

## Sujet Felix BLOCH

Au-delà de son utilité purement analytique en chimie de synthèse, la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) offre un grand nombre d'applications, de l'étude de batteries à celle de biomolécules (protéines, acides nucléiques,...) en passant également par l'imagerie médicale (IRM). On se propose ici d'étudier une méthode de mesure de constantes thermodynamiques de réaction par RMN. Dans un premier temps, les fondements de la méthodologie seront développés. Dans un deuxième temps, les constantes d'acidité de quelques composés seront mesurées. Ces mesures seront finalement utilisées pour déterminer le pKa d'un acide aminé dans une protéine.

### Remarque

Dans ce problème, la non résolution de la partie 1 n'empêche pas la résolution des parties 2 et 3. Les résultats essentiels de la partie 1 sont rappelés en début de partie 2.

## 1 Les titrages par RMN

Étudions dans un premier temps comment l'existence d'un équilibre chimique affecte les spectres de RMN. Il s'agira d'établir les temps caractéristiques relatifs à la réaction chimique (partie 1.1) et à la mesure RMN (partie 1.2).

### 1.1 Temps caractéristique d'un système en équilibre

Nous étudierons ici une transformation modèle d'équation :



où  $k_1$  et  $k_{-1}$  correspondent respectivement aux constantes de vitesse des actes élémentaires  $A \rightarrow B$  et  $B \rightarrow A$ .

Ce modèle peut décrire des équilibres acido-basiques :



ou encore l'échange d'un noyau hydrogène entre deux isomères, comme représenté sur la figure 1.

Il s'agira dans cette partie d'établir le temps caractéristique de la réaction 1.

On considère un système initialement à l'équilibre. Si ce système subit une légère perturbation, du fait par exemple de la fluctuation des valeurs des concentrations par rapport aux valeurs définies par la condition d'équilibre, il va évoluer pour réatteindre l'état d'équilibre. Le temps caractéristique afférent à ce retour à l'équilibre est appelé temps de relaxation. L'obtention de l'expression de ce temps caractéristique consiste à étudier l'évolution du système de l'état perturbé vers l'état d'équilibre. On supposera par la suite que la concentration en A a augmenté de  $\delta[A]$ .

1. Établir l'équation différentielle régissant l'évolution de la concentration en A en fonction des concentrations [A] et [B].

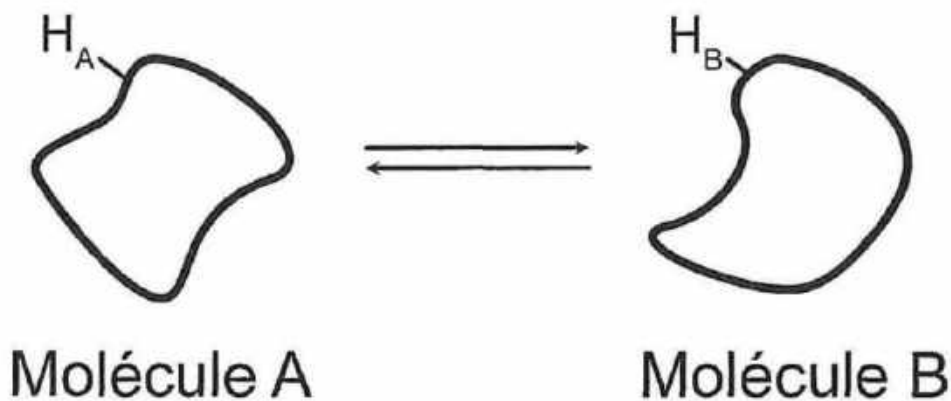


FIGURE 1 – Modélisation de l'équilibre chimique étudié ici comme l'échange intramoléculaire d'un hydrogène. Dans la molécule A, ce proton est noté  $H_A$ . Il est noté  $H_B$  dans la molécule B. Les molécules A et B sont donc ici des isomères.

Où on a :

$$-\frac{d[A]}{dt} = +k_1[A] - k_{-1}[B]$$

2. Exprimer la concentration en B au temps  $t$  en fonction des concentrations initiales en A et B (notées respectivement  $[A]_0$  et  $[B]_0$ ) ainsi que de la concentration en A au temps  $t$ . Écrire l'équation différentielle établie à la question 1 uniquement en fonction de la concentration en A au temps  $t$ , des concentrations initiales  $[A]_0$ ,  $[B]_0$  ainsi que des constantes de vitesses  $k_1$  et  $k_{-1}$ .

On a  $\forall t$   $[A](t) + [B](t) = [A]_0 + [B]_0$   
 soit  $[B](t) = [A]_0 + [B]_0 - [A](t)$   
 L'équation différentielle donne

$$-\frac{d[A]}{dt} = [A](k_1 + k_{-1}) - k_{-1}([A]_0 + [B]_0)$$

3. Déterminer l'expression du temps caractéristique noté  $\tau_c$  de retour à l'équilibre. Une représentation graphique pourra être employée mais la résolution de l'équation différentielle n'est pas indispensable.

On a une équation différentielle du premier ordre que l'on peut écrire sous forme canonique :  $y' + y \times \frac{1}{\tau_2} = \text{cte}$

Avec ici  $\tau_2 = \frac{1}{k_1 + k_{-1}}$  :

Graphiquement, la courbe est une exponentielle croissante dont la pente à l'origine est  $\frac{1}{\tau_2}$

## 1.2 Précession en RMN

On se propose ici d'établir quelques résultats théoriques de RMN en suivant une approche documentaire.

### Document 1 – Introduction au modèle vectoriel

Un spin nucléaire dans un champ magnétique possède une aimantation caractérisée par une orientation et une valeur. L'aimantation d'un ensemble de spin de noyau d'hydrogène s'écrit :

$$\vec{M} = N\gamma^2 \frac{\hbar^2}{4k_B T} \vec{B}_0 \quad (3)$$

avec  $N$  le nombre de spin de noyau d'hydrogène,  $\gamma$  le rapport gyromagnétique de l'hydrogène,  $\hbar$  la constante de PLANCK divisée par  $2\pi$ ,  $k_B$  la constante de BOLTZMANN,  $T$  la température et  $\vec{B}_0$  le vecteur champ magnétique.

À l'équilibre, l'aimantation globale d'un ensemble de spin de noyaux d'hydrogène a pour norme  $N\gamma^2 \frac{\hbar^2}{4k_B T} B_0$  et est orientée selon la direction du champ magnétique.

Afin d'expliquer simplement certains phénomènes en RMN, il est d'usage de représenter l'aimantation associée aux spins nucléaires relatifs aux noyaux hydrogène par un vecteur dans un espace tri-dimensionnel. Ce vecteur pointe dans la direction de l'aimantation dans le repère choisi, et sa norme correspond à celle du vecteur aimantation.

## Document 2 – Enregistrement d'un spectre de RMN

Afin d'obtenir un signal en RMN, l'approche consiste à déplacer les spins de leur état d'équilibre en utilisant des impulsions radio-fréquence. Dans le cadre du modèle vectoriel, cela se représente par un vecteur passant d'une orientation selon la direction du champ magnétique (l'axe  $Oz$ ) à une orientation orthogonale, c'est-à-dire dans le plan  $xOy$ , dit plan transverse. Le retour à l'état d'équilibre consiste en la perte d'aimantation dans le plan transverse et gain d'aimantation longitudinale (selon l'axe  $Oz$ ).

Ce mouvement est également associé à la rotation du vecteur aimantation autour de l'axe  $Oz$  (mouvement de précession) à une vitesse angulaire  $\omega = 2\pi\nu$ , où  $\nu$  correspond à la fréquence de résonance du spin associé au champ magnétique considéré.

On peut alors décrire l'évolution temporelle des composantes du vecteur aimantation après l'impulsion radio-fréquence comme :

$$\begin{aligned} M_x(t) &= M_0 \cos(\omega t) e^{-t/T_2} \\ M_y(t) &= M_0 \sin(\omega t) e^{-t/T_2} \\ M_z(t) &= M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right) \end{aligned} \quad (4)$$

où  $M_0$  est la norme du vecteur aimantation à l'équilibre,  $\omega$  est la vitesse angulaire de précession du vecteur aimantation,  $T_1$  le temps de relaxation longitudinal associé au gain d'aimantation longitudinale, et  $T_2$  le temps de relaxation transverse associé à la perte d'aimantation transverse. C'est la rotation de l'aimantation qui crée le courant enregistré au cours d'une expérience RMN, qui conduit au spectre RMN après transformée de FOURIER. La figure 2 récapitule les étapes d'une expérience de RMN. Après un temps  $t$ , le vecteur aimantation a tourné d'un angle  $\theta = \omega t$ .

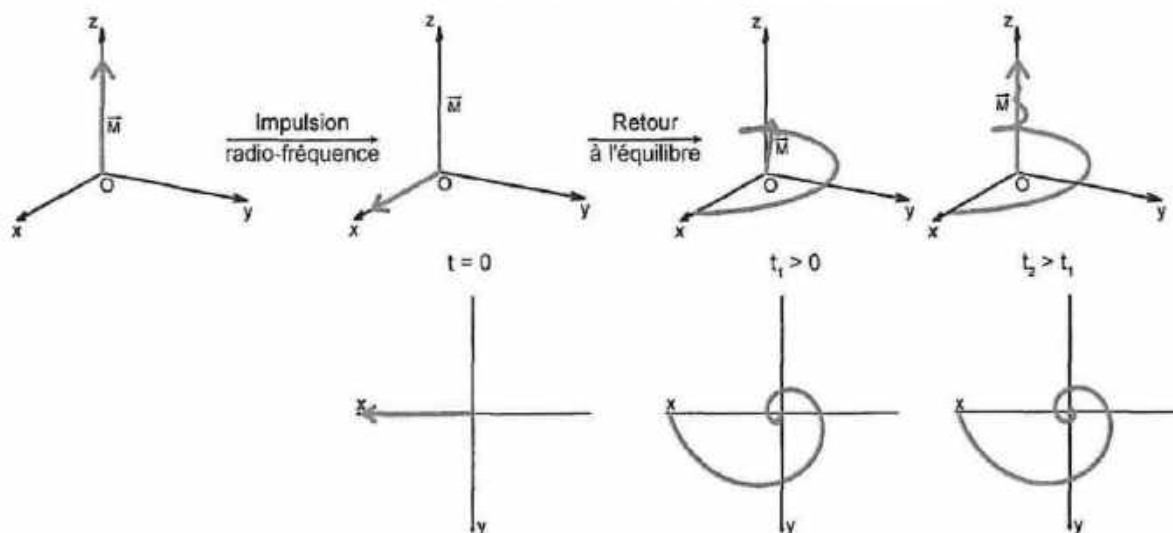


FIGURE 2 – Utilisation du modèle vectoriel pour représenter une expérience simple de RMN. L'aimantation est initialement alignée selon le champ magnétique, le long de l'axe  $Oz$ . Après application d'une impulsion radio-fréquence, les spins sont déplacés de leur état d'équilibre, et l'aimantation est orientée dans le plan transverse  $xOy$ . Le retour à l'équilibre est associé d'un mouvement de précession (rotation autour de l'axe  $Oz$ ). L'évolution de l'aimantation dans le plan transverse  $xOy$  est également indiquée. Les représentations du bas correspondent à une vue selon l'axe  $Oz$  du phénomène de précession décrit sur les figures du haut.

Dans toute la suite du problème, on ne considèrera que la rotation du vecteur aimantation sans considérer l'évolution de la norme du vecteur aimantation ni son retour vers une orientation le long de l'axe Oz.

### Document 3 – Précession et déplacement chimique

Pendant leur retour à l'état d'équilibre, les spins précessent et induisent un signal dans la sonde du spectromètre RMN. La vitesse angulaire de précession est fonction de la fréquence  $\nu$  de résonance du spin étudié. Le déplacement chimique  $\delta$ , exprimé en ppm, associé au spin qui précesse à la fréquence  $\nu$  s'exprime ainsi :

$$\delta = 10^6 \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (5)$$

avec  $\nu_{ref}$  la fréquence de résonance d'un composé de référence. Le spin doit précesser uniquement à la vitesse angulaire  $\omega = 2\pi\nu$  pour apparaître au déplacement chimique  $\delta$ . Si la vitesse angulaire de précession change au cours de la mesure, le déplacement chimique sera également modifié. La vitesse angulaire de précession dépend du champ magnétique  $B_0$  selon :

$$\omega = 2\pi\nu = 2\pi\gamma B_0(1 - \sigma) \quad (6)$$

avec  $\gamma$  le rapport gyrométrique, une constante dépendant du type de spin étudié (noyau d'hydrogène dans notre cas), et  $\sigma$  la constante d'écran, une constante qui dépend de l'environnement électronique autour du spin d'intérêt.

Soit deux spins  $H_A$  et  $H_B$ . Ces deux spins peuvent représenter deux noyaux hydrogène d'une même molécule, de deux molécules différentes, ou le même noyau hydrogène de deux espèces chimiques en équilibre (cas d'une isomérie comme indiqué sur la figure 1).

On notera  $\nu_A$  et  $\nu_B$  les fréquences de résonance des spins  $H_A$  et  $H_B$  associés. On considère ici que  $\nu_B > \nu_A$ .

On notera  $\vec{M}_A$  et  $\vec{M}_B$  les vecteurs aimantation des spins  $H_A$  et  $H_B$ . On supposera que les normes des vecteurs  $\vec{M}_A$  et  $\vec{M}_B$  sont identiques. Après application des impulsions radio-fréquences ( $t = 0$ ), les vecteurs aimantation sont supposés alignés selon l'axe  $Ox$  du repère.

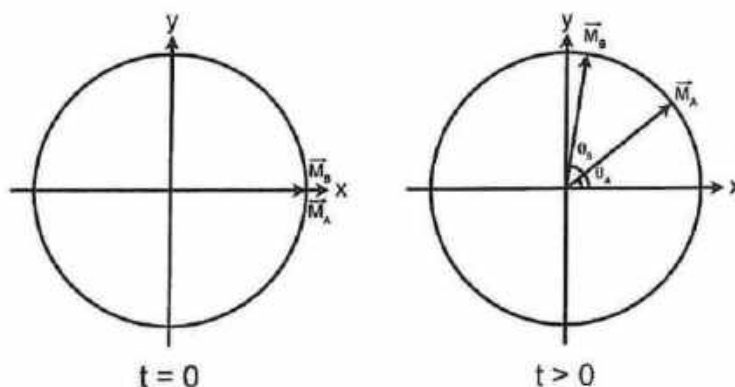


FIGURE 3 – Représentation des vecteurs aimantation dans le plan  $xOy$ . À l'instant initial ( $t = 0$ ), les deux vecteurs sont alignés selon l'axe  $Ox$ . Après un temps  $t > 0$ , les deux vecteurs  $\vec{M}_A$  et  $\vec{M}_B$  ont tourné à une vitesse angulaire  $\omega_A$  et  $\omega_B$  et forment respectivement des angles  $\theta_A$  et  $\theta_B$  par rapport à l'axe  $Ox$ .

Le champ magnétique est orienté selon l'axe  $Oz$ , et on pourra par la suite se limiter au plan  $xOy$  des repères utilisés (on ne considèrera pas ici la perte d'aimantation dans le plan transverse, associée au gain d'aimantation longitudinale). Nous avons représenté sur la figure 3 la position des vecteurs aimantation au

temps  $t = 0$  et après un temps  $t > 0$ .

Il est d'usage en RMN d'utiliser un repère dit *repère tournant* pour lequel les axes  $Ox$  et  $Oy$  tournent autour de l'axe  $Oz$  à une fréquence donnée. Considérons dans un premier temps un repère tournant à la vitesse angulaire  $\omega_A$ . Dans ce repère, on a représenté la position des vecteurs aimantation associés aux spins  $H_A$  et  $H_B$  après un temps  $t > 0$  (Figure 4).

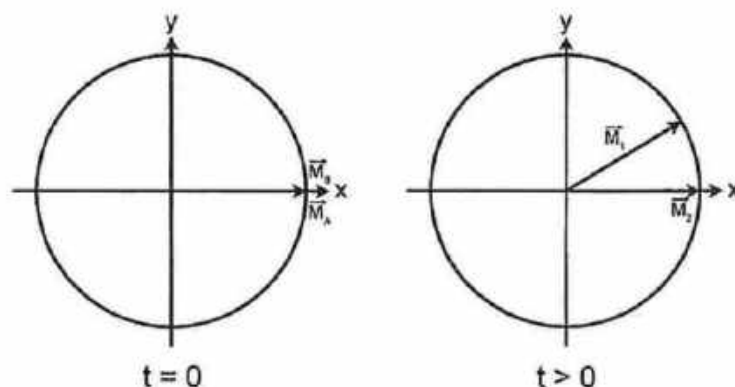


FIGURE 4 – Représentation des vecteurs aimantation dans le plan  $xOy$  dans le repère tournant à la vitesse angulaire  $\omega_A$ . Au temps initial ( $t = 0$ ), les deux vecteurs sont alignés selon l'axe  $Ox$ .

4. À quels vecteurs aimantation ( $\vec{M}_A$  ou  $\vec{M}_B$ ) les vecteurs  $\vec{M}_1$  et  $\vec{M}_2$  correspondent-ils ? Quelle est la vitesse angulaire de précession des vecteurs  $\vec{M}_A$  et  $\vec{M}_B$  dans ce repère tournant ?

En comparant les figures 3 et 4, on réalise que le référentiel tournant tourne à la vitesse  $\omega_A$ .  $\vec{M}_A$  est donc fixe dans ce référentiel. Ainsi,  $\vec{M}_2 = \vec{M}_A$  et  $\vec{M}_1 = \vec{M}_B$

Dans ce référentiel,  $\omega_1 = 0$  et  $\omega_2 = \omega_B - \omega_A$

Considérons maintenant un repère tournant à la vitesse angulaire  $\frac{1}{2}(\omega_A + \omega_B)$ . On a représenté la position des vecteurs aimantation dans ce repère au temps  $t = 0$ ,  $t_1 > 0$  et  $t_2 > t_1$  avec  $t_2 \approx t_1$ , sans indiquer à quel spin est associé chaque vecteur (Figure 5).

5. À quels vecteurs aimantation ( $\vec{M}_A$  ou  $\vec{M}_B$ ) les vecteurs  $\vec{M}_3$  et  $\vec{M}_4$  correspondent-ils ?



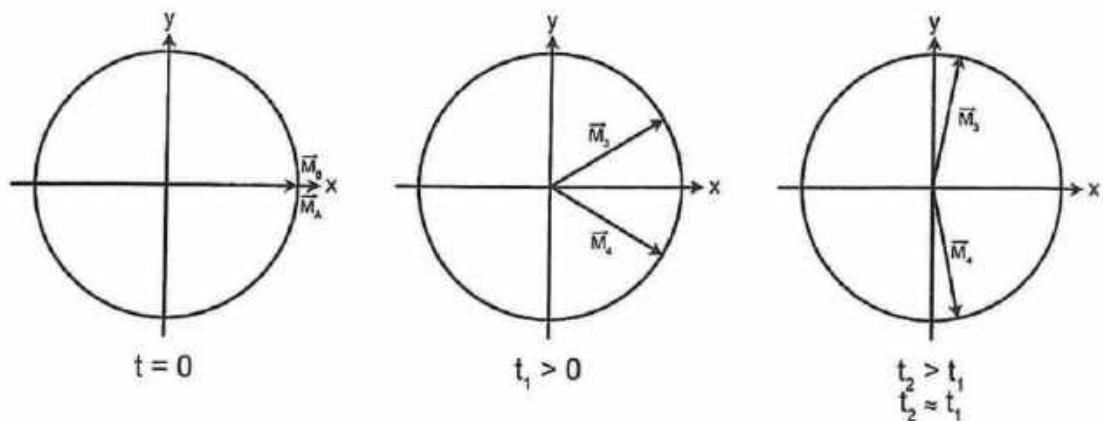


FIGURE 5 - Représentation des vecteurs aimantation dans le plan  $xOy$  dans le repère tournant à la vitesse angulaire  $\frac{1}{2}(\omega_A + \omega_B)$ . Au temps initial ( $t = 0$ ), les deux vecteurs sont alignés selon l'axe  $Ox$ . On a choisi  $t_2 > t_1$  tel que  $t_2 \approx t_1$ .

6. Dans ce repère, quelle est la vitesse angulaire de précession des vecteurs aimantation  $\vec{M}_A$  et  $\vec{M}_B$ ? En déduire l'expression du temps caractéristique  $\tau_p$  lié à la précession.

Soit comme  $\omega_A < \omega_B$  on a  $\omega_A < \frac{\omega_A + \omega_B}{2} < \omega_B$ .

Donc dans le référentiel A à une vitesse de rotation négative et B une rotation positive.

Ainsi,  $\vec{M}_3 = \vec{M}_B$  et  $\vec{M}_4 = \vec{M}_A$

6. Dans ce repère  $\omega_3 = \omega_B - \frac{\omega_A + \omega_B}{2} = \frac{1}{2}(\omega_B - \omega_A) > 0$

$$\omega_4 = \omega_A - \frac{\omega_A + \omega_B}{2} = \frac{1}{2}(\omega_A - \omega_B) < 0$$

On remarque que  $|\omega_3| = |\omega_4|$ , d'après le document 2

$$\tau_p = \frac{2\pi}{|\omega_3|}$$

### 1.3 Les régimes d'échange en RMN

#### Document 4 – L'échange chimique en RMN

Il arrive que le système étudié évolue pendant la mesure RMN. C'est le cas par exemple si une transformation chimique, par exemple une isomérisation, a lieu. Celle-ci peut être très rapide (plusieurs millions de réactions par seconde) ou très lente. C'est l'environnement électronique des noyaux qui détermine leur déplacement chimique, et ainsi, pendant la mesure, l'environnement électronique peut changer plusieurs fois, affectant ainsi le déplacement chimique. Deux cas limites apparaissent : l'échange rapide et l'échange lent. Ces deux cas limites conduisent à des spectres très différents dans l'état d'équilibre.

Dans le cas de l'échange rapide, un unique pic est observé, à une position correspondant à la moyenne des déplacements chimiques, pondérée par la proportion en chaque espèce :

$$\delta = p_A \delta_A + p_B \delta_B \quad (7)$$

avec  $p_A$  et  $p_B$  les proportions en molécules A et B, et  $\delta_A$  et  $\delta_B$  les déplacements chimiques associés aux noyaux  $H_A$  et  $H_B$ .

Dans le cas de l'échange lent (entre deux espèces), deux pics sont observés, chacun à la position correspondant aux deux états individuels ( $\delta_A$  et  $\delta_B$ ), avec une intensité dépendant de la proportion dans chacun des états ( $p_A$  et  $p_B$ ).

On a représenté sur la Figure 6 chacune de ces deux situations avec des proportions différentes en espèces A et B.

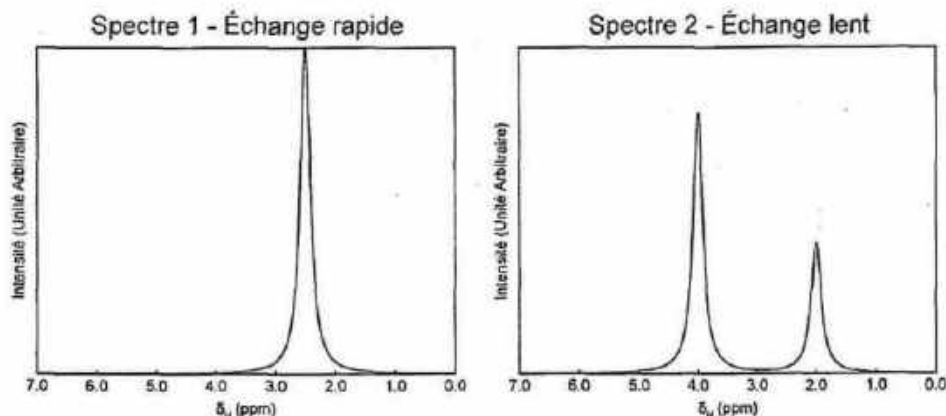


FIGURE 6 – Spectres simulés pour deux cas limites d'échange chimique entre deux espèces constituées chacune d'un proton, l'une ayant un déplacement chimique de 2,0 ppm (espèce A), l'autre de 4,0 ppm (espèce B). Les échelles d'intensité sont en unité arbitraire et indépendantes pour chacun des spectres. Dans le spectre 2, le pic à 4,0 ppm intègre pour 2 tandis que le pic à 2,0 ppm intègre pour 1. Dans le spectre 1, la proportion en espèce A est de 75 %. Elle est de 25 % dans le spectre 2.

7. Comparer les temps caractéristiques  $\tau_e$  (question 3) et  $\tau_p$  (question 6) dans le cas de l'échange rapide et de l'échange lent.



Quand  $\tau_e > \tau_p$  l'échange est rapide.

Quand  $\tau_e < \tau_p$  l'échange est lent.

8. Justifier l'allure des spectres dans chacun des deux cas limites.

Dans le cas d'un échange rapide on ne peut pas observer individuellement l'espèce A ou B mais seulement une moyenne des deux signaux.

Lorsque l'échange est lent, l'analyse RMN peut être réalisée sans que les protons se soient échangés, on peut donc voir un signal pour chaque proton.

Plaçons nous dans le cas d'un régime d'échange intermédiaire, c'est-à-dire :  $\tau_e \approx \tau_p$ .

9. Dans le cas d'un régime d'échange intermédiaire, quel serait l'effet d'une augmentation de température sur le régime d'échange ?

On favorise l'échange rapide en augmentant la température, en revanche  $\tau_p$  n'est pas modifié.

Avec la température les proportions de A et B à l'équilibre peuvent tout de même changer.

10. Dans le cas d'un régime d'échange intermédiaire, quel serait l'effet d'une augmentation du champ magnétique sur le régime d'échange ?

Si  $B_0$  augmente ce augmente donc  $\tau_p$  diminue. Ainsi, l'échange n'a pas le temps de se faire, on est dans le cas lent.

## 2 Mesurer un $pK_A$ par RMN

Dans cette partie, on établira une méthode de mesure de constante d'acidité par RMN. La réaction chimique étudiée s'écrit donc :



On s'intéressera particulièrement aux noyaux hydrogène non acides des molécules A et B, c'est-à-dire les protons ne participant pas à la réaction acido-basique. Du fait de la réaction chimique, un noyau dans la molécule A, noté  $H_A$  devient un noyau  $H_B$  dans la molécule B et n'a pas nécessairement le même déplacement chimique dans les deux molécules du fait d'environnements électroniques potentiellement différents (cf figure 1).

Dans la suite du sujet, l'échange est de type rapide (cf document 4). Ainsi, on rappelle que seul un pic est observé pour le proton  $H_A$  et le proton  $H_B$ , au déplacement chimique donné par :

$$\delta = p_A \delta_A + p_B \delta_B$$

avec  $p_A$  et  $p_B$  les proportions en molécules A et B, et  $\delta_A$  et  $\delta_B$  les déplacements chimiques respectifs associés aux noyaux  $H_A$  et  $H_B$ .

### 2.1 Déplacement chimique, pH et constante d'acidité

Dans un premier temps, on établira une condition simple pour déterminer une constante d'acidité par RMN.

11. Montrer que :

$$pH = pK_A + \log \frac{\delta - \delta_A}{\delta_B - \delta} \quad (9)$$

D'après la formule du pKa on a :

$$pH = pK_A + \log \frac{[Base]}{[Acide]} = pK_A + \log \left( \frac{P_A}{P_B} \right)$$

On en utilisant la formule donnée ~~on~~ et le fait que  $P_A + P_B = 1$

$$P_A = \frac{\sigma - \sigma_B}{\sigma_A - \sigma_B} \quad \text{ou} \quad P_B = 1 - P_A = \frac{\sigma_A - \sigma}{\sigma_A - \sigma_B}$$

D'où le résultat

Par la suite, on pourra utiliser l'équation 9 sans démonstration.

12. Pour quelle valeur du déplacement chimique  $pH = pK_A$  ?

$$\text{On a } pH = pK_A \text{ pour } \frac{\sigma - \sigma_A}{\sigma_B - \sigma} = 1 \text{ soit } \sigma = \frac{\sigma_A + \sigma_B}{2}$$

## 2.2 Mesure de quelques constantes d'acidité par RMN

En 2008, l'équipe de SYKES détermina le  $pK_A$  de quelques molécules utilisées en RMN pour étudier des biomolécules (protéines et acides nucléiques par exemple). L'intérêt de cette méthode, comme nous le verrons dans la partie suivante, est qu'elle permet de déterminer de façon précise un pH dans une solution de biomolécules sans avoir à utiliser de pH-mètre, pratique qui nécessite en général un volume trop grand pour pouvoir être utilisé dans des études de biomolécules. Les mesures de cette étude sont présentées sur la Figure 7.

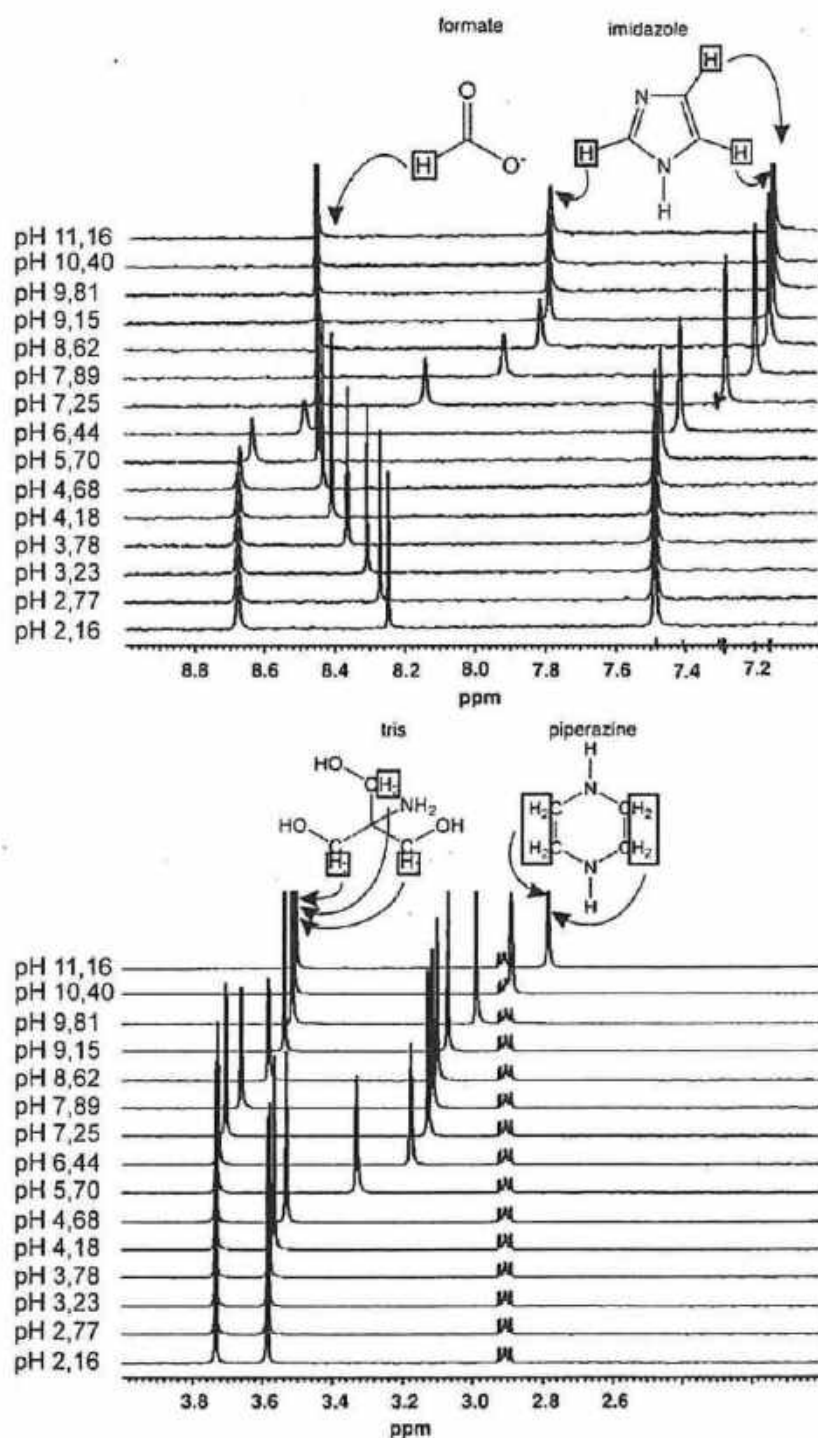


FIGURE 7 - Titrage pH-métrique de quelques composés. Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  ont été enregistrés à 500 MHz à la température de 30 °C. Les composés sont dissous à une concentration finale de  $2 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  dans une solution de KCl dans l'eau à  $10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Le triplet à 2,9 ppm correspond à une référence de déplacement chimique (le DSS : acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique).

13. Justifier le choix de l'équipe de SYKES d'étudier les quatre composés présentés sur la figure 7.

Il s'agit de molécules simples qui permettent de mesurer les brues dans les acides aminés (formate ; Tris ; imidazole) et les acides nucléiques qui sont des dérivés du pipérazine

On se focalisera dorénavant sur le cas de l'imidazole. On numérotera les noyaux hydrogène comme indiqué sur la figure 8.

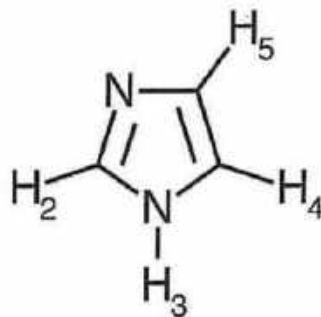


FIGURE 8 - Structure de l'imidazole.

14. Représenter le couple acide-base de l'imidazole. Justifier.

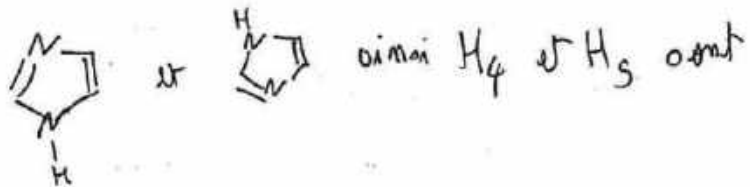
On a le couple

/

en le proton d'une amine ( $pK_a \sim 9$ )  
est beaucoup plus acide que celui des acides ( $pK_a \sim 40$ )

15. Quelle(s) information(s) l'évolution des valeurs des déplacements chimiques relatifs aux noyaux  $H_2$  ou  $\{H_4, H_5\}$  fournit-elle ? On justifiera notamment l'équivalence chimique des protons  $H_4$  et  $H_5$ .

La molécule déprotonnée ou non présente deux formes équivalentes :



équivalents.

La déprotonation augmente la densité électronique sur la molécule ainsi lors de l'augmentation du pH les signaux sont dérivés.

16. Déterminer graphiquement le  $pK_A$  de l'imidazole en utilisant l'évolution du déplacement chimique des protons  $H_4$  et  $H_5$ . On prendra soin d'indiquer la méthode utilisée.

On prend les 2 valeurs extrêmes de déplacement chimique.

$$\left. \begin{array}{l} \text{On a } \delta_A = 7,48 \text{ ppm} \\ \delta_B = 7,14 \text{ ppm} \end{array} \right\} \Rightarrow \frac{\delta_A + \delta_B}{2} = 7,31 \text{ ppm}$$

$$\text{On a vu que a } \text{pH} = \text{pK}_A \quad \delta = \frac{\delta_A + \delta_B}{2}$$

~~On a donc~~

Pour les 3 valeurs où  $\delta \neq \delta_A$  et  $\delta_B$  on a

$$\text{pK}_A = \text{pH} - \log \left( \frac{\delta - \delta_A}{\delta_B - \delta} \right) \text{ on trouve}$$

$$\text{pK}_{A_1} = 6,95 \quad ; \quad \text{pK}_{A_2} = 7,20 \quad ; \quad \text{pK}_A = 7,22$$

$$\text{En moyenne on a } \text{pK}_A = 7,12 \pm 0,1$$

17. La valeur de  $\text{pK}_A$  reportée dans l'étude pour l'imidazole est de 7,08. Expliquer pourquoi l'imidazole fait un bon indicateur de pH dans le cadre de l'étude de biomolécules.

On a une molécule avec un  $pK_A$  proche du pH physiologique

Quel que soit le résultat obtenu précédemment, on prendra 7,08 comme valeur de  $pK_A$  pour l'imidazole.

### 3 Mesurer le $pK_A$ d'un acide aminé dans une protéine

#### Remarque

La résolution de la suite du problème ne nécessite aucune connaissance de biologie.

Dans une étude publiée en 2013, l'équipe de SYKES utilise la méthodologie présentée dans la partie 2 afin de déterminer les constantes d'acidité de quelques acides aminés au sein d'une protéine, en particulier d'une Histidine (H162) dont la structure est présentée Figure 9.

L'approche consiste à diluer la protéine d'intérêt dans un tampon contenant l'imidazole comme indicateur pH-métrique. Les déplacements chimiques des noyaux hydrogène de l'imidazole vont servir à mesurer le pH de façon précise, ce qui permet par la suite d'obtenir une valeur précise du  $pK_A$  des acides aminés de la protéine.

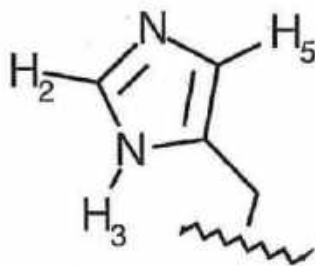


FIGURE 9 – Structure de l'histidine. Seule la chaîne latérale de l'acide aminé est représentée.

La série de spectres présentée en Figure 10 correspond au titrage pH-métrique de la protéine d'intérêt. Nous allons dans un premier temps déterminer le pH de chaque spectre puis le  $pK_A$  de l'histidine H162.

18. Le tampon contient de l'imidazole en grande quantité ( $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), la protéine est à une concentration de  $8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dans l'eau). Indiquer les déplacements chimiques de ses protons sur les spectres de pH le plus acide et le plus basique. Expliquer les différences éventuelles avec les déplacements chimiques observés dans la partie 2.



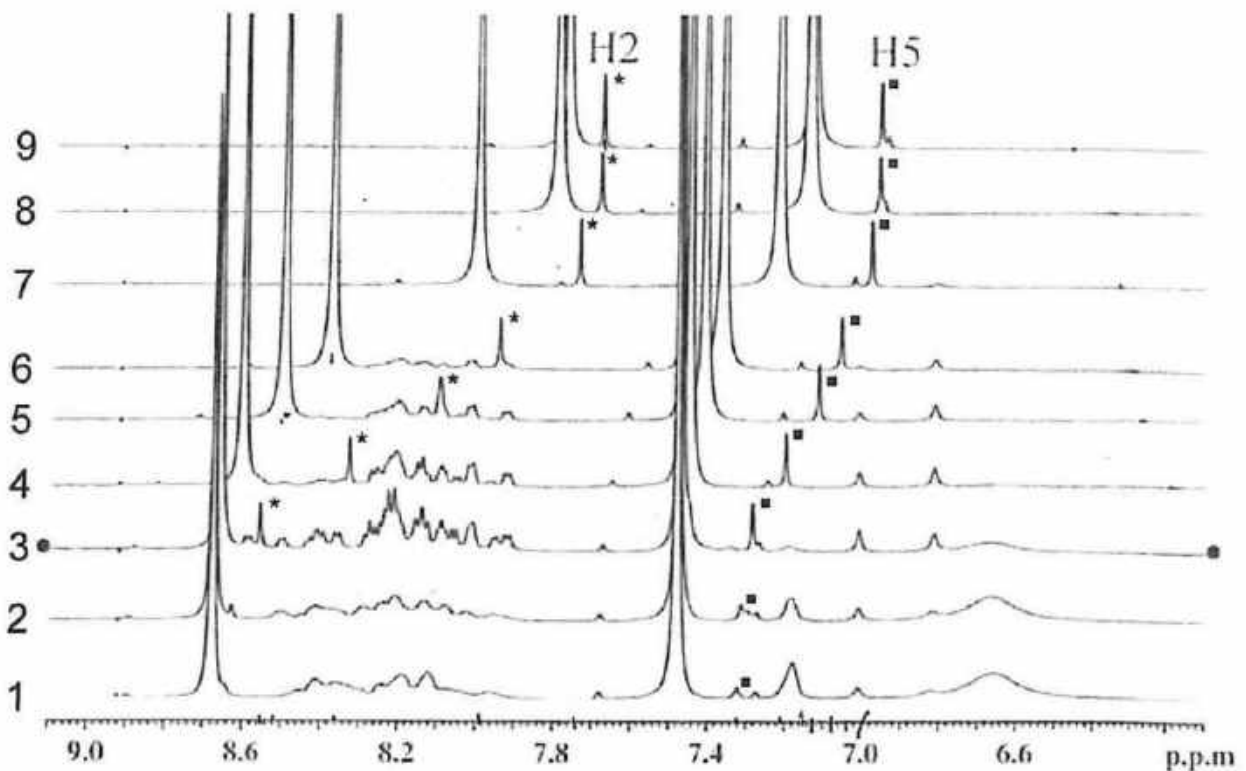


FIGURE 10 - Titrage pH-métrique de la protéine dans un tampon contenant de l'imidazole. Les signaux des protons  $H_2$  et  $H_5$  de l'histidine H162 sont indiqués, quand cela est possible, respectivement par une étoile et un carré placé à droite du pic. Les spectres ont été enregistrés à 500 MHz à une température de 30°C. La numérotation des spectres est une fonction croissante du pH.

Le spectre se déplace vers des déplacements chimiques les plus élevés  
 On a :  
 $\sigma_{H_2} = 8,55 \text{ ppm}$  et  $\sigma_{H_5} = 7,3 \text{ ppm}$   
 En milieu basique  $\sigma_{H_2} = 7,75 \text{ ppm}$  et  $\sigma_{H_5} = 6,85$ .  
 Les déplacements chimiques sont inférieurs à ceux de l'imidazole car  
 la chaîne latérale libère les signaux par effet inductif donneur.

19. Remplir le tableau suivant donnant le pH et le déplacement chimique du proton H<sub>4</sub> de l'imidazole pour chaque spectre, quand cela est possible. On déterminera le pH le plus précisément possible.

spectre	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$\delta$	8,68	8,68	8,66	8,58	8,52	<del>8,48</del> <sup>8,36</sup>	8	7,80	7,72
pH	<5,43	<5,43	5,43	6,14	6,38	<del>7,18</del> 6,78	7,46	8,72	>8,72

20. Déterminer graphiquement le pK<sub>A</sub> en utilisant la feuille de papier millimétré fournie. On prendra soin de laisser une trace du travail effectué.

On trace 
$$\text{pH} = \text{p} \left( \log \left( \frac{\sigma_A - \sigma_A^-}{\sigma_A^- - \sigma_A} \right) \right)$$

À l'origine on donne pK<sub>A</sub> = 6,05

