.W. (1997b) *J.Am.Chem.Soc.* **119**, 8985-8990.
- Tjandra N., Feller S.E., Pastor R. et Bax A. (1995) *J.Am.Chem.Soc.* **117**, 12562-12566.
- Tjandra N., Wingfield P., Stahl S., et Bax A. (1996a) *J.Biomol.NMR* **8**, 273-284.
- Tjandra N., Szabo A. et Bax A. (1996b) *J.Am.Chem.Soc.* **118**, 6986-6991.



- Tjandra N. et Bax A. (1997a) *J.Am.Chem.Soc.* **119**, 9576-9577.
- Tjandra N. et Bax A. (1997b) *J.Am.Chem.Soc.* **119**, 8076-8082.
- Vijay-Kumar S., Bugg C.E. et Cook W.J. (1987) *J. Mol.Biol.* **194**, 531-544.
- Wagner G., Thanabal V., Stockman B.J., Peng J.W., Nirmala N.R., Hyberts S.G., Goldberg M.S., Detlefsen D.J., Clubb R.T. et Alder M. (1992) *Biopolymers* **32**, 381-390.
- Walker O., Mutzenhardt P., Joly J.P. et Canet D. (2002a) *Chem.Phys.Lett.* **357**, 103-107.
- Walker O., Mutzenhardt P., Haloui E., Boubel J.C. et Canet D. (2002b) *Molec.Phys.* **32**, 2755-2761.
- Wang C. et Palmer III A.G. (2003) *Magn. Reson.Chem.* **41**, 866-876.
- Wang T., Cai S. et Zuiderweg E.R.P. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8639-8643.
- Wennerström H., Lindman B., Söderman O., Drakenberg T. et Rosenholm J.B. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 6860-6864.
- Woessner D.E. (1962) *J. Chem. Phys.* **37**, 647-654.
- Yang Y.-S., Guignard L., Padilla A., Hoh F., Strub M.-P., Stern M.-H., Lhoste J.-M. et Roumestand C. (1998) *J. Biomol. NMR.* **11**, 337-354.
- Zheng Z., Czaplicki J. et Jardetsky O. (1995) *Biochemistry* **34**, 5212-5223.

### Annexes du chapitre 3

#### A3.1 Détails du calcul des paramètres de relaxation synthétiques de l'azote-15.

Les équations des paramètres de relaxation ( $R_1$ ,  $R_2$  et  $\sigma_{NH}$ ) sont données au chapitre 1. Les vitesses de relaxation sont calculées dans le cas d'un système à deux spins N et H, séparés par une distance de 1.02Å.

Les densités spectrales utilisées correspondent à un modèle à deux paliers avec une réorientation globale de symétrie axiale :

$$\tilde{J}(\omega) = (1 - S^2)2\tau_f + S^2 \left[ \frac{1}{4}(3\cos^2\beta - 1)^2 \frac{2\tau_1}{1 + \omega^2\tau_1^2} + \frac{3}{4}\sin^2(2\beta) \frac{2\tau_2}{1 + \omega^2\tau_2^2} + \frac{3}{4}\sin^4\beta \frac{2\tau_3}{1 + \omega^2\tau_3^2} \right]$$

avec  $\tau_1 = \frac{1}{6D_x}$ ,  $\tau_2 = \frac{1}{5D_x + D_z}$ ,  $\tau_3 = \frac{1}{2D_x + 4D_z}$  et  $D_x = D_y = 2.92 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ ,  $D_z = 3.5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$  (ce qui correspond à une anisotropie  $D_z/D_x$  égale à 1.2).

Les paramètres d'ordre  $S^2$ , les temps de corrélation  $\tau_f$  correspondant aux mouvements rapides, le terme d'échange et l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 sont donnés pour chacun des trente résidus dans le tableau ci-dessous.

residu	$S^2$	tauf(ps)	phi échange (s <sup>-1</sup> )	csa (ppm)	coordonnées des vecteurs NH		
					x	y	z
1	0.90	10.0	0	-170.00	-0.682	-0.732	0.130
2	0.88	78.0	0	-150.00	0.246	0.918	0.334
3	0.86	100.0	0	-162.00	0.792	-0.478	-0.381
4	0.89	250.0	0	-164.00	-0.245	0.745	-0.627
5	0.90	30.0	0	-172.00	0.263	0.973	0.105
6	0.80	51.0	7.00E-18	-170.00	-0.286	0.861	0.440
7	0.94	258.0	0	-154.00	-0.220	0.973	0.135
8	0.81	141.0	1.00E-17	-156.00	-0.035	0.996	0.160
9	0.87	259.0	0	-163.00	0.182	0.869	0.500
10	0.85	200.0	0	-170.00	-0.158	0.905	0.421
11	0.91	55.0	0	-158.00	-0.024	1.010	0.110
12	0.86	150.0	0	-170.00	0.363	0.894	0.321
13	0.88	248.0	1.10E-17	-161.00	0.170	0.897	0.451
14	0.85	3.0	0	-164.00	-0.140	0.994	0.170
15	0.91	250.0	0	-152.00	0.151	1.006	-0.022
16	0.87	2.0	0	-175.00	0.331	0.913	0.278
17	0.94	175.0	0	-181.00	0.058	0.976	0.275
18	0.88	30.0	0	-172.00	0.127	0.887	-0.485
19	0.87	89.0	0	-180.00	0.857	0.491	0.243
20	0.89	25.0	0	-157.00	0.726	0.291	0.636
21	0.88	8.0	0	-163.00	0.721	-0.609	0.353
22	0.85	220.0	4.00E-18	-164.00	-0.067	-0.095	-1.008
23	0.89	72.0	0	-156.00	0.238	-0.618	-0.762
24	0.90	150.0	0	-164.00	0.423	-0.320	-0.857
25	0.86	73.0	0	-167.00	0.085	-0.336	-0.953
26	0.90	94.0	0	-172.00	-0.234	-0.949	-0.274
27	0.87	8.0	3.00E-18	-178.00	0.245	-0.946	-0.258
28	0.80	94.0	0	-154.00	0.140	-0.881	-0.466
29	0.86	277.0	0	-175.00	-0.206	-0.974	-0.211
30	0.88	12.0	0	-170.00	-0.016	-1.014	0.049

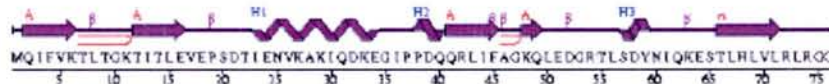
L'angle  $\beta$  entre le vecteur NH et l'axe de symétrie du tenseur de rotation-diffusion est obtenu à partir des coordonnées (x,y,z) des atomes (exprimées dans le repère moléculaire pdb) et des angles polaires  $\theta$  et  $\varphi$  définissant l'orientation du repère de rotation-diffusion par rapport au repère moléculaire.

$$\cos \beta = \sin \theta \cos \varphi \frac{x}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} + \sin \theta \sin \varphi \frac{y}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}} + \cos \theta \frac{z}{\sqrt{x^2 + y^2 + z^2}}$$

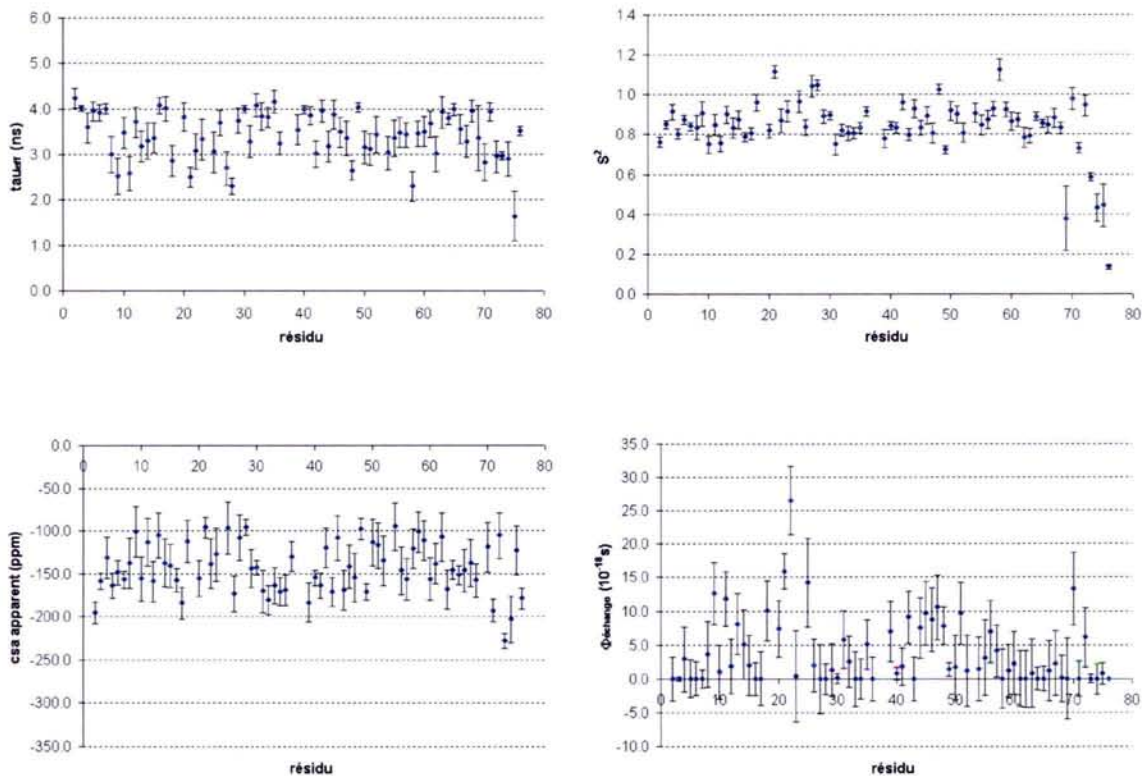
On utilise ici les valeurs  $\theta=150^\circ$  et  $\varphi=100^\circ$ .

### A3.2 Résultats de l'ajustement (décrit au chapitre 3.3) appliqué à l'ubiquitine.

Echantillon : ubiquitine marquée en azote-15, à 1.4mM, solvant H<sub>2</sub>O 95% : D<sub>2</sub>O 5%, pH 4.7.



L'ajustement a été réalisé sur des données ( $R_1$ ,  $R_2$  et  $\sigma_{NH}$ ) obtenues à trois champs : 9.4T, 11.7T et 14.1T. Elles sont présentées en annexe A2.3. Les résultats figurent ci-après sous forme de schéma.



## **Conclusion Générale**

## **Conclusion générale**

Ce mémoire traite de la relaxation de spin dans les protéines, ceci depuis sa description théorique jusqu'à l'interprétation des mesures en terme de dynamique, afin notamment de visualiser les mouvements des molécules en solution. La Résonance Magnétique Nucléaire est une source unique d'information sur la dynamique des macromolécules à des échelles de temps très variées. Vu la complexité évidente des mouvements mis en jeu au sein d'une protéine, leur caractérisation en vue de la compréhension du rôle fonctionnel de ces molécules nécessite d'une part de nouvelles approches théoriques, d'autre part l'obtention d'une plus grande variété de données sur un plus grand nombre de systèmes. Cette variété de données peut être simplement obtenue en multipliant les mesures à différentes valeurs du champ magnétique, mais également en introduisant de nouveaux paramètres de relaxation. C'est dans cette optique que nous avons développé des méthodes pour mesurer les termes de corrélation croisée. La première approche consiste à suivre l'édification de l'ordre longitudinal suite à l'inversion de l'aimantation du noyau X dans un système XH. L'étude du comportement initial de la courbe obtenue constitue une mesure directe de la corrélation croisée longitudinale en évitant les problèmes liés à la diffusion de spin. Nous avons également développé une seconde méthode basée sur la différence d'évolution des deux branches d'un doublet X et qui permet la mesure du terme de corrélation croisée aussi bien longitudinal que transversal. Nous avons introduit un nouveau filtre  $S^2ED$  qui permet la sélection des états de spin. Son utilisation dans les séquences d'impulsions multidimensionnelles est aisée et permet la sélection aussi bien dans une dimension (par exemple en proton) que dans une autre (par exemple en azote-15). L'application de ce filtre pour mesurer séparément l'évolution de chacune des branches d'un doublet dans les séquences d'impulsions classiquement utilisées en relaxation est directe. L'art et la manière d'exploiter les courbes expérimentales ont été décrits en détail, notamment en ce qui concerne les effets de la diffusion de spin. Nous avons également montré que ce phénomène affecte les mesures de relaxation croisée par méthodes impulsionnelles. Nous avons montré dans la dernière partie de ce mémoire l'importance de ces termes d'interférence. Le point intéressant provient du fait que ces paramètres sont d'une part indépendants de l'échange, et d'autre part qu'ils prennent leur origine dans l'interaction de deux mécanismes (ici anisotropie de déplacement chimique et dipolaire). Nous avons pu mettre à profit ces propriétés pour évaluer les contributions de l'anisotropie de déplacement chimique de l'azote-15 et de l'échange à la relaxation.

L'analyse des données de relaxation a permis d'aboutir à des paramètres décrivant la dynamique des macromolécules en solution. Nous avons montré la validité et l'intérêt de l'analyse locale, c'est-à-dire au niveau de chaque résidu, qui permet évidemment de mieux appréhender la dynamique et les caractéristiques locales tout en permettant la caractérisation du mouvement global lent et parfois anisotrope de la protéine. D'autre part, l'analyse présentée est autocohérente et permet ainsi d'évaluer simultanément l'anisotropie de déplacement chimique et l'échange chimique. Cependant, dans notre étude, l'échange est modélisé de telle sorte qu'il soit fonction du carré du champ magnétique utilisé pour la mesure, ce qui est réducteur. Cette analyse pourrait être complétée sans introduire de modèle a priori pour l'échange, c'est-à-dire en déterminant un paramètre  $R_2^{ex}$  pour chaque valeur du champ magnétique statique. Cette idée serait notamment intéressante pour l'étude de la protéine p13<sup>MTCPI</sup> à plusieurs températures : le paramètre  $R_2^{ex}$  permettrait de suivre l'évolution de l'échange en fonction du champ magnétique mais aussi en fonction de la température.

Nous avons également pu donner une signification plus précise des temps de corrélation effectifs. En effet, leurs valeurs et la connaissance de l'orientation des vecteurs NH de chaque groupement amide de la protéine permettent de remonter à la définition complète du tenseur de rotation-diffusion (supposé ici de symétrie axiale), c'est-à-dire à son orientation (à l'aide des angles d'Euler  $\theta$  et  $\varphi$ ), mais également à la valeur des coefficients de diffusion correspondants ( $D_{||}$  et  $D_{\perp}$ ). Cette analyse permet de mettre en évidence le mouvement global ressenti par les parties rigides de la protéine mais ne convient pas aux parties plus flexibles. Une amélioration possible consisterait à lever l'approximation usuelle qui consiste à confondre les temps de corrélation correspondant au mécanisme dipolaire et ceux correspondant au mécanisme csa. Ceci pourrait permettre de déterminer l'orientation de l'axe principal du tenseur csa par rapport au tenseur de rotation-diffusion et donc, in fine, par rapport au rayon vecteur NH.



Les travaux présentés dans ce mémoire concernent la détermination et l'exploitation des paramètres de relaxation de l'isotope-15 de l'azote dans des protéines enrichies.

La première partie introduit de manière générale les mécanismes de relaxation de spin. Le deuxième chapitre est consacré à la description des méthodes de mesure des paramètres de relaxation dans les protéines. De nouvelles méthodes permettant la mesure du terme de corrélation croisée provenant de l'interférence entre le mécanisme dipolaire (NH) et l'anisotropie de déplacement chimique (csa) de l'azote-15 sont exposées. Le troisième chapitre traite de la manière d'extraire des paramètres de relaxation des informations structurales et dynamiques. L'approche est basée sur une analyse résidu par résidu de la relaxation mesurée à plusieurs valeurs du champ magnétique statique, et s'avère compatible avec la détermination de l'anisotropie globale de réorientation des molécules. L'intérêt d'inclure les paramètres de corrélation croisée est également exposé pour la détermination simultanée du csa et de l'échange chimique.

Mots clés :

RMN, relaxation hétéronucléaire, corrélation croisée, dynamique, diffusion rotationnelle, protéines, azote-15, anisotropie de déplacement chimique, échange chimique.