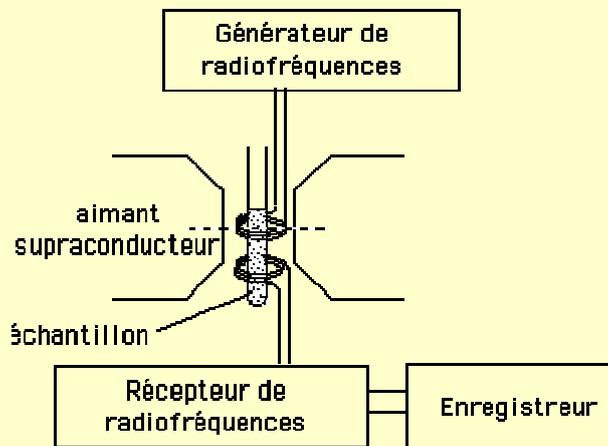


-SPECTROMETRIE DE RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

5-1-La RMN et l'analyse structurale

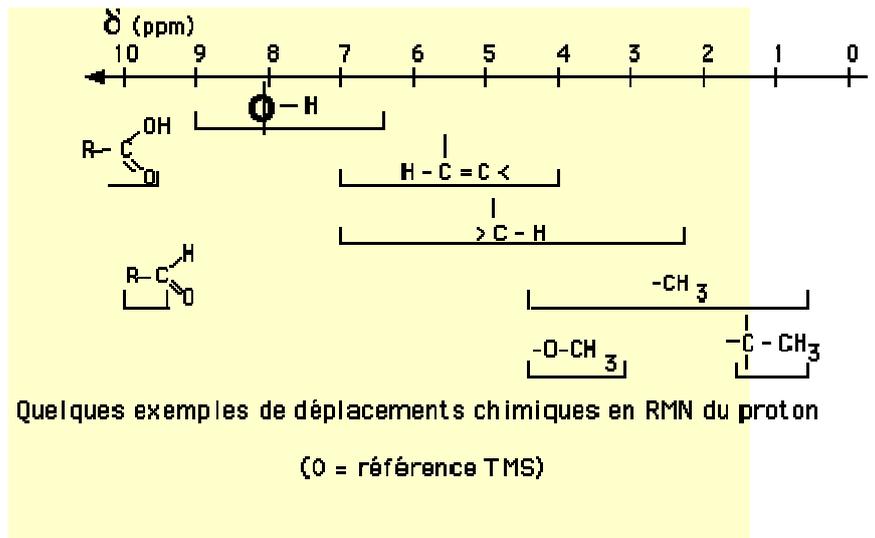
Cette technique, qui utilise les propriétés de résonance des atomes placés dans un champ magnétique, est particulièrement puissante.



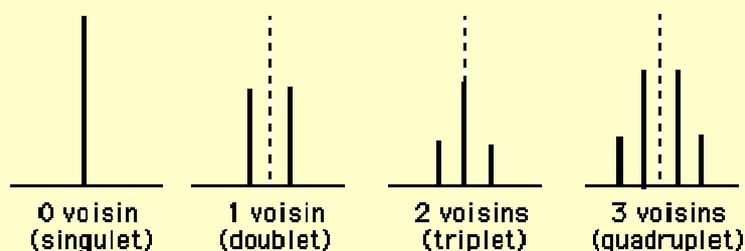
Le principe consiste à (1) utiliser un champ magnétique pour orienter les "spins" nucléaires des atomes, (2) à exciter ces spins par une onde radio à la fréquence de résonance, ce qui fait basculer certains spins, (3) après l'excitation, les spins reviennent à leur état initial, mais ceci n'est pas instantané : cette relaxation dépend d'une composante appelée spin-réseau (interaction des spins avec les autres atomes) et d'une composante spin-spin (interaction entre les spins). Le spin nucléaire se définit comme la résultante des moments cinétiques (= rotation sur eux-mêmes) des protons + neutrons (= nucléons) d'un atome. A ce spin nucléaire est associé un nombre quantique I . La RMN concerne essentiellement les noyaux avec un nombre de spin = $1/2$ (^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P). Cette méthode permet, à condition de disposer d'une substance parfaitement pure et en quantité suffisante, d'aboutir à la détermination complète des structures avec en particulier la stéréochimie des liaisons entre atomes. Il est possible d'utiliser la RMN du proton (^1H -RMN), celle du carbone (^{13}C -RMN) ou celle du phosphore (^{31}P -RMN). La faible abondance du ^{13}C dans la nature (1% environ) fait que la RMN du carbone est peu sensible.

La RMN du proton analyse les composés dissous dans un solvant deutérié (afin que les signaux du solvant n'interfèrent pas avec ceux de la molécule à étudier). Le composé doit être d'abord lyophilisé dans un solvant deutérié (D_2O) afin d'éliminer tout résidu de solvants de HPLC, puis est analysé dans l'appareil pendant une période allant de quelques heures à quelques jours. L'appareil fonctionne par accumulation successive de spectres individuels qui sont ensuite moyennés afin d'améliorer le rapport signal/bruit. Ceci permet d'obtenir des spectres valables avec de faibles quantités d'échantillon. Le spectre contient un certain nombre de signaux correspondant aux différents protons de la molécule et il convient alors de l'interpréter. Dans un champ magnétique de 10000 Gauss (B_0), les protons résonent à une fréquence très proche de 42,6 MHz. Selon leur environnement, les protons diffèrent et ils résoneront à cette fréquence pour un champ magnétique (B) légèrement inférieur. On exprimera cette différence (très faible) en ppm du champ B_0 , selon la relation :

$$\delta = (B_0 - B) / B_0 \cdot 10^6 = \text{déplacement chimique (ppm)}$$



Le signal d'un proton est donc caractérisé par son **déplacement chimique** δ (exprimé en ppm de la valeur du champ magnétique), qui dépend essentiellement de la nature de l'atome qui le porte (carbone, azote ou oxygène le plus souvent) et des autres substituants portés par ce dernier et les atomes adjacents : la présence de substituants comme des -OH, =O, ou celle de liaisons insaturées (C=C) affectent de façon caractéristique la valeur du déplacement chimique. Par ailleurs, les protons portés par un même carbone ou des atomes adjacents vont présenter des couplages, qui vont se traduire par une **multiplicité du signal** : le couplage avec un autre proton se traduit par la formation d'un doublet (avec deux protons d'un triplet etc.) et la largeur de ce doublet (exprimée en Hertz) dépend de la valeur des angles dièdres entre les liaisons C-H. La mesure des constantes de couplage permet donc de définir à la fois le nombre des voisins et la stéréochimie de la molécule.



L'application classique de la RMN concerne la **détermination des structures moléculaires**, qui seront décrites avec la **stéréochimie** exacte (ex. stéroïdes, oses, oligosaccharides,...).

L'utilisation de techniques de RMN à deux dimensions (^1H - ^1H ou ^{13}C - ^{13}C) permet d'"éclater" le spectre et facilite grandement l'identification des protons ou des carbones couplés. L'analyse en couplage ^1H - ^{13}C permet d'établir la correspondance entre les protons et les atomes de carbone. Ces approches nécessitent toutefois des temps d'accumulation nettement plus longs, mais les progrès réalisés au cours des dernières années ont largement abaissé le seuil des analyses (ex. 10 μg pour un stéroïde)

L'analyse de petites molécules (poids moléculaire < 10³) est relativement aisée. Il n'en va pas de même avec des molécules plus grosses, bien que ceci devienne depuis peu possible. Les outils actuels (appareils à haut champ dotés de moyens informatiques puissants pour le traitement des signaux) permettent de s'attaquer à la structure tridimensionnelle de protéines en solution (un grand avantage par rapport à la cristallographie aux rayons X) pour des poids moléculaires allant jusqu'à 30 kDa. Les structures en α -hélice ou en feuillet- β se traduisent par des relations de proximité (= par des couplages) entre protons qui sont caractéristiques de chacun de ces états. Il

est possible également d'analyser des interactions entre deux molécules (ligand-récepteur, métal-acide nucléique,...). La RMN permet donc actuellement des **études conformationnelles** des macromolécules biologiques.

5-2-La RMN in vivo

C'est une méthode non invasive et non traumatique qui donne accès à un certain nombre de paramètres : elle permet par exemple la **mesure du pH intracellulaire** (mesure du déplacement chimique des ions phosphate), l'identification de composés organiques et la mesure de leurs concentration, l'étude cinétique de leur métabolisme ... Elle permet des études sur des tissus, voire sur l'animal entier (souris, rat) placé dans un système de contention adéquat. Diverses molécules sont ainsi accessibles, comme par exemple : les **composés phosphorés** (nucléotides - ADP, ATP, UDPG -, ions phosphate, esters phosphates - composés de la glycolyse, créatine-P -, phospholipides - phosphatidyl-choline, phosphatidyl-éthanolamine -, acides aminés - alanine, glutamine -, neuromédiateurs - GABA, ...

5-3-L'imagerie RMN

Cette méthode utilise en pratique la RMN de l'eau, constituant de loin le plus abondant de la matière vivante. Les caractéristiques des protons de l'eau (en termes de temps de relaxation) varient selon les tissus et leur état hydrique. La méthode repose donc sur les différences d'état hydrique des tissus qui donnent des signaux différents. Ces signaux sont enregistrés selon des "plans de coupe" et les différences de temps de relaxation apparaissent comme des différences de contraste de l'image, très précise. On peut régler les appareils pour visualiser les tissus mous ou au contraire les systèmes ostéo-articulaires. Il est possible de caractériser par cette méthodes diverses pathologies (inflammations, oedèmes, tissus cancéreux etc.).