50376 1988

THESE

nº d'ordre 196

PRESENTEE



A L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE **FLANDRES ARTOIS**

POUR OBTENIR

LE DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE I (Thèse Nouveau Régime) Spécialité : BIOCHIMIE

par

Patrick BERTHAULT

APPLICATIONS DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE A UNE ET DEUX DIMENSIONS A L'ETUDE STRUCTURALE ET CONFORMATIONNELLE DES OLIGOSACCHARIDES. CONCEPTION ET MISE AU POINT DE NOUVELLES TECHNIQUES

Soutenue le 29 janvier 1988, devant la Commission d'Examen

MM.

J. MONTREUIL

Μ.

G.

PETITOU

STRECKER

Μ. PTAK

- Μ. DRIFFORD
- J.F. LABARRE
- PERLY Β.

Président

Examinateurs

A mes parents,

en témoignage d'affection.

" La biologie ne peut, ni se réduire à la physique, ni se passer d'elle. "

F. Jacob

La logique du vivant (1970)

" Les passions sont les seuls orateurs qui persuadent toujours "

> La Rochefoucault Réflexions morales (1664)

Cette étude a été entièrement réalisée au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, dans le Département de Physico-Chimie, sous la responsabilité de M. **PERLY**. Je lui suis très reconnaissant de l'aide qu'il m'a constamment apportée ; son enthousiasme, sa très grande compétence et son amitié m'ont vraiment permis d'apprendre de nombreuses choses, et de me passionner pour les sujets traités. Merci encore, Bruno !

Monsieur le Professeur **MONTREUIL**, de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, a accepté de superviser ce travail, et d'être le Président du jury. Je le remercie pour sa bienveillance et l'intérêt qu'il a porté à cette étude malgré l'éloignement géographique.

Monsieur DRIFFORD, Chef du Service de Chimie Moléculaire au CEA de Saclay, m'a permis d'effectuer ma thèse dans d'excellentes conditions, en m'accueillant très chaleureusement au sein de son service. Il a de plus accepté de juger ce travail ; qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

La collaboration avec Monsieur **PETITOU** de l'Institut CHOAY s'est toujours déroulée de façon très agréable, et les discussions que nous avons eues ont été très enrichissantes pour moi. Il se trouve très fortement associé à cette étude pour laquelle il a bien voulu être rapporteur ; c'est pourquoi je le remercie vivement.

Je remercie Monsieur **PTAK**, Professeur à l'Université d'Orléans et Monsieur **STRECKER**, Directeur de recherche à l'Université de Lille, de bien vouloir participer à l'évaluation finale de ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur LABARRE, Directeur de recherche au CNRS de Toulouse, pour les fructueuses discussions que nous avons eues, et pour m'avoir fait participer à ses sujets de recherche ; les cyclophosphazènes constituent un challenge passionnant auquel j'espère pouvoir continuer à collaborer. Merci aussi de traverser la France pour faire partie du jury de la soutenance. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Messieurs Jean CHOAY et Pierre LEFRANCIER de l'Institut CHOAY pour le soutien apporté à ce sujet et pour leur aide matérielle.

Je n'oublie pas les personnes que j'ai pu côtoyer lors de ma thèse, au sein du laboratoire de RMN du CEA de Saclay, et qui m'ont rendu ces quelques années de recherches très agréables :

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **TISTCHENKO** et Messieurs **CHACHATY, DESALOS, BESSON** et **LANGLET** qui m'ont accueilli très sympathiquement, et continuent régulièrement à m'encourager.

Véronique, Aurélia, Philippe, Christian, Thierry, Pascal, Jean-Philippe n'ont pas été de simples collaborateurs scientifiques, mais d'excellents amis, et ont créé une bonne ambiance propice à la réflexion. Ne travaillez pas trop !.

J'exprime ma gratitude à Flavio **TOMA**, à Jean-Michel **NEUMANN**, à Victor **FAZAKERLEY** et à Michel **ROUX** pour leurs précieux conseils et la sympathie qu'ils m'ont toujours témoignée.

Enfin, merci à toi, Sylvie, pour ton soutien de chaque instant.

Structure des monomères



D-Glucosamine (anomère α)



Acide D-Glucuronique (anomère α)



Acide L-Iduronique (anomère ß)



Unité insaturée provenant de l'action de l'héparinase sur un acide uronique

AVERTISSEMENT

Dans cette étude, nous employons de façon abusive certains termes propres aux "RMNistes", mais sans doute impropres aux puristes ; ceci afin de ne pas trop alourdir les phrases, et surtout car il est très difficile de ne pas écrire de la façon dont on parle.

Ainsi, pour "pulse", il faut comprendre "impulsion", et remplacer mentalement "magnétisation" par "aimantation". Lorsque le mot anglais "offset" est employé, il s'agit du décalage en fréquence.

La liste n'est peut-être pas terminée, et nous espérons que cela ne compliquera pas la tâche ardue des courageux lecteurs.



TABLE DES MATIERES

I Introduction générale :

Intérêt des oligosaccharides		•		•	•	•	•	•	9
Apports de la RMN	•	•	• •	•	•	•		•	11
Paramètres des études d'oligosaccharides	•	•	• •	•	•	•	•	•	13
Présentation du plan	•	•		•	•	•	•	•	15

I Introduction à la Résonance Magnétique nucléaire :

∐−1)	Phénomène de Résonance Magnétique	•	•	•	•	•	•	•	•	-	•	19
I −2)	Quantification du phénomène	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	20
<u>∏</u> -3)	Concepts généraux	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	24
∏-4)	Détection	•			•		•	•	•	•		उउ

I Formalisme quantique :

<u>∏</u> −1)	Introduction	•	•	•	•	•	45
11-2)	Matrice densité	•	•	•	•	•	46
∭-3)	Equation d'évolution de l'opérateur densité	•	•	٠	•	•	47
111-4)	Formalisme des opérateurs produits	•	•	•	•	•	49
11-5)	Evolution des opérateurs produits	•	•	•	•	-	55
Ⅲ-6)	Aspects pratiques des caculs d'opérateurs.	•	•	•	•	•	61
11-7)	Cyclages de phases	•				•	62

IV Limitation des expériences à une dimension classiques :

IQ-1)	Présentation des composés é	étudiés	•	•	•	•	•	٠	•	•	•	67
I Ū -2)	Spectres proton	• • • •	•	•	•	•	•	•	•	•	-	70
ID-3)	Techniques de découplage .		•	•	•	•	•	•	•	•	•	71
I □ -4)	Apport de la RMN classique	du ¹³ C	-		-				•	•	•	75

I <u>Transferts d'aimantation</u> :

☑-1)	Introduction	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	80
፬-2)	Théorie	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•	•	•		•	•	81
Q-3)	Applications	•	•	•	•	•	•	•	•	• ·	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	90

I Expériences à deux dimensions (principes généraux) :

∇I -1)	Introduction	•	•	•	•	•,	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	113
⊽I-2)	COSY et dérivés	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	116
QI-3)	Cycles de phase		•	•	•	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	118

VI Expériences de corrélation scalaire à deux dimensions :

∇∏−1)	Hétéronucléair	-63	.	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	135
∇ Π−2)	Homonucléaire	:	exp	bér	-ie	enc	e	de	- C	os	Y							•			149

DI Expériences de transferts multiples (2D) :

☑Ⅲ-1)	Introduction	•	•	•	•	167
☑Ⅲ-2)	Relais homonucléaires	•		•	•	168
ॻॻ–Ӡ)	Relais hétéronucléaires	•	•	•	•	170
☑Ⅲ-4)	Application des relais aux oligosaccharides	•	•	•	•	173
☑Ⅲ -5)	Transferts dans le champ tournant					181

IX Excitation des cohérences multiples quanta :

IX-1)	Introduction	5
IX-2)	Traitement théorique	7
IX-3)	Particularités des expériences à deux dimensions 20	19
IX-4)	Applications aux oligosaccharides	9
IX-5)	Expérience de double quantum relayée	23

X Expériences dans l'eau légère :

∑-1)	Introduction	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	231
∑-2)	Théorie des formes d'excitation .	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	233
X-3)	Applications aux oligosaccharides	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	238

XI <u>Mesure des couplages scalaires</u> :

XI-1)	Expérience de J-Resolved	247
X I-2)	Excitations sélectives	248
X I-3)	Mesures des couplages sur les oligosaccharides	252
XI-4)	Simulation	261

XII <u>Interactions dipolaires</u> :

Ⅻ-1)	Introduction	•	267
X ∏-2)	Théorie de la relaxation	•	268
∑ ∏-3)	Paramètres gouvernant l'effet Overhauser nucléaire .		273
X∏-4)	Equations des temps de relaxation	•	276

XII Expérience d'interaction dipolaire à deux dimensions :

XII-1)) But	-	•	•	•	•	283
፻፹-2)) Principe		•	•	•	•	283
XⅢ-3)) Traitement théorique	•	•	•	•	•	284
ೱⅢ-4)) Application aux oligosaccharides	•	•	•	•	•	290
XⅢ-5)) Interactions dipolaires dans le champ tour	nar	nt	•	•	•	294
XII-6)) Application aux oligosaccharides					•	301

XIV Conditions expérimentales :

XIQ-1)	Préparation des	échantillons	.	• •	• •	• •	•	•	•	٠	•	309
XIQ-2)	Appareillage .				• •		•	•	•	•	•	309
XIQ-3)	Paramètres d'acq	lisition en	RMN	du	proto	п.	•	•	•	•	•	310
XIQ-4)	Paramètres d'acqu	lisition en	RMN	du	carbo	ne	13		-	•		311

<u>Conclusion</u>



CHAPITRE I

7

INTRODUCTION GENERALE



Intérêt des oligosaccharides

glucides constituent une classe de Les composés bio-actifs d'importance considérable. Ils se rencontrent dans 1a matière vivante sous des formes très diverses allant de monomères simples (tels que le glucose), d'oligomères (lactose, saccharose. etc...) ou de polymères de très haut poids moléculaire. Bien que leur importance ait été reconnue de longue date, la variété des fonctions qu'ils remplissent a été très longtemps sous-estimée. Il était alors admis que de petites molécules jouaient un rôle essentiellement intermédiaire par leur participation aux processus élémentaires de photosynthèse et la leur position clé dans les cycles métaboliques. Les macromolécules résultant de la polycondensation de ces oligosaccharides étaient mono ou considérées comme des substances de soutien (celluloses par exemple) ou de réserve énergétique permettant de régulariser la vie métabolique de la cellule. Dans cette classification des constituants de la matière vivante. les olucides ne bénéficiaient pas de la noblesse des protéines ou des acides nucléiques par exemple.

I 1 est pourtant rapidement apparu que de nombreux composés de nature glucidique complexe intervenaient très souvent pour contrôler des processus biologiques divers. De très nombreuses protéines subissent une maturation conduisant à la formation de glycoprotéines par addition de segments oligosaccharidiques ; c'est le cas de plusieurs protéines plasmatiques, des lectines, des protéines membranaires, des facteurs de groupes sanguins, etc ... Dans ces édifices moléculaires, la particule glucidique joue le plus souvent le rôle de signal destiné à être reconnu par un autre élément, macromolècule ou cellule (1). De plus, de nombreux polysaccharides jouent un rôle clé dans la régulation des processus vitaux, en intervenant par exemple pour activer ou inhiber une cascade de réactions enzymatiques. Le contrôle des phénomènes de coagulation par l'héparine est exemplaire dans ce sens (2). La multítude de phénomènes biologiques dans lesquels des structures osidiques sont impliquées a donné un nouvel essor à l'analyse structurale de ces composés.

La première tâche que se sont fixés les biochimistes a été de mettre en évidence la nature chimique exacte de ces composés. La situation se trouve compliquée par le fait que de nombreux composés actifs sont en fait de nature polymérique : un même polymère peut correspondre à plusieurs activités biologiques apparemment indépendantes et correspondant à l'expression de segments spécifiques de la macromolécule. La situation est toute différente de celle rencontrée avec les protéines pour lesquelles la structure est optimisée pour une activité donnée. Ici au contraire, une action biologique peut éventuellement résulter d'une irrégularité structurale difficile à détecter.

En admettant qu'un segment actif soit isolé grâce à des techniques biologiques souvent très élaborées, le problème de la détermination de sa structure se pose de façon pressante. La nature même des unités glucidiques et leur mode de liaison ne permettent pas une mise en oeuvre des méthodes de séquençage chimiques si précieuses pour les peptides. Maloré 1a disponibilité de quelques procédés enzymatiques, la majorité reposent techniques d'analyse des dégradations des sur chimiques et l'analyse de fragments. Bien que ces approches se soient révélées très efficaces, elles sont très longues à mettre en oeuvre, sont destructives pour l'échantillon et ne peuvent pas s'appliquer si de très faibles quantités sont disponibles, ce qui est le plus souvent le cas. De plus, elles permettent pas la plupart du temps une "vision" du composé ne dans les conditions naturelles dans lesquelles son activité s'exprime.

pour but Ce travail a de montrer que des techniques physico-chimiques telles que la Résonance Magnétique Nucléaire permettent de répondre à l'ensemble des questions posées sans la destruction de l'échantillon, et de pousser conduire à l'analyse au-delà des problèmes structuraux vers les problèmes conformationnels pour la définition de relations structureactivité. base de la compréhension du mode d'action de ces composés.

Apports de la RMN

De multiples informations peuvent être extraites d'un spectre de RMN, aussi bien d'un point de vue statique que d'un point de vue dynamique. En effet, grâce à la qualité croissante des techniques d'excitation et d'observation (RMN pulsée, utilisation des méthodes de transformation de Fourier, ...), ainsi que l'amélioration constante des possibilités de résolution des signaux (augmentation des champs magnétiques, ...), l'étude des propriétés magnétiques des noyaux d'un composé fournit maintenant des renseignements de plusieurs types :

- détermination de la structure du produit.

Pour ceci, deux cas peuvent se présenter au départ : soit on connaît sa formule et il ne s'agit que d'une vérification de sa structure (analyse), soit on ne possède que peu de renseignements , et la recherche doit aboutir à la mise en évidence de la nature du produit.

- indications sur la conformation du composé en solution. Ce deuxième aspect demande obligatoirement la connaissance de effet, la première nécessité la structure. En lors de Magnétique Nucléaire l'élucidation par Résonance de la conformation en solution d'un composé est d'assigner totalement le spectre, c'est à dire d'attribuer chaque signal à un atome de la structure.

Ces considérations ne sont évidemment valables que si l'espèce étudiée est suffisamment représentée dans le composé et si sa sensibilité aux champs magnétiques est assez grande. Toutes ces conditions sont heureusement remplies par le proton, c'est pourquoi il constitue le noyau le plus observé par RMN. L'étude présentée ici ne faillira pas à la règle, et l'accent sera mis sur les méthodes utilisant la RMN du proton, efficaces même si seulement de très petites quantités d'échantillon sont disponibles (dans le domaine des milligrammes).

11

Pour les oligosaccharides, deux autres noyaux sont évidemment en quantité importante : le carbone et l'oxygène. Ce dernier ne possédant pas la propriété d'être facilement observable en RMN, seul le carbone accompagnera le proton dans cette étude. De sensibilité et d'abondance isotopique bien moindres, il demandera de plus grandes quantités de produit. Son observation servira néanmoins d'illustration à la théorie des transferts d'aimantation, base de la plupart des expériences.

Dans l'étude des sucres, deux particularités sont observées : Tout d'abord, la RMN du proton des oligosaccharides est compliquée par le fait que la plus grande partie des noyaux observables sont placés dans des environnements très similaires et que peu de dispersion spectrale est attendue pour des raisons de structure (3).

D'autre part (et paradoxalement), le travail est facilité par le fait que chaque unité constitue essentiellement un système de spins isolé, puisque les couplages scalaires ne s'effectuent pas à travers l'atome d'oxygène joignant deux cycles. Ce qui est pour cela un avantage peut être aussi bien vu comme un inconvénient, puisque dans une expérience classique, on ne pourra pas établir directement de lien entre les différentes unités, et il faudra avoir recours à des expériences faisant intervenir d'autres phénomènes que le couplage scalaire.

plupart des études concernant des composés naturels ou La synthétiques doivent être réalisées en solution aqueuse pour simuler autant que possible les conditions naturelles dans lesquelles l'activité biologique de ces composés s'exprime. Jusqu'à présent, toutes les études ont été conduites dans l'eau lourde afin de s'affranchir du signal de l'eau et pour cette les informations majeures ne peuvent être obtenues que raison, des protons non échangeables c'est à dire dans le cas présent, ceux qui sont portés par des atomes de carbone. Les signaux NH... pourtant potentiellement intéressants ne issus des OH, sont pas observables dans ces conditions. Nous verrons que certaines méthodes élaborées permettent toutefois d'extraire de précieuses informations dans l'eau légère.

12

Toutefois, dans les conditions classiques d'observation (solution dans l'eau lourde), les seuls éléments accessibles sont issus des protons non labiles. Il est évident que dans le cas de composés protégés ou d'intermédiaires de synthèse, de nombreuses études sont possibles en solution organique (DMSO, CDCl3...) et permettent l'observation des OH, NH etc... mais nous ne nous intéresserons dans ce travail qu'à des composés pour lesquels seule l'étude en solution aqueuse a un sens.

Paramètres à déterminer dans l'étude d'oligosaccharides

Le cas le plus difficile correspond au scénario suivant :

Après de longues et laborieuses semaines de travail, un oligosaccharide, de préférence biologiquement actif, est isolé par des équipes de biochimistes. Les quantités disponibles, quelques milligrammes par exemple, interdisent au moins la mise partiellement en oeuvre de méthodes d'analyse destructives, et de grands espoirs sont fondés sur une analyse RMN pour, au moins, dégrossir le problème dans la mesure où l'échantillon est totalement récupérable. Il existe très peu de pour lesquels le composé isolé est totalement inconnu, les cas méthodes utilisées pour le séparer et l'isoler étant toujours informatives dans ce sens. Toutefois, il devrait être possible de déterminer une structure a priori sans influences extérieures qui peuvent fausser ou orienter des interprétations se révélant ultérieurement par trop hâtives. Les questions auxquelles on doit pouvoir répondre de façon absolue sont les suivantes :

1°- Quel est l'état de pureté du composé ?

2°- Combien d'unités osidiques entrent dans sa structure ?

3°- Quelle est la nature de ces unités, sans présumer de leur place dans la chaîne oligomérique ? 4°- Quels sont les éventuels substituants présents sur ces diverses unités de base ?

Par exemple, dans le cas des dérivés d'héparine, il est fondamental de savoir si des groupes sulfate , acétyle, etc... sont présents et il est impératif de pouvoir les localiser de façon totalement univoque.

5°- Dans quel ordre ces unités sont-elles enchaînées pour constituer la structure oligosaccharidique ?

6°- Quelle est la nature de la liaison glycosidique qui joint deux unités successives (alpha ou béta) ?

7°- Comment peut on décrire la conformation de chacun des cycles osidiques?

8°- Enfin, si des études de relation structure-conformationactivité sont envisagées, il sera nécessaire de mettre en oeuvre des méthodes permettant d'accéder à la conformation globale de la molécule, c'est à dire pouvoir définir une conformation moyenne analogue aux structures secondaires ou tertiaires des protéines.

Nous allons tenter de montrer que la mise en oeuvre de techniques RMN (essentiellement protonique) peut fournir suffisamment d'informations univoques pour que l'ensemble de ces problèmes soient résolus. Après une rapide exploration des maigres apports de la RMN classique, nous montrerons que des approches plus élaborées permettent de lever successivement toutes les ambiguités et de surmonter toutes les embûches qui pas de se présenter. Enfin, pour contourner ne mangueront certains inconvénients intrinsèques des approches proposées, en particulier en RMN bidimensionelle, des méthodes efficaces et rapides seront proposées et appliquées aux cas présentés dans ce travail.

14

Présentation du plan

Cette étude a donc pour but de décrire différentes expériences en RMN haute résolution, et de montrer leurs applications sur quatre oligosaccharides présentés dans le chapitre IV. D'un objectif au départ purement méthodologique, elle est complétée par des exemples concrets d'intérêt biologique important.

Tout au long de cette étude, deux méthodes d'analyse des expériences de RMN sont mises en parallèle, afin de montrer leur complémentarité (et leurs similitudes); l'appréciation des deux permettra une compréhension plus nette des phénomènes mesurés, comparable à la vision d'un objet sous deux angles différents.

Ainsi dans un premier temps, nous rappellerons très brièvement les principes de la RMN, en utilisant tout d'abord une description classique (chapitre II), puis un formalisme dérivé de mécanique quantique (chapitre II). Ceux-ci nous la permettront par la suite de traiter les séquences de deux manières différentes en utilisant la plus adaptée à chaque cas. Les insuffisances des "anciennes" techniques de RMN seront montrées dans le chapitre IV, alors que le chapitre V servira quelque sorte d'introduction aux méthodes nouvelles en d'investigation par utilisation des couplages scalaires, en traitant des transferts d'aimantation (au sens le plus général du terme) avec les expériences hétéronucléaires ¹³C - ¹H à une dimension. Le chapitre VI présentera les principes généraux des expériences à deux dimensions, avant leur développement dans les chapitres suivants : corrélations simples (chapitre VII), multiples (chapitre QID), et corrélations via les cohérences double quantum (chapitre IX). Ces dernières nous permettront d'introduire et d'expliquer les manipulations effectuées dans l'eau légère au chapitre X; dans cette partie, nous considèrerons aussi les méthodes d'excitations sélectives qui seront utiles pour les expériences de corrélations à une dimension (chapitre XI), permettant d'obtenir des sous-spectres correspondant à des lignes ou colonnes de matrices 2D, mais possédant de nombreux avantages.

Toutes ces expériences nous permettront de déterminer la structure et la conformation de chaque unité.

15

La dernière partie de ce travail concerne les interactions dipolaires (chapitre XII), qui sont destinées à mettre en évidence des proximités entre atomes (chapitre XII), et donc donner des renseignements sur l'enchaînement inter-unité et la conformation en solution des composés.

* * * * *

REFERENCES :

- 1) J. Montreuil : Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **37**, 157 (1980)
- 2) B. Casu : Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 43, 51 (1985)

3)

J. F. G. Vliegenhart, L. Dorland et H. Van Halbeek : Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **41**, 209 (1983) CHAPITRE I

INTRODUCTION A LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE



II-1) Phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire :

Certains noyaux possèdent un moment angulaire associé à un moment magnétique détectable par RMN. En effet, ils constituent des charges électriques en constante rotation (similaires à des boucles de courant) qui se comportent comme des dipôles magnétiques.

Ces dipôles, placés dans un champ magnétique intense Bo, subissent deux forces, puisque à la fois leur moment cinétique P et leur moment magnétique μ interviennent. L'effet résultant est une précession autour de l'axe de Bo (<u>précession de</u> <u>Larmor</u>), où le dipôle forme avec le champ magnétique un angle d'autant plus grand que le champ est faible (figure II-1).







L'énergie d'interaction entre ce dipôle et le champ magnétique est :

 $E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_{0} = -\mu_{z} B_{0}$ or : $E = \frac{dP}{dt} = -\vec{P} \cdot \vec{\omega}_{0}$ d'où : $\vec{P} \cdot \vec{\omega}_{0} = \vec{\mu} \cdot \vec{B}_{0}$ $\omega_{0} = \pm \frac{\mu}{P} B_{0}$

On définit donc un facteur représentatif de chaque noyau :

 $\gamma = \pm \frac{\mu}{p}$

rapport gyromagnétique

ce qui permet d'écrire :

$$\omega_{o} = \gamma B_{o}$$

équation de Larmor

Le rapport gyromagnétique peut être positif ou négatif, ce qui définit le sens de précession des vecteurs magnétisation d'un noyau et leur orientation par rapport au champ Bo. De plus, pour un champ constant, la fréquence de précession des vecteurs est d'autant plus grande que γ est élevé.

La spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire pulsée consiste à envoyer par l'intermédiaire d'un champ radiofréquence B₁ une énergie qui doit être absorbée par ces vecteurs en précession. Ceci peut être visualisé comme un phénomène de résonance, puisque la vitesse de rotation de B₁ doit être égale à ω_0 pour que l'absorption d'énergie ait lieu.

La détection est réalisée dans le plan perpendiculaire à \vec{B}_0 suivant une seule direction (simple détection) ou suivant deux directions orthogonales dans ce même plan (noté xy = plan transverse), simultanément ou alternativement (détection en quadrature, détaillée ultérieurement).

II-2) Quantification du phénomène :

Toutes les équations données par la mécanique classique ne sont applicables que pour des grandeurs macroscopiques,c'est à dire qu'elles concernent les résultantes de phénomènes individuels impossibles à observer séparément.

Pour raisonner sur des vecteurs individuels, il est nécessaire d'avoir recours à la mécanique quantique. Celle-ci indique que le moment cinétique (et donc le moment magnétique) est quantifié. De fait, la composante P_z de \vec{P} dans la direction de \vec{B}_0 ne peut prendre que des valeurs entières ou demi-entières multiples de $\frac{h}{2\pi} = \pi$:

 $P_{z} = m_{1} \hbar$ (et, par suite : $\mu_{z} = m_{1} \gamma \hbar$)

M_I est le nombre quantique de spin et peut prendre (21 + 1) valeurs.

l, spin nucléaire, peut être entier ou demi-entier selon une règle empirique concernant le numéro atomique et le nombre de masse.

<u>Exemple</u>: - spin 1/2 : ${}^{1}H, {}^{13}C, {}^{31}P, {}^{19}F, {}^{15}N, \dots$ - spin 1 : ${}^{2}H, {}^{14}N, \dots$ - spin 3/2 : ${}^{23}Na, \dots$

L'aimantation macroscopique qui en résulte provient d'une distribution inégale des populations dans les différents états de spin, et elle est fonction de la température. Le rapport des populations obéit à la loi de distribution de Boltzmann.

Etudions plus en détail le cas de noyaux de spin 1/2 (seul cas développé dans cette étude) : μ_{τ} ne peut prendre que deux valeurs distinctes qui sont :



A l'équilibre, le système est donc constitué de deux états d'énergie :

spins parallèles spins antiparallèles $m = \frac{1}{m}$

m_ = —	m_ =
¹ 2	¹ 2
état œ	état β
N _a spins	N _e spins

Les niveaux α et β ne sont pas dégénérés et selon la loi de distribution de Boltzmann la valeur du rapport des populations est :

 $\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{-\frac{E_{\alpha} - E_{\beta}}{kT}}$ T : température (Kelvin) k : facteur de Boltzmann $E_{\alpha}, E_{\beta} : énergies des états \alpha et \beta$

Puisque l'énergie d'interaction avec B_o est :

 $E_{\alpha} = -\mu_z B_o = -m_I \gamma \hbar B_o$

alors : $E_{\alpha} - E_{\beta} = -\gamma \pi B_{0}$

$$N_{a} = e^{kT}$$

$$N_{b}$$

$$N_{b}$$

$$N_{b}$$

$$N_{b}$$

$$N_{b}$$

soit :

$$(N = N_{\alpha} + N_{\beta})$$

L'écart entre les deux populations dépend donc du rapport gyromagnétique du noyau, de l'intensité du champ B_0 et de la température. Pour augmenter cette différence de population, on pourra, soit augmenter le champ, soit diminuer la température. Il convient aussi de remarquer que pour un rapport gyromagnétique positif, il y aura plus de dipôles orientés parallèlement au champ que de dipôles antiparallèles.





FIGURE I-3

Populations de spins nucléaires soumis à un champ B0 en l'absence de tout autre champ.

Il n'existe aucune cohérence de phase pour les spins à l'équilibre, c'est à dire que la projection sur le plan transverse xy de la résultante de tous les vecteurs spins nucléaires est nulle. La résultante de ces vecteurs peut être décrite par :



FIGURE I-4 : Représentation par vecteurs d'Heisenberg

L'excès de population sur un des deux niveaux et la noncohérence de phase pour les spins implique que le vecteur résultant est aligné selon l'axe z.

II-3) Concepts généraux :

I-3-1) Impulsion :

Lorsque l'on envoie le champ radio-fréquence B_1 pendant un temps extrêmement court ("pulse"), l'équilibre est rompu, car les populations des deux niveaux changent, certains spins passant de l'état α à l'état β .





FIGURE I-5

Représentation des populations de spins nucléaires (et description par vecteurs d'Heisenberg) après impulsion radiofréquence 81.

C'est le temps d'application de l'impulsion (de puissance fixe) qui détermine l'ampleur du déséquilibre créé, et donc l'orientation du vecteur aimantation résultant qui en découle. Après une telle perturbation, deux phénomènes entrent en jeu pour chaque noyau :

- les populations vont retrouver leur proportion initiale, par l'intermédiaire des phénomènes de relaxation. Ceux-ci sont régis par deux paramètres, le temps de relaxation longitudinal T_i et le temps de relaxation transverse T_2 dont nous parlerons plus tard.

- chaque vecteur magnétisation va continuer à précesser autour

de B_0 dès que B_1 aura disparu avec sa fréquence de Larmor propre, mais cette fois sa précession sera détectable, puisque la composante de l'aimantation dans le plan tranverse est non nulle.



FIGURE I-6

Précession et retour à l'équilibre de l'aimantation après perturbation par un pulse radiofréquence.

II-3-2) Concept de phase :

Considérons le vecteur magnétisation transverse M_{xy} tournant autour de l'axe z avec la vitesse angulaire ω . Si M_{xy} est orienté selon l'axe x au temps t = 0, sa rotation peut être décrite par les expressions :

$$\begin{cases} M_{x} = M_{xy} \cos \omega t \\ M_{y} = M_{xy} \sin \omega t \end{cases}$$

où, à tout instant, M_x et M_y sont les composantes de la magnétisation selon les axes x et y.

Remarquons que M_y peut être écrit : $M_y = M_{xy} \cos(\omega t - \Phi)$ où Φ (qui est dans ce cas égal à $\frac{\pi}{2}$ rad) est appelé l'<u>angle de</u> <u>phase</u>. M_x et M_y correspondent aux termes réels et imaginaires de la fonction décrivant la rotation des vecteurs.

II-3-3) Notion de référentiel tournant :

Dans le référentiel fixe le champ Bi* tourne dans le plan xy à la fréquence de Larmor ν_0 . Afin de simplifier les raisonnements, il est plus simple d'utiliser un nouveau référentiel x'y'z, où x' et y' sont des axes orthogonaux tournant (autour de Oz) à la fréquence ν_0 . Dans ce référentiel tournant, le champ Bi est stationnaire, et, de la même manière, les moments magnétiques précessant à la fréquence ν_0 sont fixes. Ceci revient à ignorer complètement l'existence du champ Bo et à se débarrasser de ses effets.

On parlera ainsi par exemple de pulse 90[°]_x, qui signifiera égalisation des populations de spins créée par un champ de phase x dans le référentiel tournant.

II-3-4) Déplacement chimique et couplage :

A) <u>Déplacement chimique</u> :

Si les fréquences de transitions pour chaque noyau répondaient exactement à la condition de Larmor, la Résonance Magnétique Nucléaire n'apporterait que de faibles renseignements. En fait, le champ effectif que subit un noyau dépend des électrons appartenant aux noyaux voisins, et on lui associe une constante d'écran σ :

 $\underline{n} o \underline{y} a \underline{u} \underline{i} : B_i = B_o (1 - \sigma_i)$

d'où :
$$v_i = \left| \frac{\gamma_i}{2\pi} \right| B_0(1 - \sigma_i).$$

Ainsi, des vecteurs spins nucléaires, même d'espèce identique, peuvent précesser à des fréquences différentes caractéristiques de leur environnement. La position effective de résonance par rapport à une référence permet de définir le déplacement chimique 8 :

$$\delta_i = (\sigma_{rid} - \sigma_i).10^6$$
 parties par million

$$\delta_{i} = \frac{v_{ref} - v_{i}}{v_{0}} \cdot 10^{6} \text{ ppm}$$

B) <u>Couplage scalaire</u> ;

(Noté aussi couplage indirect par opposition au couplage direct – beaucoup plus fort – à travers l'espace, mais ne se manifestant pas sur les spectres de substances liquides isotropes. Cf. chapitre sur le NOE.)

La structure multiple observée au niveau d'un type de noyau provient de l'interaction des spins nucléaires par l'intermédiaire des liaisons. Cette interaction se produit par la polarisation des spins électroniques par les spins nucléaires et par le mouvement des électrons de valence. Ce phénomène intramoléculaire à travers les liaisons explique que la constante de couplage observée sur le spectre ne dépend pas de la valeur de Bo. Le résultat net est que les spins nucléaires se transmettent une information mutuelle sur leurs états de spins.

<u>Couplage_dans un_système_à_deux spins :</u>

Considérons un système à deux spins 1/2 couplés faiblement $\left(\frac{\Delta \nu}{J} > 10\right)$.

Sans couplage, le diagramme d'énergie correspondant à un tel système est représenté sur la figure II-7.

Si on suppose que J > 0 (on pourrait faire une analyse identique avec J < 0), on peut montrer que les niveaux à spins parallèles (niveaux $\alpha\alpha$ et $\beta\beta$) ont leurs énergies augmentées de $\frac{J}{4}$ et que les niveaux à spins antiparallèles ont leurs énergies abaissées de $\frac{J}{4}$. Ce serait l'inverse avec J < 0, mais le spectre obtenu serait le même (figure II-8).





FIGURE I-7



FIGURE I-8

Il y a <u>dégénérescence</u> des états d'énergie du système.

Du point de vue vectoriel, chaque vecteur spin nucléaire (précessant à la fréquence ν) est séparé en deux composantes qui tournent à des fréquences $\nu + \frac{J}{2}$ et $\nu - \frac{J}{2}$ (soit en vitesses angulaires : $\omega + \pi J$ et $\omega - \pi J$) :



FIGURE I-9

Séparation des composantes d'un vecteur spin nucléaire due au couplage avec un autre noyau (on se place dans le référentiel tournant à la fréquence v).

Au bout d'un temps t = $\frac{1}{2J}$, il y a refocalisation, c'est à dire que les deux vecteurs se retrouvent au même endroit. On comprend donc que l'effet de précession par couplage apparaît comme une fonction sinusoïdale pour un détecteur placé dans le plan transverse :



FIGURE I-10

+ couplage = J

 \Box couplage = J/2
I-3-5) Phénomènes de relaxation :

Ces phénomènes ne sont décrits ici que brièvement afin de montrer leurs effets dans les expériences de R.M.N. pulsée.

Chaque particule (noyau ou électron), entourée d'un grand nombre d'autres particules en mouvement et ayant leur propre fréquence de Larmor, perçoit un champ effectif modulé par une composante aléatoire et fluctuante appelée "le bruit magnétique". Celle-ci contient une proportion plus ou moins grande d'éléments à la fréquence du noyau considéré, qui permettent d'induire des transitions et de rétablir l'équilibre de Boltzmann.

<u>Relaxation_transversale</u> : (T₂)

Elle régit la décroissance de la composante transverse de l'aimantation, donc du signal mesuré au cours du temps. Elle est influencée par de nombreux phénomènes : - la première contribution (la plus importante) est due à des interactions directes entre spins (flip-flop) ; c'est pourquoi T2 est aussi appelée relaxation spin-spin. Lors du processus de flip-flop, deux spins de nombre quantique différent s'échangent (figure II-11).





31

FIGURE I-11

Il n'y a cependant aucune cohérence de phase entre les directions initiales et finales de l'un ou l'autre spin. Cela conduit donc à un déphasage de la magnétisation dans le plan transverse M_{xy} (mais aucunement à une variation de l'aimantation longitudinale M_{z} , puisque les populations des niveaux ne sont pas modifiées).

- Une autre contribution à T_2 est l'inhomogénéité du champ B_0 . En effet, ce paramètre entraîne une disparité au niveau des spins précessant après impulsion, et donc une diminution de M_{xy} résultante par rapport au cas idéal où B_0 est tout à fait constant.

<u>Relaxation_longitudinale_T1</u> : (spin-réseau)

Elle régit le retour à l'équilibre de l'aimantation longitudinale après une perturbation, et est provoquée par une évacuation de l'excès d'énergie par interaction avec l'environnement.



<u>FIGURE II-12</u> Mécanisme de relaxation spin⁻réseau.

Lors de ce processus, il n'y a là encore pas conservation de la phase entre les positions de départ et d'arrivée, ce qui implique que T1 contribue également à diminuer l'aimantation transverse M_{xy} .

Ainsi, on comprend que T₁ ne peut pas être plus court que T₂, et que la relaxation longitudinale apparait comme une des composantes de la relaxation transverse. Pour la RMN haute résolution sur des liquides, il n'y a pas de processus de relaxation spécifique à T₂, donc T₁ = T₂, à condition que Bo soit parfaitement homogène.

I-4) Détection :

II-4-1) Principe :

Le schéma classique de la réception est le suivant : Le signal est détecté au moyen d'une (ou plusieurs) bobine et apparait sous forme de force électromotrice qui est amplifiée ensuite et démodulée par la fréquence de la porteuse. Un filtre passe-bas est alors appliqué pour éliminer les composantes précessant à des fréquences trop éloignées, ce qui impliquerait des contraintes d'échantillonnage trop sévères. En effet, le signal analogique (continu) est converti en signal digital (discret), automatiquement échantillonné en fonction du théorème de Nyquist. Ce théorème énonce que pour représenter correctement une fonction sinusoïdale, il faut l'échantillonner (relever ses valeurs) au moins deux fois par période. Ainsi, toute raie située à une fréquence v_i par rapport à la porteuse (ν_0) ne pourra être correctement définie en position et en phase que si elle est digitalisée au moins deux fois par période, soit par intervalles de temps de $\frac{2}{|v_i - v_0|}$ maximum. Dans le cas contraire, elle apparaitrait à une fréquence de repliement (calculable), avec une phase non línéaire par rapport aux raies correctes.

En raison des phénomènes décrits précédemment (précession de Larmor et relaxation) qui agissent sur les vecteurs magnétisations transverses, le signal récupéré par le détecteur ("Free Induction Decay" = FID) aura pour forme :

<u>Spin_isolé</u> :

- résonnant exactement à la fréquence nominale v_0 du pulse : La précession apparente du vecteur dans le référentiel tournant est nulle et l'évolution du signal est due uniquement à la relaxation transverse :



- résonnant à une fréquence v_i différente de v_o :

FREE INDUCTION DECAY



-34

FIGURE II-14

Système multispin :

Si le pulse couvre une gamme de fréquence assez large (celle-ci est égale à $\frac{2}{t_p}$ Hz, où t_p est la durée du pulse), tous les noyaux d'une même espèce sont excités :





II-4-2) Modes de détection :

a) Détection simple :

Si la fréquence de la porteuse est comprise dans la gamme de fréquence des noyaux irradiés, la détection simple ne permet pas de différencier les vecteurs précessant à $(v_0 - v_i)$ et à $(v_0 + v_i)$, soit, après démodulation, $-v_i$ et v_i .

Exemple :

Détection unique selon l'axe x (seule la composante en x des vecteurs est détectée) :



MEME FID POUR LES DEUX VECTEURS

FIGURE I-16

Ainsi, après transformation de Fourier du FID, pour un noyau précessant à ν_A , on récupère un spectre erroné contenant en plus un signal image symétrique de ν_A par rapport à ν_o (rappelons que la transformée de Fourier d'une fonction réelle est une fonction paire).



FIGURE I-17

Exemple de signaux obtenus par détection simple quand le spectre est situé de part et d'autre de la porteuse. Traits pleins : pics normaux pointillés : pics images

Pour s'affranchir de ce problème, il est nécessaire que tous les vecteurs précessent plus vite (ou moins vite) que le référentiel, c'est à dire que l'impulsion soit placée à l'une ou l'autre extrémité du spectre.





FIGURE I-18

Suppression des pics images en déplaçant la porteuse à une extrémité du spectre.

Ce mode de détection présente toutefois de nombreux inconvénients :

- l'impulsion doit couvrir deux fois la gamme spectrale, ce qui peut poser des problèmes pour disposer d'une puissance suffisante au niveau de l'émetteur.
- le bruit de la partie gauche est contenue dans le FID, ce qui entraîne une diminution du rapport signal/bruit (S/N)
- le détecteur doit échantillonner le FID à une fréquence deux fois supérieure à celle qui serait suffisante si l'impulsion était au centre du spectre.

b) Détection en quadrature :

Cette technique revient à considérer deux détecteurs orthogonaux collectant l'information spectrale simultanément, réalisant la réception des points réels et des points imaginaires du FID. Ainsi la transformation de Fourier d'une telle fonction complexe fournira le spectre de part et d'autre de ν_0 :



FIGURE I-19

Détection en quadrature.

Dans le système NICOLET, les valeurs réelles et les valeurs imaginaires sont stockées respectivement dans la première et dans la seconde moitié des fichiers.

Une autre solution, employée par BRUKER, revient à décaler une fois sur deux la phase du récepteur et à échantillonner successivement les deux canaux, les points impairs correspondant au canal A (réel), les points pairs au canal B (imaginaire).

Avantages de la détection en quadrature :

- Le rapport S/N est multiplié par √2 (donc le gain de temps est de 2) puisqu'il n'y a pas repliement du bruit comme en détection simple, et qu'il y a non-cohérence du bruit dans les deux canaux.
 - Répartition plus uniforme et optimisation de la puissance du pulse.
- L'échantillonnage s'effectue à une fréquence deux fois moindre qu'en détection simple, puisque la gamme à couvrir, de l'offset (fréquence de la porteuse) au pic le plus éloigné est divisée par 2.

La détection en quadrature peut toutefois générer des anomalies dues à des petites variations des caractéristiques des canaux d'échantillonnage;

38

- inéquivalence de gain des deux canaux :

La non-compensation des différences de sensibilité des deux canaux peut entraîner l'apparition de petits pics images parasites :



FIGURE I-20

Problème d'inéquivalence de gain pour les deux canaux de réception de la quadrature.

Un simple système à deux phases (0 et 90°) pour le récepteur diminue d'un facteur 2 l'erreur d'amplitude due à cette différence de gain.

non orthogonalité des récepteurs :(ou décalage de phase non parfait)

Ceci peut entraîner là encore l'apparition de pics parasites :



FIGURE I-21

Problème de non-orthogonalité des deux détecteurs faussant la Guadrature.

Pour éliminer ce problème, une alternance (0-180°) de la phase du pulse et des récepteurs est utilisable :







FIGURE I-22

Corrections du problème de non-orthogonalité.

Gain d'un facteur 2.

Ainsi un cyclage utilisant les quatre phases (0,90,180 et 270°) permet de diminuer les erreurs dues au gain et à la non-orthogonalité des détecteurs par un facteur 8. Ce système est le système CYCLOPS :

pulse	récepteur			
×	+A	+B		
У	-B	+A		
-×	-A	-в		
-у	+B	-A		



- R. K. Harris :
 "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy "
 Pitman Publishing (1983)
- R. R. Ernst, G. Bodenhausen et A. Wokaun : " Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions " Clarendon Press - Oxford (1987)
- E. Fukushima, S. B. W. Roeder :
 "Experimental Pulse NMR "
 Addison Wesley Publishing Company, Inc. (1981)
- D. Shaw :
 "Fourier Transform N.M.R. Spectroscopy "
 Elsevier Science Publisher B.V. (1984)



FORMALISME QUANTIQUE

CHAPITRE I



I−1) Introduction :

Ce chapitre peut sembler de prime abord hermétique à n'est pas familiarisé avec la mécanique quantique et les qui calculs d'opérateurs. Cette voie est néanmoins nécessaire pour comprendre et représenter correctement les effets des séquences de pulses sur des systèmes de spins, dans quelque condition que Ce soit. En effet, la mécanique classique, fondée sur une interprétation de phénomènes macroscopiques, ne permet pas de décrire tous les évènements produits sur des spins individuels. Par exemple, si l'on peut représenter l'action d'un pulse 90° un vecteur magnétisation, qu'il soit aligné selon z sur (correspondant à une différence de population), ou dans le plan (correspondant à une excitation) par un schéma classique, xy ceci devient impossible dès lors qu'il s'agit d'une transition multíple quantum (reliant les états 🚓 et ßß d'un système à deux spins par exemple). De la même manière, la description des effets d'un pulse différent de 90° ou 180° sur la forme et l'intensité des raies d'un multiplet deviendrait très complexe par cette méthode.

Explicitons très succinctement le formalisme qui va suivre : Si l'on mesure une grandeur physique \mathfrak{B} , un état de ce système est décrit par un vecteur appelé ket $|\varphi\rangle$ (son vecteur conjugué est (φ | nommé bra). Il se modifie par l'action d'un opérateur B qui transforme ce vecteur en un autre vecteur $|\varphi'\rangle$ par la transformation $\mathfrak{B}|\varphi\rangle = |\varphi'\rangle$.

L'évolution avec le temps d'un système macroscopique (dont on ne peut donner avec certitude la position et le mouvement de chaque élément) est décrite par l'action d'un Hamiltonien. Ce dernier est un opérateur qui intervient par l'équation de Schrödinger sur un vecteur représentatif aussi précis que possible de la distribution du système, nommé fonction d'onde.

Ce chapitre a été inspiré des travaux de M. Goldman (1) et de O. W. Sørensen (2).

45

II-2) Matrice densité :

Considérons par exemple un système formé de N spins 1/2. Selon les règles de la mécanique quantique, un état de ce système caractérisant les propriétés de chacun de ces N spins doit comporter des vecteurs de la forme : $|\varepsilon_1, \varepsilon_2, ..., \varepsilon_N\rangle$ où chaque ε_i peut être + ou - (+1/2 ou -1/2 pour le nombre quantique de spin).

Le nombre de composants, donc la dimension de la base, est ainsi énorme, et il est impensable de manier un tel espace, voire même d'arriver à connaître les vecteurs individuels, puisque de toute façon le principe d'incertitude d'Heisenberg et le fondement même de la mécanique quantique (" l'observation perturbe la mesure ") interdisent d'envisager une méthode d'observation précise d'un tel système microscopique.

On utilise alors une approche statistique dans laquelle on ne précise que la distribution des probabilités qu'un spin donné soit dans un état quelconque du système. Cette démarche est analogue à ce qui se fait en mécanique et thermodynamique statistique, et elle est justifiée par le fait que, pour la plupart des grandeurs macroscopiques, la fluctuation statistique autour de leur valeur moyenne est très faible.

Dans un état $|\psi\rangle$ bien déterminé, la moyenne d'une grandeur physique β d'opérateur B est égale à $\langle \psi | B | \psi \rangle$. Pour un ensemble statistique de kets distribués selon la loi de probabilités $\mathfrak{P}(\psi)$, cette moyenne devient :

$$(B) = \int \mathcal{P}(\phi) \langle \phi | B | \phi \rangle d\tau$$
 [1]

(puisque
$$\sum_{i} |i\rangle \langle i| = 1 th - de clôture$$
)

$$= \sum_{i,j} \langle i|B|j \rangle \int \mathcal{P}(\psi) \langle \psi|i \rangle \langle j|\psi \rangle d\tau \qquad [3]$$

On définit un opérateur σ tel que :

46

$$\sigma = \int \mathcal{P}(\psi) |\psi\rangle \langle \psi| d\tau \qquad [4]$$

qui est l'<u>opérateur densité</u>.

Ainsi l'équation [3] devient :

$$(B) = \sum_{i,j} (i|B|j) (j|\sigma|i)$$
[5]

(B) = Trace (B
$$\sigma$$
) [6]

Toute l'information statistique sur le système est contenue dans l'opérateur σ , puisque l'on peut obtenir non seulement la valeur moyenne de la grandeur B mais aussi la distribution de probabilité de ses valeurs possibles.

II-3) Equation d'évolution de l'opérateur densité :

En considérant l'Hamiltonien dont les valeurs propres sont des fréquences, l'équation de Schrödinger s'écrit alors :

$$\frac{d|\psi\rangle}{dt} = |\dot{\psi}\rangle = -i\Re|\psi\rangle \qquad [7]$$

et, pour le bra conjugué :

$$\frac{d\langle \psi|}{dt} = \langle \psi| = i \langle \psi| \Re$$
[8]

donc,
$$\frac{d}{dt}|\psi\rangle\langle\psi| = |\dot{\psi}\rangle\langle\psi| + |\psi\rangle\langle\dot{\psi}|$$
$$= -i\Re|\psi\rangle\langle\psi| + i|\psi\rangle\langle\psi|\Re$$
$$= -i[\Re, |\psi\rangle\langle\psi|]$$
[9]

$$\frac{d\sigma}{dt} = \frac{\int \mathcal{P}(\psi) |\psi\rangle \langle \psi| \ d\tau}{dt}$$
$$= \int \mathcal{P}(\psi) (-i [\mathcal{R}, |\psi\rangle \langle \psi|]) d\tau$$

$$\sigma(t) = -i [\mathcal{X}, \sigma(t)]$$
Equation de Liouville-Von Neumann

L'Hamiltonien inclut les termes de déplacement chimique, de couplage, et d'interaction avec des champs radiofréquences dépendant du temps. Il peut être rendu indépendant du temps dans un intervalle fini si l'on choisit un repère mobile adéquat.

On pourra alors écrire :

 $\sigma(t) = e^{-iHt} \sigma(0) e^{iHt}$ et donc $\sigma(t+t_1+t_2) = e^{iH_2t_2}e^{-iH_1t_1} \sigma(t) e^{iH_1t_1}e^{iH_2t_2}$ [11]

(Rappelons que ces équations sont valables uniquement si H, H1, H2 sont indépendants du temps.)

On a ainsi décomposé l'évolution de l'Hamiltonien principal dans le temps en transformations unitaires, caractérisées par des propagateurs e^{iHktk}, dans lesquels les Hamiltoniens Hk sont invariables :

$$\sigma(t) \longrightarrow \sigma(t+t_1) \longrightarrow \sigma(t+t_1+t_2)$$

Ayant l'évolution de l'opérateur densité dans le temps, les composantes M_x et M_y de la magnétisation observable seront obtenues à partir des relations de trace (cf. équation [6]) :

$$\begin{cases} \langle M_{x}(t) \rangle = Trace(M_{x}(t).\sigma(t)) = N\gamma \pi.Trace(F_{x}\sigma(t)) \\ \langle M_{y}(t) \rangle = Trace(M_{y}(t).\sigma(t)) = N\gamma \pi.Trace(F_{y}\sigma(t)) \end{cases}$$

où N = nombre de noyaux par unité de volume, et

$$F_{x} = \sum_{k} I_{kx}, F_{y} = \sum_{k} I_{ky},$$

en sommant sur tous les spins kd'un isotope particulier (${}^{13}C$, ${}^{1}H$, ...).

 ${\rm F_{\times}}$ et ${\rm F_{y}}$ sont des opérateurs observables indépendants du temps, donc d'après l'équation [11] :

$$\langle M_x(t) \rangle = N_x \pi.Trace(F_x e^{-iHt}\sigma(0) e^{iHt})$$

= $N_x \pi.Trace(e^{-iHt}F_x e^{iHt}\sigma(0))$
= $N_x \pi.Trace(F_x(t)\sigma(0))$

[12]

On a ainsi rendu l'opérateur dépendant du temps, ce qui permet de retrouver la représentation d'Heisenberg, où, par analogie avec l'équation [11], l'évolution est décrite par :

$$F_{x}(t+t1+t2) = e^{iH_{1}t_{1}}e^{iH_{2}t_{2}}F_{x}e^{-iH_{1}t_{1}}e^{-iH_{2}t_{2}}$$
[13]

II-4) Formalisme des opérateurs produits :

Pour résoudre les équations [11] et [13], on doit exprimer l'opérateur densité comme une combinaison linéaire d'opérateurs de base B_{_} :

$$\sigma(t) = \sum_{s} b_{s}(t)B_{s}$$
$$B_{s} = 2^{(q-1)} \prod_{k=1}^{N} (I_{ku})^{a_{sk}}$$

οù

u = x ou y ou z ; k : index du noyau (pour les différencier) N = nombre total de noyaux dans le système de spins a_{sk} = 1 pour noyau q et a_{sk} = 0 pour les N - q restants q = nombre d'opérateurs à 1 spin dans l'opérateur produit.

Un système à N spins est décrit par 4^N opérateurs produits.

 $\underline{E} \times \underline{emple}$: recensement des 16 opérateurs produits B_s pour un système à 2 spins.

 $q = 0 : \frac{1}{2}$

 $q = 1 : I_{1\times}, I_{1y}, I_{1z}, I_{2\times}, I_{2y}, I_{2z}$

 $q = 2 : 2I_{1\times}I_{2\times}, 2I_{1\times}I_{2\vee}, 2I_{1\times}I_{2\times}, 2I_{1\vee}I_{2\vee}, 2I_{2\vee}I_{2\vee}, 2I_{2\vee}I_{2$

Opérateurs_à_1_spin :

(Ikz	:	magnétisation	longitudina	ale d	du spin	I	
Ikx	:	magnétisation	transverse	(en	phase)	sêlon	х
	:	magnétisation	transverse	(en	phase)	selon	У







FIGURE 1-1

Représentation des opérateurs à un spin par les vecteurs d'Heisenberg et populations (pour z) ou transitions (x ou y) correspondantes.

<u>Cohérences_à_2_spins</u> :

 $2I_{kz}I_{1z}$: magnétisation longitudinale d'ordre 2 $2I_{kx}I_{1z}$: magnétisation transverse x de I_k en antiphase par rapport à I_1 . $2I_{ky}I_{1z}$: magnétisation transverse y de I_k en antiphase par rapport à I_1 .

 $2I_{kx}I_{1x}$, $2I_{ky}I_{1y}$, $2I_{kx}I_{1y}$, $2I_{ky}I_{1x}$: opérateurs formant les cohérences à 0 et 2 quanta.







20
$$2(I_{kx}I_{1x} - I_{ky}I_{1y})$$
:

NON REPRESENTABLE PAR VECTEURS D'HEISENBERG





NON REPRESENTABLE PAR VECTEURS D'HEISENBERG



FIGURE 1-2

Exemples d'opérateurs à deux spins (représentation d'Heisenberg et diagrammes d'énergies).

Dans un système à 3 spins, on aura aussi :

<u>Opérateurs à trois spins</u> :

4I_{k×}I_{1z}I_{mz} : magnétisation transverse x en antiphase par rapport à I₁ et à I_m. 4I_{k×}I_{1×}I_{mz} : cohérence 2 spins en antiphase par rapport à I_m. 4I_{kz}I_{1z}I_{mz} : magnétisation longitudinale d'ordre 3. 4I_{k×}I_{1×}I_{m×} : cohérence à 3 spins.



FIGURE 1-3

Diagrammes d'énergie sur lesquels sont représentées les transitions correspondant aux multiplets l_{kx} , $2l_{kx}l_{z}$ et $4l_{kx}l_{z}l_{mz}$ (tous de fréquence ω_{μ}).

52

La cohérence à 2 spins en antiphase comprend des transitions à 0 et 2 quanta (notées 0Q et 2Q) avec des multiplets de composantes en opposition de phase dépendant de la polarisation I_{m_z} du spin "passif" I_m .

Remarque : on parle de "magnétisation" uniquement pour les transitions à 1Q observables, et de "cohérence" pour la magnétisation transverse et pour la cohérence multiple quantum.

Les effets de précession libre et des pulses radiofréquence sont donc décrits par des séquences de transformations du type :

e^{-iΦB}r.B_s.e^{iΦB}r

où $\phi B_r = (\Omega_k \tau) I_{kx}$ pour précession par déplacement chimique, $\phi B_r = (\pi J_{k\ell}) 2 I_{kx} I_{\ell x}$ pour évolution par couplage, $\phi B_r = \beta I_{ku}$ pour pulse radiofréquence d'angle β selon l'axe u

Les phases relatives des différents pics d'un signal peuvent être retrouvées à partir des opérateurs produits. On utilise pour cela (par exemple) une procédure dans laquelle on définit un paramètre a_i;

 $a_{ij} = \frac{\gamma_i \gamma_j J_{ij}}{|\gamma_i| |\gamma_j| |J_{ij}|} (\text{donc égal à 1 ou -1})$

J_{ij} : couplage entre i et j Υ_i,γ_j : rapports gyromagnétiques

Lorsqu'un spectre est "multíplié" par ce paramètre, cela signifie que les phases de toutes les raies sont :

- changées de 180° quand $a_{ij} = -1$ - inchangées quand $a_{ij} = 1$.



 $J_{12} > J_{13}$

FIGURE II-4 Construction du multiplet $4/_{1x}/_{2x}/_{3x}$ (détecteur supposé sur x).

II-5) Evolution des opérateurs produits :

Rappelons la formule de l'Hamiltonien dynamique de 2 spins 1/2 faiblement couplés non perturbés, lorsque l'on néglige les phénomènes de relaxation :

$$\mathfrak{X} = \sum_{k} \Omega_{k} I_{kz} + \sum_{k < 1} 2\pi J_{k1} I_{kz} I_{1z}$$

$$\mathcal{H} = \sum_{k} \Omega_{k}(I_{kz}) + \sum_{k \leq 1} \pi J_{k1}(2I_{kz}I_{1z})$$

que l'on peut réécrire en termes d'opérateurs produits B_s. Les termes de cette équation commutent, donc l'évolution causée par les termes individuels de l'Hamiltonien imperturbé peuvent être traités séparément en ordre arbitraire. Ainsi on peut traiter les problèmes (les séquences complètes) en "cascades" de termes de déplacements chimiques et de "cascades" de termes de couplages, par analogie aux cascades de pulses.

II-5-1) <u>Déplacements chimiques</u> : (pendant une durée τ)

- <u>sur opérateurs à 1 spin</u> :

$$I_{k\times} \xrightarrow{\Omega_{k}\tau \ I_{kz}} I_{k\times}^{\text{COS}(\Omega_{k}\tau)} + I_{ky}^{\text{Sin}(\Omega_{k}\tau)}$$

$$I_{ky} \xrightarrow{\Omega_{k}\tau \ I_{kz}} I_{ky}^{\text{COS}(\Omega_{k}\tau)} - I_{k\times}^{\text{Sin}(\Omega_{k}\tau)}$$

$$I_{kz} \xrightarrow{\Omega_{k}\tau \ I_{kz}} I_{kz}$$

- <u>opérateurs_à_2_spins</u> :

magnétisation en antiphase :

$$\begin{pmatrix} 2I_{kx}I_{1z} & \xrightarrow{\Omega_{k}\tau \ I_{kz}} \\ 2I_{ky}I_{1z} & \xrightarrow{\overline{\Omega_{k}\tau \ I_{kz}}} 2I_{kx}I_{1z}\cos(\Omega_{k}\tau) + 2I_{ky}I_{1z}\sin(\Omega_{k}\tau) \\ \\ 2I_{ky}I_{1z} & \xrightarrow{\overline{\Omega_{k}\tau \ I_{kz}}} 2I_{ky}I_{1z}\cos(\Omega_{k}\tau) - 2I_{kx}I_{1z}\sin(\Omega_{k}\tau) \end{pmatrix}$$

cohérence à 2 spins :

$$\left\{ \begin{aligned} 2I_{k\times I_{1,x}} & \xrightarrow{\Omega_{k} \tau \ I_{k,z}} \Omega_{n} \tau \ I_{1,z} \\ & 2(I_{k\times cos}(\Omega_{k}\tau) + I_{k,y}sin(\Omega_{k}\tau))(I_{1,x}cos(\Omega_{1}\tau) + I_{1,y}sin(\Omega_{1}\tau)) \\ \\ 2I_{k,y}I_{1,y} & \xrightarrow{\Omega_{k} \tau \ I_{k,z}} \Omega_{1}\tau \ I_{1,z} \\ & 2(I_{k,y}cos(\Omega_{k}\tau) - I_{k,x}sin(\Omega_{k}\tau))(I_{1,y}cos(\Omega_{1}\tau) - I_{1,x}sin(\Omega_{1}\tau)) \\ \\ & 2I_{k,x}I_{1,y} & \xrightarrow{\Omega_{k} \tau \ I_{k,z}} \Omega_{1}\tau \ I_{1,z} \\ & 2(I_{k,x}cos(\Omega_{k}\tau) + I_{k,y}sin(\Omega_{k}\tau))(I_{1,y}cos(\Omega_{1}\tau) - I_{1,x}sin(\Omega_{1}\tau)) \\ \end{aligned}$$

Remarque :

$$2I_{k\times I_{1\times}} = \frac{1}{2} \{2(I_{k\times I_{1\times}} - I_{ky}I_{1y}) + 2(I_{k\times I_{1\times}} + I_{ky}I_{1y})\}$$

donc ,

$$2I_{k\times I_{1\times}} \xrightarrow{\Omega_{1} \tau \ I_{1\times}} \xrightarrow{\Omega_{1} \tau \ I_{1\times}} \underbrace{(I_{k\times}I_{1\times} - I_{k}_{1}I_{1\times})}_{(I_{k\times}I_{1}} \underbrace{(I_{k\times}I_{1\times} + I_{k}_{1}I_{1\times})}_{(I_{k\times}I_{1\times} + I_{k}_{1}I_{1\times})} \underbrace{(I_{k}_{k}I_{1\times} + I_{k}_{1}I_{1\times})}_{(I_{k\times}I_{1\times} - I_{k}_{1}I_{1\times})} \underbrace{(I_{k}_{k}I_{1}}_{(I_{k}\times I_{1})} \underbrace{(I_{k}_{k}I_{1})}_{(I_{k}\times I_{1})} \underbrace{(I_{k})}_{(I_{k}\times I_{1})} \underbrace{(I_{k})}_{(I$$

des A ceux possédant une différence de zéro quantum. Les cohérences par les sont décrites convenablement fréquences e D SOMMe intervenir une cohérences peuvent être quantum, sab Aes .. faisant - I double ц В sont quan tum + H termes opérateurs cohérences fréquence double s a T

$$I^{+} = I_{x} + iI_{y}$$

$$I^{-} = I_{x} - iI_{y}$$

$$I^{-} = I_{x} - iI_{y}$$

$$I^{-} = -i \frac{1}{2}(I^{+} - I^{-})$$

... (précession) N Opérateurs de rotation autour de l'axe

$$I + \frac{\Phi I}{\Phi I} = e^{-\frac{1}{2}\Phi I} + I$$

II-5-2) Couplages spin-spin : (pendant une durée τ)

$$= \underbrace{\operatorname{sur} \operatorname{opérateurs}}_{I_{kx}} \xrightarrow{\pi J_{k1}\tau \cdot 2I_{kz}I_{1z}}_{I_{kx}} \xrightarrow{\pi J_{k1}\tau \cdot 2I_{kz}I_{1z}}_{I_{kx}} \xrightarrow{I_{kx}\cos(\pi J_{k1}\tau) + 2I_{ky}I_{1z}\sin(\pi J_{k1}\tau)}_{I_{ky}} \xrightarrow{\pi J_{k1}\tau \cdot 2I_{kz}I_{1z}}_{I_{ky}\cos(\pi J_{k1}\tau) - 2I_{kx}I_{1z}\sin(\pi J_{k1}\tau)}$$

Ceci correspond à la conversion de magnétisation en phase en magnétisation antiphase. Si on démarre en antiphase, l'évolution sous couplage scalaire génère de la magnétisation en phase :

- <u>opérateurs_à_2_spins</u> :

 $2I_{kx}I_{1z} \xrightarrow{\pi J_{k1}\tau \cdot 2I_{kz}I_{1z}} 2I_{kx}I_{1z} cos(\pi J_{k1}\tau) + I_{ky}sin(\pi J_{k1}\tau)$ $2I_{ky}I_{1z} \xrightarrow{\pi J_{k1}\tau \cdot 2I_{kz}I_{1z}} 2I_{ky}I_{1z}cos(\pi J_{k1}\tau) - I_{kx}sin(\pi J_{k1}\tau)$

L'évolution des cohérences multiple quantum n'est pas affectée par le couplage entre deux noyaux appartenant à la transition. Par exemple :

$$2I_{kx}I_{1x} \xrightarrow{\pi J_{k1}\tau \cdot 2I_{kz}I_{1z}} 2I_{kx}I_{1x} ,$$

mais les structures de multiplets dans les spectres multiple quantum résultent des spins passifs ; ainsi, pour une cohérence pQC, le couplage effectif avec un spin passif I_m est défini par :

 $J_{eff} = \sum_{k} \Delta m_{k} J_{km} , \text{ où } \Delta m_{k} = \pm 1 \text{ selon la variation du nombre}$ quantum de I_k. On a alors :

 $\{pQC\}_{\chi} \xrightarrow{\pi J_{km} \tau \cdot 2I_{kz}I_{mz}} \{pQC\}_{\chi} cos(\pi J_{eff} \tau) + 2I_{mz} \{pQC\}_{\chi} sin(\pi J_{eff} \tau) + 2I_{mz} \{pQC\}$

II-5-3) <u>Pulses</u> :

- <u>opérateurs à 1_spin</u> :

 $I_{kz} \xrightarrow{\beta I_{kx}} I_{kz} \cos\beta - I_{ky} \sin\beta$ $I_{ky} \xrightarrow{\beta I_{kx}} I_{ky} \cos\beta + I_{kz} \sin\beta$ $I_{kz} \xrightarrow{\beta I_{ky}} I_{kz} \cos\beta + I_{kx} \sin\beta$ $I_{kz} \xrightarrow{\beta I_{ky}} I_{kz} \cos\beta - I_{kz} \sin\beta$

- <u>opérateurs à 2_spin</u>s :

A) magnétisation antiphase :

a)
$$2I_{kx}I_{1z} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}(I_{ky} + I_{1y})} \xrightarrow{-2I_{kz}I_{1x}}$$

C'est le passage de l'opposition des vecteurs magnétisation du spin k à l'opposition des vecteurs du spin l.

Cas général (angle quelconque) :

b) $2I_{kx}I_{1z} \xrightarrow{\pi} (I_{kx} + I_{1x})$ transformation en cohérence à 2 spins.

Cas général :

$$2I_{k\times}I_{1z} \xrightarrow{\beta(I_{k\times} + I_{1\times})} 2\{I_{k\times}\}\{I_{1z} cos\beta - I_{1y} sin\beta\}$$

B) Opérateurs de 2QC :

Comparées aux transitions à 1Q, les cohérences double quantum sont deux fois plus sensibles aux pulses et aux inhomogénéités de champ : ΦF_z {pQC} $\longrightarrow e^{-ip\Phi}$ {pQC} Remarques :

<u>1- Pulses_avec_une_phase_arbitraire :</u>

L'effet d'un pulse d'angle β et de phase ϕ peut être calculé par décomposition en trois étapes séparées :

$$\sigma(t_{-\phi} \sum_{k \neq z} \beta \sum_{k \neq z} \frac{\phi \sum_{k \neq z} \phi \sum_{k \neq z}}{k} \phi \sum_{k \neq z} \sigma(t_{+})$$

(phase définie comme le déplacement à partir de l'axe x vers l'axe y).

<u>2- Angle de tilt :</u>

Pour un pulse d'angle β , de phase ϕ et d'angle de tilt θ par rapport à l'axe z, la transformation des opérateurs densité est décomposable en cinq parties :

$$\sigma(t_{-}) \xrightarrow{-\phi \sum_{k \neq z} I_{kz}} \frac{\left(\frac{\pi}{2} - \theta\right) \sum_{k \neq y} \beta \sum_{k \neq k} I_{kx}}{(\pi - \theta) \sum_{k \neq y} \beta \sum_{k \neq y} \beta$$

$$\frac{-\left(\frac{\pi}{2}-\theta\right)\sum_{k=1}^{\infty}I_{ky}}{k} \xrightarrow{\varphi \sum_{k=1}^{\infty}I_{kz}} \sigma(t_{k})$$

Ceci permet de traiter l'effet d'un pulse sur un noyau éloigné de la fréquence centrale. L'offset est exprimée sous forme d'angle 8 calculé en fonction du champ effectif reçu par ce noyau.

Notons qu'à la résonance $(v_i = v_0), \theta = \frac{\pi}{2}$.

<u>3-</u> <u>Pulses_sélectifs_et_semi-sélectifs</u> :

* les pulses sélectifs agissent sur les pics individuels, avec

| γB_1 | < $|2\pi J|$ < $\Delta\Omega$, et peuvent être décrits par combinaisons linéaires d'opérateurs produits. Dans un système de deux spins couplés, un des composants du doublet du spin I_k est égal à ($I_{kx} \pm 2I_{kx}I_{1z}$):



FIGURE I-5

Ainsi la transformation créée par un pulse sélectif sur une des raies du multiplet selon l'axe u et d'angle β s'écrira :

$$\beta \frac{1}{2} (I_{ku} \pm 2I_{ku}I_{1z})$$

On peut appliquer le même raisonnement pour d'autres types de multiplets.

* Pour les pulses semi-sélectifs, c'est à dire ceux qui touchent toutes les raies du multiplet d'un spin donné uniformément, il suffit d'appliquer les opérateurs classiques (évidemment à celles-ci uniquement) en tenant compte de l'effet de l'offset (différence de fréquence avec le pulse) par la correction d'angle de tilt, comme nous venons de le voir. I-6) Aspects pratiques des calculs d'opérateurs densité :

Expériences d'écho de spin : (séquence $\tau/2 - 180^\circ - \tau/2$)

1/

Hétéronucléaire :

(pulse 180° appliqué uniquement au noyau I)



FIGURE I-6

Echo de spin hétéronucléaire.

 $\sigma_{1} \xrightarrow{\frac{1}{2}\pi J\tau \cdot 2I_{z}S_{z}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\Omega_{g}\tau \cdot S_{z}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\Omega_{1}\tau \cdot I_{z}} \xrightarrow{\pi I_{\phi}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\Omega_{g}\tau \cdot S_{z}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\pi J\tau \cdot 2I_{z}S_{z}} \xrightarrow{\pi I_{\phi}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\Omega_{g}\tau \cdot S_{z}}$

En utilisant les règles liées aux opérateurs exponentiels, en l'occurence celle qui concerne les pulses 180° : (si B_k est la composante d'un opérateur agissant sur k)

 $e^{i\Phi B_k}$ $e^{i\pi I_{k\times}}$ $e^{i\pi I_{k\times}}$ $e^{-i\Phi B_k}$

on voit que ceci est équivalent à :

$$\sigma_1 \xrightarrow{\pi I_{\Phi}} \Omega_{S} \tau.S_{z} \sigma_{z}$$

couplage et déplacement chimique de 1 refocalisés (annulés), déplacement chimique de 5 conservé. Homonucléaire : (I et S sont deux noyaux de même espèce)



FIGURE 1-7

Echo de spin homonucléaire.

 $\sigma_{1} \xrightarrow{\frac{1}{2}\pi J\tau \cdot 2I_{z}S_{z}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\Omega_{g}\tau \cdot S_{z}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\Omega_{I}\tau \cdot I_{z}} \xrightarrow{\pi I_{\phi}} \xrightarrow{\pi S_{\phi}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\Omega_{g}\tau \cdot S_{z}}$ $\xrightarrow{\frac{1}{2}\Omega_{I}\tau \cdot I_{z}} \xrightarrow{\frac{1}{2}\pi J\tau \cdot 2I_{z}S_{z}} \xrightarrow{\sigma_{2}}$

équivalent à :

effet de couplage conservé.

On vérifie que dans les deux cas, l'effet de précession par déplacement chimique sur le noyau qui subit l'écho de spin est supprimé.

II-7) Cyclage de phase :

(pour sélectionner les types de transitions)

De nombreuses séquences de pulses utilisent des cycles de phase pour sélectionner les cohérences voulues. Un exemple important en est la spectroscopie multiple quantum, où le fait que les cohérences à p quanta aient une sensibilité p fois plus grande aux effets de pulse et d'inhomogénéité de champ que les 10 permet d'envisager un moyen de séparation entre les deux phénomènes. Détaillons une séquence d'excitation des cohérences multiple quantum paires :

Soit U_{Φ} un propagateur (séquence de pulses) schématisé par :

90° 180° 90°

FIGURE 1-8

où tous les pulses ont la même phase à l'intérieur d'une expérience, mais où la phase varie d'une expérience à l'autre.

$$\sigma_{0} \xrightarrow{\pi} P \xrightarrow$$

les termes de l'équation précédente :

$$\sigma_{0} \xrightarrow{-\Phi F_{z}} \xrightarrow{U_{x}} \xrightarrow{\Phi F_{z}} \sigma_{1}$$

Si σ_0 représente l'équilibre thermique, le premier "pulse" (rotation) selon z n'a aucun effet, et on voit que, dans l'analyse d'expériences incluant des cycles de phase, il est suffisant de calculer l'évolution sous U_{ϕ} - pour une seule valeur de ϕ - et ensuite d'appliquer des pulses z pour connaître l'évolution pour d'autres valeurs de ϕ . <u>Remarque</u> : si une séquence de pulses constituant un propagateur U transfère des cohérences à p quanta en cohérences à p' quanta, sa sensibilité au changement de phase peut être exprimée par :

 $\{pQC\} \xrightarrow{-\varphiF_z} \bigcup_x \varphiF_z$ $\{pQC\} \xrightarrow{-\varphiF_z} \{p'QC\}$

équivalent à :

U_× {pQC}.e^{ipΦ} → {p'QC}.e^{-ipΦ}

ce qui donne un facteur de phase de $e^{-i(P'-P)\Phi} = e^{-i\Delta P\Phi}$

d'où : $\{pQC\}(\phi) = e^{-i\Delta p\Phi} \cdot \{p'QC\}_{\times}$

* * * * *

REFERENCES :

1)

M. Goldman:

Note CEA n°2503 Saclay_Octobre 1986 :

" Introduction aux méthodes quantiques de calcul en R.M.N. de haute résolution "

2) O. W. Sørensen : Doctorat de Sciences Naturelles Zürich 1984 : " Modern pulse techniques in liquid state nuclear magnetic resonance spectroscopy " CHAPITRE IV

LIMITATIONS DES EXPERIENCES A UNE DIMENSION CLASSIQUES


IQ-1) Présentation des composés étudiés dans ce travail :

Les performances de la RMN et des nouvelles approches décrites dans ce travail seront illustrées par des applications à quelques oligo-saccharides naturels ou synthétiques dérivés de l'héparine.

Ce polymère naturel possède plusieurs propriétés biologiques importantes et la compréhension des mécanismes régissant ses activités passe par la détermination des séquences correspondant à l'expression de l'une ou l'autre de chacune de celles-ci.

Les deux fonctions principales de l'héparine sont le contrâle des processus de coagulation (par l'intermédiaire de la fixation de certains segments de ce polymère sur l'antithrombine II) et la régulation de certains phénomènes de croissance. De nombreux travaux ont été consacrés à la mise en évidence des oligo-saccharides limites capables de remplir l'une ou l'autre de ces fonctions.

La structure de base de l'héparine est un disaccharide dont la structure est représentée ci-dessous :





<u>FIGURE ID-1</u> Structure de base de l'héparine.

Elle correspond à un enchaînement :

acide (1 \rightarrow 4)-O-(α -L-idopyranosyluronic 2-sulfate) --(1 \rightarrow 4)-(2-déoxy-2-sulfamino- α -D-glucopyranosyl 6-sulfate)

mais en réalité de nombreuses irrégularités existent et peuvent être fondamentales pour l'expression de certaines activités biologiques. La mise en évidence des oligomères limites possédant une activité biologique donnée passe par l'isolement de fragments d'héparine après dépolymérisation partielle par voie chimique, la séparation de ces fragments, la recherche de leurs éventuelles activités et enfin la détermination de la structure exacte des molécules isolées.

Les composés utilisés dans ce travail sont représentés sur la figure IQ-2 et ont été fournis par l'Institut CHDAY.

Le tétrasaccharide T_1 est un composé synthétique comportant quelques unités de base de l'héparine, et qui a été utilisé pour la mise au point de la plupart des expériences originales décrites dans ce travail.

Le pentasaccharide P1 a été mis en évidence comme étant la partie active du site d'interaction de l'héparine avec l'antithrombine II (1). Le pentasaccharide P2 n'en diffère que par la méthylation de l'acide glucuronique, et est totalement inactif. L'hexasaccharide H1 a été décrit par certains auteurs (2) comme actif, en désaccord avec les observations effectuées par l'Institut CHOAY ; une étude RMN intensive a été nécessaire pour confirmer la structure (3).

Dans la description des résultats successifs conduisant à la caractérisation complète de ces oligosaccharides, nous considèrerons toujours que les structures sont déjà connues afin de simplifier la présentation des résultats.









FIGURE ID-2

Composés utilisés dans cette étude.

Pour des raisons de cohérence, la nomenclature des unités est identique à celle des articles décrivant ces produits.

IQ-2) Spectres proton :

Considérons à titre d'exemple le spectre RMN protonique du pentasaccharide P1 qui a été présenté précédemment. Ce spectre est montré sur la figure IQ-3.



FIGURE IV-3 Spectre ¹H du pentasaccharide P1 dans D20 à 500 HHz.

La première observation majeure qui peut être faite est que l'ensemble du spectre est localisé sur un domaine spectral très restreint (moins de 3 ppm) et que seule la région située à champ faible semble résolue (de 4.5 à 6 ppm). Elle contient en effet essentiellement des protons anomères (protons 1) qui sont déblindés par le fait que contrairement à tous les autres, ils

sont portés par des carbones de type acétalique. Cette particularité est extrêmement importante et sera utilisée comme point de départ pour l'immense majorité des méthodes que nous mettrons en oeuvre par la suite. En dehors de cette portion claire du spectre, la région 3 - 4.5 ppm est très confuse même s'il apparait qu'elle contient en fait une très grande quantité de signaux individuellement bien résolus. Dans le cas du composé présenté ici, tous les protons non labiles et non anomériques sont effectivement situés dans ce domaine spectral. Il faut de plus souligner que ce spectre a été enregistré à 500 MHz et sur un pentasaccharide. Les spectres obtenus à des champs inférieurs ou avec des composés plus complexes peuvent donc rapidement devenir inextricables, au moins au premier abord.

Nous devons garder à l'esprit le fait qu'une étude complète d'un oligosaccharide "inconnu" doit permettre la détermination univoque de tous les déplacements chimiques, couplages scalaires et dipolaires qui sont nécessaires pour établir sa structure et sa conformation en solution.

Voyons dans un premier temps ce que les méthodes classiques de la RMN peuvent apporter comme information :

IU-3) Techniques de découplage :

L'une des approches les plus simples pour mener à bien l'analyse d'un spectre protonique consiste à irradier successivement les signaux correspondant à des protons isolés (sur le spectre) afin de mettre en évidence par la suppression des couplages scalaires la fréquence de résonance des protons voisins. Ceci est bien sûr faisable dans le cas présent puisque nous avons vu que les protons anomériques sont isolés sur le spectre. On peut donc envisager d'irradier successivement les protons 1 pour localiser les protons 2 et espérer pouvoir poursuivre même au delà ce type de démarche. La figure IQ-4 montre les résultats obtenus avec le pentasaccharide P1 qui est tout à fait représentatif de la situation rencontrée quotidiennement avec ce type de composés.



(c) irradiation de A_2^{nr} et A_2^* .

Les flèches indiquent les signaux modifiés dans le spectre.

Il est parfaitement clair que l'irradiation des protons A_1^{nr} et A_1^* par exemple permet de localiser parfaitement les protons A_2^{nr} et A_2^* et de mesurer les couplages 2-3. Toutefois, ceci représente la fin du voyage, car ces protons mis en évidence sont pratiquement superposés et une irradiation spécifique de A_2^{nr} ou de A_2^* est impossible techniquement. L'irradiation ponctuelle de ces signaux est inconcevable car ils sont trop proches, et, si deux solutions sont théoriquement envisageables à priori, elles s'écroulent d'elles-mêmes dès qu'il s'agit de les mettre en oeuvre :

- par le canal de découplage, l'envoi d'un pulse de très faible puissance (de manière à ce qu'il ne couvre que quelques hertz) ne permettra pas d'arriver à l'état de saturation pour le proton irradié, et donc n'empêchera pas les transferts d'aimantation entre celui-ci et les noyaux voisins.
- par le canal principal, la durée d'un pulse qui ne couvrirait que quelques hertz serait beaucoup trop longue et entrainerait des distorsions sur tout le spectre, rendant ininterprétables les transformations occasionnées par ce "découplage particulier". L'utilisation de pulses sélectifs sera développée ultérieurement.

Toute tentative de perturbation sur le massif contenant ces deux signaux (voir figure IQ-4c) se traduit donc par deux réponses distinctes mais il est bien sûr impossible d'attribuer réponses à l'un ou l'autre des protons A_3^{nr} ou A_3^* . Dans ces ces conditions, l'ambiguïté ne pouvant être levée, l'analyse est totalement inefficace et si des différences importantes existent entre ces deux unités , elles ne pourront pas être mises en évidence par suite du caractère partiel de la détermination de structure. Cette situation est extrêmement fréquente dans le domaine des oligo-saccharides, car, alors que les protons anomériques très sensibles aux différences d'environnement sont souvent séparés, les protons 2 sont au contraire très peu affectés par des variations parfois importantes de la nature des substituants des carbones 2. Ceci est bien sûr particulièrement critique quand, comme dans le cas des oligosaccharides dérivés de l'héparine, le nombre de types d'unités possibles est relativement limité.

I 1 est donc clair que les méthodes de routine ne sont pas utilisables pour mettre en évidence la structure complète de composés de ce type. Toute analyse partielle pouvant conduire à des résultats grossièrement faux, il convient de rester très prudent quant aux informations qui peuvent être déduites de ces méthodes. On pourrait penser qu'en raison du particulier des protons anomériques isolés sur le caractère spectre, une inspection superficielle de ce dernier permettrait de dénombrer au moins les unités constitutives. Ceci constitue sûr une information précieuse, mais en l'absence d'autres bien méthodes, le spectre RMN seul ne permet même pas d'extraire cet élément avec certitude pour les raisons suivantes :

- La nature des unités osidiques impose que, dans la majorité des cas, le proton anomérique apparaisse sous forme d'un doublet puisqu'en principe il n'est couplé scalairement qu'à un seul proton. Toutefois, c'est aussi le cas des protons 5 des acides uroniques (cf Is et Gs par exemple); De plus la proximité du groupe carboxyle peut induire un déblindage suffisant pour faire apparaître les signaux correspondants dans la région "anomérique".
- La nature de la liaison glycosidique exerce une considérable influence sur le déplacement des protons anomériques : ainsi, une liaison de type béta (sur un sucre de la série D) conduit à des protons anomériques situés dans la région 4.5-4.8 ppm qui peuvent être enfouis sous des signaux provenant de protons non anomériques. Ils peuvent toutefois être reconnus par la valeur importante du couplage 1-2 comparé à ce qui est observé pour la liaison de type alpha dans les mêmes séries.

peut être utile aussi de faire varier les conditions 11 température, force ionique... expérimentales telles que pH, quelques renseignements supplémentaires obtenir sur pour l'identité des signaux observés. Par exemple, une méthode pour reconnaître le proton 5 d'une unité uronique (qui apparaît donc comme un doublet, et à fréquence pas forcément établie) est de faire varier le pH de la solution ; le proton 5, près du groupe carboxylique, subit un effet de déplacement beaucoup plus grand que le proton 1 (à pH 7, le signal de Is se trouve près de l'eau ; à pH < pK, il se déplace vers les champs faibles).

La triste conclusion de ce paragraphe concernant l'analyse sommaire d'un spectre protonique est que l'on ne peut obtenir que des informations très précaires par cette méthode. Dans la mesure où peu de renseignements sont disponibles sur la structure du composé étudié, des méthodes plus élaborées sont indispensables. En particulier dans le domaine concernant l'établissement de relations structure-conformation-activité, il serait très dangereux de se limiter à une étude aussi sommaire et équivoque pour établir de façon crédible des structures moléculaires dans le domaine des oligo-saccharides. Il faut toutefois reconnaître que l'analyse superficielle garde tout son sens pour la détermination de la pureté d'un composé de ce type. De faibles quantités de contaminants peuvent être mises en évidence et dosées par RMN du proton en raison de la grande sensibilité intrinsèque de cette technique, si l'observation est effectuée à champ très élevé.

II-4) Apports de la RMN classique du ¹³C :

Nous avons vu précédemment que la RMN classique du proton ne permettait même pas de déterminer avec une absolue certitude le nombre d'unités constitutives d'un oligosaccharide inconnu. Ceci est dû au fait que les protons anomériques sont trop sensibles à des variations d'environnement très grandes qui peuvent fausser les estimations. Cette importante information doit toutefois pouvoir être obtenue par la RMN du ¹³C (4). Les carbones de type acétalique (C1) donnent des raies ¹³C dans une région caractéristique du spectre (vers 100 ppm) qui ne correspond en général pas à d'autres types d'atomes de carbone que l'on rencontre classiquement dans les oligosaccharides. Ceci est montré sur la figure $I\Sigma$ -5 dans laquelle les cinq carbones anomériques sont parfaitement visualisés, ne laissant pas de doute sur la taille de cet oligomère.



La région contenant les signaux des carbonyles est exclue.

BU

Cependant, la situation n'est pas toujours aussi claire : un autre exemple est montré sur la figure IV-6 concernant l'hexasaccharide H1.



Ce spectre semble indiquer la présence de sept unités, ce qui s'avèrera faux ultérieurement.

Nous verrons dans la suite de ce mémoire qu'une confirmation du nombre d'unités du composé plus probante que par ces spectres carbone est apportée par les expériences de corrélation hétéronucléaires. Il est toutefois de toute première importance de noter que ces mesures ne sont possibles que si des quantités importantes de matériel sont disponibles (dans le domaine de 20-50 mg pour des composés de cette taille). Cette condition n'est pas toujours remplie quand on s'adresse à des composés naturels, et la grande majorité des méthodes présentées ultérieurement sera ciblée sur les techniques de RMN protonique dont la sensibilité est très supérieure. Les approches utilisant le ¹³C ne seront que des confirmations éventuelles, et il est évident que la RMN du proton doit pouvoir fournir la totalité des données permettant la construction de la structure moléculaire et ne laisser strictement aucun doute.

+ + + + +

REFERENCES :

1)

G. Torri, B. Casu, G. Gatti, M. Petitou, J. Choay,
J.C. Jacquinet et P. Sinay :
Biochem. Biophys. Res. Comm. 128, 134 (1985)

- 2) R. J. Linhardt, K. G. Rice, Z. M. Merchant, Y. S. Kim et D. L. Lohse : J. Biol. Chem. 261, 14448 (1986)
- 3)

M. Petitou, J. C. Lormeau, B. Perly, P. Berthault, V. Bossennec, P. Sié et J. Choay : Soumis pour publication à J. Carb. Chem.

4) E. Breitmaier, W. Voelter :
 " Carbon-13 NMR Spectroscopy "
 VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1987)



CHAPITRE I

79

TRANSFERTS D'AIMANTATION



☑-1) Introduction :

Dans le chapitre I, nous avons vu que plusieurs paramètres intervenaient lors de la précession du moment magnétique d'un noyau de spin 1/2 : outre le déplacement chimique, qui induit des différences de vitesse de rotation entre les spins, les phénomènes de relaxation et de couplage agíssent. Pour des liquides en RMN haute résolution, le premier phénomène, dû aux interactions dipolaires entre les différents spins et aux interactions avec le milieu, est de l'ordre de la seconde, car il fait intervenir des échanges thermiques (les processus n'étant jamais réellement adiabatiques). Il sera traité dans les chapitres XII et suivants.

Le second phénomène, beaucoup plus rapide, car provenant de mouvements électroniques, est à la base de nombreuses expériences et sera développé dans ce chapitre, d'un côté par la méthode des vecteurs d'Heisenberg et de l'autre par les calculs d'opérateurs densité. Cet effet d'interaction scalaire est utilisé dans la plupart des expériences de RMN multipulsées, qu'elles soient à une ou deux dimensions, pour véhiculer une information d'un noyau à un autre. par l'intermédiaire des liaisons, et la connaissance de son principe est fondamentale pour la compréhension et la réalisation de toutes les séquences modernes.

Au sein même de ce chapitre, seules des expériences hétéronucléaires où une partie de l'aimantation d'un noyau X sur un noyau A d'une autre espèce seront étudiées, car passe leur cas est plus facilement analysable par les vecteurs d'Heisenberg (1). En effet, on ne décrira que les expériences d'éditions de spectres comme applications des transferts de polarisation, c'est à dire que pour illustrer le principe de base qui est l'inversion sélective de population, on détaillera séquences hétéronucléaires qui permettent de sélectionner les les noyaux en fonction du nombre de noyaux de l'autre espèce qui leur sont liés.

☑-2) Théorie :

Nous allons d'abord étudier les transferts de polarisation sur un système particulier à 2 spins 1/2 : C-H, puis nous généraliserons à un système AX.

☑-2-1) <u>Cas du système C-H</u> :

Les spectres classiques (sans découplage) seront les suivants :





FIGURE I-1

Spectres ${}^{13}C$ et ${}^{1}H$ prévisibles pour une paire ${}^{13}C - {}^{1}H$ (sans autre couplage) en abondance naturelle.

La sensibilité d'un noyau étant directement fonction de son rapport gyromagnétique, les satellites du spectre proton seront théoriquement quatre fois plus facilement détectables que le doublet en ¹³C, mais ils seront masqués par le grand pic (dû aux protons liés à un ¹²C qui sont presque cent fois plus nombreux que les protons liés à un ¹³C (abondance naturelle ¹³C = 1.1%)). Ce grand pic va saturer la mémoire de l'ordinateur et les satellites peuvent être pris pour du bruit de fond puisque leur stockage n'est fait que sur quelques bits uniquement.

On retrouve le diagramme d'énergie de la figure II-8 avec les populations particulières du proton et du carbone 13 :



FIGURE Q-2 Diagramme d'énergie pour un système CH.

On définit pour chaque noyau la fraction de spins en excès :

$$p = \frac{N_{\alpha} - N_{\beta}}{N} = \frac{\gamma B_0 \pi}{2kT} d' \text{ après le chapitre II.}$$

Ceci permet de vérifier que p = 4p (puisque $\gamma_{\rm H}$ = 4 $\gamma_{\rm C}$) et le diagramme d'énergie peut être écrit comme suit :



FIGURE D-3

Normalisation : la somme des populations est égale à 4.

Rappelons que la vitesse de précession des spins X est aussi directement proportionnelle à γ_x , et on peut écrire :

 $\frac{\gamma_{x}}{\gamma_{A}} = k \frac{\nu_{x}}{\nu_{A}} = k' \frac{\text{Intensite}_{x}}{\text{Intensite}_{A}}$

On vérifie sur le diagramme que l'intensité des transitions ¹³C est égale à un quart de celle des transitions proton. Si, dans le spectre proton, on irradie un des deux satellites par un pulse de 180° :







FIGURE D-4

Irradiation sélective d'un satellite $^{1}H - ^{13}C$.

Cela revient à inverser les populations au niveau des protons liés à un état de spin particulier du ¹³C, ce qui donne sur le diagramme d'énergie :



FIGURE <u><u>U-5</u></u>

Diagramme d'énergie après inversion des niveaux 2 et 4

soit, pour le spectre ¹³C :



FIGURE D-6

Spectre carbone résultant. Les intensités des raies sont calculées à partir des différences de populations 1 - 2 et 3 - 4.

Le total en valeur absolue des intensités est de 16p, alors qu'au départ on avait 4p, donc on a obtenu un gain en sensibilité. La seule différence est que la phase est détruite ; une partie de la magnétisation du noyau proton a été transférée sur le carbone.

 $\overline{\mathbf{v}} - 2 - 2$) <u>Cas général</u> :

A) Système AX :

L'inversion sélective de population (SPI) sur un tel système pour le noyau X, donnera lieu au diagramme d'énergie suivant :

(BU)



FIGURE D-7

Effet de l'inversion sélective de population sur le diagramme d'énergie d'un système AX.

a gain = $\frac{2(p_A - p_X)}{2p_A} = 1 - \frac{\gamma_X}{\gamma_A}$

gain =
$$\frac{2(p_A + p_X)}{2p_A} = 1 + \frac{\gamma_X}{\gamma_A}$$

<u>Remarques</u> :

ь

- d'une manière générale, quand deux noyaux A et X sont couplés, toute variation des populations de spins sur le noyau X va affecter le noyau A, et réciproquement. Du point de vue physique, cela revient à considérer que le champ magnétique local dû au noyau voisin est changé.
- il n'y a pas de variation de déplacement chimique dans ce cas, car la densité électronique est inchangée quel que soit l'état de spin du noyau voisin.
- si on irradie les deux satellites X :



Cela ne change rien pour les transitions A. En fait, l'inversion sélective de population sur X revient à changer les populations de départ ou d'arrivée des transitions A, et donc l'intensité des raies. Si on inverse toutes les populations X, on change à la fois les populations de départ et d'arrivée de la même quantité, ce qui n'a aucun effet sur A ; ainsi pour parvenir à un transfert de magnétisation de X sur A, il faut arriver, dans le modèle vectoriel d'Heisenberg, à la situation :



FIGURE 1-9

Inversion sélective des spins X.

 A_{α}, A_{β} : populations (états α et β) du spin A. $X_{\alpha}(X_{\beta})$: excès de population X liée à $A_{\alpha}(A_{\beta})$. Le transfert d'aimantation s'effectue à partir du moment où les composantes des vecteurs X_a et X_b selon z sont non nulles. Son intensité dépend de ces composantes (plus les vecteurs sont alignés selon z, plus il y aura transfert).

B)

Système AX₂ :

Transitions

 $\begin{array}{c} 1 & -p_A \\ 1 & +p_A \end{array} \end{array} \begin{array}{c} 2p_A \end{array} \qquad \qquad \begin{array}{c} 1 & -p_A \\ 1 & +p_A \end{array} \end{array} \begin{array}{c} 2p_A \end{array} \end{array}$

$$\frac{1 - p_{A} - 2p_{X}}{1 + p_{A} + 2p_{X}}$$
 2(p_A + 2p_X)

FIGURE V-10

a gain =
$$\frac{2(p_A - 2p_X)}{2p_A} = 1 - 2 \frac{\gamma_X}{\gamma_A}$$

b gain =
$$\frac{2p_A}{2p_A} = 1$$

$$gain = \frac{2(p_A + 2p_X)}{2p_A} = 1 + 2 \frac{\gamma_X}{\gamma_A}$$

Le multiplet de A est donc transformé de la manière suivante :





FIGURE D-11

Exemple numérique pour le carbone dans un groupement CH2.

C) Système AX_a :

La figure Ω -12a donne le diagramme d'énergie pour un système AX $_3$:

	^{\$} * ^{\$} * ^{\$} *	
	^α Α ^β × ^β × ^β ×	
^β [~] × ^β × ^β ×	^{\$} A ^{\$} x ^{\$} x ^{\$} x	^β _Α ^β × ^β × ^α ×
^α Α ^α χ ^β χ ^β χ	^۵ ۹ ^β × ^۵ × ^β ×	^α Α ^β × ^β × ^α ×
^β A ^a x ^a x ^β x	^β A ^α x ^β x ^α x	^β A ^β X ^α X ^α X
[∝] ^ ^œ x ^œ x ^β x	^a A ^a x ^β x ^a x	^a A ^B × ^a × ^a ×
	^β A ^α x ^α x ^α x	
	~~~~~~	

### FIGURE D-12a

Etats d'énergie composant un système AX3

Transitions

 
$$1 - p_A - 3p_X$$
 $2p_A$ 
 a
  $2(p_A - 3p_X)$ 
 $\begin{pmatrix} 1 - p_A + 3p_X \\ 1 + p_A - 3p_X \end{pmatrix}$ 
 $1 - p_A - p_X$ 
 $2p_A$ 
 a
  $2(p_A - 3p_X)$ 
 $\begin{pmatrix} 1 - p_A + p_X \\ 1 + p_A - 3p_X \end{pmatrix}$ 
 $1 - p_A - p_X$ 
 $2p_A \times 3$ 
 b
  $3 \times 2(p_A - P_X)$ 
 $\begin{pmatrix} 1 - p_A + p_X \\ 1 + p_A - p_X \end{pmatrix}$ 
 $1 - p_A + p_X$ 
 $2p_A \times 3$ 
 c
  $3 \times 2(p_A + P_X)$ 
 $\begin{pmatrix} 1 - p_A - p_X \\ 1 + p_A - p_X \end{pmatrix}$ 
 $1 - p_A + p_X$ 
 $2p_A \times 3$ 
 c
  $3 \times 2(p_A + p_X)$ 
 $\begin{pmatrix} 1 - p_A - p_X \\ 1 + p_A + p_X \end{pmatrix}$ 
 $1 - p_A + 3p_X$ 
 $2p_A \times 3$ 
 c
  $3 \times 2(p_A + p_X)$ 
 $\begin{pmatrix} 1 - p_A - p_X \\ 1 + p_A + p_X \end{pmatrix}$ 
 $1 - p_A + 3p_X$ 
 $2p_A$ 
 d
  $2(p_A + 3p_X)$ 
 $\begin{pmatrix} 1 - p_A - 3p_X \\ 1 + p_A + 3p_X \end{pmatrix}$ 

inversion sélective sur spins X (associés à A_p)

## FIGURE D-12b

équilibre

Populations des différents niveaux à l'équilibre et après inversion sélective .

a 
$$gain = \frac{2(p_A - 3p_X)}{2p_A} = 1 - 3\frac{\tau_X}{\tau_A}$$
  
b  $gain = \frac{3 \times 2(p_A - p_X)}{3 \times 2p_A} = 1 - \frac{\tau_X}{\tau_A}$   
c  $gain = \frac{3 \times 2(p_A + p_X)}{3 \times 2p_A} = 1 + \frac{\tau_X}{\tau_A}$   
d  $gain = \frac{2(p_A + 3p_X)}{2p_A} = 1 + 3\frac{\tau_X}{\tau_A}$   
soit :  
13  
14  
15  
10  
19  
-9  
-11

FIGURE D-13

Exemple numérique pour le carbone dans un groupement CH3.

### Q-3) Applications :

Les transferts de magnétisation d'un noyau sur un autre peuvent avoir plusieurs applications :

- augmentation de la sensiblité d'un noyau de faible 😙

- édition de spectres

- expériences de corrélation (décrites dans le chapitre VI)

### 

Ce sont les expériences SPI que nous venons de décrire. Il faut remarquer qu'on ne peut cependant pas effectuer de telles expériences pour un spectre complexe, car cela demanderait d'irradier un par un tous les satellites, et la réalisation serait beaucoup trop longue. On aura donc recours à des séquences multipulses de type INEPT, DEPT .... dont nous parlerons par la suite.

Au phénomène de transfert de magnétisation par couplage scalaire s'ajoute l'effet Overhauser Nucléaire, qui peut soit augmenter, soit diminuer le signal (cf. chapitre sur la relaxation). Sa vitesse d'apparition est beaucoup plus faible (de l'ordre de la seconde) que celle des transferts de polarisation directs, et il n'apparaîtra le plus souvent que dans le cas de séquences suffisamment longues.

D'une manière générale, on peut quantifier le gain apporté par les différentes méthodes de transferts d'aimantation :

La réceptivité d'un noyau A est donnée par :

$$\Re_A = \gamma_A^3 S(S + 1) a_A$$

- γ_A : rapport gyromagnétique
- a _ : abondance isotopique
- S : nombre quantique de A
  - (on étudie uniquement les noyaux à spins 1/2)

La polarisation d'un noyau excité est : (cf. chapitre I)

 $P = N_{\alpha} - N_{\beta} = \gamma_{e \times c} B_{0} \cdot \chi$ 

x : facteur de Boltzmann

et l'amplitude du vecteur magnétisation du noyau observé :

 $M_{obs} = \gamma_{obs} P$ 

donc le signal détecté apparaît sous la forme :

$$s(t) = \frac{d}{dt} M_{obs} e^{i\omega_{obs}t}$$
$$= \omega_{obs} M_{obs}$$
$$= \gamma_{obs} B_0 M_{obs}$$
$$= \gamma_{exc} \gamma_{obs}^2 B_0^2$$

et le bruit de fond :

$$N = \sqrt{\omega_{obs}} = \sqrt{\gamma_{obs}} \cdot \sqrt{B_0}$$

donc le rapport signal sur bruit est égal à :

$$\frac{S}{N} = \gamma_{e \times c} \gamma_{obs}^{3/2} B_0^{3/2}$$

Cette équation permet de considérer les avantages relatifs des différentes expériences de transfert de cohérence :

- <u>détection</u> <u>directe</u> : (noyau A)

$$\frac{S}{N} = \gamma_A^{5/2} B_0^{3/2}$$

- transfert de_X_à_A : (INEPT classique (2))

 $\frac{S}{N} = \gamma_{X} \gamma_{A}^{3/2} B_{0}^{3/2}$ 

<u>transfert</u> <u>de</u> <u>A</u> <u>à</u> <u>X</u> : (INEPT inverse et expériences reverse ) (références 3, 4, 5)

$$\frac{S}{N} = \gamma_A \gamma_X^{3/2} B_0^{3/2}$$

 $\frac{S}{N} = \gamma_{X}^{5/2} B_{0}^{3/2}$ 

- transfert de_X_à_A_suivi_d'un transfert de_A_à_X : (6)

.

Remarque :

Ces équations ne sont valables que si l'on néglige les phénomènes de relaxation. En fait, il convient de multiplier chacune d'elles par un facteur f qui tient compte de la vitesse de retour à l'équilibre de l'aimantation entre les expériences :

 $f = 1 + e^{-\frac{t}{T_{iexc}}}$ 

où t : intervalle de récupération entre les expériences et T_{lexc} : temps de relaxation longitudinal du noyau excité ( cf. chapitre sur la relaxation)

### ☑-3-2) Edition de spectres :

(sélection des noyaux A par le nombre de noyaux X qui leur sont couplés)

### A) Principe :

Les transitions A des systèmes AX,  $AX_2$ ,  $AX_3$  vont se comporter différemment les unes des autres à la fois par leurs différences de multiplicités, et par les différences de couplage qu'elles présentent entre elles.

On utilise donc les transferts de magnétisation de X sur A pour sélectionner les systèmes grâce à ces informations. Ce sont les séquences INEPT (2, 7, 8) et DEPT (9) qui permettent d'effectuer une inversion sélective de population sur les signaux adéquats (de même multiplicité) du spectre.

Ces séquences fonctionnent à partir du même principe, et demandent au minimum trois pulses (deux sur le canal X, un sur le canal A) : le premier génère la magnétisation transverse pour le noyau X ; le délai qui suit permet la séparation des vecteurs dans le plan xy par effet de couplage, le second pulse sur X transforme les différences de fréquences (dans le référentiel tournant) en différences de populations, ce qui entraîne un changement dans les transitions A détectables par un troisième pulse (sur A). Des pulses 180° permettent de s'affranchir des effets de

précession dûs aux déplacements chimiques, et des cycles de phase adéquats suppriment les spins A non couplés :



### FIGURE <u><u>U-14</u></u>

Séquences générales des expériences INEPT et DEPT.

Dans l'expérience d'INEPT, c'est le choix du temps τ qui Permet la sélection des signaux de même type, alors que dans le DEPT c'est la valeur de l'angle θ qui est déterminante.

B) INEPT

Nous allons développer l'étude de l'INEPT sur des systèmes AX,  $AX_2$ ,  $AX_3$  grâce à la représentation des vecteurs de magnétisation d'Heisenberg, en considérant :

- les excès de population proton,
- les excès de population carbone (ceux que l'on observe dans un spectre normal carbone).

On va s'attacher à décrire l'INEPT simplifié, c'est à dire sans refocalisation :



# FIGURE D-15

INEPT sans ~ + focalisation.

Rappelons que c'est le temps τ qui permet de séparer les AX des AX₂ des AX₃.

<u>Système AX</u> : (C-H par exemple)

a) On ne considère que l'excès de population des protons :

H_a : lié à C_aC_a : population de spin dans l'état  $\alpha$  liée à H_a. H_b : lié à C_pC_p : population de spin dans l'état  $\beta$  liée à H_b. (H_a = H_b = C_a = C_a à 10⁻⁵ près)



# FIGURES Q-16 (a)-(f)

Evolution des vecteurs d'Heisenberg en fonction des pulses et délais de l'expérience d'IHEPT sans refocalisation.

### Etape (c) :

Si on choisit le référentiel tournant à la fréquence du ¹³C, pendant le délai  $\tau = \frac{1}{4 J_{CH}}$ , chaque vecteur aura tourné de  $\frac{\pi}{4}$ (puisque  $\omega_a = \omega_0 + \pi J \tau$  et  $\omega_b = \omega_0 - \pi J \tau$ ).

## Etape (d) :

Puisque les populations  $C_{\alpha}$  et  $C_{\beta}$  sont inversées, le sens de précession des vecteurs  $H_{a}$  et  $H_{b}$  est inversé (la précession dans le repère tournant n'étant due qu'au couplage).

### Etape (e) :

L'intensité des vecteurs  $C_{\alpha}$  et  $C_{\beta}$  étant liée à la magnétisation proton devient égale à 4p.

Cette situation est propice au transfert de magnétisation puisque l'on a inversé sélectivement un des deux excès de spin proton (cf. paragraphe précédent). Ce transfert d'aimantation se traduirait donc sur le spectre carbone par :



#### FIGURE D-17

Transitions carbone dues uniquement au transfert de magnétisation venant des protons (ce n'est pas réellement ce que l'on récupère, puisqu'il faut compter aussi les transitions normales ¹³C - voir le paragraphe b qui suit).

Tous les systèmes de même diagramme d'énergie vont réagir de la même manière, donc il n'est plus nécessaire de réaliser une irradiation ponctuelle.

b) Il faut maintenant considérer une autre population : les spins  13 C en excès.

C_a: lié à H_aH_a: population de spin dans l'état  $\alpha$ C_b: lié à H_pH_p: population de spin dans l'état  $\beta$ Seuls les pulses 180°× (¹³C) = 90°× (¹³C) les affectent :





### FIGURE **Q-18**

Signaux ¹³C dûs aux excès de population carbone (ce que l'on récupèrerait sans transfert d'aimantation). Le signal ¹³C récupéré sur le spectre est donc le suivant :





### FIGURE 1-19

Signal obtenu par la séquence d'IHEPT classique sans refocalisation sur un système AX.

Cependant, cette séquence brute manque d'intérêt, puisque même les noyaux A qui n'ont pas reçu d'aimantation de noyaux X couplés apparaissent sur le spectre, et une variante est le plupart du temps utilisée : l'INEPT classique (nommé INEPT différentielle), qui comporte une alternance de phase pour le dernier pulse 90° proton : pour un FID,  $90_y^{,}$ , et pour le suivant  $90_{-y}^{,}$ . Ainsi, le signe du transfert d'aimantation du proton sur le carbone est inversé d'une fois sur deux, alors que le signal provenant des excès de spin carbone est inchangé. La soustraction d'un FID sur deux (ou l'alternance 0 - 180° de la phase du récepteur) permet donc de supprimer les signaux provenant de spins A non couplés à des spins X. 1) Excès proton :



2) Excès carbone :







Donc le signal carbone sera : 3p

# FIGURE 1-20

-5p

Vecteurs d'Heisenberg lors de l'INEPT différentielle.

L'alternance des phases  $\pm y$  et la soustraction des FID permet d'obtenir :







## FIGURE D-21

Signaux obtenus pour un système CH avec la séquence d'IHEPT différentielle.



Remarque : si l'on considère l'INEPT avec refocalisation :
Ainsi on récupère (sans faire d'INEPT différentielle) :



# FIGURE D-23

Le pulse  $\pi$  a servi à refocaliser les différents vecteurs.

Ceci revient à supprimer le signal normal que l'on obtiendrait sur un spectre classique ¹³C. Ainsi, lorsqu'il n'y a pas de transfert d'aimantation, le signal résultant est nul, ce qui permet donc de séparer les différents systèmes de spins.

Système AX₂ : (CH₂ par exemple)



Signal ¹³C pour un groupement CH₂ (acquisition classique).

Il ne peut y avoir de transfert d'aimantation des protons sur le carbone pour des ¹³C couplés à deux protons de spins opposés (les effets de couplage s'annulent mutuellement), donc pour un système CH₂ on ne considère que deux vecteurs magnétisation séparés par 2J_{CH}. Le maximum de transfert est donc obtenu pour  $\tau = \frac{1}{8J}$  et à la valeur précédente de  $\frac{1}{4J}$ , il y a annulation du signal résultant car aucun transfert n'intervient (les vecteurs tournant deux fois plus vite décrivent un tour complet).

<u>Système</u> AX₃ : (CH₃ par exemple)



#### FIGURE 1-25

Signal ¹³C pour un groupement CH₃ (acquisition classique).

Dans ce cas, il faut considérer le couplage J et le couplage 3J, et le raisonnement est identique.

D'une manière générale, pour les trois systèmes, la fonction d'efficacité du transfert en fonction du délai  $\tau$  est donnée par :

AX : 
$$\frac{\gamma_{x}}{\gamma_{A}} \sin (\pi J \tau)$$
  
AX2 :  $\frac{2\gamma_{x}}{\gamma_{A}} \sin (2\pi J \tau)$   
AX3 :  $\frac{3\gamma_{x}}{4\gamma_{A}} (\sin (\pi J \tau) + \sin (3\pi J \tau))$ 

C) DEPT

"Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer"

Nous allons traiter cette expérience par les calculs d'opérateurs densité. Rappelons la séquence :



# FIGURE 1-26

Seuls les opérateurs densité σ₀, σ₁ et σ₈ ont été représentés, car les autres ne sont pas associés à des instants précis de la séquence, mais proviennent de réarrangements d'opérateurs.



En utilisant les règles définies dans le chapitre  $\pi$ . et en considérant que le premier opérateur  $S_z$  et le dernier  $I_z$  n'ont pas d'effet ( $S_z$  inactif car le noyau n'a toujours pas été excité,  $I_z$  parce que l'observation n'est faite que sur le noyau S), on peut simplifier cette formule :

$$\sigma_{0} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}I_{\times}} \xrightarrow{2I_{z}S_{z}} \xrightarrow{\pi I_{y}} \xrightarrow{\frac{\pi}{2}S_{\times}} \xrightarrow{2I_{z}S_{z}} \xrightarrow{\pi S_{y}} \xrightarrow{\theta I_{y}} \xrightarrow{2I_{z}S_{z}} \sigma_{g}$$

$$\sigma_{0} = \sum_{i=1}^{n} I_{iz}$$

$$\sigma_{1} = -\sum_{i=1}^{n} I_{iy}$$

$$\sigma_{2} = \begin{pmatrix} 2 \sum_{i=1}^{n} I_{ix} \end{pmatrix} S_{z}$$
  
$$\sigma_{3} = -\begin{pmatrix} 2 \sum_{i=1}^{n} I_{ix} \end{pmatrix} S_{z}$$
  
$$\sigma_{4} = \begin{pmatrix} 2 \sum_{i=1}^{n} I_{ix} \end{pmatrix} S_{y}$$

 $\sigma_s$  : là, le couplage effectif entre le spin S et les n-1 spins I passifs (non représentés dans l'opérateur précédent) s'effectue :

$$\sigma_{5} = 2^{n} \sum_{i=1}^{n} \left( I_{i \times} \prod_{ji} I_{jz} S_{\times, y} \right)$$

 $S_x$  quand n est pair,  $S_y$  quand n est impair

Le pulse  $\pi$  qui suit change le signe des opérateurs contenant S  $_{x}$  :

$$\sigma_{e} = 2^{n} \sum_{i=1}^{n} \left( I_{i \times} \prod_{j \neq i} I_{jz} S_{\times, y} \right)$$
  
$$\sigma_{7} = 2^{n} \left[ \sum_{i=1}^{n} \left( I_{i \times} C_{e} - I_{iz} S_{e} \right) \prod_{j \neq i} \left( I_{jz} C_{e} + I_{j \times} S_{e} \right) S_{\times, y} \right]$$

et, en ne gardant que les termes à un quantum (en S), seuls qui seront observables :

$$\sigma_{7} = 2^{n} \prod_{i=1}^{n} I_{iz} S_{x,y} \times c_{\theta}^{n-1} s_{\theta} n$$

$$\sigma_{\theta} = n \sin \theta \cos^{n-1} \theta S_{x}$$

Système IS :  $\sigma_{\theta} = \sin \theta S_{\chi} (\text{optimum pour } \theta = \frac{\pi}{2} \pm \pi)$ Système I2S :  $\sigma_{\theta} = 2 \sin\theta\cos\theta S_{x} = \sin2\theta S_{x} (optimum pour \theta = \frac{\pi}{a} \pm \pi)$ Système IBS :  $\sigma_{\theta} = 3 \sin\theta \cos^2 \theta S_{\chi} = \frac{3}{4} (\sin\theta + \sin 3\theta)$ Rappelons que l'intensité du signal récupéré est de plus multipliée par un facteur égal à  $\frac{\tau_{x}}{\tau_{a}}$ . Enveloppe des signaux en fonction de l'angle 0 pour les groupements CH, CH2, CH3 : DEPT 1.2 0.**8** 

107



0.6

On remarquera la similitude avec les résultats de l'INEPT, en considérant que là  $\pi J_{\tau}$  est remplacé par 0.

D) Comparaison entre les deux séquences DEPT et INEPT :

Ces deux séquences présentent les qualités suivantes :

- Comme nous l'avons vu précédemment, c'est une excellente méthode pour observer les noyaux de faible rapport gyromagnétique, à condition toutefois qu'ils soient couplés à des noyaux sensibles.
- De plus, cette technique est utilisable quelle que soit le signe de ce rapport, et fournit une augmentation de la sensibilité supérieure à ce que l'on obtient simplement avec l'effet Overhauser nucléaire.

Cependant les avantages du DEPT sur l'INEPT sont nombreux :

- Tout d'abord, la séquence du DEPT contient moins de pulses que celle de l'INEPT et est donc moins sujette aux imperfections et inhomogénéités de ceux-ci. Par contre, elle est plus longue, et donc intrinsèquement moins sensible.
- Ensuite, l'INEPT présente l'inconvénient de dépendre des couplages par l'intermédiaire de son délai  $\tau = \frac{1}{2J}$  à optimiser. En effet, les valeurs des couplages C-H peuvent varier considérablement d'un système de spins à un autre, et dans ce cas, si l'on optimise la séparation des groupements CH, CH₂, CH₃ pour un cas précis, il y a peu de chance que ceci convienne pour les autres. Dans le DEPT, les intensités sont indépendantes de J' et dépendent uniquement de  $\theta$  au premier ordre. Elles diffèreront des valeurs théoriques si la période  $\frac{1}{2J}$  n'est pas adéquate, mais cet effet est moindre car de second ordre.
- Enfin, le DEPT fournit, à la différence de l'INEPT, des multiplets non distordus.

#### 

En considérant tous les avantages énumérés précédemment, nous avons préféré réaliser les éditions de spectre par l'expérience de DEPT sur les oligosaccharides. Les trois DEPT les plus couramment utilisés ont été appliqués sur le pentasaccharide P1, et les spectres obtenus sont représentés sur la figure  $\nabla$ -28.



Le DEPT 45 permet, par comparaison directe avec le spectre classique, de déterminer ne les carbones quaternaires. Ceux-ci peuvent en effet bénéficier de l'aimantation donnée les par protons, puisqu'ils ne sont pas liés à ces noyaux, et donc le

109

DEPT 45 (comme les DEPT 90 et 135) élimine leurs signaux. Le DEPT 90 supprime les signaux ¹³C appartenant aux groupements  $CH_2$ ,  $CH_3$ , ne gardant donc que les CH. Le DEPT 135, conformément à la figure  $\Sigma$ -27, sépare les  $CH_2$  des autres signaux en les faisant apparaître négatifs. Ainsi, tous les différents systèmes de spins (AX_n où 0 ≤ n ≤ 3) peuvent être distingués, ce qui facilitera l'interprétation de la corrélation hétéronucléaire à deux dimensions.

* * * * *

#### **REFERENCES** :

1)

- D. T. Pegg, M. R. Bendall et D. M. Doddrell : J. Magn. Res. **44**, 238 (1981)
- 2) G. A. Morris et R. Freeman : J. Am. Chem. Soc. 101, 760 (1979)
- 3) M. R. Bendall, D. T. Pegg, D. M. Doddrell, J. Field : J. Magn. Res. 51, 520 (1983)
- D. Neuhaus, J. Keeler et R. Freeman :
   J. Magn. Res. 61, 553 (1985)
- 5) A. Shaka et R. Freeman : J. Magn. Res. **50**, 502 (1982)
- 6) G. Bodenhausen et D. J. Ruben :Chem. Phys. Lett. 69, 185 (1980)
- 7) M. R. Bendall, D. T. Pegg et D. M. Doddrell : J. Magn. Res. 45, 8 (1981)
- B) D. T. Pegg, D. M. Doddrell, W. M. Brooks et
   M. R. Bendall :
   J. Magn. Res. 44, 32 (1981)
- 9)
- D. M. Doddrell, D. T. Pegg et M. R. Bendall : J. Magn. Res. **48**, 323 (1982)

CHAPITRE VI

EXPERIENCES A DEUX DIMENSIONS (PRINCIPES GENERAUX)



#### **VI-1**) Introduction :

Le FID obtenu lors d'une expérience à une dimension est une fonction du temps d'acquisition  $t_2$ ,  $s(t_2)$ , qui fournit le spectre des fréquences de précession après transformation de Fourier. On peut donc le représenter comme un vecteur dans la base des points discrétisés après échantillonnage.

L'expérience à deux dimensions consiste en une suite d'expériences à une dimension identiques à un paramètre près. Ce paramètre varie linéairement de l'une à l'autre, et doit conduire à une évolution périodique du FID en fonction du temps (de même que  $s(t_2)$  est une fonction périodique de  $t_2$ ). Dans la plupart des expériences à deux dimensions actuelles, c'est un temps d'évolution, noté  $t_i$ , qui est incrémenté régulièrement entre chaque FID. Le schéma général des expériences à deux dimensions peut donc être représenté par :



# FIGURE VI-1

Etapes constituant une expérience à deux dimensions P : préparation E : évolution M : mélange D : détection

L'étape de préparation est la même que dans les expériences à une dimension multipulsées, c'est à dire un long délai destiné au retour à l'équilibre, suivi d'un ou plusieurs pulses. Pendant la période d'évolution (variable), les spins perturbés subissent les effets de déplacement chimique et de couplage. Le temps de mélange est constitué de pulses et délais de longueurs fixées.



Réalisation d'une expérience à deux dimensions : double transformation de Fourier

Remarques :

Dans certaines expériences à deux dimensions, la période
d'évolution possède en son centre un pulse destiné à supprimer
les effets de déplacement chimique dans la seconde dimension.
Le temps de mélange est absent de quelques expériences.

On obtient donc une matrice correspondant aux valeurs de la fonction  $s(t_2, t_1)$ , qui après double transformation de Fourier fournira une "carte" mettant en évidence des interactions entre noyaux (ceci sera détaillé ultérieurement).

On peut imaginer de la même façon des expériences à trois dimensions où deux paramètres sont variables et indépendants dans chaque FID. Il suffit de posséder un ordinateur capable de traiter de tels espaces et d'effectuer de triples transformées de Fourier.

Le schéma-type de telles expériences se présentera alors comme suit :



#### FIGURE VI-3

Etapes constituant une expérience à trois dimensions.

Ainsi, si l'on réalise  $n_1$  FID constitués de  $n_2$  points dans lesquels le premier paramètre est fixe et le second incrémenté, et que l'on répète  $n_3$  fois ces FID en incrémentant pour chaque série le deuxième paramètre, alors l'espace obtenu après triple transformation de Fourier est un cube  $n_2 \times n_1 \times n_3$  qui contient des éléments de volume indiquant des transferts d'informations entre noyaux.

De telles expériences commencent à être étudiées (1,2) mais ne feront pas ici l'objet d'une analyse plus détaillée.

115

DI-2) COSY et dérivés :

La première expérience à deux dimensions (J. Jeener (3)) fut une corrélation homonucléaire, proposée pour déterminer les connectivités dans les différents systèmes de spins : COSY : COrrelation SpectrocopY.

Cette expérience de base a largement été développée (4,5,6) et quelques modifications de base permettent maintenant aussi :

- de détecter les petits couplages (7,8,9),
- de déterminer leur signe (7,8),
- de supprimer les pics de solvant (10,11),
- de supprimer les déplacements chimiques dans la seconde dimension F1 (12).

Regardons la séquence de base du COSY d'un peu plus près (Celle-ci sera détaillée dans le chapitre VII).



# FIGURE VI-4

Séquence de base du COSY

Pendant le temps d'évolution, il y a transfert d'aimantation entre les noyaux par interaction scalaire (on considère que les phénomènes de relaxation n'ont pas le temps de s'exprimer). Ainsi, un spin i précessant à  $\omega_i$  subit une dégénérescence de ses différents états d'énergie grâce au couplage avec un noyau j. Du point de vue représentation vectorielle, le spin est séparé en deux composantes qui se décalent progressivement (cf. paragraphe sur le couplage dans le chapitre II). De plus, ces composantes provenant d'un transfert d'énergie avec l'autre noyau, possèdent des différences de population caractéristiques du spin j, ce qui sera détecté après le pulse de lecture lors de l'acquisition (t₂) (ces différences étant représentables par des composantes non nulles selon z, on peut comprendre qu'un pulse 90° permet de les basculer dans le plan transverse et donc de les détecter).

Le déplacement chimique et le couplage étant des phénomènes oscillatoires, on récupère après double transformation de Fourier, outre les taches diagonales qui correspondent aux spins qui n'ont pas transféré leur aimantation, des taches hors diagonale ou pics croisés (en anglaís "cross-peaks") qui indiquent des connections scalaires entre noyaux.

Par exemple, pour reprendre le cas précédent, on obtient deux taches diagonales de coordonnées  $(\omega_i, \omega_i)$  et  $(\omega_j, \omega_j)$  dans la base  $(F_2, F_1)$  et deux taches symétriques par rapport à cette diagonale  $(\omega_i, \omega_j)$  et  $(\omega_j, \omega_i)$ , qui indiquent que les noyaux sont couplés scalairement.



### FIGURE VI-5

Exemple de matrice montrant une corrélation homonucléaire.

117

#### VI-3) Cycles de phase :

Dans la plupart des techniques de RMN pulsée, les procédures de cyclage de phase font partie intégrante des séquences (13,14). En particulier, pour l'obtention de résultats corrects et interprétables lors de la réalisation d'une expérience à deux dimensions, il est nécessaire de tenir compte de plusieurs paramètres et d'effectuer certaines améliorations aux séquences de phases classiques. En effet, pour les expériences à double transformée de Fourier, les cyclages de phases ont plusieurs objectifs :

- 1- assurer un cycle de quadrature optimum dans la première dimension (F2),
- 2- éliminer les artefacts dus aux imperfections de pulses,
- 3- supprimer les signaux parasites pouvant apparaître dans la dimension F1 :

o pics axiaux qui résultent de la magnétisation longitudinale présente au début du temps de mélange et provenant de la relaxation spin-réseau pendant t1.

D autres signaux non modulés.

4- permettre la séparation des fréquences positives et négatives apparaissant normalement dans la seconde dimension.

Nous allons revenir sur chaque point, car les corrections et optimisations de phase, si elles sont utiles mais non fondamentales dans les expériences à une dimension, sont par contre impératives dans les expériences à deux dimensions, et constituent le plus souvent des obstacles à la réalisation de mesures de bonne qualité.

# VI-3-1) Optimisation de la quadrature :

Il s'agit du même problème que pour une expérience classique (1D), on emploie donc le cycle de phase CYCLOPS traité dans le chapitre II, combiné avec les autres cyclages.

119

VI-3-2) Compensation des imperfections de pulses :

Des signaux parasites peuvent apparaître sur la matrice lorsque les pulses sont inhomogènes en amplitude et en phase.

a) Erreurs d'amplitude :

Si l'on considère une séquence deux dimensions dans laquelle le pulse de refocalisation n'est pas exactement 180°, celle-ci n'est pas complète, et un problème survient (15) : La magnétisation longitudinale apparaissant après la première partie du temps d'évolution (due à la relaxation occurant pendant le délai ti/2) est basculée par le pulse 180° imparfait de telle manière que le vecteur résultant possède une composante non nulle dans le plan transverse :



# FIGURE DI-6

Action d'un pulse 180 impartait sur les composantes longitudinales de la magnétisation. La solution pour s'affranchir de ce problème consiste à réaliser une alternance  $\phi$ ,  $-\phi$  de la phase de ce pulse et une addition cohérente d'un nombre pair d'acquisitions.

pulse 90°	pulse 180°	Récepteur
×	×	+
×	-×	+

Ainsi, on parvient à une compensation des imperfections d'amplitude du pulse :





1+2



# FIGURE DI-7

Correction des imperfections de pulses : alternance de phase d'une acquisition sur l'autre. La même méthode est utilisée pour éliminer la magnétisation transverse interférant dans une expérience de mesure de T₁ par inversion-recouvrement.

Pour le COSY, si le premier pulse n'est pas un pulse 90° exactement, on récupèrera là encore une composante non nulle selon z qui peut être éliminée par le cycle de phase suivant :

pulse 90°	pulse 90°	Récepteur
×	×	+
×	-×	+

En fait, dans ce cas, le problème revient à considérer la suppression des pics axiaux, ce qui est traité dans le paragraphe suivant (on constatera que l'on aboutit bien au même cycle de phase).

b) Décalage de phase (cas du COSY) :

Si la phase du premier pulse n'est pas constante et subit une variation aléatoire d'une expérience à l'autre, le signal d'évolution (en F1) n'est plus tout à fait sinusoïdal, et présente des points aberrants.

Pour remédier à cela, une rotation de 90° du second pulse à l'intérieur d'un seul FID suffit :

pulse 90°	pulse 90°	Récepteur
×	×	+
- <b>X</b>	У	· +

# II-3-3) Suppression des signaux non modulés dans F₁ :

Tous les signaux non modulés sinusoïdalement pendant le temps d'évolution apparaissent à fréquence nulle dans la seconde dimension, et sont donc dénommés <u>pics axiaux</u>.

Ils sont la plupart du temps dûs à des phénomènes de retour à l'équilibre de la magnétisation, et sont donc plus fréquents lorsque l'on travaille avec des échantillons relaxant très rapidement. En effet, pendant la période d'évolution, l'aimantation basculée dans dans le plan xy subit l'effet de la

121

relaxation, et sa composante transverse décroit de façon exponentielle pendant que sa composante longitudinale augmente. C'est pourquoi, si ti est incrémenté linéairement d'une expérience à l'autre, l'intensité du signal récupéré après le pulse de lecture varie exponentiellement, mais non périodiquement (au pire, à l'échelle des ti utilisés, ce sera une droite). Ainsi, après la double transformation de Fourier, on récupère, pour chaque tache normale sur la matrice, un signal à fréquence nulle dans Fi :



suporession des pite exteux. Tous est traité dans le paragraphe suivant (on constaters jus l'on aboutit bien au mêns

#### FIGURE DI-9

Représentation des pics axiaux dans une matrice 2D

Ces pics axiaux peuvent être éliminés par simple inversion de la phase du pulse de lecture d'une acquisition à l'autre, ce qui inverse leur signe et laisse invariant celui des pics diagonaux et des taches de corrélation.

Decalage de chave (cas du COSV)

#### Pour le COSY :

pulse 90°	pulse 90°	Récepteur
×	×	+
×	-×	+

#### QI-3-4) Quadrature en Fi :

De la même manière que dans la première dimension un seul signal périodique ne permet pas, après transformation de Fourier simple, de séparer les fréquences symétriques par rapport à la fréquence 0 (fréquence de la porteuse), l'évolution périodique du signal en fonction de ti, fournit, après la seconde transformation de Fourier, des taches images, symétriques par rapport à la fréquence O de la seconde dimension. Ceci est encore explicable par le fait que cette évolution périodique constitue simplement une fonction réelle (non complexe), dont la transformée de Fourier ne peut être qu'une fonction paire.

Ainsi, on distingue deux sortes de pics :

pics d'antiécho, ou pics P, sont les pics qui - les correspondent à la précession dans le même sens dans ti et t2, pics d'écho, ou pics N, correspondent à des précessions - les en sens inverse pendant ti et t2.



# FIGURE VI-10

Pics N et P dans une matrice 2D d : pics diagonaux c : pics de corrélation a : pics axiaux

A partir du moment où la fréquence de la porteuse est située dans la gamme spectrale, la suppression d'une de ces deux classes de pics est absolument nécessaire pour envisager l'analyse d'une matrice compliquée en évitant les recouvrements entre pics P et pics N, et permettre de réduire la largeur spectrale de la deuxième dimension par 2 (et donc, pour la même résolution en F1, de diviser le nombre d'expériences par 2). La solution consiste à simuler un deuxième canal décalé de 90° pour la détection en F1, c'est à dire compléter le signal d'évolution selon t1 purement réel en signal complexe.

Deux méthodes sont alors utilisables :

 La première consiste à réaliser deux expériences pour chaque valeur de t1, en décalant la phase du signal d'évolution de 90°:



+N +P



-N +P

#### FIGURE VI-11

Le décalage de la phase permet d'envisager la sélection des pics N ou P selon que l'on change ou non la phase du récepteur. Par exemple, dans le cas du COSY, le cycle de phase devra être :

pulse 90°	pulse 90°	Récep	teur
		<u>type N</u>	<u>type P</u>
×	×	+	+
×	У	-	· +

Combiné avec le cycle de suppression des pics axiaux, cela donne :

pulse 90	)° pulse	90°	Récepteur		
			<u>type N</u>	<u>type P</u>	
×	×		+	+	
×	-x		+	+	
×	y.		-	+	
×	y		·	+	

EXORCYCLE (15)

Enfin, pour la détection en quadrature dans les deux dimensions, il faut combiner EXORCYCLE et CYCLOPS. Ainsi, pour la sélection des pics N, on aboutit à :

pulse 90°	pulse 90°	Récepteur
×	×	+A +B
×	-×	+A +B
×	У	-A -B
×	-y	-A -B
У	У	-B +A
Y	-y	-B +A
Y ·	-x	+B –A
У	×	+B –A
-×	Y	+A +B
×	-y	+A +B
-x	-×	-А -В
-×	×	-A -B
-y	-x	-B +A
-у	×	-B +A
-y	-у	+B –A
-у	y ·	+B –A

Les pics P sont moins intéressants (i.e. le COSY type P est moins sensible que le N), car :

- le récepteur n'est pas cyclé sur les quatre phases.
- les pics P ne bénéficient pas de l'effet d'écho réalisé pour les pics N. En effet, puisque le sens de précession des vecteurs N est inversé lorsqu'ils passent de t1 à t2, les effets d'inhomogénéité sont compensés pendant cette dernière période :





FIGURE VI-12Evolution des vecteurs N pendant t1 et t2

La refocalisation complète survient lorsque  $t_1 = t_2$ , c'est pourquoi en observant le FID en cours de réalisation pendant l'expérience, on peut connaître la valeur correspondante de  $t_1$  à partir du maximum du signal :



# FIGURE VI-13

Forme habituelle des FID d'une expérience de corrélation.

Par contre, les effets d'inhomogénéité sont accentués pour les vecteurs correspondant aux pics d'antiécho, les rendant beaucoup moins intéressants.

Un tel cyclage de phase (où chaque point dans la dimension F1 est considéré comme complexe) ne permet cependant pas d'obtenir après double transformation de Fourier une matrice "phasable". En effet, on ne peut obtenir de cohérence de phase entre les deux dimensions, puisque le signal recueilli selon la dimension F1 ne contient aucune information de phase, et entraîne donc une distorsion pour les taches de corrélation. Ceci peut poser des problèmes, car il est nécessaire de traiter de telles matrices en valeur absolue, et lors de cette transformation, une perte de résolution effective est observée. 2) la deuxième méthode permet, elle, d'obtenir des matrices phasables. Il s'agit de la méthode TPPI, développée par plusieurs équipes (16,17).

Cette méthode, dont les initiales signifient " time-proportional phase incrementation " consiste à réaliser la quadrature en Fi en changeant la phase du signal d'évolution de 90° d'une expérience à l'autre. Pour les systèmes ne possédant qu'un seul détecteur, ceci est généralement effectué incrémentant la phase du en premier pulse (pulse de préparation) de 90°, et en divisant l'incrément du temps d'évolution par 2. Ceci fournit, dans la seconde dimension, un signal comparable à celui d'un FID de la première dimension, où point sur deux est décalé de 90° (points réels นก et imaginaires). Ainsi, en utilisant la même transformation de Fourier dans les deux dimensions, on obtient une matrice correspondant non seulement à une double détection en quadrature, mais aussi possédant une cohérence de phase entre  $F_2$  et  $F_1$ .

PROJECTIONS

F₂ F٩

# CONTOUR



# FIGURE DI-14

Projections et contour d'une tache de corrélation pour une matrice phasée.

Pour les systèmes à deux détecteurs séparés (système Nicolet), une première série d'expériences est réalisée et stockée dans la moitié inférieure du fichier, puis la phase du premier pulse est incrémentée de 90°, et une deuxième série d'expériences est faite puis stockée dans la seconde moitié.

Le cycle de phase du COSY est donc :

	pulse 90°	pulse 90°	Récepteur
FID i	×	×	+
FID (i+1)	У	×	+
FID (i+2)	-×	×	+
FID (1+3)	-у	×	+



i = 4k + 1, avec  $k \in \mathbb{N}$ 

En combinant avec le cycle de correction des pics axiaux, on obtient (toujours avec l'incrémentation de 90° de la phase du premier pulse) :

pulse 90° (FID i)	pulse 90°	Récepteur
×	×	+
×	-×	+

et l'optimisation de la quadrature dans les deux dimensions conduit au cycle de phase :

pulse 90°	pulse 90°	Récepteur
×	×	+A +B
×	-×	+A +B
-×	×	-A -B
-×	-×	-A ~B
У	У	-B +A
У	-y	-B +A
-y	У	+B -A
-y	-y .	+BA

Ce chapitre a traité les expériences bidimensionnelles sous forme très générale pour définir les principes de base nécessaires à la réalisation pratique des séquences en s'affranchissant des divers artéfacts propres à l'expérience ou à l'appareillage.

Le contenu informatif de telles expériences est en fait lié à la nature de ce qui est transmis après le pulse de préparation, donc dépend des séquences d'impulsions, ainsi que des temps d'évolution et de mélange. Cependant, la connaissance de ces paramètres ne suffit pas, puisqu'il importe de déterminer les cycles de phase adéquats ; ceux-ci sont facilement calculables à partir des règles décrites dans ce chapitre, et il est alors possible de concevoir de nouvelles séquences mono- et bidimensionnelles pour d'autres applications en RMN. Les chapitres suivants montrent comment il est possible de

sélectionner judicieusement les transferts d'aimantation entre noyaux, avec les expériences 2D classiques (chapitres VI-VI).

+ + + + +

#### **REFERENCES** :

- 1) G. W. Vuister and R. Boelens : J. Magn. Res. **73**, 328 (1987)
- 2) C. Griesinger, D. W. Sørensen and R. R. Ernst : J. Magn. Res. 73, 574 (1987)
- 3) J. Jeener : Ampere International Summer School Basko Polje, Yugoslavia (1971)
- 4) R. R. Ernst : ☑Ith International Conference on Magnetic Resonance on Biological Systems, Kandersteg, Switzerland (1974)
- 5) W. P. Aue, E. Bartholdi et R. R. Ernst : J. Chem. Phys. **64**, 2229 (1976)
- K. Nagayama, A. Kumar, K. Wüthrich et R. R. Ernst :
   J. Magn. Res. 40, 321 (1980)
- 7) A. Bax, R. Freeman :
   J. Magn. Res. 44, 542 (1981)
- B) A. Kumar, R. V. Hosur et K. Chandrasekhar:
   J. Magn. Res. 60, 143 (1984)
- 9) C. Griesinger, D. W. Sorensen et R. R. Ernst :
   J. Am. Chem. Soc. 107, 6394 (1985)
- 10) P. J. Hore : J. Magn. Res. 55, 283 (1983)
- G. A. Morris et K. I. Smith :
   J. Magn. Res. 68, 526 (1986)
- 12) W. P. Aue, J. Karhan et R. R. Ernst :J. Chem. Phys. 64, 4226 (1976)

- 13) A. D. Bain :
   J. Magn. Res. 56, 418 (1984)
- 14) D. Piveteau, M. A. Delsuc et J. Y. Lallemand : J. Magn. Res. 63, 255 (1985)
- 15) G. Bodenhausen, R. Freeman et D. L. Turner : J. Magn. Res. 27, 511 (1977)
- 16) D. Marion et K. Wüthrich : Biochem. Biophys. Res. Comm. 113, 967 (1983)
- 17) G. Bodenhausen, H. Kogler et R. R. Ernst : J. Magn. Res. 58, 370 (1984)

133 CHAPITRE DI EXPERIENCES DE CORRELATION SCALAIRE A DEUX DIMENSIONS



Ces expériences ont pour but de mettre en évidence le fait que deux noyaux (de même nature ou non) sont couplés scalairement dans la molécule, ce qui implique le plus souvent qu'ils sont séparés par un nombre faibles de liaisons chimiques autorisant le transfert d'information via les électrons de valence. Elles reposent donc sur les principes de transferts d'aimantation dont les principes généraux ont été établis et démontrés au chapitre  $\underline{\nabla}$ .

VII-1) Corrélations hétéronucléaires :

# ☑I-1-1) Introduction :

Une très grande variété d'expériences de corrélations hétéronucléaires existe, et la liste s'est considérablement allongée depuis que les expériences de type reverse ont été créées. Notre but n'est pas ici de les décrire toutes, mais plutôt de présenter leur principe de base par des méthodes simples. La plupart de ces séquences sont utilisées pour la détermination des couplages scalaires entre ¹³C et ¹H directement liés, mais nous raisonnerons sur un système général AX, puisque toute paire de noyaux de spins nucléaires non nuls peut être choisie.

UI-1-2) Description de l'expérience de base (d'après (1)) :

On réalise l'expérience suivante :



# FIGURE VII-1

Expérience de corrétation hétéronucléaire(séquence de base).

Considérons un système de deux spins 1/2 couplés scalairement : (Système AX isolé, de couplage  $J_{AX} > 0$ )

A l'équilibre, on retrouve le diagramme d'énergie du chapitre I, avec les populations :

 $P_{1} = 1 + P_{A} + P_{X}$   $P_{2} = 1 - P_{A} + P_{X}$   $P_{3} = 1 + P_{A} - P_{X}$   $P_{4} = 1 - P_{A} - P_{X}$ 

rappet :

$$p_{A} = \frac{\gamma_{A}B_{0}\hbar}{2kT} \qquad p_{X} = \frac{\gamma_{X}B_{0}\hbar}{2kT}$$



#### FIGURE VI-2

Diagramme d'énergie d'un système AX isolé (couplages faibles). Les fréquences de transitions A et X sont indiquées entre les niveaux concernés.

Le pulse  $90_x^*$  appliqué sur le noyau X crée la magnétisation transverse (figures 3,4,5). Si l'on considère un référentiel fixe, pendant le temps t₁ le vecteur se scinde en deux

composantes qui précessent à des fréquences angulaires  $\Omega_{13} = \Omega_0 - \pi J_{AX}$  et  $\Omega_{24} = \Omega_0 + \pi J_{AX}$  et qui possèdent des amplitudes  $M_0^{(X)}$  respectivement égales à  $P_1 - P_3$  et  $P_2 - P_4$ . Ainsi, après un temps  $t_1$ , les vecteurs ont décrit des angles égaux à  $\Omega_{13}t_1$  et  $\Omega_{24}t_1$  par rapport à leur position d'origine. Le second pulse  $90^{\circ}_{X}$  bascule la composante en y des vecteurs magnétisation sur l'axe z (figure 6).



Evolution des vecteurs magnétisation X (représentation par vecteurs d'Heisenberg) au cours de la séquence de corrélation hétéronucléaire.

3) état d'équilibre 4) après le premier pulse 90 5) à la fin du temps d'évolution 6) après le second pulse 90

A cet instant on a :

$$\begin{pmatrix} M_{z \ 13}^{(\times)} = - M_0^{(\times)} \cos (\Omega_{13} t_1) \\ \\ M_{z \ 24}^{(\times)} = - M_0^{(\times)} \cos (\Omega_{24} t_1) \end{pmatrix}$$

Puisque la magnétisation longitudinale est directement proportionnelle aux différences de population des niveaux d'énergie, celles-ci deviennent :

 $p_{1}(t_{1}) = 1 + p_{A} - p_{X} \cos (\Omega_{13}t_{1})$  $p_{2}(t_{1}) = 1 - p_{A} - p_{X} \cos (\Omega_{24}t_{1})$  $p_{3}(t_{1}) = 1 + p_{A} + p_{X} \cos (\Omega_{13}t_{1})$  $p_{4}(t_{1}) = 1 - p_{A} + p_{X} \cos (\Omega_{24}t_{1})$  Ces équations montrent que la magnétisation longitudinale du noyau A a changé, puisque de l'état d'équilibre où :

 $\begin{pmatrix} M_0^{(A)} & \text{proportionnel à } p_1 - p_2 = 2p_A \\ \text{et aussi} & & \\ M_0^{(A)} & \text{proportionnel à } p_3 - p_4 = 2p_A \end{pmatrix}$ 

on est passé à :

$$\begin{pmatrix} p_{1} - p_{2} = 1 + p_{A} - p_{X} \cos(\Omega_{13}t_{1}) - 1 + p_{A} + p_{X} \cos(\Omega_{24}t_{1}) \\ = 2p_{A} + p_{X} (\cos(\Omega_{24}t_{1}) - \cos(\Omega_{13}t_{1})) \\ p_{3} - p_{4} = 1 + p_{A} + p_{X} \cos(\Omega_{13}t_{1}) - 1 + p_{A} - p_{X} \cos(\Omega_{24}t_{1}) \\ = 2p_{A} + p_{X} (\cos(\Omega_{13}t_{1}) - \cos(\Omega_{24}t_{1}))$$

ce qui implique que :

$$\begin{pmatrix} M_{z \ 12}^{(A)} = M_{0}^{(A)} + \frac{1}{2} M_{0}^{(X)} (\cos(\Omega_{13}t_{1}) - \cos(\Omega_{24}t_{1})) \\ M_{z \ 34}^{(A)} = M_{0}^{(A)} + \frac{1}{2} M_{0}^{(X)} (\cos(\Omega_{24}t_{1}) - \cos(\Omega_{13}t_{1})) \end{pmatrix}$$

De plus, on a  $M_0^{(\times)} = \frac{\gamma_{\chi}}{\gamma_A} M_0^{(A)}$ 

Le signal détecté après un pulse 90° sur A qui bascule la magnétisation dans le plan transverse est donc :

$$S(t_{1},t_{2}) = M_{z_{12}}^{(A)} e^{i\Omega_{12}t_{2}} + M_{z_{34}}^{(A)} e^{i\Omega_{34}t_{2}}$$

$$= M_{0}^{(A)} \left\{ 1 + \frac{\gamma_{x}}{2\gamma_{A}} [\cos(\Omega_{13}t_{1}) - \cos(\Omega_{24}t_{1})] \right\} e^{i\Omega_{12}t_{2}}$$

$$+ M_{0}^{(A)} \left\{ 1 + \frac{\gamma_{x}}{2\gamma_{A}} [\cos(\Omega_{24}t_{1}) - \cos(\Omega_{13}t_{1})] \right\} e^{i\Omega_{34}t_{2}}$$

La transformée de Fourier de ce signal selon t₂ fournit deux pics aux fréquences A (Carbone 13 par exemple)  $\Omega_{12}$  et  $\Omega_{34}$ ,
d'amplitudes : 
$$1 + \frac{\tau_x}{2\tau_A} [\cos(\Omega_{13}t_1) - \cos(\Omega_{24}t_1)]$$
et  
 $1 + \frac{\tau_x}{2\tau_A} [\cos(\Omega_{24}t_1) - \cos(\Omega_{13}t_1)]$ respectivement.  
La seconde transformée de Fourier - selon  $t_1$  - fera apparaître  
six pics sur la matrice finale, de coordonnées (base( $F_2, F_1$ )):

Les deux pics axiaux  $(\Omega_{12}, 0)$  et  $(\Omega_{34}, 0)$  proviennent des composantes non modulées selon t₁, et peuvent être supprimés par un cycle de phase adéquat (cf. chapitre  $\overline{\Omega}$ ).



FIGURE DI-7

Exemple de matrice obtenue pour une corrélation ¹³C - ¹H réalisée avec la séquence de base.  $\Pi$ -1-3) Améliorations de la séquence de base (2) :

a) Découplage du noyau X pendant la détection :



Expérience de corrélation hétéronucléaire avec découplage des noyaux X pendant l'acquisition des signaux de A.

La matrice résultante est simplifiée, car dans la première dimension (fréquence du noyau A) il n'y a plus qu'un pic (suppression du couplage hétéronucléaire pendant la détection).





b) Suppression du couplage hétéronucléaire pendant t₁ (3):



10000 24 10

Séquence complète de corrélation hétéronucléaire permettant la suppression des couplages hétéronucléaires dans les deux dimensions.

On réalise un écho de spin (séquence  $\tau = 180^{\circ} = \tau$ ) qui a pour effet de supprimer les effets de couplage pendant la période d'évolution. Il ne reste donc plus, si l'on fait la projection de la matrice sur l'axe de la deuxième dimension (noyau X) qu'un seul pic :





FIGURE VI-11

Corrélation  ${}^{13}C$  -  ${}^{1}H$  obtenue avec la séquence II-10.

c) Suppression des couplages homonucléaires X-X (4,5) :



#### FIGURE VI-12

Expérience de corrélation hétéronucléaire permettant la suppression de tous les couplages hétéronucléaires (dans les deux dimensions) et des couplages homonucléaires X-X vicinaux.

 $\begin{bmatrix} X & 90'_{x} - 180'_{x} - 90'_{-x} \\ - 180'_{x} - 180'_{-x} \end{bmatrix}$ 

La séguence

agit comme un simple pulse

180° sur les noyaux X non couplés à des noyaux A, alors que les autres ne sont pas affectés. Ainsi, un noyau X lié d'une part à un carbone 13 et d'autre part à un autre noyau X (qui n'a que très peu de chance d'être couplé à un ¹³C) voit les effets de couplage homonucléaire avec ce noyau se compenser entre les deux périodes, et donc disparaître. 13 1 VII-1-4) <u>Applications : correlation C - H</u>

Les expériences de corrélation  ${}^{13}C - {}^{1}H$  ont été réalisées sur le pentasaccharide P1 et sur l'hexasaccharide H1 en utilisant la séquence modifiée de façon à faire disparaître les couplages homonucléaires  ${}^{1}H - {}^{1}H$ .

La figure VI-13 montre un contour de la matrice complète pour le pentasaccharide P1.

Afin de faciliter l'analyse de cette matrice, deux extensions du contour sont présentées sur la figure  $\overline{\Omega}I-14$ .

La figure  $\Sigma II-14(a)$  montre la corrélation ¹³C - ¹H dans la région des carbones anomériques 99 - 105 ppm. La région correspondante du spectre proton montrée en "projection" verticale permet d'identifier immédiatement les signaux des protons corrélés et met en évidence en particulier le fait que le doublet à 4.7 ppm en proton ne correspond pas à un anomérique.

La position du carbone portant ce proton est visible au contraire sur la figure  $\Omega$ I-14(b) (à partir du déplacement chimique proton) et apparaît à 73.1 ppm.

Un phénomène intéressant est également noté sur cette figure : on remarque qu'aucune corrélation n'est observable pour les trois carbone de type CH2 (C6 des glucosamines) dans la région 67 - 69 ppm. Nous savons par l'expérience de DEPT que ces carbones correspondent aux CH2. Ce phénomène est très courant dans le cas des oligosaccharides, et repose sur le fait que l'expérience utilise une séquence de suppression des couplages vicinaux ¹H - ¹H, qui n'affecte pas les couplages géminés entre les deux protons d'un tel groupement. En effet, dans ce dernier cas, les deux protons liés à un carbone 13 voient leurs populations inversées en même temps par le pulse 180 (H) central, et les effets de couplage entre eux ne sont pas refocalísés. Ceci implique donc une dispersion de ces signaux sur la matrice, et comme leur intensité est déjà moins grande que celle des systèmes C-H simples (les délais n'étant pas optimisés pour eux), ils n'apparaissent la plupart pas sur la matrice. Si l'on pouvait les voir, la corrélation devrait montrer quatre taches, mais la dilution de l'information



FIGURE VI-13

Contour complet de la corrélation ¹³C - ¹H pour P1. Les tracés des "projections" F1 et F2 sont constitués par les spectres proton et carbone et ne correspondent donc pas aux projections réelles de la matrice.



## FIGURE DI-14

Extensions de la figure VII-12 montrant les corrélations dans les régions anomériques (a) et non anomériques (b).

conduit à des taches trop faibles perdues dans le bruit de fond. Elles ne sont visibles que si des concentrations supérieures sont disponibles ; cet artéfact limite souvent l'intérêt de ce type d'expérience pour l'analyse des spectres carbone.

La figure ⊠I-15 montre de la même façon les résultats obtenus ont toutes l'hexasaccharide Н1. Les taches été avec interprétées grâce à l'attribution complète des protons par les qui seront détaillées dans les paragraphes et techniques chapitres suivants. En ce qui concerne les carbones de la région des anomériques (figure VII-15 (a)), on constate que celui situé à 109 ppm donne une corrélation avec son proton à 6.0 ppm, c'est à dire en dehors des valeurs classiques pour un proton anomérique. Il s'agit en effet du attendues signal correspondant au carbone 4 de l'unité insaturée A. Les corrélations constituent six taches confirmant la autres structure hexasaccharidique. Sur la figure VII-15 (b), on peut de même que précédemment l'absence de corrélations remarquer dans la région 67-69 ppm correspondant au Ce des glucosamines pour les mêmes raisons que celles évoquées pour P1.

Les corrélations hétéronucléaires ¹³C - ¹H permettent donc de certaines ambiguïtés concernant les structures des lever oligosaccharides et souvent de confirmer les attributions des Toutefois elles restent d'une utilité limitée en protons. raison des concentrations importantes requises ( supérieures à 20 mM). Elles ne peuvent donc être considérées que comme approches de confirmation, mais non utilisables en méthodes systématiques dans le cadre d'une stratégie générale d'étude d'oligosaccharides en conditions naturelles, c'est à dire avec de faibles quantités. L'obtention de ce type d'information en inverse (détection indirecte ¹H - ¹³C) ouvrira peut-être mode de nouvelles perspectives, mais dans le cas de ces systèmes, le gain de sensibilité ne sera pas énorme, et des champs très élevés resteront nécessaires pour l'obtention de résultats univoques.

Il serait sans doute important de disposer de données sûres et précises en RMN du ¹³C sur des composés simples, afin de constituer une banque de données permettant d'orienter rapidement l'attribution des spectres carbone.



Corrélation ¹³C - ¹H sur l'hexasaccharide H1. (a) région des carbones anomériques (b) non anomériques.



## DI-2) Expérience de COSY :

(Corrélation homonucléaire à 2 dimensions (6))

### QII-2-1) Introduction :

Nous venons de décrire une expérience de corrélation hétéronucléaire au moyen des vecteurs d'Heisenberg et des calculs de populations des différents états d'énergie. L'expérience homonucléaire correspondante (brièvement décrite au chapitre  $\nabla I$ ) va être traitée par les opérateurs densités. Ceci permettra une interprétation complète du signe et de la forme des multiplets obtenus sur la matrice, ainsi que leur intensité respective en fonction de l'angle 0.

II-2-2) Description par les opérateurs densité : (d'après (7))

La séquence de base est décrite sur la figure QI-16. La valeur de 8 sera définie au cours de la présentation.



#### FIGURE DI-16

Soit un système  $I_1 - I_2 - I_3$  avec  $|J_{12}| > |J_{13}| > |J_{23}|$ on notera  $\begin{cases} c_i = \cos \alpha_i t_1 & s_i = \sin \alpha_i t_1 \\ c_{ij} = \cos(\pi J_{ij} t_1) & s_{ij} = \sin(\pi J_{ij} t_1) \end{cases}$ 

Si on analyse l'expérience de COSY  $\theta$  par les effets des différents opérateurs produits de la séquence en considérant uniquement au départ la magnétisation provenant de  $I_i$ , alors les opérateurs densité aux points 0 à 3 seront :

$$\sigma_0 = I_{1z}$$

$$\sigma_1 = -I_{1y}$$
 (pulse  $\frac{\pi}{2}$  selon x  $\implies \beta = \frac{\pi}{2} \phi = 0$ )

 $\sigma_2$ : pendant t₁, le vecteur magnétisation représenté par  $-I_{1y}$  précesse à la fréquence  $\nu_1$  et les couplages  $J_{12}$  et  $J_{13}$  s'expriment, séparant ce vecteur en plusieurs composantes.

- $I_{1y} \xrightarrow{\Omega_1 t_1 I_{1z}} \xrightarrow{\pi J t_1 2 I_{1z} I_{2z}} \xrightarrow{\pi J t_1 2 I_{1z} I_{3z}} \sigma_z$
- $\sigma_{2} = -c_{1}c_{12}c_{13}I_{1y} + s_{1}c_{12}c_{13}I_{1x} + c_{1}s_{12}c_{13}^{2}I_{1x}I_{2z}$  $+ s_{1}s_{12}c_{13}^{2}I_{1y}I_{2z} + c_{1}c_{12}s_{13}^{2}I_{1y}I_{3z} + s_{1}c_{12}s_{13}^{2}I_{1y}I_{3z}$  $+ c_{1}s_{12}s_{13}^{4}I_{1y}I_{2z}I_{3z} - s_{1}s_{12}s_{13}^{4}I_{1x}I_{2z}I_{3z}$

$$\sigma_3$$
: pulse  $\theta_3$  ( $\beta = \theta \quad \Phi = 0$ )

Pour plus de clarté, détaillons l'effet de ce pulse sur les opérateurs présents dans  $\sigma_2$  un par un :

1) 
$$I_{1y} \xrightarrow{\theta I_{1x}} I_{1y} \cos \theta - I_{1z} \sin \theta$$
  
2)  $I_{1x} \xrightarrow{\theta I_{1x}} I_{1x}$   
3)  $2I_{1x}I_{2z} \xrightarrow{\theta I_{1x}} \frac{\theta I_{2x}}{\theta I_{2x}} 2I_{1x}I_{2z} \cos \theta - 2I_{1x}I_{2y} \sin \theta$   
4)  $2I_{1y}I_{2z} \xrightarrow{\theta I_{1x}} \frac{\theta I_{2x}}{\theta I_{2x}} (I_{1y} \cos \theta + I_{1z} \sin \theta)(I_{2z} \cos \theta - I_{2y} \sin \theta)$   
 $= 2(I_{1y}I_{2z} \cos^{2} \theta + I_{1z}I_{2z} \cos \theta \sin \theta - I_{1y}I_{2y} \cos \theta \sin \theta - 2I_{1z}I_{2y} \sin^{2} \theta)$   
5)  $2I_{1x}I_{3z} \xrightarrow{\theta I_{1x}} \frac{\theta I_{2x}}{\theta I_{2x}} 2I_{1x}I_{3z} \cos \theta - 2I_{1x}I_{3y} \sin \theta$   
6)  $2I_{1y}I_{3z} \xrightarrow{\theta I_{1x}} \frac{\theta I_{2x}}{\theta I_{2x}} 2I_{1x}I_{3z} \cos \theta - 2I_{1x}I_{3y} \sin \theta$   
6)  $2I_{1y}I_{3z} \xrightarrow{\theta I_{1x}} \frac{\theta I_{2x}}{\theta I_{2x}} \frac{\theta I_{3x}}{\theta I_{2x}} \frac{\theta I_{3x}}{\theta I_{2x}} \frac{\theta I_{3x}}{\theta I_{1y}I_{2z}I_{3z}} \frac{\theta I_{1x}}{\theta I_{2z}} \frac{\theta I_{2x}}{\theta I_{2z}} \frac{\theta I_{3x}}{\theta I_{3x}} \frac{\theta I_{1y}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta - I_{1y}I_{2y}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta}{\theta I_{1y}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta - I_{1y}I_{2y}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta} \frac{1}{1_{1y}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta - I_{1y}I_{2y}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta}{\theta I_{1x}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta - I_{1y}I_{2y}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta} \frac{1}{1_{1x}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta} \frac{1}{1_{1z}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta - I_{1z}I_{2y}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin^{2} \theta}{\theta I_{1y}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta - I_{1y}I_{2y}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta} \frac{1}{1_{1z}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta - I_{1z}I_{2y}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin^{2} \theta}{\theta - I_{1z}I_{2z}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin \theta - I_{1z}I_{2y}I_{3z} \cos^{2} \theta \sin^{2} \theta}$ 

donc,

 $\sigma_{3}^{=}$   $= c_{1}c_{12}c_{13}I_{1y}cos\theta + c_{1}c_{12}c_{13}I_{1z}sin\theta + c_{1}s_{12}c_{13}2I_{1x}I_{2z}cos\theta$   $= c_{1}s_{12}c_{13}2I_{1x}I_{2y}sin\theta + c_{1}c_{12}s_{13}2I_{1x}I_{3z}cos\theta$   $= c_{1}c_{12}s_{13}2I_{1x}I_{3y}sin\theta + c_{1}s_{12}s_{13}4I_{1y}I_{2z}I_{3z}cos^{3}\theta$   $= c_{1}s_{12}s_{13}4I_{1y}I_{2y}I_{3z}cos^{2}\thetasin\theta - c_{1}s_{12}s_{13}4I_{1z}I_{2y}I_{3z}cos\thetasin^{2}\theta$   $= c_{1}s_{12}s_{13}4I_{1z}I_{2z}I_{3y}cos\thetasin^{2}\theta + c_{1}s_{12}s_{13}4I_{1z}I_{2z}I_{3z}cos^{2}\thetasin\theta$   $+ c_{1}s_{12}s_{13}4I_{1z}I_{2y}I_{3y}sin^{3}\theta + s_{1}c_{12}c_{13}I_{1x} + s_{1}s_{12}c_{13}2I_{1y}I_{2z}cos^{2}\theta$   $+ s_{1}s_{12}c_{13}2I_{1z}I_{2y}sin^{2}\theta + s_{1}c_{12}s_{13}2I_{1y}I_{2y}cos\thetasin\theta$   $= s_{1}s_{12}c_{13}2I_{1z}I_{2y}sin^{2}\theta + s_{1}c_{12}s_{13}2I_{1y}I_{3y}cos\thetasin\theta$   $= s_{1}c_{12}s_{13}2I_{1z}I_{3y}sin^{2}\theta - s_{1}s_{12}s_{13}2I_{1y}I_{3y}cos\thetasin\theta$   $= s_{1}s_{12}s_{13}4I_{1x}I_{2z}I_{3y}cos\thetasin\theta + s_{1}s_{12}s_{13}4I_{1x}I_{2y}I_{3z}cos^{2}\theta$   $+ s_{1}s_{12}s_{13}4I_{1x}I_{2y}I_{3y}sin^{2}\theta - s_{1}s_{12}s_{13}4I_{1x}I_{2y}I_{3z}cos^{2}\theta$   $= s_{1}s_{12}s_{13}4I_{1x}I_{2y}I_{3y}sin^{2}\theta - s_{1}s_{12}s_{13}4I_{1x}I_{2y}I_{3z}cos^{2}\theta$ 

et si l'on ne garde que les termes observables directement :

 $\sigma_{3} = -c_{1}c_{12}c_{13}I_{1y}cos\theta + c_{1}s_{12}c_{13}2I_{1x}I_{2z}cos\theta$  $+ c_{1}c_{12}s_{13}2I_{1x}I_{3z}cos\theta + c_{1}s_{12}s_{13}^{4}I_{1y}I_{2z}I_{3z}cos^{3}\theta$  $- c_{1}s_{12}s_{13}^{4}I_{1z}I_{2y}I_{3z}cos\thetasin^{2}\theta - c_{1}s_{12}s_{13}^{4}I_{1z}I_{2z}I_{3y}cos\thetasin^{2}\theta$  $+ s_{1}c_{12}c_{13}I_{1x} + s_{1}s_{12}c_{13}2I_{1y}I_{2z}cos^{2}\theta - s_{1}s_{12}c_{13}2I_{1z}I_{2y}sin^{2}\theta$  $+ s_{1}c_{12}s_{13}^{2}I_{1y}I_{3z}cos^{2}\theta - s_{1}s_{12}c_{13}^{2}I_{1z}I_{2y}sin^{2}\theta$  $- s_{1}s_{12}s_{13}^{4}I_{1x}I_{2z}I_{3z}cos^{2}\theta.$ 

A partir de ces résultats, on peut déjà différentier trois types de pics :

- les pics diagonaux, qui sont constitués par les opérateurs qui n'ont pas été touchés par le deuxième pulse ( $I_{1x}$ , donc, et les composantes cosinusoïdales des autres opérateurs de  $\sigma_2$ ),
- les pics de corrélations ("cross-peaks") constitués par les autres opérateurs, et apparaissant à  $\omega_2$  et  $\omega_3$  dans la première dimension (bien sûr à  $\omega_1$  dans la seconde),

- les pics axiaux provenant de la relaxation longitudinale qui s'exprime pendant le temps de mélange (cf. chapitre VI), non représentés ici car les calculs d'opérateurs que nous avons effectués ne tiennent pas des processus de relaxation.
- A) Cas particulier : COSY 90

$$\sigma_{3} = s_{1}c_{12}c_{13}I_{1x} - s_{1}s_{12}c_{13}I_{1z}I_{2y} - s_{1}c_{12}s_{13}I_{1z}I_{3y}$$
[1]

Chaque élément de  $\sigma_3$  représente un multiplet que l'on peut décomposer en deux parties :

- la première regroupe les termes modulés en t,,

- EX:  $c_1s_{12}c_{13}$  (=  $cos\omega_1t_1 \times sin\pi J_{12}t_1 \times cos\pi J_{13}t_1$ )
- la seconde les composantes détectables lors de l'acquisition (t₂).
- $EX : 4I_{1\times}I_{2\times}I_{3\times}$

Ainsi on peut connaître la structure détaillée de chaque multiplet constituant une tache sur la matrice de corrélation. Par exemple, étudions la structure du signal représenté par  $-s_1c_{12}s_{13}2I_{1z}I_{3y}$  dans le COSY 90 (il s'agit de la tache de corrélation 1-3 sur la matrice) ; il se décompose en  $2I_{1z}I_{3y}$  selon la dimension  $F_2$  ( $t_2$ ) et  $-s_1c_{12}s_{13}$  selon  $F_1$  ( $t_1$ ). Ces deux composantes sont analysées successivement :

a)  $2I_{1z}I_{3y}$ : la forme de la tache que constitue ce multiplet peut être déterminée :

( On rapelle que  $|J_{12}| > |J_{13}| > |J_{23}|$  )



# FIGURE $\underline{\nabla II} - 17$ Construction du multiplet $2I_{1x}I_{3y}$ .

donc ce multiplet peut être écrit sous la forme :

a₁₃{-,-,+,+}

b) -s₁c₁₂s₁₃ :

D'après les formules trigonométriques :

$$cos(a)cos(b) = \frac{1}{2} [cos(a+b) + cos(a-b)]$$

$$cos(a)sin(b) = \frac{1}{2} [sin(a+b) + sin(a-b)]$$

$$sin(a)sin(b) = \frac{1}{2} [cos(a-b) - cos(a+b)]$$

La structure du multiplet de la matrice 2D sera donc :

On a ainsi le signe relatif des pics constituant la tache de corrélation 1-3 dans le cas du COSY 90.

Comme on peut le voir à partir de l'équation [1], les matrices de COSY ont l'inconvénient de présenter des pics diagonaux et des pics de corrélation décalés en phase de 90° dans les deux dimensions. Ainsi, lorsque l'on phase de manière à ce que ces derniers, qui constituent les informations importantes de ces expériences, soient en pure absorption, on obtient une diagonale en dispersion. Ceci, après transformation en valeur absolue, donne un signal assez large, qui peut, dans certains cas, cacher les pics proches (correspondant à la corrélation entre deux noyaux de déplacements chimiques voisins). Une alternative efficace consiste à utiliser un second pulse correspondant à  $\theta \neq 90^{\circ}$  (8).

#### B) COSY 8 :

Pour le COSY  $\theta$ , les multiplets correspondant à la tache de corrélation 1-3 ( $\omega_1$  dans F₁,  $\omega_3$  dans F₂) sont :

 $\begin{array}{l} * - c_{1}s_{12}s_{13} & 4I_{1z}I_{2z}I_{3y}cos\theta \sin^{2}\theta \\ * - s_{1}s_{12}c_{13} & 2I_{1z}I_{3y} \sin^{2}\theta & traité précédemment. \end{array}$ 

Intéressons-nous à -  $c_{1}s_{12}s_{13}$  4I  $_{12}I_{22}I_{3y}cos\theta$  sin² $\theta$  :

a) dans F, :



## FIGURE DI-18

d'où  $\omega_2$ :  $a_{13}a_{23}$  {+,-,-,+}

b) dans F₁ :  

$$= C_{1}S_{12}S_{13} =$$

$$\frac{1}{4} \left\{ \cos\left[\left(\Omega_{1} - \pi(J_{12} + J_{13})\right)t_{1}\right] - \cos\left[\left(\Omega_{1} - \pi(J_{12} - J_{13})\right)t_{1}\right] \right\} \\ = \cos\left[\left(\Omega_{1} + \pi(J_{12} - J_{13})\right)t_{1}\right] + \cos\left[\left(\Omega_{1} + \pi(J_{12} + J_{13})\right)t_{1}\right] \right\}$$

soit 
$$\omega_1$$
 :  $a_{12}a_{13}\{+,-,-,+\}$ 

La structure du multiplet correspondant à ce terme dans la matrice 2D sera donc :

$$a_{12}a_{13} \begin{pmatrix} + \\ - \\ - \\ + \end{pmatrix} \times a_{13}a_{23} \{+, -, -, +\} = a_{12}a_{23} \begin{bmatrix} + - - + \\ - + + - \\ - + + - \\ + - - + \end{bmatrix}$$
  
(car  $a_{13}^2 = 1$ )

Donc la tache de corrélation 1-3 dans la matrice est constituée par la superposition des multiplets :

 $\begin{bmatrix} --++\\ ++--\\ --++\\ ++-- \end{bmatrix}$  et  $a_{12}a_{23}$   $\begin{bmatrix} +--+\\ -++-\\ -++-\\ +--+ \end{bmatrix}$ avec un facteur avec un facteur sin² $\theta$  cos $\theta$ sin² $\theta$ 

Le multiplet résultant sera ainsi fonction du produit  $a_{12}a_{23}$ donc du signe de  $J_{12}$ . $J_{23}$ :

De ce fait, la tache de corrélation 1-3 apparaîtra sous deux formes possibles suivant le signe des couplages 1-2 et 2-3 :

 $J_{12}, J_{23} > 0$ :

$$\begin{bmatrix} \odot \bigcirc \odot \odot \\ \odot \oplus \odot \bigcirc \\ \ominus \odot \ominus \odot \\ \ominus \odot \ominus \odot \end{bmatrix} \downarrow^{\omega_1}$$

 $\bigcirc$  intensité (cos $\theta$  + 1)sin² $\theta$ 

0 intensité  $(1 - \cos\theta)\sin^2\theta$ 

 $J_{12}.J_{23} < 0 :$ 

Le rapport des intensités des deux types de taches est donné par :

 $\frac{\cos\theta + 1}{1 - \cos\theta}$  qui est d'autant plus grand que  $\theta$  est petit.

La différence d'intensité entre les deux types de taches est donnée par :

 $2 \cos\theta \sin^2\theta$  qui est maximum pour  $\theta = 54°7'$ .

Il faut cependant constater que le maximum absolu (sans tenir compte des phénomènes de relaxation) pour les taches les plus intenses est obtenu pour  $\theta \simeq 70^{\circ}5'$  (maximisation de (cos $\theta$  + 1)sin² $\theta$ ). Dans ce cas le rapport d'intensité des deux types de tache est égal à 2.

En général, pour connaître le signe des produits de couplage (donc des couplages) on réalise un COSY 45 qui est un compromis entre bonne discrimination des deux types de taches et sensibilité raisonnable, et on consid**è**re l'angle de la tache de corrélation par rapport à la diagonale.

Exemple :





 $J_{12}.J_{13} > 0$  $J_{12}.J_{23} < 0$  $J_{13}.J_{23} < 0$ 

#### FIGURE DI-19

Schéma de matrice obtenue par COSY 8 montrant l'orientation des taches en fonction des signes des produits de couplage. donc, si l'on sait que  $J_{12} > 0$ alors on a :  $\begin{cases} J_{13} > 0 \\ & & !! \\ J_{23} < 0 \end{cases}$ 

Si les mêmes calculs avaient été effectués sur les opérateurs constituant une tache diagonale, on pourrait constater que celle-ci n'est pas aussi importante que dans le cas du COSY 90, ce qui est un autre avantage pour le COSY 45.

## III-2-3) Applications : corrélations homonucléaires : (9)

Les applications des expériences de corrélations homonucléaires classiques seront illustrées par des exemples concernant le pentasaccharide actif déjà utilisé pour montrer les sévères limitations des méthodes de double irradiation. Les figures  $\Sigma II-20$  à  $\Sigma II-22$  montrent le résultat d'une expérience réalisée dans des conditions standard destinées à mettre en évidence les interactions par couplage scalaire sans tentative particulière pour accentuer la sensibilité dans une gamme précise de constantes de couplage. La séquence normale décrite sur la figure  $\Sigma II-16$  avec  $\theta = 90^\circ$  a été utilisée.



#### FIGURE DI-20

Tracé tridimensionnel du résultat d'une expérience COSY 90 sur le pentasaccharide P1 à 500 MHz (295 K).



## FIGURE VI-21

Tracé contour du COSY 90 sur le composé P1 et attribution des corrélations 1-2 pour quatre protons anomériques



## FIGURE VI-22

Extension de la figure III-21 dans la région non anomérique et mise en évidence des protons 3 des unités A^r et A^{nr}.

On peut constater que cette expérience permet d'aller plus loin que les méthodes classiques unidimensionelles dans la mesure où les protons  $A_2^{nr}$  et  $A_2^r$  sont facilement distingués et qu'il est possible de mettre en évidence la position des protons suivants  $A_3^{nr}$  et  $A_3^r$ .

Toutefois, une analyse plus complète de l'ensemble des protons de chacune de ces deux unités par exemple se heurte maintenant à des difficultés dues à la proximité des protons 3 et 4 qui est très courante pour ce type de composé. Les corrélations 3-4 donnent des pics de corrélation très proches de la diagonale qui interfèrent avec les pics d'autocorrélation. Dans le cas présent, l'analyse est totalement impossible pour l'enchaînement au niveau des protons  $A_3^{nr} - A_4^{nr}$  (à 3.6 ppm environ), et, pire, à 4.2 ppm ou 4.4 ppm quatre signaux sont quasiment superposés. D'une manière générale, il est très fréquent de se trouver devant des situations très ambigües qui peuvent compromettre la validité des déterminations ultérieures.

Les limitations de cette méthode apparaissent plus clairement encore pour les unités de type acide glucuronique pour lesquelles les protons 3,4 et 5 sont très souvent très fortement couples (voir fig VI-22). Il est dès lors impossible d'établir avec certitude l'ensemble des attributions pour ces unités . Nous verrons dans un chapitre ultérieur que des modifications apparemment anodines de cette unité dans le pentasaccharide actif conduisent à une inactivation totale de la molécule et que la modification structurale n'est identifiable avec certitude que grâce à la mise en oeuvre de méthodes très performantes.

#### <u>COSY 45</u> :

Les avantages du COSY 45 sur le COSY 90 sont nombreux. Tout d'abord, il permet de connaître le signe des couplages, comme nous l'avons montré précédemment, par l'orientation des taches de corrélation par rapport à la diagonale, mais il éclaircit aussi considérablement cette diagonale, ce qui peut faciliter dans certains cas la détermination des interactions scalaires entre noyaux de déplacements chimiques proches. Enfin, même si sa sensibilité intrinsèque est moins grande, il peut être réalisé avec un plus petit délai de relaxation entre chaque expérience.



Comparons le COSY 90 et le COSY 45 appliqués sur le même pentasaccharide.

## FIGURE DI-23

Comparaison des expériences de corrélation scalaires de type COSY pour le pentasaccharide P1 avec  $\theta = 90^{\circ}$  et  $\theta = 45^{\circ}$ . Seules les parties non anomériques sont tracées. Les flèches marquées sur le COSY 45 indiquent l'orientation des taches de corrélation.

Bi

Si les taches du COSY 90 sont plus nettes et donnent des indications sur les types de multiplets qu'il faut attendre dans le spectre, elles présentent par contre l'inconvénient d'être plus larges et non orientées par rapport à la diagonale. Dans le COSY 45, ce n'est évidemment pas le cas et on peut remarquer par exemple que les taches de corrélation situées à (3.9,4.2) et (3.9,4.4) (dans la base  $(F_2,F_1)$ ) forment un angle plus grand que 45° avec la diagonale, alors que la tache (4.2,4.4) forme un angle plus petit. Ceci indique, puisqu'elles proviennent obligatoirement des mêmes signaux (couplages entre trois noyaux), que l'on est en présence des interactions entre protons 5 et 6, 6' d'une des unités glucosamines. En effet, le couplage 6-6' étant un couplage géminé est négatif, alors que les couplages 5-6 et 5-6', vicinaux, sont positifs. plus, le COSY 45 en montrant une diagonale moins marquée De permet de distinguer la tache de corrélation (4.38,4.42) de la

Cependant on remarque que même avec le CDSY 45 la corrélation des protons  $A_3^{nr} - A_4^{nr}$  n'est pas évidente, et on ne peut à coup sûr continuer sans risque l'enchaînement de cette unité glucosamine.

diagonale contenant un pic de à (4.4,4.4).

I 1 est que l'utilisation donc clair des approches bidimensionelles classiques de type COSY ne permet en général pas de déterminer de façon univoque l'ensemble des déplacements chimiques de toutes les unités d'oligosaccharides complexes. Ces limitations deviennent très importantes si la taille de la molécule croît ou si les mesures sont réalisées à champ moyen. Ces approches sont toutefois souvent suffisantes pour traiter le cas de petits oligomères . Dans le cas particulier que nous choisi de traiter, et qui est représentatif de cas avons rencontrés quotidiennement, peu de structures oligosaccharidiques peuvent être totalement résolues par le COSY donc justifié de tenter de mettre au point classique. Il est des approches complémentaires plus performantes pour lever de façon undubitable les ambiguïtés d'attribution.

## **REFERENCES** :

1)	A. Bax : " Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance in Liquids " Delft University Press, Delft, Holland (1984)
2)	R. Freeman et G. A. Morris : J. Chem. Soc. Chem. Common. <b>684</b> (1978)
3)	A. Bax et G. A. Morris : J. Magn. Res. <b>41,</b> 501 (1981)
4)	V. Rutar : J. Magn. Res. <b>58,</b> 306 (1984)
5)	A. Bax : J. Magn. Res. <b>53,</b> 517 (1983)
6)	W. P. Aue, E. Bartholdi et R. R. Ernst : J. Chem. Phys. <b>64</b> , n°5, 2229 (1976)
7)	O. W. Sørensen : " Modern pulse techniques in liquid state nuclear magnetic resonance spectroscopy " Doctorat de Sciences Naturelles (Zürich 1984)
8)	A. Bax, R. Freeman : J. Magn. Res. <b>44</b> , 542 (1981)
9)	5. L. Patt : J. Carb. Chem. <b>3.</b> 493 (1984)

CHAPITRE II

EXPERIENCES DE TRANSFERTS MULTIPLES (2D)



#### **QI**−1) Introduction :

expériences de transferts multiples, qu'elles Les soient hétéro- ou homonucléaires, sont des extensions des expériences de corrélations que nous venons de décrire dans le chapitre précédent. Leur but est complémentaire de celles-ci, puisqu'elles permettent de lever les ambiguïtés d'interprétation des taches de corrélation. En effet, si, par exemple, le COSY est l'expérience qui permet de confirmer ou infirmer des interactions scalaires que des mesures de couplages ou des découplages sélectifs ne peuvent fournir clairement dans une expérience classique à une dimension, les expériences de sont, elles, les étapes suivantes qui transferts multiples permettent d'aller plus loin dans la recherche des connectivités entre spins. Elles sont aussi appelées expériences de RELAIS, car leur principe est de relayer le transfert d'aimantation entre deux noyaux sur un troisième noyau. Ainsi, pour le cas homonucléaire, si l'on dispose d'un système à trois spins 1/2 A-B-C tels que A soit couplé faiblement à B et B à C, l'expérience de COSY fournira une matrice montrant une corrélation scalaire entre A et B - taches à  $(\omega_A, \omega_B)$  et  $(\omega_B, \omega_A)$  - et une corrélation entre B et C -  $(\omega_B, \omega_C)$ et  $(\omega_{c},\omega_{B})$  - ,alors que le RELAIS simple (1,2) permettra d'obtenir deux taches supplémentaires  $(\omega_A, \omega_C)$  et  $(\omega_C, \omega_A)$ témoignant d'un transfert d'aimantation entre A et C par l'intermédiaire de B. On saura donc immédiatement à partir des taches d'une seule ligne ou colonne de la matrice (même si le signal diagonal de B est difficile à séparer de ceux d'autres noyaux), que A est lié à B et B à C, et on pourra continuer l'enchaînement tant qu'il existera un couplage scalaire entre deux atomes consécutifs de la structure.



## FIGURE DI-1

Contours théoriques d'une expérience de COSY et de RELAIS simple pour un système de trois spins A-B-C tel que J_{AC} = 0. (une seule moitié de matrice est représentée)

☑II-2) Expériences de relais homonucléaires :

La séquence des transferts à relais multiple (3,4) peut être écrite sous la forme générale décrite sur la figure  $\overline{VII}-2$  :



#### FIGURE DI-2

Séquence générale des expériences de relais multiples. n indique le nombre de relais (tel n ≥ 0).

Dn ne va s'attacher ici à décrire que l'expérience de relais simple (n = 1) par les opérateurs densité, en considérant que le délai de mélange  $\tau$  est optimisé pour un couplage moyen, de façon à ce que  $\tau$  soit égal à  $\frac{1}{4\pi}$  (transfert maximum).

Soit un système à trois spins  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$ , tel que :

```
 \begin{pmatrix} I_{1} \text{ soit couplé à } I_{2} \\ I_{2} \text{ couplé à } I_{3} \\ I_{1} \text{ non couplé (ou très faiblement) à } I_{3} \end{pmatrix}
```

Suivons la magnétisation provenant du seul spin  $I_1$  (donc apparaissant à la fréquence  $v_1$  dans la dimension  $F_1$ ).

 $\sigma_0 = I_{1z}$ 

 $\sigma_{1} = -I_{1y}$   $\sigma_{2} = c_{1}(-I_{1y}c_{12} + 2I_{1x}I_{2z}s_{12}) + s_{1}(I_{1x}c_{12} + 2I_{1y}I_{2z}s_{12})$   $\sigma_{3} = -c_{1}c_{12}I_{1z} - c_{1}s_{12}2I_{1x}I_{2y} + s_{1}c_{12}I_{1x} - s_{1}s_{12}2I_{1z}I_{2y}$ 

Si on faisait l'acquisition à cet instant, on aurait le COSY. (sur la matrice, observation de  $s_1c_{12}I_{1x}$  [diag] et  $s_1s_{12}2I_{1z}I_{2y}$ )

 $\sigma_4$ : d'après le chapitre I, il revient au même d'appliquer la séquence  $\frac{\tau}{2}$  – 180° –  $\frac{\tau}{2}$  ou d'appliquer d'abord le pulse 180° suivi d'un délai  $\tau$  pendant lequel uniquement le couplage s'exprime.

- pulse  $180_{x}$ :

 $\sigma = c_1 c_{12} I_{12} + c_1 s_{12} 2 I_{1\times} I_{2y} + s_1 c_{12} I_{1\times} - s_1 s_{12} 2 I_{1z} I_{2y}$ - temps  $\tau = \frac{1}{41}$ : les couplages  $J_{12}$  et  $J_{23}$  s'expriment.

 $\sigma \xrightarrow{\pi J_{12} \tau \cdot 2I_{1z}I_{2z}} \xrightarrow{\pi J_{23} \tau \cdot 2I_{2z}I_{3z}} \sigma_{4} =$ 

 $c_{1}c_{12}I_{1z} - c_{1}s_{12}4I_{1x}I_{2x}I_{3z} + s_{1}c_{12}2I_{1y}I_{2z} + s_{1}s_{12}2I_{2y}I_{3z}$ 

Puis, après le pulse de lecture :

σ5	$= - c_{1} c_{12} I_{1y} +$	C ₁ S ₁₂ 4I _{1×} I _{2×} I _{3×}	- 5,5,2 ² I _{2z} I _{3×}	- 5 ₁ C ₁₂ ^{2I} 1z ^I 2×
	observable à $v_1$ dans $F_2$	triple quantum	observable à _{Va} dans F ₂	observable à $\nu_2$ dans F ₂

Il faut remarquer que la tache  $(\nu_3, \nu_1)$  provient de l'opérateur -  $s_1 s_{12} 2 I_{2z} I_{3x}$  qui découle de -  $s_1 s_{12} 2 I_{1z} I_{2y}$  de l'étape  $\sigma_3$  (COSY), donc c'est bien l'aimantation qui a déjà été transférée de  $I_1$  sur  $I_2$  qui arrive sur  $I_3$ .

De la même manière, en augmentant n, on pourra avoir sur la même ligne (ou colonne) de fréquence de la matrice les noyaux situés de 1 à n + 1 liaisons de l'atome préalablement excité, aussi longtemps que des couplages scalaires autoriseront le transfert.

### **VII-3)** Relais hétéronucléaires : (5,6)

Les expériences de corrélations hétéronucléaires simples transfèrent l'aimantation d'un noyau X sur un noyau A (à priori moins sensible) qui est observé. Les relais hétéronucléaires peuvent donc être de plusieurs types :

- soit on réalise d'abord un transfert homonucléaire entre deux noyaux de même espèce X, puis on communique l'aimantation résultante à un troisième noyau de l'autre espèce A qui est observée (transfert X-X-A) (5,6,7,8),
- soit on effectue cette opération dans le sens contraire, c'est à dire qu'une première corrélation hétéronucléaire est réalisée (de X à A), puis l'aimantation résultante est transférée à un autre noyau d'espèce A observée (transfert X-A-A),
- soit on transfère l'aimantation d'un premier noyau X à un noyau A, puis on la relaie sur un autre noyau X (transfert X-A-X), ce qui consitue une succession de transferts hétéronucléaires. Cette dernière séquence a été réalisé par Delsuc et coll. (9) pour l'observation de systèmes ¹H ³¹P ¹H en proton :

Séquence :



#### FIGURE DI-3

Séquence de relais hétéronucléaire X-A-X.

La réalisation de la deuxième séquence implique que la sensibilité de l'espèce A soit suffisamment bonne pour permettre une observation directe de transferts d'aimantation entre noyaux A, ce qui n'est généralement pas le cas. Ceci est donc très rarement utilisé.

Séquence :



# FIGURE <u>DI-4</u> Séquence du relais X-A-A.

Pour le premier type d'expériences (le plus courant), les séquences peuvent être construites directement à partir des expériences de relais homonucléaires. Comme dans le cas de la corrélation simple où l'on avait :



FIGURE DI-5

on peut faire correspondre :





172







FIGURE DI-6

Ces expériences de relais hétéronucléaires pourraient être d'une utilité considérable pour l'analyse des oligosaccharides, mais elles sont malheureusement pénalisées par une sensibilité très faible (de 3 à 10 fois inférieure à la corrélation directe  ${}^{13}C - {}^{1}H$ ). Elles ne sont utilisables que si de grandes concentrations sont facilement disponibles.

QI-4) Application des relais aux olígosaccharides :

Les principes développés dans la première partie de ce chapitre ont été appliqués aux oligosaccharides (10,11). La première étape consiste à réaliser un transfert avec relais simple (n = 1). On doit à partir de cette technique mettre en évidence les voisins couplés scalairement de tout proton ainsi que leurs propres voisins. La figure  $\overline{\Omega}$ montre les résultats obtenus avec le pentasaccharide P1.

La comparaison des figures  $\overline{\Omega}\overline{\mathbf{u}}-7(\mathbf{a})$  et (b) est plus facile au niveau des protons anomériques. On constate effectivement que l'utilisation d'un relais permet de faire transiter l'information des protons 1 aux protons 3 qui sont donc identifiés de façon univoque. On peut dès maintenant noter le fort déblindage de A^{*} indiquant la 3-0-sulfatation sur cette unité. En ce qui concerne les conditions utilisées pour assurer ce transfert, une remarque doit être apportée : il est possible d'optimiser le relais par un choix judicieux de  $\frac{\tau}{2}$ . Ceci implique de connaître  $J_{12}$  et  $J_{23}$  . Il est évident que ces valeurs ne sont pas connues à priori et peuvent varier de 0 à 12 Hz. Elles sont par exemple très faibles (2-3 Hz) pour les unités iduroníques et très grandes (9-11 Hz) pour les glucuroniques. Il convient donc de trouver un compromis ; nous avons choisi  $\frac{\tau}{2}$  = 30 msec correspondant à un transfert optimum pour J = 8 Hz. On peut remarquer que cette valeur est appropriée, car les corrélations relayées sont observées dans tous les cas de figure, en particulier aussi bien pour les glucuroniques que pour les iduroniques. Ce temps de transfert de 30 msec sera utilisé pour toutes les expériences de relais ultérieures, au moins en deux dimensions.



## FIGURE DI-7

Comparaison des expériences de COSY 45 (a) et RELAIS simple (6) réalisées pentasaccharide sur 1 a P1 Les taches apparues en (6) à partir e t des protons anomériques sont entourées identifiées.
L'obtention simultanée des matrices de CDSY et RELAIS simple constitue une méthode de choix pour lever une partie des ambiguités d'attribution dans les oligosaccharides, et la deuxième expérience permet de confirmer les données déduites de la première. Dans la pratique, ces deux séquences sont enchaînées pour permettre une acquisition dans des conditions identiques et aussi de moyenner les éventuelles fluctuations expérimentales. L'utilisation systématique de cette approche permet souvent, pour les oligosaccharides en particulier, de disposer du maximum de certitude pour les attributions en un minimum de temps machine.

L'efficacité de cette procédure encourage à tenter de poursuivre les transferts au delà de n = 1. Nous verrons par la suite que la qualité des informations déduites de cette approche justifie ces expériences.

Dans le cas de transferts multiples (n > 1) le calcul d'un temps de mélange  $\frac{\tau}{2}$  optimisé est compliqué par le fait que l'efficacité des transferts dépend de l'ensemble des constantes de couplage mises en cause. Il est illusoire de réaliser un transfert correctement optimisé pour toutes les situations possibles. Le choix du même compromis (30 msec) s'est avéré très satisfaisant pour des situations extrêmes. Il faut noter que toute tentative d'optimiser les transferts pour des unités comportant de faibles couplages (acides iduroniques par exemple) conduit à des résultats décevants ; l'allongement du temps  $\tau$  nécessaire pour augmenter l'efficacité des transferts conduit en effet à de fortes pertes en signal par les phénomènes de relaxation.

Les résultats obtenus par un double RELAIS sont présentés sur la figure VII-8.

Cette figure montre clairement que le passage d'un simple relais  $(1 \rightarrow 2 \rightarrow 3)$  à un double relais  $(1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4)$  met en évidence les protons 4 de façon absolument univoque. Cette information sera ultérieurement très précieuse pour la détermination de la séquence de l'oligosaccharide qui utilisera essentiellement les corrélations dipolaires  $1 \rightarrow 4$  de part et d'autre de la liaison glycosidique.





# FIGURE DI-8

Corrélations avec relais simple (a) et double (b) pour le pentasaccharide P1. Seule la partie de la matrice correspondant aux protons anomériques est montrée. Les taches supplémentaires en (b) sont indiquées par des flèches. On peut aussi remarquer que l'unité Iduronique I est totalement identifiée sur la figure  $\Im$ II-8 et que le signal à 4.75 ppm est attribuable définitivement à I₅. Avec un relais simple, on réalise en effet les transferts 1  $\rightarrow$  2  $\rightarrow$  3 à partir de I₁ et 5  $\rightarrow$  4  $\rightarrow$  3 à partir de I₅. La tache I₃ est donc commune à partir de I₁ et I₅.

Le transfert séquentiel complet à partir des protons anomériques peut être réalisée en effectuant les expériences de relais triple et quadruple correspondant à n = 3 et 4. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure  $\Sigma II-9$ .

Les protons 5 puis 6, 6' sont ainsi facilement identifiés avec les expériences de relais triple et quadruple à partir des protons anomériques. Ceci termine les transferts scalaires possibles dans le cas des hexoses, en permettant de joindre tous les protons d'une unité en partant d'un signal à priori bien séparé des autres.

L'expérience finale avec relais quadruple permet donc d'obtenir par coupe de la matrice un spectre d'une sous-unité quelle qu'elle soit, totalement débarassé des signaux provenant d'autres unités. La figure III-10 illustre ce résultat sur le tétrasaccharide T1.



FIGURE DI -9

Corrélations à 3 (a) et 4 (b) relais (contours partiels) pour le pentasaccharide P1 ; Dans chaque cas les taches nouvellement apparues sont indiquées par des flèches.



# FIGURE DI-10

Tracé tridimensionnel (a) et contour (b) correspondant à une expérience de relais quadruple sur le tétrasaccharide T1. Les tracés ne concernent que la partie des matrices contenant les trois protons anomériques  $(A^r, A^* et I)$ .

Avantages et inconvénients des RELAIS multiples :

Ces approches permettent de lever toutes les ambiguïtés d'attribution dans le cas d'oligosaccharides complexes ou de mélanges de composés. L'attribution séquentielle des protons successifs à partir des anomériques est univoque et permet en particulier de mettre en évidence des substitutions éventuelles et surtout d'identifier les protons 4 de chaque unité pour le séquençage ultérieur du composé (dans le cas d'enchaînements  $1 \rightarrow 4$  évidemment).

Ces techniques possèdent toutefois des inconvénients intrinsèques qui limitent éventuellement leurs applications. Elles sont liées à l'existence de temps de transferts qui deviennent non négligeables devant les temps de relaxation  $T_2$  lorsque le nombre de relais augmente. Les pertes de signal par relaxation transverse peuvent rendre ces méthodes inutilisables. Ce sera essentiellement le cas pour des composés présentant des raies larges (oligosaccharides de grande taille, polysaccharides). Il temps de relaxation donc nécessai**re** d'estimer les pst caractéristiques pour définir la limite supérieure du nombre de transferts envisageables. Dans le cas d'oligomères (comportant jusqu'à une dizaine d'unités) il est toutefois possible d'espérer de très bons résultats jusqu'aux transferts doubles ou triples à condition que les molécules ne soient pas associées en solution.

Les limitations de ces méthodes impliquent qu'il serait souhaitable de disposer d'approches destinées à fournir au moins une partie des informations sans perte importante du signal. C'est l'objet des expériences de transfert total dans le champ tournant qui feront l'objet du paragraphe suivant, et qui sont destinées à fournir directement les sous-spectres de chaque unité sans trop de perte du signal, mais ne peuvent toutefois permettre une attribution séquentielle des protons.

☑II-5) Transferts dans le champ tournant :

## $\nabla I = 5-1$ ) Introduction :

Les expériences à deux dimensions classiques (COSY, Double Quantum, ...) utilisent le concept de transfert de cohérence pour la détermination des systèmes de spins ou l'augmentation de la sensibilité d'observation d'un noyau. Elles possèdent toutefois l'inconvénient de conduire à des transferts de magnétisation non complets (où l'aimantation d'un noyau ne passe pas totalement sur l'autre) et ne conservant généralement pas la phase d'origine.

Exemple :



### FIGURE VI-11

Récupération d'un doublet en antiphase pour un pic de corrélation provenant d'un signal d'absorption pure au début du temps d'évolution dans un COSY. Le détecteur est considéré comme étant selon x. Ceci peut entraîner une suppression partielle du signal (si la largeur des raies est importante) et donc une perte de sensibilité, et interdit aussi l'obtention de spectres découplés.

De plus, nous avons vu que le problème de la non-conservation de la phase lors des transferts d'aimantation classiques est très limitatif dans les expériences à deux dimensions, puisque l'on récupère sur la matrice des pics de corrélation décalés en phase de 90° par rapport aux pics diagonaux.

Pour que les pics de corrélation soient en phase avec les pics diagonaux représentant la magnétisation qui n'a pas été touchée par le second pulse, il faut que leur phase soit la même pendant t1 et t2.

Pour ces problèmes, une solution a été proposée qui consiste à laisser les vecteurs magnétisation se refocaliser (12), mais elle conduit à une perte de signal due aux phénomènes de relaxation.

Une autre solution a donc été envisagée par Müller et coll.(13)

On peut obtenir des transferts de magnétisation nets (pouvant permettre de relier en une seule expérience tous les spins d'un système donné) en se plaçant dans les conditions de Hartmann-Hahn (14), c'est à dire en supprimant ou en rendant identiques les contributions Zeemann des noyaux à étudier.

Par exemple, dans le cas homonucléaire de deux noyaux A et B distincts, cela revient à égaliser (ou à rendre très proches) leurs fréquences de précession respectives :

 $(\gamma_{H}B_{1A} = \gamma_{H}B_{1B} + \omega_{A} = \omega_{B})$ , ce qui tend à "écraser" le diagramme d'énergie.

Ainsi, le nouveau système est similaire à celui de deux spins fortement couplés  $\left(\frac{\nu_A}{J} - \frac{\nu_B}{v_B} \simeq 1\right)$  et son Hamiltonien tient compte des termes de flip-flop (explicité dans la partie théorique).



Evolution : couplage faible
 Spin-lock : couplage fort
 Detection : couplage faible

### FIGURE DI-12

Séquence générale du transfert total dans le champ tournant (HOHAHA).

Après le premier pulse  $90^{\circ}$  qui bascule les vecteurs magnétisation selon l'axe y, le pulse de spin-lock (très long et d'une puissance  $B_1$  assez faible) sert à les bloquer selon cet axe. Les vecteurs vont donc précesser autour de  $B_1$  qui est beaucoup plus faible que  $B_0$ , et leurs fréquences de précession respectives seront très rapprochées.

 $\Box I - 5 - 2)$  Théorie :

On démontre que de forts transferts de magnétisation sont obtenus quand l'Hamiltonien de mélange  $\mathcal{X}_m$  est régi par les conditions de Hartmann-Hahn. Dans ce cas il est dominé par les termes de couplage "isotrope", et la formule générale :

$$\mathcal{R} = -\sum_{k} \Omega_{k} \vec{I}_{kz} + \sum_{k \leq 1} 2\pi J_{ki} \vec{I}_{k} \vec{I}_{i}$$

devient :  $\mathcal{X}_{m} = \sum_{k \leq 1} 2\pi J_{k1} \vec{I}_{k} \vec{I}_{1}$ 

Les opérateurs à un spin  $(I_x, I_y, ...)$  qui précessent indépendamment dans le champ  $B_o$ , vont là participer aux modes appelés "modes de spins collectifs" (15). Ceci conduit à un phénomène oscillatoire de transfert de cohérence à travers les systèmes de spins couplés.

Les effets de transfert de magnétisation par couplage isotrope peuvent être mieux appréciés si l'on considère un système de deux spins 1/2.

Dans les conditions de Hartmann-Hahn :

$$\mathfrak{X}_{12} = 2\pi J \vec{I}_1 \vec{I}_2$$

ce qui peut s'écrire :

$$\mathcal{R}_{12} = 2\pi J \left( I_{12}I_{22} + I_{1\times}I_{2\times} + I_{1y}I_{2y} \right)$$
  
=  $2\pi J \left[ I_{12}I_{22} + \frac{1}{2} \left( I_{1}I_{2} + I_{1}I_{2} \right) \right]$ 

 $I_1^*I_2^-$  et  $I_1^-I_2^+$  sont des opérateurs de flip-flop (que l'on néglige dans le cas de couplages faibles) puisqu'ils relient uniquement des états d'énergie en inversant chacun des spins, ce qui est à rapprocher de l'échange de magnétisation spin-spin gouverné par  $T_2^-$ .



FIGURE DI-13

Les "modes de spins collectifs" correspondent à la somme et à la différence des opérateurs simples à un spin, et à la somme et la différence des opérateurs produits à deux spins :  $-I_{1\alpha}$ ,  $I_{2\alpha}$  peuvent être remplacés par :

$$\left\{ \begin{array}{l} \Sigma_{\alpha} = \frac{1}{2} \left( I_{1\alpha} + I_{2\alpha} \right) \\ \Delta_{\alpha} = \frac{1}{2} \left( I_{1\alpha} - I_{2\alpha} \right) \end{array} \right.$$

$$-I_{1\alpha}I_{2\theta}$$
 et  $I_{1\theta}I_{2\alpha}$  par :

$$\Sigma_{\alpha\beta} = \frac{1}{2} (I_{1\alpha}I_{2\beta} + I_{1\beta}I_{2\alpha})$$
$$\Delta_{\alpha\beta} = \frac{1}{2} (I_{1\alpha}I_{2\beta} - I_{1\beta}I_{2\alpha})$$

Notation :  $\alpha$ ,  $\beta = x$  ou y ou z

Ces nouveaux opérateurs répondent aux relations de commutation suivantes :

 $\begin{bmatrix} \mathcal{X}_{12}, \Sigma_{\alpha} \end{bmatrix} = 0 \qquad \qquad \begin{bmatrix} \mathcal{X}_{12}, \Sigma_{\alpha\beta} \end{bmatrix} = 0 \\ \begin{bmatrix} \mathcal{X}_{12}, \Delta_{\alpha} \end{bmatrix} = i\Delta_{\beta\gamma} \qquad \qquad \begin{bmatrix} \mathcal{X}_{12}, \Sigma_{\alpha\beta} \end{bmatrix} = -i\Delta_{\alpha}$ 

 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ : permutation cyclique de x, y, z (c'est à dire que si  $\alpha = x$ , alors  $\beta = y$  et  $\gamma = z$ )

Exemples de calculs :  $\begin{bmatrix} \mathcal{H}_{12}, \mathcal{Z}_{x} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_{1x}I_{2x} + I_{1x}I_{2x} + I_{1y}I_{2y}, I_{1x} + I_{2x} \end{bmatrix}$   $= iI_{1y}I_{2x} + iI_{1x}I_{2y} - iI_{1x}I_{2y} - iI_{1y}I_{2x}$  = 0  $\begin{bmatrix} \mathcal{H}_{12}, \mathcal{A}_{y} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_{1x}I_{2x} + I_{1x}I_{2x} + I_{1y}I_{2y}, I_{1y} - I_{2y} \end{bmatrix}$   $= -iI_{1x}I_{2x} + iI_{1x}I_{2x} + iI_{1x}I_{2x} - iI_{1x}I_{2x}$   $= i\mathcal{A}_{xx}$ 

Cela conduit immédiatement aux équations suivantes d'évolution des termes de différence : (car on a  $\frac{d\sigma}{dt} = -i [\Re, \sigma(t)]$ )

•.•

 $\Delta_{\alpha} \xrightarrow{\mathcal{H}_{12}\tau_{m}} \Delta_{\alpha} cos(2\pi J\tau_{m}) + \Delta_{\beta\gamma} sin(2\pi J\tau_{m})$ 

$$\Delta_{\beta\gamma} \xrightarrow{\mathcal{H}_{12}\tau_m} \Delta_{\beta\gamma} \cos(2\pi J\tau_m) - \Delta_{\alpha} \sin(2\pi J\tau_m)$$

alors que les termes de somme  $\Sigma_{\alpha}$  et  $\Sigma_{\alpha\beta}$  restent invariants.

L'évolution de l'opérateur  $I_{1x}$  est donc : (puisque  $I_{1x} = \Sigma_x + \Delta_x$ )

$$I_{1\times} \xrightarrow{\mathcal{X}_{12}\tau_{m}} \frac{1}{2}(I_{1\times} + I_{2\times}) + \frac{1}{2}(I_{1\times} - I_{2\times})\cos(2\pi J\tau_{m}) \\ + (I_{1y}I_{2z} - I_{1z}I_{2y})\sin(2\pi J\tau_{m}) \\ = \frac{1}{2}I_{1\times}(1 + \cos(2\pi J\tau_{m})) \\ + \frac{1}{2}I_{2\times}(1 - \cos(2\pi J\tau_{m})) \\ + (I_{1y}I_{2z} - I_{1z}I_{2y})\sin(2\pi J\tau_{m})$$

Des expressions similaires sont obtenues pour  $I_{1y}$ , $I_{1z}$  et  $2I_{1x}I_{2z}$ ,  $2I_{1y}I_{2z}$ . Tous ces composants sont périodiquement échangés entre les spins 1 et 2. Si  $\tau_m = \frac{1}{2I}$ , alors l'évolution pour  $I_{1x}$  donne :

 $I_{1\times} \xrightarrow{\mathfrak{X}_{12}\tau_{m}} I_{2\times}$  Le transfert de magnétisation est complet !

Il est à remarquer que pour des valeurs intermédiaires de  $\tau_m$ , on récupère aussi des composantes antiphase pour les deux spins  $(I_{1v}I_{2z} \text{ et } I_{1z}I_{2v})$ .

Si l'on compare avec un transfert de magnétisation classique :

	CDSY (transfert classique)	HOHAHA (Hartmann-Hahn homonucléaire)	
$I_{i\times} \rightarrow$	I _{1×} cos(2πJτ _m ) + 2I _{1y} I _{2z} sin(2πJτ _m )	$\frac{1}{2}I_{1\times}(1 + \cos(2\pi J\tau_m)) + \frac{1}{2}I_{2\times}(1 - \cos(2\pi J\tau_m)) + (I_{1y}I_{2z} - I_{1z}I_{2y})\sin(2\pi J\tau_m)$	
Maximum de transfert pour τ _m =	$\frac{1}{4J}$	$\frac{1}{2J}$	
Maximum d'aimantation transférée à partir de I _{1×}	21 ₁ , ¹ 2z	I _{2×}	

Donc, l'expérience réalisée dans les conditions de Hartmann-Hahn donne lieu à un phénomène oscillatoire d'échange de magnétisation de période 1/J. VII-5-3) Paramètres importants pour l'expérience 2D :

A).... Différents signaux obtenus :

Si l'on considère l'expérience de base à deux dimensions de la figure  $\Sigma II-12$ , il faut remarquer que l'on peut, à priori, récupérer trois sortes de signaux (16) :

- les signaux normaux de corrélations scalaires dûs aux transferts dans les conditions de Hartmann-Hahn, mais aussi :
- 2)- des signaux de type COSY classiques.

Ceux-ci proviennent des composantes en antiphase qui apparaissent à la fin du temps d'évolution, et qui sont transformées par le pulse de spin-lock, ce dernier agissant comme un pulse normal 0, comparable au deuxième pulse 90° dans le COSY, mais extrêmement long :

$$2I_{1\times}I_{2z} \xrightarrow{\theta_{y}} 2I_{1\times}I_{2z}C_{\theta}^{2} + 2I_{1\times}I_{2\times}S_{\theta}C_{\theta} - 2I_{1z}I_{2z}C_{\theta}S_{\theta} - 2I_{1z}I_{2\times}S_{\theta}^{2}$$

C'est ce dernier terme qui représente la magnétisation antiphase qui a été transférée de A à B. L'intensité de ce transfert tient compte du fait que le spin-lock est inhomogène et extrêmement long, et est donc proportionnelle à la moyenne  $(\sin^2 \theta) = 0.5$ .

3)- des signaux düs aux interactions dipolaires dans le champ tournant (type ROESY). Ceux-ci sont traités dans le paragraphe XII-5.

B).... Effets d'offset :

L'impulsion de spin-lock, du fait de sa durée, rend les effets d'inhomogénéité du champ B1 non négligeables, et les vecteurs non parallèles à ce champ vont se déphaser rapidement, alors que les autres sont bloqués et restent cohérents par rapport au référentiel habituel. Ainsi, les effets d'offset sont prépondérants lors de la réalisation d'une telle expérience, et plusieurs remarques doivent être faites.

B

Y.B

K

V.A

Si l'on considère les fréquences de précession dans le champ tournant B1 dues aux impulsions radiofréquences effectives reçues par deux noyaux A et B couplés faiblement (dans Bo) :



b) Précession dans B1

FIGURE VII-14

Spectres obtenus par précession : a)-dans le champ statique B0 b)-dans le champ tournant B1.

Si  $\nu_1 \gg \Delta \nu_A$ , on peut écrire :  $\nu_{1A} = \nu_1 + \frac{\Delta \nu_A^2}{2\nu}$ 

 $\frac{\left|\Delta v_{A}^{2} - \Delta v_{B}^{2}\right|}{2 v_{A}} < |J_{AB}|$ 

$$\nu_{1B} = \nu_1 + \frac{\Delta \nu_B^2}{2\nu_1}$$

Or le transfert de magnétisation dans le champ tournant ne peut être effectif que si  $|v_{1A} - v_{1B}| \le |J_{AB}|$ ,

donc

Si v, » Δv

Ceci montre qu'il faut utiliser un champ B1 assez intense pour obtenir un transfert isotrope entre noyaux du spectre. De plus,

[1]

on voit qu'il ne faut pas espèrer, en augmentant régulièrement  $\tau_m$ , sélectionner le nombre de transferts (COSY, RELAIS simple, double, ...) à partir d'un noyau, puisque l'efficacité de ceux-ci dépend aussi et surtout de la différence entre les offsets des noyaux corrélés.



### FIGURE DI-15

Pour amoindrir ces effets de dépendance d'offset, une méthode consiste à couper l'impulsion cohérente de spin-lock en plusieurs pulses de phase alternée (17).



### FIGURE DI-16

On montre que la condition nécessaire pour le transfert isotrope devient alors :

$$\frac{\tau_{m}^{2} \Delta v_{A}^{2} - \Delta v_{B}^{2}}{2 v_{1}} < \frac{1}{4}$$
[2]

Ainsi, plus le spin-lock est haché en impulsions de phase alternée ( $\tau'_m$  petit), moins les effets d'offset sont importants. On retrouve les problèmes d'efficacité de découplage ; c'est ainsi qu'une version récente (18) fait intervenir des pulses composites, c'est à dire qu'une rotation de 180° autour de l'axe x est réalisée par la "cascade" U = 90° - 180° - 90° . Le cycle final est constitué par la séquence : (19) U -2U U -2U 2U -U 2U -U 2U -2U (MLEV 16)

C).... Obtention de signaux en pure absorption :

Nous avons vu que cette méthode permet d'obtenir des pics en pure absorption, car, lorsque le délai  $\tau_m$  est optimisé (égal à  $\frac{1}{2J}$ ), la phase pendant le temps d'évolution est la même que celle pendant le temps d'acquisition, c'est à dire que le spin-lock agit sur les vecteurs magnétisation de telle manière que ceux qui sont convenablement bloqués dans le champ transverse retrouvent leur orientation initiale après le cycle complet.

Exemple :

$$I_{1x} \xrightarrow{SL} I_{2x}$$
$$2I_{1y}I_{2z} \xrightarrow{SL} 2I_{1z}I_{2y}$$

Ceci n'est vrai que si :

- le délai  $\tau_m$  est égal à 1/2J, ce qui ne peut pas être réalisé pour tous les systèmes de spins du composé, chacun ayant son propre couplage.

- les signaux apparaissant sont dûs aux seuls transferts dans les conditions de Hartmann-Hahn. L'alternance de phase au cours du spin-lock comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, permet aussi de supprimer les transferts scalaires classiques.

Pour s'affranchir de la première contrainte (optimisation du délai de spin-lock), plusieurs solutions sont utilisables :

La première consiste à faire varier  $\tau_m$  à l'intérieur d'une même expérience avec co-addition des FID, afin de moyenner à 0 les signaux indésirables :

<u>Exemple</u>: si l'opérateur de départ est  $I_{1x}$ , on récupère des composantes en phase ( $I_{2x}$  par exemple) et hors-phase ( $2I_{1z}I_{2y}$ )

τ _m	I _{2×}	21 ₁₂ 1 _{2y}	
$\frac{1 + \epsilon}{2J}$	$\frac{1}{2}(1 - \cos(\pi + \epsilon \pi))$	1 -(sin(π + επ)) 2	
$\frac{1-\epsilon}{2J}$	$\frac{1}{2}(1 - \cos(\pi - \epsilon \pi))$	$\frac{1}{2}(\sin(\pi - \epsilon\pi))$	
Addition des deux expériences	1 + coseπ	0	

La seconde méthode introduit des pulses défocalisants ("trim pulses") dont le but est d'évincer toute la magnétisation qui n'est pas selon un axe donné. De tels pulses sont insérés au début et à la fin de l'impulsion de spin-lock, et sont de l'ordre de quelques millisecondes (18).



### FIGURE DI-17

Séquence complète utilisée pour l'expérience de HOHAHA.

D).... Effets de relaxation :

Si l'on réalise l'expérience avec une impulsion de spin-lock unique cohérente, les vecteurs magnétisation bloqués dans le plan transverse relaxent à la vitesse  $\frac{1}{T_{10}}$ .

Ceci présente l'avantage de permettre des délais de retour à l'équilibre entre chaque expérience plus courts, mais aussi par contre l'inconvénient de faciliter les échanges dipolaires entre noyaux. VII-5-3) Application aux oligosaccharides :

La possibilité de transférer l'aimantation de façon isotrope à l'intérieur d'un système de spin permet d'envisager diverses expériences destinées à l'obtention de chaque sous-spectre à partir de l'un quelconque des signaux qui le composent. Nous allons considérer maintenant l'efficacité et les applications de ces méthodes pour les oligosaccharides.

La redistribution de l'aimantation dans le champ tournant s'effectue pendant l'impulsion de spin-lock dont la durée va conditionner l'efficacité du transfert. Nous allons étudier les deux extrêmes conduisant :

- à un transfert faible (limité au voisin immédiat, comme le COSY),
- 2) à une distribution quasi-isotrope sur tout le système couplé.

La figure  $\Sigma I = 18$  montre le résultat obtenu sur le pentasaccharide P₁ pour une courte durée de spin-lock (13 ms).

On constate que dans ces conditions, le résultat est très proche de celui obtenu avec une expérience de COSY. Les taches de corrélation sont essentiellement dues à des couplages scalaires entre voisins et les protons 2 sont tous parfaitement identifiés. On observe toutefois déjà un début de transfert sur certains protons 3 (1  $\rightarrow$  3), en particulier pour les unités Glucuronique et Iduronique.

Si le temps de contact est augmenté de façon significative (65 ms), une redistribution isotrope de l'aimantation peut s'effectuer : figure  $\Sigma$ II-19.

Cette figure montre un résultat qualitativement analogue à celui obtenu par corrélation multirelayée (n = 4). Par exemple, une coupe réalisée au niveau de chaque proton anomérique fournit un sous-spectre de l'unité concernée.



### FIGURE DI-18

Contour d'une matrice de corrélation scalaire dans le champ tournant. Le temps de contact (pendant lequel les conditions de Hartmann-Hahn sont réalisées) est fixé à une valeur faible (13 ms) afin de limiter le transfert.



FIGURE DI-19

Corrélation scalaire totale dans le champ tournant (temps de contact 65 ms) pour le pentasaccharide P1.

On peut également noter à titre un peu anecdotique que l'unité  $A^r$  terminale montre en plus à partir de son proton 1 une corrélation avec le méthoxy terminal indiquant que l'anomérique à 5.1 ppm correspond à celui d'une unité formant l'extrémité du côté réducteur de la chaîne. Le couplage  $A_1^r - OCH_3$  est sans doute ridiculement faible, mais dès lors qu'il n'est pas strictement nul une petite quantité d'aimantation peut être transférée dans le champ tournant. Notons que ce type de corrélation est indétectable par les expériences de type COSY, même lorsqu'elles sont optimisées pour mettre en évidence les petits couplages.

Seuls les transferts sur les protons 6, 6' restent faibles, mais ils peuvent être augmentés en allongeant la durée du spin-lock jusqu'à 80-90 ms.

Nous allons maintenant montrer l'utilité de ces expériences pour l'analyse de mélanges complexes d'oligosaccharides. Afin de simplifier l'exposé, nous considèrerons que les constituants du mélange sont connus.

La figure III-20 montre le spectre proton d'une fraction de pentasaccharide synthétique.

Il est évident que cet échantillon n'est pas homogène ; il est en fait constitué des deux pentasaccharides P2 et P1 dans le rapport 2/3. Les deux composés diffèrent seulement par l'existence d'un ester méthylique sur l'acide glucuronique de P2. En effet, les deux molécules constitutives ne se séparent pas lors de la purification classique du pentasaccharide actif P1. Cet échantillon pose un problème très intéressant, car son activité spécifique n'est que de 40% de celle de P1 pur. Cela semble indiquer que le composé modifié est totalement inactif ; cette observation est évidemment très importante pour l'établissement de relations structure-activité dans cette Voyons comment on peut déterminer la différence série. structurale entre P1 et P2.

Le spectre présenté sur la figure  $\overline{\mathbf{Q}}\overline{\mathbf{m}}$ -20 montre un dédoublement de la plupart des signaux par rapport à celui du pentasaccharide P1. Une autre singularité est la présence d'un



# FIGURE DI-20

Spectre ¹H (500 HHz) d'un mélange des deux pentasaccharides P1 et P2 dans le rapport 2/3 en faveur de P2. Les protons anomériques correspondant à P1 sont indiqués par des flèches.



197

## FIGURE DI-21

Corrélation scalaire totale dans le champ tournant pour le mélange de pentasaccharides P1 + P2.

(a) Extension au niveau des anomériques

(b) Extension de la région contenant les unités glucuroniques.

singulet intense à 3.85 ppm, caractéristique d'un groupe méthyl-ester. Il reste donc à savoir où cet ester est placé.

Les figures QII-21 (a)(b) montrent comment les corrélations totales dans le champ tournant vont être utilisées pour mettre en évidence l'unité estérifiée.

La figure 💵-21(a) montre le résultat global obtenu avec un temps de contact de 60 ms. A l'exception des protons 6 et 6', la plupart des corrélations prévues sont visibles sur la figure ΩI-21(**a**). On peut aussi identifier sans aucun doute les protons anomériques de chacun des deux composés, et ainsi observer que les spectres des unités A*, A^{nr}, A^r et I sont très peu modifiés entre P1 et P2, à l'exception d'une importante différence de déplacements chímiques entre les anomériques des unités A^{nr} des produits. Au contraire l'observation de la section deux concernant l'unité glucuronique (figure QII-21(b)) montre que de profondes modifications sont intervenues avec en particulier un net déblindage des protons G, , G, et surtout G de P2 par rapport au pentasaccharide non modifié. Cette observation implique nécessairement que le glucuronique soit l'unité modifiée par estérification dans P2. Il est par ailleurs raisonnable de penser que les variations d'environnement induites par l'estérification modifient le déplacement des protons voisins, et surtout de A^{nr} comme nous l'avons montré précédemment.

Cette unique expérience a donc permis d'identifier dans le mélange les deux composés très proches. Une purification par échange d'ions a ultérieurement permis de les séparer et de vérifier que P₂ est inactif. Ceci constitue une information très importante pour la compréhension des fonctions indispensables à l'activité. Une saponification douce de P₂ permet d'ailleurs de régénérer P₁ et de restaurer l'activité.

Les derniers éléments présentés montrent que ces techniques de corrélation dans le champ tournant permettent d'obtenir facilement les sous-spectres des unités dans le cas de structures complexes. L'information obtenue est analogue à celle dérivée des relais quadruples, mais la sensibilité est supérieure car les pertes d'aimantation par relaxation transverse sont faibles (mêmes si celle-ci est régie par  $T_{10}$ 

plus petit que  $T_2$  dans les conditions classiques de champ fixe). Ainsi, il est possible de récupérer le même rapport signal sur bruit avec un temps d'expérience beaucoup plus court que pour les relais complets.

Toutefois les deux approches sont tout à fait complémentaires, car l'inconvénient de l'expérience de corrélation dans le champ tournant est que l'on ne peut pas être sûr, en fixant à une valeur donnée la durée de l'impulsion de spin-lock, de n'obtenir que telle ou telle étape de relais. Il est en effet évident que le caractère séquentiel des attributions dans les expériences de corrélations relayées est extrêmement précieux pour une détermination univoque des fréquences de résonance et la mise en évidence de substitutions telles que les groupes O-sulfate ou N-acétyle. Il n'est pas envisageable de réaliser cette sélectivité par corrélation dans le champ tournant. Une stratégie efficace consiste donc à réaliser les expériences de corrélations relayées, puis la corrélation totale dans le champ tournant.

* * * * *

### **REFERENCES** :

1) G. Eich, G. Bodenhausen et R. R. Ernst : J. Am. Chem. Soc. 104, 3731 (1982) 2) G. Wagner : J. Magn. Res. 55, 151 (1983) 3) G. Eich : Diploma Thesis, Eidgenossische Technische Hochschule Zürich (1982) 4) A. Bax et G. Drobny : J. Magn. Res. 61, 306 (1985) P. H. Bolton : 5) J. Magn. Res. 48, 336 (1982) 6) P. H. Bolton et G. Bodenhausen : Chem. Phys. Lett. 89, 139 (1982) 7) A. Bax : J. Magn. Res. 53, 149 (1983) S. K. Sarkar et A. Bax : 8) J. Magn. Res. 63, 512 (1985) 9) M. A. Delsuc, E. Guittet, N. Trottin et J. Y. Lallemand : J. Magn. Res. 56, 163 (1984) 10) B. Perly, P. Berthault et M. Petitou : Proc. of the XIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems Todtmos, RFA (1986)

- 11) M. Ikura et K. Hikichi : Carb. Res., sous presse (1987)
- 12) K. Nagayama, A. Kumar, K. Wüthrich, R. R. Ernst : J. Magn. Res. 40, 321 (1980)
- 13) L. Müller and R. R. Ernst : Molec. Phys. 38, N°3, 963 (1979)
- 14) S. R. Hartmann and E. L. Hahn : Phys. Rev. 128, N°5 (1962)
- 15) L. Braunschweiler and R.R Ernst : J. Magn. Res. 53, 521 (1983)
- 16) A. Bax et D. G. Davis : J. Magn. Res. 63, 207 (1985)
- 17) D. G. Davis et A. Bax : J. Am. Chem. Soc. **107**, 2820 (1985)
- 18) A. Bax et D. G. Davis : J. Magn. Res. **65**, 355 (1985)
- 19) M. H. Levitt, R. Freeman et T. Frenkiel : J. Magn. Res. 47, 328 (1982)



CHAPITRE IX

EXCITATION DES COHERENCES MULTIPLES QUANTA



### IX-1) Introduction :

Les expériences décrites dans ce chapitre utilisent le CARCEPT de filtre multiple quantum (1) ; en effet, les cohérences double quantum sont excitées, puis transformées en transitions à un quantum pour qu'elles deviennent détectables. Ces séquences permettent d'autre part de supprimer les transitions initiales à un quantum par un cycle de phase adéquat.

Ceci répond à plusieurs objectifs :

*- Carbone 13 :

- 1 dimension : suppression des transitions  $^{13}C$   $^{12}C$  (2),
- 2 dimensions : obtention des corrélations scalaires  ${}^{13}C {}^{13}C$  (suppression toujours des paires  ${}^{13}C {}^{12}C$ ) (3)

Ces expériences ont été nommées INADEQUATE ("Incredible Natural Abundance Double Quantum Experiment") et ont été largement développées par de nombreuses équipes (4-11).

*- Proton : (expérience à 2 dimensions)

Obtention d'une matrice montrant les corrélations scalaires, avec suppression de la diagonale, des signaux non couplés, et donc des éventuels pics de solvant (13-16).

La séquence de base de ces expériences homonucléaires est la suivante :



Les chiffres indiqués représentent les opérateurs densité qui sont utilisés dans les calculs.

En une dimension, le temps t est le plus petit possible pour éviter les pertes de magnétisation par relaxation, et le pulse 8 de 90 degrés pour récupérer le maximum de signal.

En deux dimensions, c'est ce temps t qui est le délai incrémenté entre chaque expérience (t1) pour la création de la seconde dimension. En effet, puisque les cohérences à double quantum ne sont pas observables directement, leurs fréquences doivent être déterminées dans la seconde dimension (F1). De fait, si l'on veut obtenir une matrice avec, dans F2, les déplacements chimiques et couplages et, dans F1, les sommes des fréquences des noyaux couplés, il convient de faire évoluer la cohérence double quantum pendant la période t1 avant de la reconvertir en transition à un quantum.



Ainsi, si l'on compare avec la séquence de COSY :

FIGURE IX-2

Comparaison des étapes de préparation du double quantum et du COSY.

La différence est uniquement le "pulse" de préparation P1 qui est, dans ce cas, destiné à exciter uniquement les cohérences double quantum. De ce fait, sa phase est très importante et constitue la seule difficulté à la construction d'une telle séquence.

#### IX-2) Traitement théorique :

Reprenons la séquence de la figure IX-1.

Le temps  $t_i$  ne changeant rien au raisonnement, ce cycle de phase est valable pour les expériences à une dimension comme pour celles à deux dimensions.

### <u>Raisonnement_sur_un système AX</u> :

(Cas, par exemple, du carbone, où l'on n'a que des paires  ${}^{13}C - {}^{12}C$  et  ${}^{13}C - {}^{13}C$  [*la probabilité d'avoir un système AHX*  ${}^{13}C - {}^{13}C - {}^{13}C$  *est trop faible*], et où l'on cherche à éliminer les premières [*transitions à 1Q*] pour ne conserver que les secondes [2Q].)

```
Soient donc :
1 spin isolé : S
1 paire I<sub>1</sub> - I<sub>2</sub> de couplage J<sub>12</sub>
```

Nous allons utiliser les résultats du chapitre II, c'est à dire que pour connaître les opérateurs obtenus avec une phase  $\phi$ , nous allons d'abord calculer le propagateur (la séquence)  $U_x$ , puis effectuer une rotation  $\phi F_x$ .

<u>Calcu</u>l :

 $\sigma_0$  (éq- thermique) = I_{1z} + I_{2z} + S_z

 $\sigma_1^{\times} = -I_{1y} - I_{2y} - S_y$ 

D'après le chapitre II, pour le "sandwich"  $\tau$  - 180° -  $\tau$  on peut appliquer d'abord le pulse 180° suivi d'une période  $2\tau$  :

pulse  $180_x^*$ :  $\sigma_z^{\times} = I_{1y} + I_{2y} + S_y$  $\sigma_3^{\times} = -2I_{1\times}I_{2Z} - 2I_{1Z}I_{2\times} + S_y$ Un pulse  $90_x^*$  excite ensuite les transitions 2Q :

 $\sigma_{4}^{x} = 2 I_{1x}I_{2y} + 2 I_{1y}I_{2x} + S_{z}$ 

Pour calculer  $\sigma_4^{y}$ , on a juste à appliquer une rotation de 90° autour de z à  $\sigma_4^{x}$ :

$$\sigma_{A}^{\times} \xrightarrow{\frac{\pi}{2} I_{1z}} \xrightarrow{\frac{\pi}{2} I_{2z}} \xrightarrow{\frac{\pi}{2} S_{z}} - 2 I_{1y}I_{2x} - 2 I_{1x}I_{2y} + S_{z} = \sigma_{A}^{y}$$

En appliquant  $\pi_z \doteq \sigma_4^{\times}$ , on voit que  $\sigma_4^{-\times} = \sigma_4^{\times}$ , en appliquant  $\left(\frac{\pi}{2}\right)_{-z}$   $\doteq \sigma_4^{\times}$ , on voit que  $\sigma_4^{-y} = \sigma_4^{y}$ .

On remarque que si on cycle ce troisième pulse de la façon suivante :

$$\sigma_A^{X} ; - \sigma_A^{Y} ; \sigma_A^{-X} ; - \sigma_A^{Y}$$

alors :

 $\sigma_4 = 2 I_{1x}I_{2y} + 2 I_{1y}I_{2x} = \{2QC\}_y$ 

l'opérateur provenant du spin s non couplé est éliminé.

Finalement, un pulse  $(\pi/2)_x$  donne des doublets antiphase :

 $\sigma_6 = 2 I_{1\times}I_{2\times} + 2 I_{1\times}I_{2\times}$ 

Donc, par un système de phases judicieusement choisi, on parvient à ne récupérer que les signaux provenant de transitions à 20, en éliminant les autres.

<u>Exemple</u>: Si, en ¹³C, on avait :



FIGURE IX-3

Spectre classique carbone (découplage proton).

avec l'INADEQUATE 1D, on récupère :



## FIGURE IX-4

Spectre des satellites  ${}^{13}C - {}^{13}C$  obtenu avec la séquence INADEQUATE. Les transitions à 1Q correspondant aux paires  ${}^{12}C - {}^{13}C$  sont éliminées.

## Remarque :

Une alternative pour réaliser le filtre double quantum consiste à garder la phase des trois premiers pulses fixe (toujours  $U_x$ ), et de cycler sur le pulse de lecture et la phase du récepteur, soit :

PHASE	1 ^{er} p. 90•	p. 180°	2 ^{ème} p. 90°	3 ^{ème} p. 90°	Récepteur
1 ^{er} transient	×	×	×	×	×
2 ^{2me}	×	×	×	У	-у
3 <del>e</del> m e	×	×	×	-×	-×
4 ème	×	×	×	-y	У

IX-3) Particularités des expériences à deux dimensions :

De la même façon que pour le CDSY et les autres expériences à deux dimensions classiques, dans l'expérience de double quantum il est nécessaire, pour simplifier l'interprétation de la matrice contenant les taches de corrélation, de différentier les pics d'écho et les pics d'antiécho, afin de réaliser la quadrature en F1 (seconde dimension).

Nous avons vu dans le chapitre  $\overline{\text{VI}}$  que les pics d'écho (précessant dans le même sens pendant ti et t2) étaient beaucoup plus intéressants que les pics d'antiècho pour le COSY, car le temps t2 permettait de refocaliser ces vecteurs magnétisation qui avaient été dispersés par les effets d'inhomogénéité de Bo pendant ti, en réalisant comme leur nom l'indique une sorte d'écho. Cet effet est identique dans l'expérience de double quantum, à la différence près que là il faut attendre une valeur  $t_2 = 2t_1$  pour obtenir une refocalisation complète de ces vecteurs, puisque pendant la période d'évolution ceux-ci précessent deux fois plus vite (et sont donc deux fois plus sensibles aux inhomogénéités de champ) que pendant le temps d'acquisition après qu'ils aient été transformés en transitions observables.

Il faut donc parvenir à différentier les deux types de pics et à ne sélectionner que les pics d'écho ; pour cela plusieurs méthodes ont été développées (3,4). Avant de les considérer, détaillons la séquence de base 2D :

Si l'on reprend le système AX du paragraphe précédent :
- Dans l'expérience à deux dimensions, l'évolution pendant t₁
se traduit par :

$$\sigma_{4} \left(= \{2QC\}_{y}^{12}\right) \xrightarrow{I_{1z}} \xrightarrow{I_{2z}} \xrightarrow{2I_{1z}I_{2z}} \{2QC\}_{y}^{12} \subset_{1+2} - \{2QC\}_{x}^{12} \leq_{1+2}$$

 $c_{1+2} = \cos \left( (\omega_1 + \omega_2) t_1 \right) \qquad s_{1+2} = \sin \left( (\omega_1 + \omega_2) t_1 \right)$ 

On rappelle que le couplage 1-2 n'a aucun effet sur la cohérence 20 entre ces deux spins.

<u>Détail du calcul</u> :

 $2I_{1\times}I_{2y} \xrightarrow{I_{1z}} 2(I_{1\times}C_1 + I_{1y}S_1)(I_{2y}C_2 - I_{2\times}S_2)$ 

 $= 2I_{1x}I_{2y}C_{1}C_{2} - 2I_{1y}I_{2x}S_{1}S_{2} - 2I_{1x}I_{2x}C_{1}S_{2} + 2I_{1y}I_{2y}S_{1}C_{2}$
$$\begin{aligned} 2I_{1y}I_{2x} & \xrightarrow{I_{1z}} & \xrightarrow{I_{2z}} & 2(I_{1y}c_1 - I_{1x}s_1)(I_{2x}c_2 + I_{2y}s_2) \\ &= 2I_{1y}I_{2x}c_1c_2 - 2I_{1x}I_{2y}s_1s_2 + 2I_{1y}I_{2y}c_1s_2 - 2I_{1x}I_{2x}s_1c_2 \end{aligned}$$
  
En combinant les deux :  

$$\sigma_5 &= (2I_{1x}I_{2y} + 2I_{1y}I_{2x})(c_1c_2 - s_1s_2) \\ &- (2I_{1x}I_{2x} - 2I_{1y}I_{2y})(c_1s_2 + s_1c_2) \end{aligned}$$
  
- Pulse  $\theta_x$  :  

$$\sigma_5 & \xrightarrow{\theta_x} & \{20C\}_y^{12} c_{1+2}c_0 + (2I_{1x}I_{2x} + 2I_{1x}I_{2x}) c_{1+2}s_0 \\ &- 2I_{1x}I_{2x}s_{1+2} + 2I_{1y}I_{2y}s_{1+2}c_0^2 \\ &+ (2I_{1y}I_{2z} + 2I_{1z}I_{2y})s_{1+2}s_0c_0 + 2I_{1z}I_{2z}s_0^2 \end{aligned}$$
  
solt, si l'on ne garde que les termes observables :  

$$\sigma_6 &= (2I_{1x}I_{2z} + 2I_{1z}I_{2x})c_{1+2}s_0 + (2I_{1y}I_{2z} + 2I_{1z}I_{2y})s_{1+2}s_0c_0 \\ c_0 &= \cos \theta \qquad s_0 = \sin \theta \end{aligned}$$
  
Sil $\theta_1 = -90^\circ$ ,  

$$\sigma_6 &= (2I_{1x}I_{2z} + 2I_{1z}I_{2x})c_{1+2} \\$$
  
Le premier terme apparaît à  $(\omega_1, \omega_{1+2})$  dans la base  $(F_2, F_1)$ , less second à  $(\omega_2, \omega_{1+2})$ .

 $\omega_{1+2} = \omega_1 + \omega_2$ 

Il n'y a pas de différentiation possible entre écho et antiécho (autre que par un cycle de phase) puisque le facteur indiquant la modulation en  $t_1$  n'est constitué que par un terme en cosinus ; ce facteur n'étant pas complexe va donner après transformation de Fourier un signal d'évolution symétrique par rapport à la fréquence zéro de la seconde dimension (voir chapitre  $\nabla$ I), et le sens de la précession double quantum ne pourra pas être déterminé.

#### Angle 8 quelconque :

Puisque les termes apparaissant à  $\omega_1$  et  $\omega_2$  dans F2 sont modulés par les mêmes facteurs, il suffit de raisonner sur un seul. Ainsi, si l'on ne garde que les termes constituant la tache à  $(\omega_1, \omega_{1+2})$ , et si l'on considère que l'on réalise la détection en quadrature selon l'axe x, alors le terme  $2I_{1x}I_{2z}$  apparait comme réel pour le récepteur, et le terme  $2I_{1y}I_{2z}$  comme imaginaire.

Ainsi le signal détecté est :

$$s(t_1, t_2) = k (c_{1+2}s_0 + i s_{1+2}s_0c_0) e^{i\omega_1 t_2}$$

k : constante

et si l'on note  $c_a = cos(w_1 t_2)$   $s_a = sin(w_1 t_2)$ :  $s(t_1, t_2) = k \ s_{\theta}(c_{1+2}c_a + i \ s_{1+2}c_ac_{\theta} + i \ c_{1+2}s_a - s_{1+2}s_ac_{\theta})$   $= \frac{k}{2} \ s_{\theta}(c_{1+2+a} + c_{1+2-a} + i \ s_{1+2+a}c_{\theta} - i \ s_{1+2-a}c_{\theta}$   $+ i \ s_{1+2+a} - i \ s_{1+2-a}c_{\theta} + c_{1+2+a}c_{\theta})$  $= \frac{k}{2} \ s_{\theta}\{(1 + c_{\theta})(c_{1+2+a} + i \ s_{1+2+a})\}$ 

 $\frac{2}{2} + (1 - c_{\theta})(c_{1+2+a} + i - s_{1+2+a}) + (1 - c_{\theta})(c_{1+2-a} + i - s_{1+2-a})$ 

soit, en notation traditionnelle :

$$s(t_{1},t_{2}) = \frac{k}{2} s_{\theta} \{ [1 + c_{\theta}] [cos((\omega_{1} + \omega_{2})t_{1} + \omega_{1}t_{2}) + i sin((\omega_{1} + \omega_{2})t_{1} + \omega_{1}t_{2})] + [1 - c_{\theta}] [cos((\omega_{1} + \omega_{2})t_{1} - \omega_{1}t_{2}) + i sin((\omega_{1} + \omega_{2})t_{1} - \omega_{1}t_{2})] \}$$

La première partie – modulée en  $sin\theta(1 + cos\theta)$  – constitue l'antiécho (précession dans le même sens en ti et t2) et la seconde – modulée en  $sin\theta(1 - cos\theta)$  – l'écho. On voit donc que le choix de l'angle  $\theta$  est fondamental pour la sélection de l'un ou l'autre type de pic :



## FIGURE IX-5

Sélection des pics d'écho (+) et d'antiécho ( $\Box$ ) par le pulse  $\theta$ .

Un gain de 30% sur l'intensité du signal est réalisé lorsque l'on choisit 0 = 120° au lieu de 90°. Cependant la valeur communément utilisée dans ces expériences est de 135°, car elle fournit la meilleure discrimination entre pics N et P en augmentant quand même l'intensité des taches de 20%.

La deuxième méthode pour réaliser la quadrature dans la seconde dimension est celle classique qui consiste à décaler la phase signal d'évolution de 90° (et à cycler le récepteur en du conséquence) en constituant une deuxième expérience pour chaque de ti (cf. chapitre II). Cette méthode étant employée valeur dans toutes les expériences à deux dimensions, il est normal d'y penser pour l'expérience présente ; rappelons toutefois que cette technique ne permet pas de récupérer une matrice phasée. Ceci n'est pas important, car le signe des raies des multiplets obtenus est très difficile à prévoir, voire même impossible pour des systèmes possédant plus de deux spins couplés. Pour l'expérience d'INADEQUATE (terme que nous employons

abusivement aussi pour le proton), la réalisation simple de cette technique n'est envisageable que si l'on peut incrémenter

la phase des trois premiers pulses de 45°. En effet, pour décaler la phase résultante à la fin du temps d'évolution de 90°, il convient de tenir compte du fait que les cohérences double quantum sont deux fois plus sensibles aux changements de phase que les excitations classiques à un quantum, et donc qu'une rotation préliminaire d'un angle  $\varphi$  sur ces opérateurs induira un changement de la phase d'évolution de 2 $\varphi$ .

Si l'on ne possède pas l'appareillage nécessaire pour envoyer des phases multiples de 45°, il faut se tourner vers une autre solution qui consiste à utiliser des pulses composites (12), dont l'effet sera de faire tourner la magnétisation à un quantum de 45° selon l'axe z, et la cohérence à deux quantum de 90°. Si l'on néglige les effets d'offset et d'inhomogéneité du champ radiofréquence, il peut être montré que la séquence 90° -  $\varphi_y = 90°$ , est équivalente à  $\varphi_z$  (décalage de phase d'un angle  $\varphi$ ) de même que 90°,  $= \varphi_{-y} = 90°$ . De ce fait la deuxième partie de la séquence (construite uniquement pour la quadrature en F1) se présente sous la forme suivante (on applique le pulse composite après le troisième pulse qui crée la cohérence à deux quanta) :

 $90_{x}^{*} - 90_{-x}^{*} - 45_{-y}^{*} - 90_{x}^{*}$  simplifiable en  $45_{-y}^{*} - 90_{x}^{*}$ ,  $90_{-x}^{*} - 90_{x}^{*} - 45_{y}^{*} - 90_{-x}^{*}$  simplifiable en  $45_{y}^{*} - 90_{-x}^{*}$ .

La séquence résultante est donc :

# FIGURE IX-6

INADEQUATE 2D dans laquelle la quadrature en F1 est réalisée par l'addition de deux FID où le signal d'évolution est décalé de 90°. Les phases des pulses sont indiquées dans le texte. Il faut maintenant distinguer le cas du carbone 13 et celui du proton. Pour la première espèce, les seuls systèmes que l'on peut rencontrer sont de type AX (pour les raisons citées dans le paragraphe précédent). De plus, les très faibles sensibilité et abondance isotopique de ce noyau ne permettent pas d'envisager l'utilisation de la séquence décrite sur la figure IX-6.

En proton, on peut avoir des systèmes AX, AMX, ... et il est là impératif à la fois de sélectionner les pics N par leur intensité (par la valeur du pulse 0) et de supprimer les autres au moyen du cycle de phase décrit précédemment. En effet, l'autre problème qui se pose avec de tels systèmes est que si l'on effectue un pulse de lecture de 90°, on récupère théoriquement une matrice contenant non seulement les corrélations directes entre spins, mais aussi les taches des spins passifs pour une somme de fréquences dans F1 donnée (13).

Détaillons ce point :

Sur un système de 3 spins couplés 1-2-3, si l'on réalise l'expérience d'INADEQUATE 2D avec un délai  $\tau$  supposé optimisé pour les trois couplages, on a au début du temps d'évolution :

$$\sigma_{4} = \{2QC\}_{U}^{12} + \{2QC\}_{U}^{13} + \{2QC\}_{U}^{23}$$

Si l'on raisonne uniquement sur le premier opérateur, les effets de déplacement chimique et de couplage pendant le temps d'évolution vont le transformer en :

$$\{2QC\}_{y}^{12} \longrightarrow \{2QC\}_{y}^{12} c_{1+2} c_{J} = \{2QC\}_{x}^{12} s_{1+2} c_{J}$$
$$- 2I_{3z} \{2QC\}_{x}^{12} c_{1+2} s_{J} = 2I_{3z} \{2QC\}_{y}^{12} s_{1+2} s_{J}$$

 $c_j, s_j: cos(\pi J_{eff}t_1)$  effet de couplage avec le spin passif

Pulse de lecture 0 :

$$\begin{array}{c} \theta_{\times} \\ \xrightarrow{\qquad} 2[I_{1\times}(I_{2y}C_{\theta} + I_{2z}S_{\theta}) + (I_{1y}C_{\theta} + I_{1z}S_{\theta})I_{2\times}]C_{1+2}C_{J} \\ &- 2[I_{1\times}I_{2\times} - (I_{1y}C_{\theta} + I_{1z}S_{\theta})(I_{2y}C_{\theta} + I_{2z}S_{\theta})]S_{1+2}C_{J} \\ &- 4[I_{1\times}I_{2\times}(I_{3z}C_{\theta} - I_{3y}S_{\theta}) - (I_{1y}C_{\theta} + I_{1z}S_{\theta})(I_{1y}C_{\theta} + I_{1z}S_{\theta})(I_{1y}C_{\theta} + I_{1z}S_{\theta})]C_{1+2}S_{J} \\ &- 4[I_{1\times}(I_{2y}C_{\theta} + I_{2z}S_{\theta})(I_{3z}C_{\theta} - I_{3y}S_{\theta}) + (I_{1y}C_{\theta} + I_{1z}S_{\theta})(I_{2\times})(I_{3z}C_{\theta} - I_{3y}S_{\theta})]S_{1+2}S_{J} \end{array}$$

Termes observables : (à ( $\omega_1 + \omega_2$ ) dans F₁)

fréquences dans F2 :

ωī	:	$2I_{1\times}I_{2z}S_{\theta}C_{1+2}C_{J}$ ; - $4I_{1\times}I_{2z}I_{3z}S_{\theta}C_{\theta}S_{1+2}S_{J}$ ;
		$2I_{1y}I_{2z}C_{\theta}S_{\theta}S_{1+2}C_{J}; 4I_{1y}I_{2z}I_{3z}S_{\theta}C_{\theta}C_{1+2}S_{J}$
ωz	:	$2I_{1z}I_{2x}S_{\theta}C_{1+2}C_{J}$ ; - $4I_{1z}I_{2x}I_{3z}S_{\theta}C_{\theta}S_{1+2}S_{J}$ ;
		$2I_{iz}I_{2y}C_{\theta}S_{\theta}S_{1+2}C_{j}; 4I_{iz}I_{2y}I_{3z}S_{\theta}C_{\theta}C_{1+2}S_{j}$
ω ₃	:	4I _{1z} I _{2z} I _{3y} 5 ³ ₉ C ₁₊₂ S _J

On voit que si  $\theta = 90^{\circ}$ , la tache ( $\omega_3, \omega_1 + \omega_2$ ) a même intensité que les deux autres représentant des corrélations directes.

Pour un angle  $\theta$  différent de 90°, les taches étant formées de multiplets en absorption et en dispersion, il est très difficile de prévoir leur signe. Néanmoins, puisque les quatre multiplets (pour  $\omega_1$  et  $\omega_2$  dans F₂) sont tous différents, la hauteur maximale relative des pics correspond à la totale cohérence des opérateurs. L'intensité des taches "directes" est donc proportionnelle à [sin $\theta$  + 2sin $\theta$ cos $\theta$  + sin² $\theta$ cos $\theta$ ], alors que le signal dû au signe passif est modulé par sin³ $\theta$  qui diminue quand  $\theta$  s'écarte de 90°.

De plus, on peut constater qu'au facteur d'angle près, les intensités des deux taches directes sont gouvernées par les mêmes opérateurs, que ce soit en dispersion ou en absorption. Le calcul pour l'un des deux modes donne donc des indications sur les effets "d'interférences" constructives ou destructives des opérateurs. 1)  $2I_{1\times}I_{2\times} \equiv a_{1\times}\{-,-,+,+\}$   $C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{1\times}C_{$ 

(* intervention du couplage avec le spin passif  $J_{eff} = J_{13} + J_{23}$ 

$$J_{13} + J_{23} \neq \begin{bmatrix} --++\\ --++\\ --++ \end{bmatrix}$$

 $multipliée par a_{12}sin0$ 

2) - 4I_{1×}I_{2z}I_{3z} =  $a_{12}a_{13}$ {-,+,+,-}  $S_{1+2}S_{J} = a_{13}a_{23}$ {+,-} [- + + -|+ - - +] 《a₁₂a₂₃sin8cos8》

Tache résultante :

si J₂₃ > 0 :

©o⊕o	
©⊙⊙€	

 $Ointensité : sin \theta (1 - cos \theta)$   $Ointensité : sin \theta (1 + cos \theta)$ 

b) Tache  $(\omega_2, \omega_1 + \omega_2)$  :

 $si J_{13} > 0$ :

Ainsi, si les taches apparaissant à même fréquence en F1, et provenant de corrélation directe (c'est à dire symétriques par rapport à la droite de pente 2) ont même orientation, alors les deux couplages avec le spin passif ont même signe.

La figure IX-7 présente un schéma global de comparaison entre les matrices obtenus théoriquement pour un système AMX avec l'expérience double quantum à deux dimensions pour les deux valeurs de 8 traitées précédemment (8 = 90° et 8 = 135°).



 $\frac{\text{FIGURE IX}-7}{6\theta = 90^{\circ}} \qquad 6\theta = 135^{\circ}$ 

L'expérience à deux dimensions avec un angle 0 différent de 90° possède donc un triple avantage pour un composé contenant des systèmes AMX. Tout d'abord, elle permet la sélection des pics d'écho, mais aussi elle supprime les signaux de corrélation non directe, et enfin elle permet de connaître le signe des couplages par les orientations respectives des taches.

De plus, la structure hyperfine est très souvent visible directement sur la matrice (selon F2), car le fait que l'on obtienne des composantes en absorption et en dispersion affine les signaux initiaux, puisqu'en choisissant convenablement les niveaux d'intensité on peut ne garder que les raies provenant de l'addition cohérente des deux composantes. IX-4) Applications aux oligosaccharides :

Les techniques de corrélations via les transitions à deux quanta seront illustrées ici par des expériences en RMN du proton sur les oligosaccharides (les expériences INADEQUATE ¹³C étant beaucoup trop insensibles pour les quantités d'échantillon dont nous disposons).

Considérons les résultats obtenus avec le pentasaccharide P1. Le contour complet est montré sur la figure IX-8.

On peut dès à présent noter que les signaux de l'eau et du méthoxy sont extrêmement faibles par rapport aux observations classiques. Ceci est dû au fait que ces systèmes ne peuvent donner de cohérences à deux quanta et leur contribution est éliminée par le cycle de phase qui supprime les transitions classiques à un quantum.

La figure IX-8 montre les schémas d'attribution pour les deux unités G et A^r. Les enchaînements ont été interrompus dès qu'une ambiguité s'est présentée, et il est clair que ce type d'expérience permet d'aller beaucoup plus loin que les corrélations classiques (COSY).

L'absence de diagonale constitue un atout majeur pour la mise en évidence de corrélations dans les systèmes fortement couplés. De plus, il faut noter que la structure des multiplets est conservée dans la matrice et que ceci peut être utilisé pour estimer la valeur des constantes de couplage. L'expérience peut en effet être conduite de manière à augmenter la résolution dans la dimension  $F_2$  en sacrifiant éventuellement celle de la dimension  $F_1$  pour éviter de créer et manipuler des matrices de trop grande dimension ; il n'y a en effet aucune contrainte pour les rapports de résolution entre les deux dimensions.

Nous avons détaillé dans le chapitre précédent la forme et l'orientation théorique des taches apparaissant sur la matrice de l'expérience INADEQUATE. La figure IX-9 montre qu'en



## FIGURE IX-8

contour d'une expérience Trac**é** ЗD at de corrélation par les à deux quanta (INADEQUATE 1_H) entasaccharide cohérences 52 p le schéma P1. La pseudo diagonale ~9u**ée** ainsi 9u**e** d'attribution concernant l'unité A^r.



# FIGURE IX-9

Contour d'une expérience d'INADEQUATE proton l a mélange de asaccharides 1 2 taches sont agrandies afin de 20 nt, ł et s d'orientation et las différents couplages las constituant.

choisissant de façon adéquate les niveaux d'intensité, on peut connaître quelques couplages directement, sans que cela ne nécessite une grande résolution (taille identique à celle des autres expériences 2D telles que COSY ...). L'orientation des taches est conforme à ce qui avait été prévu précédemment, c'est à dire qu'elles sont toutes dans le même sens, puisque les systèmes que l'on observe ne possèdent que des couplages de même signe (couplages vicinaux). Seules les parties 5, 6, 6' pourraient montrer des signaux - à même fréquence dans F1 orientés différemment, mais on ne peut les voir, car les couplages avec le spin passif sont de signes opposés et tendent à "écraser" les taches dans la seconde dimension.

Les performances de cette catégorie d'expériences sont telles qu'elles devraient être utilisées beaucoup plus systématiquement qu'elles ne le sont actuellement. Nous verrons ultérieurement qu'elles permettent de plus de nombreuses variations très utiles et qu'elles sont précieuses pour mettre en évidence des corrélations autrement très difficiles à observer, comme par exemple lors des travaux dans l'eau légère.

La possibilité de réaliser les attributions bien au delà de ce qui est généralement possible en corrélation classique fait que ces expériences constituent une alternative très efficace aux techniques de transferts multiples (RELAIS, ...) dans le cas où l'on est confronté à des problèmes de largeur de raies, comme dans les polymères par exemple. Dans cette optique là, ils peuvent aussi remplacer de façon avantageuse les expériences de transferts dans le champ tournant qui sont, elles, limitées par la relaxation transverse très importante de ces composés.

IX-5) Expérience de double quantum relayée :

L'intérêt majeur que présentent les expériences 2D tient dans le principe d'évolution des d'INADEQUATE cohérences double quantum pendant ti, qui permet d'obtenir dans la seconde dimension la somme des fréquences des signaux corrélés, et donc d'espérer, outre la suppression de la diagonale et des pics de noyaux non couplés tels que solvants autres, une séparation plus grande (dans F1) des pics de et fréquences proches. Dans le COSY, pour que deux taches soient superposées, il suffit que les paires de signaux correspondant aient des déplacements chimiques proches, alors que dans l'INADEQUATE, il faut aussi que les sommes des signaux couplés soient identiques, ce qui est moins fréquent.

Ces considérations ont conduit quelques équipes (17,18) à envisager de relayer l'information obtenue sur ces matrices, afin de récupérer sur une même "ligne" dans Fi les deux signaux directs plus ceux des protons qui leur sont liés.



#### FIGURE IX-10

Comparaison schématique des matrices : a) d'INADEQUATE, b) d'INADEQUATE relayée.

L'utilisation d'un simple relais par la séquence  $\tau = 180^{\circ} - \tau = 90^{\circ}$  (identique au relais classique) placée après l'INADEQUATE, tel que l'ont conçu Macura et coll. (17) s'est montrée d'une faible sensibilité sur nos oligosaccharides, et présente l'inconvénient de demander un important cycle de phase pour la réalisation correcte de l'expérience. De plus, sur la matrice, on récupère outre les taches normales de part et d'autre de la "diagonale" de pente 2, une droite de pente 1 correspondant à des transitions 10 directes. Il doit s'agir des transitions 20 qui sont refocalisées par le second sandwich  $\tau_2 = 180^{\circ} - \tau_2$ . Notons que les signaux des noyaux isolés, tels solvant, OCH₃ ... n'apparaissent pas sur la matrice, donc le cycle de phase les supprime bien.

Pour contourner ces problèmes, nous proposons une autre solution, qui combine l'expérience d'INADEQUATE avec l'emploi, pour relayer la magnétisation, d'un pulse de spin-lock afin de réaliser les conditions de Hartmann-Hahn sur les cohérences 20.

La séquence est la suivante :



# FIGURE IX-11

# Expérience DREAM

("Double quantum Relay Enhanced by Adiabic Mixing")

Les cohérences double quantum évoluent pendant ti, permettant l'obtention d'une matrice du même type que celle de l'INADEQUATE, et sont bloquées dans le plan transverse (selon un axe) par le pulse de spin-lock, les cohérences non parallèles à cet axe étant immédiatement défocalisées. Ainsi, puisque ces cohérences répondent aux conditions de Hartmann - Hahn pendant leur évolution commune dans le champ tournant, des échanges de magnétisation isotropes se produisent entre elles, conduisant à des transferts d'aimantation entre noyaux même faiblement couplés. De ce fait, on peut espérer récupérer avec une telle expérience une matrice montrant des corrélations relayées via les transitions double quantum.

#### Application aux oligosaccharides :

Cette nouvelle expérience a été réalisée avec succès sur le pentasaccharide P1, ainsi que le montre la figure IX-12.

La durée du pulse de spin-lock est de 26 ms, et 160 incréments de ti ont été utilisés (beaucoup moins que pour l'INADEQUATE, ce qui explique que les taches soient légèrement allongées en Fi). Tous les autres paramètres sont identiques à ceux de l'expérience INADEQUATE.

Sur la matrice, on s'aperçoit que la magnétisation est effectivement bien relayée pendant le spin-lock, puisque il y a de nombreuses taches supplémentaires par rapport au double quantum classique. Toutes les taches ont été interprétées, et on constate que l'on a même dépassé le stade du relais, puisque par exemple tous les protons 1 présentent plus de deux taches dans F1 : si l'on regarde à la fréquence du proton 1 de l'unité  $A_s^*$ , on trouve des taches de corrélation à  $(\omega_1, \omega_{1+2})$ ,  $(\omega_1, \omega_{1+3})$ et  $(\omega_1, \omega_{2+3})$  bien sûr, mais aussi à  $(\omega_1, \omega_{3+4})$ , et même une toute petite à  $(\omega_1, \omega_{2+4})$ .

Pour les unités composant ce pentasaccharide, il existe de nombreux couplages ⁴J, c'est à dire par exemple des couplages 1-3 ou 2-4. Ainsi, le spectre contient de nombreux systèmes AMX, et l'on peut se dire que pour obtenir des taches relayées comme  $(\omega_3, \omega_1 + \omega_2)$ , il suffit d'appliquer un pulse de lecture de 90° à la place du 135° de l'INADEQUATE classique, comme nous venons de le voir. Cette expérience a été réalisée sur le même pentasaccharide, et il s'avère que de nombreux artefacts apparaissent, dûs à une mauvaise réalisation de la quadradure en F1. De plus, l'expérience DREAM permet, en rallongeant la durée du spin-lock, d'espérer obtenir des effets de double, triple, voire quadruple relais, et possède là un deuxième avantage considérable sur l'INADEQUATE 90°.



FIGURE IX-12

Contour complet expérience de DREAM pentasaccharide d'attribution sch**á**ma protons de l'unité ast indiqua, a t las taches de relais pour ces protons sont entourées.

# **<u>REFERENCES</u>** :

1)	A. J. Shaka et R. Freeman :
	J. Magn. Res. <b>51,</b> 169 (1983)
2)	A. Bax, R. Freeman et S. P. Kempsell :
	J. Am. Chem. Soc. <b>102,</b> 4849 (1980)
3)	A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel et M. H. Levitt :
	J. Magn. Res. <b>43</b> , 478 (1981)
4)	T. Mareci et R. Freeman :
	J, Magn. Res. <b>48</b> , 158 (1982)
5)	D. L. Turner :
	J. Magn. Res. <b>49</b> , 175 (1982)
6)	D. L. Turner :
	J. Magn. Res. 53, 259 (1983)
7)	A. Bax et T. H. Mareci :
	J. Magn. Res. <b>53,</b> 360 (1983)
8)	D. W. Sørensen, R. Freeman, T. Frenkiel,
	I. H. Mareci et R. Schuck :
	J. Mayn. Res. 40, 180 (1982)
9)	D. Piveteau, M. A. Delsuc, E. Guittet
	et J. Y. Lallemand :
	Magn. Res. Chem. 28, n°2 (1985)
10)	S. W. Sparks et P. D. Ellis :
	J. Magn. Res. 62, 1 (1985)
11)	H. Kessler, W. Bermel et C. Griesinger :
	J. Magn. Res. 62, 573 (1985)
12)	M. H. Levitt et R. R. Ernst :
	J. Magn. Res. 55, 247 (1983)

- 13) T. H. Mareci et R. Freeman : J. Magn. Res. 51, 531 (1983)
- 14) J. Boyd, C. M. Dobson et C. Redfield : J. Magn. Res. 55, 170 (1983)
- 15) C. C. Hanstock et J. W. Lown : J. Magn. Res. 58, 167 (1984)
- 16) C. Dalvit, P. E. Wright et M. Rance : J. Magn. Res. 71, 539 (1987)
- 17) P. H. Bolton : J. Magn. Res. 54, 333 (1983)
- 18) S. Macura, N. G. Kumar et L. R. Brown : J. Magn. Res. 60, 99 (1984)

 	 -	-	2/10

EXPERIENCES DANS L'EAU LEGERE



## X-1) Introduction :

Le principal intérêt des travaux de RMN dans l'eau légère est l'observation des protons labiles des molécules étudiées, c'est à dire ceux qui, liés à un atome d'oxygène ou d'azote, peuvent s'échanger avec les protons du solvant ; ce sont, dans le cas des oligosaccharides, essentiellement les protons appartenant aux groupements OH et NH (pour les peptides et protéines, les NH appartenant aux résidus). De plus, il peut être très intéressant que les échantillons restent dans leur milieu initial (la plupart du temps, faibles concentrations en milieu aqueux) à la fois pour s'assurer que les résultats des mesures sont fiables et correspondent à ce qui existe en environnement naturel (certaines protéines sont dénaturées par la lyophilisation) et aussi pour permettre d'autres analyses physicochimiques en ayant laissé les produits dans leur état initial. De ce fait, les expériences de RMN sur de petites concentrations de soluté dans H2O prennent actuellement beaucoup d'ampleur (1), et suscitent de nouveaux intérêts au fur et à mesure que les techniques et les appareillages deviennent plus performants.

La présence d'un immense pic d'eau sur un spectre présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, ce pic peut cacher certains signaux intéressants en les recouvrant totalement ; ensuite de sérieux problèmes concernent alors l'appareillage :

- résolution inadéquate pour le convertisseur analogique-numérique,
- dépassement de la capacité de la mémoire,
- erreurs d'arrondis pendant la transformation de Fourier,

- non linéarité du système de détection.

Il est donc impératif, en RMN à tranformée de Fourier, d'utiliser des techniques spéciales pour s'affranchir de ces obstacles.

D'une manière générale, ces techniques se partagent en trois groupes :

- celles qui détruisent la magnétisation longitudinale du signal indésirable avant la séquence elle-même, de telle manière que l'aimantation transverse après le pulse d'observation soit la plus petite possible, - celles qui utilisent une excitation sélective touchant tout le spectre sauf le pic de solvant,

- celles qui consistent à exciter les transitions multiquanta et à sélectionner au moyen d'un cycle de phase approprié uniquement les noyaux couplés. Ces expériences ont été détaillées dans le chapitre précédent.

La première catégorie de méthodes a généré d'une part les expériences basées sur la séquence d'inversion-recouvrement (2,3), qui reposent sur la différence de temps de relaxation longitudinal entre les noyaux du solvant et ceux du soluté, d'autre part la simple saturation (4) qui supprime l'aimantation du solvant. La saturation peut permettre une très efficace suppression des protons de l'eau, mais ne convient plus lorsqu'ils sont en échange rapide (plus rapide que la relaxation intrinsèque du solvant) avec des noyaux intéressants du soluté, puisque dans ce cas on aboutit aussi à 1 a suppression de ces derniers. Cela exclut donc l'utilisation de cette technique pour l'observation des protons appartenant aux groupements hydroxyles des unités oligosaccharidiques.

Une autre technique consiste à diminuer le temps de relaxation spin-spin des protons de l'eau au moyen d'un sel (NH^{*}₄Cl⁻,...) et à utiliser la séquence de Carr - Purcell - Meiboom - Gill pour supprimer totalement leur signal (5). Là encore, cette méthode est déconseillée pour notre étude des oligosaccharides, car, outre le fait qu'elle "détruit" l'échantillon, l'introduction de composés fortement dipolaires risque de perturber la conformation du produit observé. De plus, le changement de constante diélectrique induit par ces ions ne permettra pas de conserver les mêmes conditions expérimentales.

Le deuxième type de techniques de suppression du solvant est donc l'envoi de pulses sélectifs.

Là encore, on peut distinguer deux types d'expériences :

- celles qui utilisent des pulses longs et de faible puissance (Pulses "mous"),
- celles qui utilisent des trains de pulses intenses et très courts, séparés par des délais.

Les pulses mous demandent un appareillage particulier, ou l'utilisation de pulses composites : <u>Exemple</u> : séquence "2-1-4" de Redfield (6,7)

Les expériences à trains de pulses intenses permettent plus facilement un contrôle de la phase obtenue : Exemple : séquences DANTE (8) et " $1-\overline{1}$ " (9)

Comme nous le verrons par la suite, ces deux types de séquences possèdent les mêmes inconvénients pour la suppression de la résonance de l'eau : tout d'abord, il est très difficile de détecter les signaux proches du solvant, ensuite les intensités des raies ne sont plus forcément respectées, et enfin il peut être nécessaire d'employer une correction de phase violente et non linéaire du spectre résultant. Ainsi, ces techniques sont progressivement supplantées par les séquences de pulses "polynômiaux".

#### X-2) Théorie des formes d'excitation :

Pour un système à l'équilibre, l'aimantation transverse générée par une excitation F(t) est égale à :

$$M_{xy}(\nu) = M_0(\nu).E(\nu)$$

où E(v) = Transformée de Fourier de <math>F(t)

Ainsi, si l'on peut négliger les phénomènes de relaxation, le spectre d'excitation (en fonction de la fréquence) est proportionnel à la transformée de Fourier de la fonction constituée par la séquence de pulses radiofréquence précédant l'acquisition.

X-2-1) DANTE :

Cette séquence est constitué par de petits pulses séparés par des délais identiques et fixes. Il s'agit donc d'un peigne de Dirac dont la transformée de Fourier est un autre peigne dans le domaine des fréquences : <u>Peigne_de Dirac</u> :





Fonction_rectangle :



 $G_2(v) = t_1 \operatorname{sinc}(vt_1)$ 

$$t_{1}$$

$$F_{2}(t) = \operatorname{Rect}\left(\frac{t}{t_{1}}\right)$$

$$\sin \pi x$$

Rappel : sinc  $x = \frac{\pi x}{\pi x}$ 

La fonction d'excitation réelle du spectre est la combinaison des deux fonctions précédentes :

<u>Apodisation</u> : (troncature due au fait que le signal n'est pas infini)



$$F_{3}(t) = \sum_{k=0}^{n} \delta(t - k\tau) \qquad G_{3}(\nu) = G_{1}(\nu) \otimes \operatorname{sinc}\left(\frac{1}{n\tau}\right)$$



@ : opérateur de convolution

Comme on le voit, l'irradiation sélective par le DANTE n'est pas parfaite, puisque le signal principal est accompagné de nombreuses - "oreilles". Pour obtenir une encore meilleure sélectivité, d'autres méthodes ont été proposées. En effet, les critères d'optimisation des formes d'excitation sélective sont doubles. Tout d'abord, il faut obtenir une bande assez large d'excitation nulle autour de la fréquence du solvant (généralement la fréquence de la porteuse), afin que l'on puisse tolérer de petites inhomogénéités du champ Bo et des la porteuse, sur la position de mais aussi, erreurs paradoxalement, que les autres signaux soient convenablement excités même s'ils sont proches de celui du solvant. Cela a conduit à penser aux fonctions sinⁿ(x) (réf. 10) qui se

rapprochent de ces critères (on met l'offset du pic à supprimer à v = 0) :

X-2-2) Fonctions sinⁿ(x) :



$$G(v) = \sin^{n}(\pi v \tau)$$

#### FIGURE X-2

La transformée de Fourier inverse de telles fonctions est donnée par :

$$F(t) = \sum_{k=0}^{n} (-1)^{k} {n \choose k} \delta\left(t - \left(k - \frac{n}{2}\right)\tau\right)$$

 $o\dot{u} \begin{pmatrix} n \\ k \end{pmatrix} = k^{i \, i \, m \, e}$  étément du polynome de Pascal d'ordre n Exemple :  $\sin^2 x : n = 2 \, \text{donc polynôme } 1 \, 2 \, 1$ 

$$F(t) = \sum_{k=0}^{2} (-1)^{k} {\binom{2}{k}} \delta(t - (k - 1)\tau)$$
  
=  $\delta((t + 1)\tau) - 2\delta(t\tau) + \delta((t - 1)\tau)$ 

donc la séquence est :  $\alpha_{\phi} = \tau = 2\alpha_{-\phi} = \tau = \alpha_{\phi}$ .



FIGURE X-3 séquence 1 2 1

La barre sur le 2 signifie que la phase est inversée de 180

La séquence 1  $\overline{3}$   $\overline{3}$   $\overline{1}$  est la plus utilisée.

Les fonctions cosinusoïdales correspondantes (lorsque l'on veut irradier la fréquence 0) sont :

$$G(v) = \cos^{n}(\pi v\tau) \xrightarrow{FT} F(t) = \sum_{k=0}^{n} {n \choose k} \delta\left(t - \left(k - \frac{n}{2}\right)\tau\right)$$

conduisant aux séquences 1 2 1, 1 3 3 1, 1 4 6 4 1 ...

<u>Remarque</u>: les fonctions sinusoïdales (traitées comme imaginaires) conduisent, après transformation de Fourier à des fonctions impaires, donc les deux moitiés du spectre de part et d'autre de la fréquence O seront en opposition de phase. Par contre, la phase sera identique pour tous les signaux des spectres obtenus avec une fonction d'excitation cosinusoïdale.

#### X-2-3) Pulses gaussiens :

<u>X−3)</u>

Une enveloppe gaussienne (11) est un bon compromis entre l'optimisation de la sélectivité dans le domaine des fréquences et la minimisation de la durée de la séquence dans le domaine des temps, puisque la transformée de Fourier d'une gaussienne est une gaussienne.

Pour envoyer ces pulses gaussiens, certains spectromètres ont subi quelques modifications qui leur permettent d'envoyer des pulses "mous", mais il est aussi possible de réaliser ceci en utilisant des pulses polynômiaux. <u>Exemple</u> : séquence OBTUSE (12)

Applications aux oligosaccharides :

L'observation des protons labiles dans l'eau ordinaire est conditionnée par la vitesse d'échange avec le solvant. Dans les conditions normales d'étude, les oligosaccharides ne représentent pas une catégorie de composés favorable, car les protons hydroxyliques s'échangent très vite avec l'eau et sont la plupart du temps inobservables.

Une autre catégorie est constituée par les protons de groupes particulier ceux qui appartiennent aux groupements NH, et en acétamides, tels que ceux de la N-Acétyl Glucosamine. Cette minoritaire dans l'héparine, mais l'acétylation unité est modifie profondément les propriétés des dérivés actifs. Toute N-acétylation (ou N-acylation) doit donc pouvoir être mise en façon univoque. Les études réalisées jusqu'à évidence de présent utilisent en fait le déplacement chimique du proton 2 de la glucosamine comme critère d'acétylation. Malheureusement, deux écoles s'opposent régulièrement en plaçant ce proton à



# FIGURE X-4

Spectre ¹H de la H-Acétyl-Glucosamine dans H2O/D2O (90:10 v/v) à 500 HHz (solution 10 mH) pH = 7.0 température 296 K. a) Spectre obtenu par acquisition classique b) Spectre obtenu avec élimination du pic de l'eau par la séquence 1 3 3 1.

3.95 (13) ou 3.40 ppm (14,15,16). Il est évident qu'une telle différence est anormale et qu'il faut trancher définitivement entre ces deux valeurs. L'utilisation de ces données par d'autres auteurs a en effet déjà conduit à des déterminations de structure (et de relations structure-activité) totalement peut venir erronées. La réponse absolue ne que d'une observation directe du signal NH (dans les conditions classiques d'étude, soit dans l'eau), et de la mise en évidence d'une manière ou d'une autre de la corrélation scalaire NH - H2 dans cette unité.

C'est ce problème que nous allons traiter dans le cas de l'hexasaccharide H1 contenant à priori une unité N-acétylée. La première étape consiste à observer le proton NH dans l'eau ordinaire. Afin de ne pas rencontrer d'ambiguïté lors de l'attribution, les premières expériences seront réalisées sur le monomère N-Acetyl D-glucosamine (présence de deux anomères). La figure X-4 montre les spectres de ce composé dans l'eau ordinaire.

On constate que si le signal est très difficilement détectable avec une expérience classique, les techniques de pulses composites du type 1  $\overline{3}$   $\overline{3}$   $\overline{1}$  permettent un niveau de suppression très élevé (facteur 600 ici !).

Les signaux des protons NH correspondant aux deux formes anomériques sont bien visibles à 8.1 et 8.2 ppm. Le couplage  $J_{NH-HZ}$  est de 8.7 Hz dans les deux cas et laisse envisager des corrélations entre NH et D₂ par interaction scalaire.

Quelle que soit la méthode choisie : COSY, expériences sélectives de transfert à une dimension, corrélations via les cohérences double quantum, on doit adapter la méthode en tenant compte du fait que le pic d'eau doit être éliminé. Si les techniques basées sur des trains de pulses type 1 3 3 1 sont aussi utilisables pour réaliser des expériences de corrélation à deux dimensions, elles souffrent du fait que tous les signaux proches de l'eau (entre 4.5 et 5.1 ppm) ne seront que très faiblement excités, et ne donneront pas de réponses fiables. De même, la présaturation de l'eau dans une expérience de COSY classique conduit à une saturation importante des NH. Toutes ces méthodes ont été essayées, mais ne sont en général pas satisfaisantes. Les totalement approches utilisant les transitions à deux quanta ont au contraire donné de bons

résultats ; le signal d'eau est en effet naturellement supprimé



a) Corrélation via les cohérences double quantum pour l'hexasaccharide H1 dans H2O/D2O (90:10) à 296 K (solution 8mH) et 500 MHz.

b) Extension de la région non anomérique.

sans que les signaux qu'il recouvre soient affectés, à condition que ces derniers puissent provenir de cohérences à deux quanta transformées.

Les résultats obtenus avec le composé Hi sont reportés sur la figure X-5.

Sur cette figure, la corrélation entre le NH du groupe acétamide et le proton D2 est parfaitement visible. Le déplacement chimique de D2 à 3.95 ppm est ainsi parfaitement déterminé, tranchant définitivement la question précédemment soulevée (17).

On constate de plus que toutes les corrélations attendues sont observables, mêmes celles qui concernent des protons proches de l'eau. On notera particulièrement les corrélations dans l'unité A, surtout la tache  $A_2 - A_4$  due à un couplage à longue distance.

La figure X-5 (b) montre que l'on peut identifier presque totalement les signaux d'une unité donnée (ici l'unité F).

Il est donc évident que les techniques passant par l'excitation et la sélection des cohérences double quantum constituent une approche de choix pour les études dans l'eau légère, en particulier l'observation des corrélations concernant des protons très proches du solvant.

 $\leftrightarrow$   $\leftrightarrow$   $\leftrightarrow$   $\leftrightarrow$ 

#### **REFERENCES** :

1) P. J. Hore : J. Magn. Res. 55, 283 (1983) 2) F. W. Bentz, J. Feeney et G. C. K. Roberts : J. Magn. Res. 8, 114 (1972) 3) P. Plateau et M. Guéron : J. Am. Chem. Soc. 104, 7310 (1982) 4) G. Wider, R. V. Hosur et K. Wüthrich : J. Magn. Res. 52, 130 (1983) 5) D. L. Rabenstein et S. Fan : Anal. Chem. 58, 3178 (1986) A. G. Redfield et R. K. Gupta : 6) J. Chem. Phys. 54, 1418 (1971) 7) A. G. Redfield, S. D. Kunz et E. K. Ralph : J. Magn. Res. 19, 114 (1975) 8) G. A. Morris et R. Freeman : J. Magn. Res. 29, 433 (1978) 9) G. M. Clore, B. J. Kimber et A. M. Gronenborn : J. Magn. Res. 54, 170 (1983) 10) P. J. Hore : J. Magn. Res. 54, 539 (1983) 11) с. Bauer, R. Freeman, T. Frenkiel, J. Keeler et A. J. Shaka : J. Magn. Res. 58, 442 (1984) 12) G. A. Morris, K. I. Smith et J. C. Waterton : J. Magn. Res. 68, 526 (1986)

- 13) T. H. Huckerby et I. A. Nieduszynski : Carb. Res. 103, 141 (1982)
- 14) L. Ayotte, E. Mushayakarara et A. S. Perlin : Carb. Res. 87, 297 (1980)
- 15) L. Ayotte et A. S. Perlin : Carb. Res. 145, 267 (1986)
- 16) R. J. Linhardt, K. G. Rice, Z. M. Merchant, Y. S. Kim et D. L. Lohse : J. Biol. Chem. 261, 14448 (1986)
- M. Petitou, J. C. Lormeau, B. Perly, P. Berthault, V.
   Bossennec, P. Sié et J. Choay :
   Soumis pour publication à J. Carb. Chem.

MESURE DES COUPLAGES SCALAIRES

CHAPITRE XI


La mesure des constantes de couplage peut se faire de plusieurs manières ; les deux techniques principales que nous avons utilisées sont d'une part les expériences de J-Resolved, et d'autre part les expériences d'irradiation sélective.

#### XI-1) Expérience de J-Resolved :

Le J-Resolved est une expérience à deux dimensions dans laquelle le temps d'évolution ti est coupé en son centre par un pulse 180° (1).



#### FIGURE XI-1

### Séquence de J-Resolved homonucléaire

Celui-ci permet de ne conserver dans la seconde dimension que le couplage, puisqu'il provoque un écho de spin (voir paragraphe II-6). En effet, le sens de précession des vecteurs dans le référentiel fixe dû au déplacement chimique est inversé, car les populations sont inversées, alors que la rotation dans le référentiel tournant (due au couplage homonucléaire) n'est pas changée, le pulse 180° touchant les populations des deux vecteurs mis en jeu dans une interaction scalaire de la même façon.

On récupère donc dans la première dimension les déplacements chimiques et les couplages (t2 est une acquisition normale) et dans la seconde uniquement les couplages. Une opération de transformation de la matrice  $((\omega_2, \omega_1) \rightarrow (\omega_2 - \omega_1, \omega_1))$  permet d'obtenir des signaux symétriques par rapport à la fréquence 0 de la deuxième dimension, car seuls les déplacements chimiques sont gardés dans F2. XI-2) Excitations sélectives :

XI-2-1) <u>But</u> :

Le chapitre précédent a traité des différentes techniques d'excitations sélectives pour la suppression des pics de solvant. Ces techniques sont néanmoins utilisables pour, cas inverse, l'irradiation d'un seul signal ou groupe de signaux dans un spectre. Dans ce chapitre nous parlerons d'irradiation sélective, qui est un terme impropre au sens de la mécanique quantique ; en effet on distingue (cf. chapitre I) pulse sélectif, ne touchant qu'une raie d'un multiplet, et pulse semi-sélectif affectant tout le multiplet correspondant à un spin. En RMN du proton, il est rarement possible de composante d'un massif, car les n'exciter qu'une seule couplages scalaires sont généralement trop petits - ce quí n'est pas le cas pour d'autres noyaux, pour lesquels nous avons transferts d'aimantation à partir de réaliser des pu l'irradiation d'une seule raie (2) ; on parlera donc de pulse sélectif à la place de pulse semi~sélectif.

Comme nous l'avons vu, toute expérience à deux dimensions consiste en un ou plusieurs pulses suivis par un délai incrémenté. qui sert à créer la deuxième dimension en différenciant les spins par leurs déplacements chimiques respectifs. Ceci conduit à certaines remarques : tout d'abord, la résolution obtenue dans les expériences 2D ne peut pas être égard aux contraintes de temps et de capacité de très bonne eu stockage. ensuite, si l'on parvient à séparer les différents générant des FID ne contenant que l'information spins en d'un seul noyau, il n'est plus nécessaire d'utiliser provenant toute une série d'expériences pour obtenir des sous-spectres montrant les corrélations entre spins. Pour n'exciter qu'un solution la plus évidente est bien sûr seul novau. la l'irradiation sélective.

Le but des expériences qui vont suivre est donc double ; d'une part un gain de temps énorme et d'autre part l'obtention de sous-spectres possédant une résolution bien meilleure, identique à celle d'un spectre 1D classique.

#### XI-2-2) Methode :

Les critères à prendre en compte pour la réalisation de ces expériences sont, évidemment, la sélectivité du pulse d'excitation, sa durée, mais aussi la facilité avec laquelle on peut calculer son angle et sa phase, puisque ces deux paramètres sont drastiques dans les séquences possédant plus d'un pulse.

Ceci a conduit les équipes qui possèdent des appareillages spèciaux à utiliser des pulses de formes gaussiennes (3,4), et cela devrait être aussi réalisable avec des trains de pulses polynômiaux. Cependant, nous avons préféré utiliser la séquence DANTE qui a l'avantage d'être facilement implantable sur tout spectromètre, et ne nécessite pas de calcul compliqué pour la définition de ses paramètres. Nous avons rejoint dans ce choix Brondeau et coll. (5,6) pour la réalisation d'impulsions sélectives.

Cette méthode ayant été décrite dans le chapitre précédent, nous n'y reviendrons pas dans le détail, mais regardons simplement la sélectivité que l'on peut espérer :

- si l'on réalise une impulsion sélective à partir de n pulses, en appliquant la fonction  $G_3(\nu)$  définie dans le chapitre précédent, on peut connaître la largeur entre le maximum d'irradiation et le premier zéro, qui est égale à  $\frac{1}{n_{\tau}}$  Hertz, ou bien la largeur à mi-hauteur approximativement égale à  $\frac{0.64}{n_{\tau}}$  Hz.

Exemple :

$$\begin{array}{c} n = 40 \\ \tau = 1 \text{ ms} \end{array} \right) \xrightarrow{1} \frac{1}{n\tau} = 25 \text{ Hz}$$

largeur à mi-hauteur : 16 Hz.



#### FIGURE XI-2

Hodulation en intensité obtenue avec une excitation sélective type DANTE, en fonction de la différence de fréquence avec le centre de l'irradiation (partie droite seulement).

D'autre part, la réalisation pratique de l'expérience est la suivante : Pour envoyer un pulse sélectif à des protons situés à  $\Delta\nu$  de la fréquence de la porteuse, il faut séparer les brèves impulsions composant le DANTE par un délai  $\tau = \frac{1}{\Delta\nu}$ . L'angle est calculé en sommant les durées de toutes ces impulsions, et en comparant la durée totale à celle d'un pulse classique (par le même canal).

Le reste de la séquence est analogue à ce qui existe en deux dimensions, à quelques points près :

A)- le temps d'évolution (correspondant à ti) n'est plus variable, mais fixé (Do) de façon à ce que les transferts d'aimantation soient optimums, en tenant compte du couplage moyen entre les noyaux.

Les séquences de transferts sélectifs apparaîtront donc'sous la forme :



### FIGURE XI-3

Séquence de base du COSY sélectif par la méthode DAHTE. SSEP : Semi Selective Excitation Pulse

Relais sélectifs :



#### FIGURE XI-4

Séquence générale des Relais sélectifs par la méthode DANTE.

B)- le cycle de phase n'est pas forcément celui de l'expérience à deux dimensions correspondante, puisqu'il n'est évidemment plus nécessaire de se préoccuper de la réalisation de la quadrature en F1. Les seuls paramètres importants sont d'une part le passage par les quatre phases du détecteur, c'est à dire le système CYCLOPS (cf. chapitre II), mais aussi et surtout la suppression des composantes qui ne sont pas touchées par le premier pulse 90_{sel}, mais qui sont basculées par le second pulse, et qui seraient automatiquement détectés si l'on ne réalisait pas de cycle de phase particulier. Cette modification de la phase est la même que celle de suppression des pics axiaux dans une expérience à deux dimensions, puisqu'en fait cela revient à éliminer les vecteurs qui ne sont pas modulés pendant le temps d'évolution.

90° sélectif	2ème pulse 90°	Récepteur	
У	×	+A +B	
У	-×	+A +B	
-y	×	-A -B	
-y	-×	-A -B	
-×	У	-B +A	
-×	-y	-B +A	
×	У	+B –A	
×	-y	+B -A	

Pour le COSY sélectif, le cycle de phase est donc :



XI-3) Mesures des couplages sur les olígosaccharides :

Nous allons montrer les applications des deux techniques précédemment décrites pour les mesures de couplages sur les oligosaccharides.

A) <u>J-Resolved</u> :

Cette expérience 2D a été réalisée sur le pentasaccharide P1, avec une taille de matrice de 2048  $\times$  64 points.

La figure XI-5 montre le contour complet correspondant, ainsi qu'un agrandissement de la région à champ fort. La première constatation est que les taches sont extrêmement résolues, permettant une mesure des couplages au dixième de hertz près. On note cependant la présence de quelques systèmes couplés au second ordre, qui ne sont que très difficilement interprétables.

Les inconvénients intrinsèques d'une telle expérience sont sa longueur d'exécution (bien qu'elle soit beaucoup plus courte



# FIGURE XI-5

J-Resolved réalisé sur le pentasaccharide P1.

- a) Contour complet.
- b) Extension de la région à champ fort montrant les effets de second ordre (indiqués par les flèches)

qu'un COSY ou qu'une INADEQUATE) et la taille de la matrice résultante. En effet, la largeur spectrale de la seconde dimension étant très faible demande des incréments du délai d'évolution très grands, et dès lors on se heurte à des problèmes de relaxation par T₂, qui nécessitent que l'on effectue de nombreux FID.

#### B) Excitations selectives :

Les expériences de transferts multiples en une dimension seront illustrées par des exemples concernant le tétrasaccharide T₁ (7) et le pentasaccharide P₂. Ces deux exemples représentent les situations extrêmes pour lesquelles le proton anomérique intéressant est, soit isolé, soit au contraire entouré d'autres signaux.

Traitons tout d'abord le cas du tétrasaccharide T1. Le spectre conventionnel avec les attributions des protons anomériques est représenté sur la figure XI-6. L'échantillon est une solution 7 mM dans D20.

Nous allons considérer dans un premier temps le proton anomérique de l'unité A^{*} à 5.45 ppm ; c'est sur ce proton qu'est appliqué le pulse sélectif par la méthode DANTE. La sélectivité est optimisée pour exciter uniformément le doublet (l'impulsion de 90° est ici créée par 78 impulsions de 0.5  $\mu$ s).

La fréquence porteuse est placée à l'extérieur du spectre (à 3.0 ppm) afin d'éviter de créer des excitations harmoniques parasites. Les expériences sont ensuite conduites en utilisant temps de transfert Dn fixe de 30 ms. Dans les expériences un ultérieures, ces temps seront optimisés suivant les relais, en des constantes de couplage déterminées au fur et à fonction mesure. La fréquence porteuse est replacée au centre du spectre (à 4.5 ppm) avant l'acquisition, pour permettre une résolution maximale du spectre final. Les signaux obtenus sont évidemment très difficilement phasables en raison des délais multiples introduits. Le signal est de ce fait présenté en mode valeur absolue après application de filtres gaussiens destinés à Nous verrons ultérieurement améliorer leur forme de raie. comment ces séquences peuvent être éventuellement améliorées.



<u>FIGURE XI-6</u> Spectre ¹H classique du tétrasaccharide T1 dans D20 à 500 MHz.



**BU** UILE

FIGURE XI-7

Transferts obtenus à partir du proton A₁[#] (à 5.45 ppm) dans le tétrasaccharide T1. L'indice n indique le nombre de relais réalisés. La figure XI-7 montre les résultats obtenus pour les divers relais (n = 0 jusqu'à 4) à partir du proton  $A_1^*$ .

Les résultats présentés sur cette figure montrent aue l'information est effectivement correctement transmise de façon séquentielle sur l'ensemble de l'unité. Les signaux non concernés par l'excitation semi-sélective sur  $A_1^*$  sont supprimés par le cycle de phase utilisé, à l'exception des raies de l'eau résiduelle et du groupement O-CH3. Ce phénomène (apparaissant aussi dans les matrices 2D correspondantes) est lié à des problèmes de relaxation. En effet, les valeurs des temps de relaxation longitudinaux de l'eau et du méthoxy sont très longs (supérieurs à 2s) en raison de leurs temps de corrélation propres très courts (cf. chapitre XII) ; dans ces conditions, le temps de recyclage utilisé (1s) est très insuffisant et les signaux de ces groupes ne peuvent être totalement supprimés. Nous verrons dans l'exemple suivant qu'un délai de recyclage beaucoup plus long permet effectivement de les éliminer. Les tracés obtenus avec n = 0 jusqu'à 4 permettent de déterminer avec une grande résolution le déplacement chimique et les couplages pour chaque proton nouvellement apparu. La comparaison de ces résultats avec les valeurs de couplages obtenues par ailleurs montre un accord excellent. Le gain de temps est bien sûr considérable, puisque l'ensemble de ces spectres individuels pour l'unité A* peut être obtenu en moins de dix minutes.

Les spectres avec n = 0 ont été réalisés avec 16 transients, ceux pour n = 1 et 2 avec 32 et ceux pour n = 3 et 4 avec 64 passages.

L'efficacité des transferts dépendant de la valeur des couplages, on peut se demander ce que donne cette approche pour des systèmes comportant des couplages très différents de ceux pour lesquels les transferts sont optimisés. Nous avons donc appliqué cette méthode à l'unité iduronique I du tétrasaccharide T₁, dont le proton I₁ résonne à 5.25 ppm. Cette unité ne contient que des noyaux couplés faiblement (2 à 4 Hz) pour des raisons conformationnelles. La figure XI-8 montre le résultat final obtenu avec n = 3, ce qui permet un transfert complet sur tout le cycle (1  $\rightarrow$  2  $\rightarrow$  3  $\rightarrow$  4  $\rightarrow$  5). Le temps de transfert D_n a été maintenu à 30 ms pour toutes les expériences.







Expérience de transfert multiple (n = 3) concernant l'unité / du tétrasaccharide T1.

On peut constater un excellent transfert entre les protons, jusqu'à Is. Ce spectre a été obtenu avec 64 passages, sur la même solution que précédemment (7 mM).

Les résultats très encourageants fournis par ces méthodes peuvent laisser envisager le traitement de cas plus difficiles pour lesquels il est important d'évaluer la sélectivité de la même méthode.

Le pentasaccharide P2 déjà considéré (et identifié) par les expériences de transfert dans le champ tournant sera utilisé comme exemple de cas plus compliqué. Nous avons vu que ce composé différait de P1 par un ester méthylique sur l'unité glucuronique. Nous allons utiliser la méthode des transferts monodimensionnels pour mettre en évidence tous les protons de cette unité et confirmer les attributions précédentes.

Le proton G1 est situé à 4.65 ppm et est entouré par des signaux très proches ( $I_5$  et  $A_6^r$ ). De plus, la grande valeur du couplage  $G_1 - G_2$  dû à la nature de la liaison glycosidique (liaison de type  $\beta$  1  $\rightarrow$  4) peut laisser craindre une difficulté au niveau de la sélectivité de l'excitation. Cette dernière doit être suffisamment modérée pour toucher l'ensemble du doublet de G1, ce qui peut avoir pour effet d'exciter aussi en partie les protons voisins. Les résultats sont présentés sur la figure XI-9 pour des transferts allant de n = 0 jusqu'à 3.

On peut constater que la sélectivité est ici optimisée (32 x 1  $\mu$ s) pour exciter correctement G1 sans trop perturber le voisinage immédiat. On peut ainsi attribuer très facilement les protons de cette unité et mettre en évidence l'effet de la méthylation sur le déplacement de Gs.

Ces résultats sont en tous points identiques à ceux fournis par la corrélation dans le champ tournant. Ici de plus les constantes de couplage peuvent être mesurées avec une très grande précision.

Les signaux résiduels dans la région 4.2 - 4.6 ppm proviennent essentiellement d'une faible excitation (et des transferts résultants) des protons  $A_6^r$  et I₅ situés à proximité de G₁. Dans le cas présent, un temps de recyclage de 5s a été utilisé, et on peut constater que le signal du groupement méthoxy de l'ester, à 3.84 ppm, est presque totalement supprimé.



## FIGURE XI-9

Transferts sélectifs 1D sur l'unité G1 du Pentasaccharide P2. Le nombre de rélais effectués est indiqué.

Cette expérience montre que même dans un cas assez peu favorable comme celui d'un acide glucuronique, l'approche monodimensionnelle reste très efficace. Notons qu'une méthode pour affiner la sélectivité consiste à exciter simultanément, mais de façon séparée les deux raies du doublet en utilisant un double train d'impulsions.

Ces expériences, bidimensionnelles à l'origine, reconverties en une dimension constituent un moyen très efficace d'analyse des connectivités et surtout de détermination des constantes de couplage.

L'expérience de transfert complet sur toute l'unité fournit le même type d'information que la méthode proposée par d'autres auteurs (8,9) utilisant le transfert isotrope dans le champ tournant ; toutefois cette dernière méthode ne permet pas d'identifier les protons de façon séquentielle, ce qui constitue un handicap important.

Ces nouvelles approches peuvent être améliorées, au moins en ce qui concerne la qualité des informations. Le problème des distorsions de phase qui obligent à traiter violemment le signal peut être résolu en incorporant une séquence de purge (type filtre z) avant l'acquisition (10); cependant cette technique conduit à l'introduction de délais supplémentaires qui ont pour effet majeur de réduire considérablement la sensibilité, à cause des pertes de signal par relaxation.

XI-4) Simulation :

Les expériences de J-Resolved homonucléaire et de transfert par irradiation sélective ont permis d'obtenir très précisément les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage des protons du composé T1, et une simulation complète de ce tétrasaccharide a été réalisée au moyen d'un programme d'ajustement par calculs itératifs (11) (PANIC : Parameter Adjustment in NMR by Iteration Calculation). Les unités, indépendantes car ne possédant pas de couplage scalaire entre elles, ont été simulées une par une (exemple en figure XI-10), puis assemblées pour former le spectre total (figure XI-11).







## FIGURE XI-11

Comparaison entre spectre réel (a) et simulation (b) pour le tétrasaccharide T1.

A ce stade, l'attribution complète de tous les déplacements chimiques et couplages a été réalisée, ce qui permet d'obtenir non seulement la structure, mais aussi la conformation de chaque unité (à partir des couplages)- chaise, bateau ... ou des combinaisons de ces formes -.

Par contre, on ne peut pas encore connaître l'enchaînement entre les unités, ni la topologie globale de la molécule (sa "structure tertiaire"), ce que l'on va chercher à obtenir par les expériences mettant en jeu les interactions dipolaires.

#### **REFERENCES** :

1) W. P. Aue, J. Karhan et R. R. Ernst : J. Chem. Phys. 64, 4226 (1976) P. Berthault, B. Perly, L. Vidaud et J. F. Labarre : 2) J. Mol. Struc. 162, 97 (1987) 3) H. Oschkinat et R. Freeman : J. Magn. Res. 60, 164 (1984) 4) H. Kessler, H. Oschkinat, C. Griesinger et W. Bermel : J. Magn. Res. 70, 106 (1986) 5) J. Brondeau et D. Canet : J. Magn. Res. 47, 159 (1982) 6) J. Brondeau et D. Canet : J. Magn. Res. 47, 419 (1982) 7) B. Perly, V. Bossennec, P. Berthault et M. Petitou : Tetrahedron Letters 28, n° 29 p.3331 (1987) 8) D. G. Davis et A. Bax : J. Am. Chem. Soc. 107, 7197 (1985) 9) S. Subramanian et A. Bax : J. Magn. Res. 71, 325 (1987) 10) O. W. Sørensen, M. Rance et R. R. Ernst : J. Magn. Res. 56, 527 (1984) A. A. Bothner-By et S. M. Castellano : 11) " Computer Program for Chemistry ", Vol. 1 Ed. W. A. Benjamin Inc., New York (1968)

CHAPITRE XI

INTERACTIONS DIPOLAIRES



#### XI-1) Introduction :

Lorsque deux noyaux possédant un spin non nul sont assez proches dans l'espace (pas nécessairement couplés scalairement), il existe entre eux une interaction dipôle-dipôle d'énergie :

$$U_{DD} = \left\{ \frac{\mu_1 \cdot \mu_2}{r^3} - 3 \frac{(\mu_1 \cdot r)(\mu_2 \cdot r)}{r^5} \right\} \frac{\mu_0}{4\pi}$$

donc d'Hamiltonien : (formule générale)

$$\mathcal{X}_{DD} = \frac{\gamma_{1}\gamma_{2}\kappa^{2}\mu_{0}}{4\pi} \left\{ \frac{\vec{I}_{1}\cdot\vec{I}_{2}}{r^{3}} - 3 \frac{(\vec{I}_{1}\cdot\vec{r})(\vec{I}_{2}\cdot\vec{r})}{r^{5}} \right\}$$
[1]

r : distance entre les deux dipôles μ₀ : constante de perméabilité

Dans le cas de liquides ou de solutions isotropes, l'agitation thermique (mouvements browniens) moyenne les différents termes de l'équation, et annule cet Hamiltonien (1); cela signifie que les interactions dipolaires n'affectent pas les énergies de transition ni les intensités pour les spectres de R.M.N. haute résolution. Celà permet d'ailleurs la mise en évidence des couplages scalaires qui ne seraient que difficilement visibles autrement, car masqués par les phénomènes dipolaires d'énergie beaucoup plus forte.

Si cette énergie ne conduit à aucun changement dans les fréquences des signaux du spectre, elle joue cependant un rôle important dans les transferts de polarisation entre spins. En effet, si l'on perturbe l'un des noyaux en l'irradiant par exemple par un champ radio-fréquence, le second noyau va voir sa dynamique de spin changer. Ce phénomène est appelé l'<u>Effet</u> <u>Overhauser Nucléaire</u> (NDE). La variation d'intensité par effet Overhauser provient de la relaxation croisée entre les deux noyaux. Le premier noyau, dans un état excité puisqu'il a absorbé l'énergie du pulse radio-fréquence, peut perdre son énergie par interaction avec le second noyau de deux manières différentes (2) ; soit il lui transfère son énergie en l'excitant (les populations des niveaux se rapprochent) et l'intensité du signal observé est alors plus petite que la normale, soit les deux noyaux perdent leur énergie dans un processus couplé, et dans ce cas l'intensité du signal est plus grande. Le signe et l'importance de la variation d'intensité du pic observé sont une indication sur la contribution de l'irradiation du premier noyau à la relaxation du second, et donc sur la proximité spatiale et les mouvements relatifs des deux entités (3,4).

XI-2) Théorie :

Les expériences réalisées sont les suivantes :



#### FIGURE XI-1

(1) Acquisition simple sur le noyau A.

(2) Découplage continu de X et observation de A.

On définit alors un facteur de modification de l'intensité du signal,  $\eta_A$ , qui s'appelle le <u>facteur d'exaltation Overhauser</u> <u>nucléaire</u> :

$$n_{A} = \frac{I_{A} - I_{A}}{I_{A}}$$
 [2]

l_A : intensité du signal de A sans irradiation de X l_a : intensité du signal de A avec découplage de X

Le phénomène de transfert de polarisation peut être explicité comme suit :

### a) <u>cas d'un spin isolé</u> :

 $\left\{ \begin{array}{c} \mathcal{H} = \mathcal{H}_{\alpha} + \mathcal{H}_{\beta} \\ \mathcal{H} = \mathcal{H}_{\alpha} - \mathcal{H}_{\beta} \end{array} \right.$ 

Sous l'effet d'un champ magnétique, on retrouve la situation décrite au chapitre II, c'est à dire que les dipôles s'orientent parallèlement ou antiparallèlement au champ.

parallèle	<u>antiparallèle</u>
$m_{1} = + \frac{1}{2}$	$m_{I} = -\frac{1}{2}$
état $\alpha$	état β
$\frac{dN_{\alpha}}{dt} = N_{\beta}W_{\beta} - N_{\alpha}W_{\alpha}$	$\frac{dN_{\beta}}{dt} = N_{\alpha}W_{\alpha} - N_{\beta}W_{\beta}$

 $W_{\rho}$  = probabilité de transition de  $\beta$  vers  $\alpha$  $W_{\alpha}$  = probabilité de transition de  $\alpha$  vers  $\beta$  $N_{\rho}$  = population de spins dans l'état  $\beta$  $N_{\alpha}$  = population de spins dans l'état  $\alpha$ 

La différence de population entre les deux niveaux d'énergie évolue de la façon suivante :

$$\frac{dn}{dt} = \frac{dN_{\beta}}{dt} - \frac{dN_{\alpha}}{dt} = 2 W_{\alpha}N_{\alpha} - 2 W_{\beta}N_{\beta}$$

$$= N(W_{\alpha} - W_{\beta}) - n(W_{\alpha} + W_{\beta})$$
[3]

Quand le noyau est plongé dans le champ  $B_0$  seul,  $\frac{dn}{dt} = 0$ 

En fait, l'équation [3] décrit le retour à l'équilibre de la composante selon z de la magnétisation après que cet équilibre ait été rompu par un pulse ; on peut donc exprimer cela en fonction du temps de relaxation longitudinal T₁, et écrire :

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_o - n}{T_1}$$

 $o\dot{u} \begin{cases} \frac{T}{T_{1}} = \psi_{\alpha} + \psi_{\beta} \\ \\ n_{0} = \lambda \frac{\psi_{\alpha} - \psi_{\beta}}{\psi_{\alpha} + \psi_{\beta}} \end{cases}$ 

(n_o correspond à la différence de population à l'équilibre)

On retrouve l'équation de Bloch :  $\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_z^0 - M_z}{T_z}$ 

b) <u>cas d'un système de deux spins 1/2</u> :

Soit deux noyaux A et X pas forcément couplés scalairement :



Les lettres X et A indiquent les possibilités de transitions pour les spins de ces noyaux

### FIGURE XI-2

Diagramme d'énergie pour un système AX.

On réalise sur ces noyaux les deux séquences précédentes :

[4]

a) <u>Sans_découplage de_X_</u>: (expérience (1))

L'intensité du signal de A est proportionnelle à :

$$n_{A} = (N_{1} - N_{2}) + (N_{3} - N_{4}),$$

$$l' \text{ intensité du signal de X à :}$$

$$n_{X} = (N_{1} - N_{3}) + (N_{2} - N_{4})$$

$$donc, \text{ après calculs :}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn_{A}}{dt} = (W_{0} + 2W_{A} + W_{2})(n_{A}^{0} - n_{A}) + (W_{2} - W_{0})(n_{X}^{0} - n_{X}) \\ \frac{dn_{X}}{dt} = (W_{0} + 2W_{X} + W_{2})(n_{X}^{0} - n_{X}) + (W_{2} - W_{0})(n_{A}^{0} - n_{A}) \end{array} \right.$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn_{A}}{dt} = (W_{0} + 2W_{X} + W_{2})(n_{X}^{0} - n_{X}) + (W_{2} - W_{0})(n_{A}^{0} - n_{A}) \\ \frac{dn_{A}}{dt} = R_{A} (n_{A}^{0} - n_{A}) + \sigma_{AX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \end{array} \right\}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn_{A}}{dt} = R_{A} (n_{A}^{0} - n_{A}) + \sigma_{AX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \\ \frac{dn_{X}}{dt} = R_{A} (n_{A}^{0} - n_{A}) + \sigma_{AX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \end{array} \right\}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn_{A}}{dt} = R_{A} (n_{A}^{0} - n_{A}) + \sigma_{AX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \\ \frac{dn_{X}}{dt} = R_{A} (n_{X}^{0} - n_{X}) + \sigma_{XX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \end{array} \right\}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn_{A}}{dt} = R_{A} (n_{A}^{0} - n_{A}) + \sigma_{AX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \\ \frac{dn_{X}}{dt} = R_{A} (n_{X}^{0} - n_{X}) + \sigma_{XX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \end{array} \right\}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dn_{X}}{dt} = R_{X} (n_{X}^{0} - n_{X}) + \sigma_{XX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \\ \frac{dn_{X}}{dt} = R_{X} (n_{X}^{0} - n_{X}) \\ \frac{dn_{X}}{dt} = R_{X} (n_{X}^{0} - n_{X}) + \sigma_{XX} (n_{X}^{0} - n_{X}) \end{array} \right\}$$

$$\frac{dn_{x}}{dt} = R_{x} \left( n_{x}^{0} - n_{x} \right) + \sigma_{Ax} \left( n_{A}^{0} - n_{A} \right)$$

 $R_{A} = 2W_{A} + W_{0} + W_{2} : vitesse d'auto-relaxation de A$   $R_{X} = 2W_{X} + W_{0} + W_{2} : vitesse d'auto-relaxation de X$   $\sigma_{AX} = W_{2} - W_{0} : vitesse de relaxation croisée entre A et X$ 

b) Si_on irradie le_noyau_X_: (expérience (2))

$$n'_{x} = 0$$

$$\begin{cases} \frac{dn'_{A}}{dt} = (W_{0} + 2W_{A} + W_{2})(n^{0}_{A} - n^{'}_{A}) + (W_{2} - W_{0})n^{0}_{X} \\ \frac{dn'_{X}}{dt} = (W_{2} - W_{0})(n^{0}_{A} - n^{'}_{A}) \end{cases}$$
[6]

 $dn'_{A}$ Or  $\frac{dn'_{A}}{dt}$  = 0 puisque l'irradiation continue de X crée un état stationnaire sur A.

Donc 
$$n_{A}^{0} - n_{A}^{i} = -\frac{(W_{2} - W_{0}) n_{X}^{i}}{W_{0} + 2W_{A} + W_{2}}$$

$$\frac{n_{A}^{'}}{n_{A}^{0}} = 1 + \frac{n_{X}^{0}}{n_{A}^{0}} \left( \frac{W_{2} - W_{0}}{W_{0} + 2W_{A} + W_{2}} \right)$$
[7]

 $n_A^0$  et  $n_X^0$  - différences de population à l'équilibre - sont directement proportionnelles aux rapports gyromagnétiques des noyaux, donc :

$$\eta_{A} = \frac{I_{A} - I_{A}}{I_{A}} = \frac{\gamma_{X}}{\gamma_{A}} \left( \frac{W_{2} - W_{0}}{W_{0} + 2W_{A} + W_{2}} \right)$$
[8]

Solomon (5) a évalué les probabilités  $W_A$ ,  $W_2$ ,  $W_0$  :

$$W_{A} = \frac{\Upsilon_{A}^{2} \Upsilon_{X}^{2} \Re^{2}}{20 r^{6}} \frac{3 \tau_{c}}{1 + \omega_{A}^{2} \tau_{c}^{2}}$$

$$W_{2} = \frac{\Upsilon_{A}^{2} \Upsilon_{X}^{2} \Re^{2}}{20 r^{6}} \frac{12 \tau_{c}}{1 + (\omega_{A} + \omega_{X})^{2} \tau_{c}^{2}}$$

$$W_{0} = \frac{\Upsilon_{A}^{2} \Upsilon_{X}^{2} \Re^{2}}{20 r^{6}} \frac{2 \tau_{c}}{1 + (\omega_{A} - \omega_{X})^{2} \tau_{c}^{2}}$$

τ_c : temps de corrélation = temps pour que le vecteur (molécule, groupement, atome, ...) tourne d'un radian

Quand  $\omega^2 \tau_c^2 \ll 1$ , c'est à dire pour de petites molécules (zone de rétrécissement extrême), on peut négliger ce terme et écrire :

$$W_{A} = \frac{\gamma_{A}^{2} \gamma_{X}^{2} \pi^{2}}{20 r^{6}} 3\tau_{c}$$

$$W_{2} = \frac{\gamma_{A}^{2} \gamma_{X}^{2} \pi^{2}}{20 r^{6}} 12\tau_{c}$$

$$W_{0} = \frac{\gamma_{A}^{2} \gamma_{X}^{2} \pi^{2}}{20 r^{6}} 2\tau_{c}$$

d'où :

$$\eta_{A}^{\text{maxi}} = \frac{\gamma_{X}}{2 \gamma_{A}}$$
[9

1

Il est à remarquer que les équations [5] à [9] ne sont valables que si la relaxation est uniquement de type dipôle-dipôle ; si ce n'est pas le cas, il convient de rajouter à  $R_A$  et  $R_X$  les termes  $\rho_A$  et  $\rho_X$  qui sont les contributions des autres mécanismes à la relaxation (spin-rotation, paramagnétiques, etc...).

$$R_{A} = 2W_{A} + W_{0} + W_{2} + \rho_{A}$$

$$R_{x} = 2W_{x} + W_{0} + W_{2} + \rho_{x}$$
[10]

L'équation [8] devient alors :

$$\eta_{A} = \frac{\Upsilon_{X}}{\Upsilon_{A}} \left( \frac{W_{2} - W_{0}}{W_{0} + 2W_{A} + W_{2} + \rho_{A}} \right)$$
[11]

Si l'on se trouve dans la zone de rétrécissement extrême, la mesure du facteur d'exaltation donne donc une information sur l'efficacité de la relaxation par un mécanisme exclusivement dipolaire.

XII-3) Paramètres gouvernant l'effet NOE :

XII-3-1) Rapports gyromagnétiques des noyaux :

En reprenant la formule [9] on voit que :

- lorsque les noyaux sont identiques (cas homonucléaire)  $\eta_A^{ma \times i} = 0.5$ , c'est à dire que l'intensité du signal de A est augmentée de 50% dans le cas idéal.

- dans le cas hétéronucléaire :

 si les deux rapports gyromagnétiques sont de même signe, η > 0.

<u>Exemples</u>: ¹³C - ¹H, ³¹P - ¹⁹F

. si les deux rapports gyromagnétiques sont de signe contraire,  $\eta < 0.$ 

 $E \times emple : {}^{15}N - {}^{1}H.$ 

Ceci peut conduire à  $\eta = -1$ , ce qui entraîne une intensité nulle du signal lorsque l'on découple l'autre noyau (danger dans l'INEPT ¹⁵N ...(6)).

### XII-3-2) Influence de la distance entre A et X :

La formule [9] fait apparaitre que  $\eta$  est indépendant de  $r_{AX}$ . En effet, pour deux spins en interaction, mais isolés du reste du milieu, le facteur d'exaltation ne peut pas conduire à des mesures de distance.

Par contre, si pour un noyau A, on mesure l'effet NOE produit par découplage de deux autres noyaux X et Y indépendants entre eux, et si  $\rho_{a} = 0$ , on remarque que :

$$R_{A} = 2W_{A} + (W_{2} + W_{0})_{X} + (W_{2} + W_{0})_{Y}$$

Dans la zone de rétrécissement extrême, on a alors :

$$\frac{\eta_{A}\{X\}}{\eta_{A}\{Y\}} = \frac{(W_2 - W_0)_X}{(W_2 - W_0)_Y} = \left(\frac{r_{AY}}{r_{AX}}\right)^6$$

Il faut cependant s'assurer que l'effet NDE mesuré n'est pas perturbé par autre chose.

### XII-3-3) Influence des substances paramagnétiques :

Les substances paramagnétiques (oxygène de l'air, reste de catalyseur, etc ...) introduisent une relaxation très efficace qui apparait dans la valeur de  $\eta$  par le terme  $\rho_A$ . On voit que plus  $\rho_A$  augmente, plus  $\eta$  diminue. Comme de faibles quantités paramagnétiques conduisent à  $\rho_A$  très grand, il est nécessaire d'éliminer toute trace de ces substances pour obtenir une mesure d'effet NOE correcte.

#### XII-3-4) Influence de Bo et de tc:

Lorsque l'on ne se trouve pas dans la zone de rétrécissement extrême, et que l'on réinjecte les termes de probabilité non simplifiés dans l'équation [8], il apparait que  $\eta$  dépend aussi de la fréquence de résonance (donc du champ  $B_0$ ) et du temps de corrélation  $\tau_c$ . La représentation graphique de la variation de  $\eta$  en fonction de ces paramètres est donnée en figure 3.



ωτ

#### FIGURE XI-3

Courbe (uniquement qualitative) donnant l'évolution du facteur d'exaltation en fonction de  $w_0 \tau_c$ .

On remarque :

- que l'on peut obtenir des NOE négatifs même quand q^{maxi} précédemment défini est positif. Le cas peut se produire si l'on est en milieu visqueux ou s'il s'agit de grosses molécules.
- que η mesuré à deux fréquences différentes peut être différent.
- que l'on peut, dans des conditions extrêmes : très haut champ,  $\tau_c$  faible, arriver au cas où  $\eta = -1$ , c'est à dire à l'annulation du signal.

Ces remarques sont importantes quand on travaille avec des macromolécules ou dans des solvants visqueux où  $\tau_c$  > 10⁻⁹s.

XI-4-1) Système à deux spins 1/2 :

a) <u>Hétéronucléaire</u> :

Si on réalise l'expérience suivante :



## FIGURE XI-4

Expérience d'inversion-recouvrement hétéronucléaire. r : délai que l'on fait varier pour avoir plusieurs points de la courbe de relaxation.

Le pulse 180° inverse les populations de A, et l'équation [5] du paragraphe I-2 devient :

$$\frac{dn_{A}}{dt} = -(W_{0} + 2W_{A} + W_{2})(n_{A}^{0} - n_{..}) + (W_{2} - W_{0})n_{X}^{0}$$
[12]

Puisque les spins du noyau X sont irradiés en continu, la relaxation de A s'effectue jusqu'à un état stationnaire (cf. équation [6]), défini par :

$$\Pi_{A}^{0} - \Pi_{A}^{'} = \frac{(W_{2} - W_{0}) \Pi_{X}^{0}}{W_{0} + 2W_{A} + W_{2}}$$

En remplaçant dans l'équation [12] :

$$\frac{dn_{A}}{dt} = -(W_{0} + 2W_{A} + W_{2})(n_{A}^{0} - n_{A}) + (W_{0} + 2W_{A} + W_{2})(n_{A}^{0} - n_{A})$$
$$= (W_{0} + 2W_{A} + W_{2})(n_{A} - n_{A})$$

$$\frac{1}{T_{1DD}} = W_0 + 2W_A + W_2$$

donc,

[13] :

$$R_{A} = \frac{1}{T_{1DD}} = \frac{2}{20 r^{6}} \left( \frac{1}{1 + (\omega_{X} - \omega_{A})^{2} \tau_{c}^{2}} + \frac{3}{1 + \omega_{A}^{2} \tau_{c}^{2}} + \frac{6}{1 + (\omega_{X} + \omega_{A})^{2} \tau_{c}^{2}} \right)$$

et

$$\sigma_{AX} = 2 \quad \frac{\gamma_A^2 \gamma_X^2 \; \pi^2 \tau_c}{20 \; r^6} \left( \frac{6}{1 + (\omega_X + \omega_A)^2 \tau_c^2} - 1 \right)$$
[13b]

Les termes causant la relaxation spin-réseau conduisent à une incertitude dans les transitions et donc dans les largeurs de raies ; ceci implique une contribution à  $T_2$  égale à  $\frac{1}{2}T_1$ . ( $T_1 \ge T_2$ ). Le calcul (non détaillé ici) donne :

[14] :

$$\frac{1}{T_{2DD}} = \frac{\Upsilon_A^2 \Upsilon_X^2 + \Upsilon_C^2}{20 r^6} \left( 4 + \frac{1}{1 + (\omega_X - \omega_A)^2 \tau_C^2} + \frac{3}{1 + \omega_A^2 \tau_C^2} + \frac{6}{1 + \omega_X^2 \tau_C^2} + \frac{6}{1 + (\omega_X + \omega_A)^2 \tau_C^2} \right)$$

La formule exprimant le temps de relaxation longitudinal dans le champ tournant  $(T_{1p})$  est très proche de celle du temps de relaxation spin-spin  $(T_2)$  puisque les vecteurs magnétisation sont bloqués dans le plan transverse. La vitesse angulaire des spins du noyau A dans le champ radiofréquence,  $\omega_{1A}$ , intervient cependant dans la formule, puisque les vecteurs magnétisation sont d'autant plus éloignés du plan transverse que la valeur de ce champ est élevée.

$$\frac{1}{T_{1\rho DD}} = \frac{\Upsilon_A^2 \Upsilon_X^2 \ ^{\kappa^2} \tau_c}{20 \ r^6} \left( \frac{4}{1 + \omega_{1A}^2 \tau_c^2} + \frac{1}{1 + (\omega_X - \omega_A)^2 \tau_c^2} + \frac{3}{1 + \omega_A^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + \omega_X^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + (\omega_X + \omega_A)^2 \tau_c^2} \right)$$

On remarque que l'on aura toujours :

 $\mathsf{T}_2 \leqslant \mathsf{T}_{1\rho} \leqslant \mathsf{T}_1$ 

## b) <u>Homonucléaire</u> :

Les termes de flip-flop de l'Hamiltonien dipolaire ne sont plus tout à fait négligeables devant les termes Zeemann, puisque les fréquences de précession entre les deux noyaux sont moins éloignées.

Si on réalise l'expérience suivante :



## FIGURE XI-5

Expérience d'inversion-recouvrement homonucléaire Comme dans l'expérience hétéronucléaire, on réalise pulsieurs expériences avec différentes valeurs de T.

La formule régissant la variation de population des spins des différents niveaux après perturbation par un champ radiofréquence (correspondant au système d'équations [5] du paragraphe XII-2) devient :

$$\frac{dn_{A}}{dt} = (W_{0} + 2W_{A} + W_{2})(n_{A}^{0} - n_{A}) + (W_{2} - W_{0})(n_{A}^{0} - n_{A})$$

$$= 2 (W_{A} + W_{2})(n_{A}^{0} - n_{A}) \qquad [16]$$

donc, (on considère que  $\omega_A = \omega_X = \omega_0$ )

$$\frac{1}{T_{1DD}} = \sigma_{AX} + R_{A} = 6 \frac{\gamma_{A}^{4} \pi^{2} \tau_{c}}{20 r^{6}} \left( \frac{1}{1 + \omega_{0}^{2} \tau_{c}^{2}} + \frac{4}{1 + 4\omega_{0}^{2} \tau_{c}^{2}} \right)$$
[17]

$$\sigma_{AX} = 2 \frac{\gamma_A^4 + \pi^2 \tau_c}{20 r^6} \left( \frac{6}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} - 1 \right)$$
 [18]

$$\frac{1}{T_{2DD}} = 3 \frac{\gamma_A^4 \pi^2 \tau_c}{20 r^6} \left( 3 + \frac{5}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{2}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right)$$
[19]

$$\frac{1}{T_{1\rho DD}} = 3 \frac{\gamma_A^4 \pi^2 \tau_c}{20 r^6} \left( \frac{3}{1 + \omega_1^2 \tau_c^2} + \frac{5}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{2}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right) [20]$$

## Remarque_:

Si à la place du pulse 180° couvrant toute la gamme spectrale, on envoie un pulse 180° sélectif ne touchant qu'un seul des deux noyaux, alors le temps de relaxation mesuré correspond à ce qui a été calculé dans le cas hétéronucléaire.

## XII-4-2) Système multispin :

Seul le cas homonucléaire (7) sera traité ici, car il permet d'introduire la théorie des expériences à deux dimensions mettant en jeu des interactions dipolaires.

$$\frac{dM_{zi}}{dt} = R_i \left( M_{zi}^{\circ} - M_{zi} \right) + \sum_j \sigma_{ij} \left( M_{zi} - M_{zj} \right)$$
[21]

280

avec 
$$\begin{cases} R_{i} = 3 \frac{\gamma_{i}^{4} \pi^{2}}{10} \sum_{j} \frac{1}{r_{ij}^{6}} \left[ \frac{\tau_{c}}{1 + \omega_{0}^{2} \tau_{c}^{2}} + \frac{4\tau_{c}}{1 + 4\omega_{0}^{2} \tau_{c}^{2}} \right] \\ \sigma_{ij} = \frac{\gamma_{i}^{4} \pi^{2}}{10 r_{ij}^{6}} \left[ \frac{6\tau_{c}}{1 + 4\omega_{0}^{2} \tau_{c}^{2}} - \tau_{c} \right] \end{cases}$$

 $\leftrightarrow$   $\leftrightarrow$   $\leftrightarrow$   $\leftrightarrow$ 

# REFERENCES :

1)	R. K. Harris : " Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy " Pitman Publishing (1983)
2)	A. A. Bothner-By : " Biological Applications of Magnetic Resonance " R. G. Schulman Editor, Academic Press p.177 (1979)
3)	A. Abragam : " The Principles of Nuclear Magnetism " Clarendon Press, Oxford (1961)
4)	J. H. Noggle et R. E. Schirmer : " The Nuclear Overhauser Effect " Academic Press, New York (1971)
5)	I. Solomon : Phys. Rev. <b>99</b> , 559 (1955)
6)	G. E. Hawkes, W. M. Litchman et E. W. Randall : J. Magn. Res. 19, 255 (1975)
7)	A. Kalk et H. J. C. Berendsen : J. Magn. Res. <b>24.</b> 343 (1976)

CHAPITRE XI

EXPERIENCE D'INTERACTION DIPOLAIRE A DEUX DIMENSIONS


# XI-1) But :

A la différence des expériences de corrélation, l'objectif de cette expérience n'est pas d'obtenir des couplages scalaires, donc des enchaînements par liaison des atomes d'une molécule, mais plutôt d'indiquer des proximités entre noyaux à travers l'espace. Dans le chapitre précédent, nous avons vu que des mesures d'effets Overhauser nucléaires permettaient d'obtenir des distances relatives entre noyaux par

la temps of, qui est incremente entre chaque FI

l'intermédiaire du facteur  $\frac{AX}{r_{AY}}$  qui régit le facteur

d'exaltation lorsque plus de deux noyaux sont en interaction  $(r_{AX}$ étant la distance entre les noyaux A et X). Ce principe est utilisé sans qu'il soit ici question d'une étude précise des distances ; cette expérience fournira simplement une matrice avec, dans chaque dimension, les déplacements chimiques (et les couplages observables sur les taches elles-mêmes), et des signaux hors-diagonale caractérisant les interactions dipolaires entre deux noyaux.

# XII-2) Principe :

Le schéma global d'une expérience à deux dimensions permettant la mise en évidence de relaxation croisée entre noyaux est le suivant :



FIGURE XI-1

Séquence de l'expérience 2D d'interactions dipolaires : MOESY

Nous allons décrire brièvement cette expérience.

- Le premier pulse  $90_x^{\circ}$  crée la magnétisation transverse. Pendant le temps  $t_i$ , qui est incrémenté entre chaque FID, les vecteurs magnétisation précessent à la fréquence  $\omega_k$ . Ce temps d'évolution sert à créer la deuxième dimension ; comme dans toute expérience 2D, il sépare les différents composants de la magnétisation par leurs fréquences respectives (cf. COSY).

- Le deuxième pulse  $90_x$  fait basculer la composante en y de la magnétisation sur l'axe z.

Il est à remarquer que jusque là on retrouve la séquence de pulses d'un COSY, et si on faisait l'acquisition à ce moment, on aurait la matrice 2D de corrélation homonucléaire  ${}^{1}H - {}^{1}H$ . La différence est que dans le cas du COSY, c'est la composante en x avant le 2^{ème} pulse qui est intéressante et subsiste dans le plan transverse après ce pulse. Pour le NOESY, c'est la composante de magnétisation basculée sur z par ce pulse qui va contenir l'information, c'est à dire qu'il faut que la magnétisation soit longitudinale (parallèle au champ) pour que la relaxation croisée puisse s'accomplir.

Cette séquence est suivie d'un délai assez long et variable : le temps de mélange ("Mixing Time"  $\tau_m$ ) qui est de l'ordre de T₁ pour permettre à l'effet Overhauser de s'effectuer.

Pour les composantes de magnétisation qui nous intéressent dans cette expérience, les deux premiers pulses  $90_x^{\circ}$  séparés par t_i (qui ne sert qu'à créer la deuxième dimension, rappelons-le, et est inactif sur ces vecteurs) sont assimilables à un pulse  $180_x^{\circ}$ unique. La séquence est alors à rapprocher d'une expérience de mesure de T, par inversion-recouvrement.

XII-3) Traitement théorique de cette expérience : (réf (1))

Soit un système de g groupes de noyaux, chaque groupe contenant n, spins équivalents, et résonnant à  $\omega_c$ :



g = 5

#### FIGURE X1-2

Exemple numérique explicitant la signification de g,  $n_k$  et  $\omega_k$ .

La relaxation longitudinale suit l'équation :

$$\frac{d\vec{m}}{dt} = -R\vec{m}$$
 [1]

Le vecteur  $\vec{m}$  comprend les déviations de  $M_{zk}$  (magnétisation longitudinale des spins du groupe k) de l'équilibre thermique pour les g groupes de spins :

$$m_{k} = M_{zk} - \left(\frac{n_{k}}{N}\right) M_{0}$$
 [2]

$$\left(N = \sum_{k} n_{k}\right)$$

- R : matrice de relaxation avec les constantes de vitesse R_{k1}, comprenant les contributions de relaxation croisée et de relaxation externe.
- $\sigma_{kl}$ : vitesse de relaxation croisée entre k et l R_l : vitesse de relaxation externe



La relaxation croisée conduit à une distribution de magnétisation sur le système, la relaxation externe à une perte de magnétisation dans l'environnement.

#### FIGURE XI-3

La période essentielle dans un NOESY est le temps de mélange  $\tau_m$ pendant lequel la relaxation s'effectue. Déviation de la magnétisation au début de  $\tau_m$ :

$$m_{1}(0) = M_{z1}(0) - \frac{n_{1}}{N} M_{0}$$

$$= -\left[1 + \cos(\omega_{1}t_{1}) e^{-\frac{t_{1}}{T_{z1}}}\right] \frac{n_{1}}{N} M_{0} \qquad [3]$$

Pendant  $\tau_m$ , la déviation de la magnétisation longitudinale suit :

$$m_1(\tau_m) = m_1(0) e^{-R \tau_m}$$
 [4]

Juste après le troisième pulse x, sans effet de relaxation, on aurait :

$$M_{y} = -\sum_{k} \cos(\omega_{k}t_{1}) \frac{n_{k}}{N} M_{0} \qquad [5]$$

(On peut vérifier que  $t_1 = 0$  implique  $M_y = -M_0$ , car la séquence revient alors à un pulse  $270_x^{\circ}$ .) donc, pendant  $T_p$ , la magnétisation serait décrite par :

$$M_{y} = -\sum_{k} \cos(\omega_{k}t_{1}) \frac{n_{k}}{N} M_{0} \times \cos(\omega_{k}t_{2}) e^{-\frac{t_{2}}{T_{2k}}}$$
[6]

Mais puisque le retour à l'équilibre de la magnétisation pendant le temps de mélange est gouverné par l'équation [4], on récupère :

$$M_{y}(t_{1}, \tau_{m}, t_{2}) = \sum_{k} \cos(\omega_{k} t_{2}) e^{-\frac{t_{2}}{T_{2k}}} \left[e^{-R \tau_{m}}\right]_{k} \times \cos(\omega_{k} t_{1}) e^{-\frac{t_{1}}{T_{2k}}} \frac{n_{k}}{N} M_{0}$$
$$- \left[\sum_{\substack{k, 1 \ k \neq 1}} \cos(\omega_{k} t_{2}) e^{-\frac{t_{2}}{T_{2k}}} \left[e^{-R \tau_{m}}\right]_{k, 1} \times \left\{1 + \cos(\omega_{1} t_{1}) e^{-\frac{t_{1}}{T_{21}}}\right] \frac{n_{1}}{N} M_{0}$$

(équation [7])

soit :

$$M_{y}(t_{1},\tau_{m},t_{2}) = \sum_{\substack{k,1\\k\neq 1}} \cos(\omega_{k}t_{2})e^{-\frac{t_{2}}{T_{2k}}} \times \left\{ \left[ e^{-R\tau_{m}} \right]_{k,1} \times \left\{ 1 + \cos(\omega_{1}t_{1})e^{-\frac{t_{1}}{T_{21}}} - \delta_{k1} \right] \frac{n_{1}}{N} M_{0} \right\}$$

$$\begin{pmatrix} avec \ \delta_{k\ell} : symbole \ de \ Kroneker \\ \delta_{k\ell} = 0 \ si \ k \neq \ell \quad \delta_{k\ell} = 1 \ si \ k = \ell \end{pmatrix}$$
 (équation [8])

Ceci peut être décomposé en deux parties :

 $M_{y}^{cross} = \sum_{k,1} \cos(\omega_{k}t_{2})e^{-\frac{t_{2}}{T_{2k}}} \times \left[e^{-R\tau}\right]_{k1} \cos(\omega_{1}t_{1})e^{-\frac{t_{1}}{T_{21}}} \frac{n_{1}}{N} M_{0},$ 

(équation [9a])

Ce terme comprend les composantes modulées en  $t_i$ , donc formant les pics croisés (et auto-pics) entre  $\omega_i$  et  $\omega_k$ . Pour un temps  $\tau_m$  long, ces composantes décroissent et tendent vers 0, car des phénomènes de fuite de magnétisation tels que diffusion de spin (2), ... apparaissent.

$$M_{\gamma}^{a \times ial} = \sum_{k,l} \cos(\omega_{k}t_{2})e^{-\frac{t_{2}}{T_{2k}}} \times \left\{ \left[ e^{-R\tau} \right]_{kl} - \delta_{kl} \right\} \frac{n_{l}}{N} M_{0} \qquad [9b]$$

regroupe les composantes non influencées par  $t_1$ , et conduit aux pics axiaux indésirables (apparaissent à  $\omega_1 = 0$  dans la seconde dimension).

On voit donc qu'un cycle de phase quelconque ne convient pas pour une telle expérience puisqu'il faut supprimer :

- A) les restants de magnétisation transverse (3,4),B) les pics axiaux (provenant de l'équation [9b]).
- A) a- Puisque pour les vecteurs de magnétisation donnant lieu à des phénomènes de cross-relaxation les deux premiers pulses sont assimilables à un pulse 180^{*}, le fait de changer le sens de rotation (180^{*}) en appliquant deux pulses 90[°] de phase -x revient au même et aligne de la même façon ces vecteurs selon l'axe z avant le temps de mélange. Par contre les vecteurs de magnétisation transverse qui ne sont affectés que par le premier pulse sont inversés entre les deux séquences résultantes :

	90°	90°	90°
1 ^{er} transient	×	×	×
2 ^{ème}	-×	-×	-×

L'addition de ces deux FID élimine donc les interférences de magnétisation transverse de manière significative.

b- De plus, si à chaque fois, on fait varier  $\tau_m$  de façon aléatoire, on peut obtenir une distribution uniforme des

vecteurs magnétisation dans le plan transverse avant le second pulse 90°, et ainsi amoindrir encore les effets de magnétisation transverse.

B) Dans une telle expérience, deux types de pics axiaux sont à redouter. Les premiers sont ceux qui apparaissent pendant le temps d'évolution ti (destiné uniquement à "marquer" les spins par leur fréquence dans la seconde dimension, et non à créer déjà un effet de relaxation) et sont supprimés en même temps que les autres vecteurs de magnétisation transverse par le cycle de phase décrit dansle paragraphe précédent, seconds apparaissent et croissent de façon dramatique les quand le temps de mélange augmente, et doivent tout autant être supprimés. Ils proviennent du retour à l'équilibre de la pendant le temps de mélange par magnétisation autorelaxation. Une méthode pour les supprimer consiste à créer des séquences de type :

- North	ישל כצר מו	90°	90°	90°
1er	transient	×	×	×
51-111	2 ^{ème}	×	-×	-×

Au début de  $\tau_m$ , les vecteurs magnétisation seront opposés et les effets de relaxation directe (non croisée) vont s'annuler.

Pour la suppression à la fois des pics de magnétisation transverse et des pics axiaux, on utilise donc la séquence de phase suivante :

ifier le solva	90°	90.	90°
1 ^{er} transient	×	×	×
2 ^{ème}	-×	×	-×

avec addition des FID, et variation aléatoire du temps  $\tau_{\rm m}$  entre chaque FID.

Ce cycle de phase est complété par la quadrature en F1, la suppression des pics double quantum et le cycle de phase CYCLOPS en F2.

XI-4) Application aux oligosaccharides :

Les interactions dipolaires résiduelles mises en évidence par effet Overhauser nucléaire dans cette expérience seront utilisés pour donner des renseignements sur la proximité de protons dans l'espace. On peut donc espérer deux types d'informations adaptées aux cas des oligosaccharides :

- 1- détermination de la séquence d'enchaînement des unités, par interactions des protons 1 et 4 de deux unités successives par exemple,
- 2- conformation spatiale de la molécule par la construction d'une carte de distances entre protons permettant de connaître les angles  $\varphi$  au niveau de la liaison interglycosidique.

Nous avons vu précédemment que l'intensité de l'effet NOE est très fortement dépendante du terme  $\omega \tau_c$ ; il se trouve que pour les oligosaccharides comportant de quatre à dix unités observés à température ambiante et à 500 MHz, ce paramètre est très défavorable et conduit à des effets très faibles voire négatifs.

Dans ces conditions, il faut trouver une façon de modifier la valeur de  $\tau_c$  puisqu'il n'est pas possible de changer  $\omega$ . En effet, toute mesure à une fréquence nettement plus basse se heurte à des problèmes de sensibilité et de résolution du spectre (nous verrons dans le paragraphe suivant qu'il existe un moyen de contourner cette difficulté en mesurant des interactions dipolaires dans le champ tournant). Il n'est pas non plus judicieux de modifier le solvant, et la seule solution consiste à travailler à température plus basse pour allonger le temps de corrélation (ralentir les mouvements moléculaires).

Pour les oligosaccharides en solution aqueuse, une température de 283 K constitue un compromis acceptable entre NOE significatifs et conditions expérimentales pas trop délicates. Il convient toutefois de signaler que l'attribution des signaux du spectre doit être réalisée à nouveau, certains signaux ayant des coefficients thermiques importants. La figure XII-4 montre le résultat obtenu avec le pentasaccharide Pi lors d'une expérience de NOESY réalisée à 283 K. Nous avons utilisé la version phasée qui permet dans ces conditions de séparer les pics dûs aux interactions dipolaires (négatifs) et ceux provenant des corrélations scalaires ou autres phénomènes parasites (positifs).

Sur cette figure, on rappelle également le contour du quadruple relais qui va permettre d'identifier immédiatement les corrélations  $1 \rightarrow 4$  à l'intérieur d'une même unité facilitant la détermination de séquence. Pour chaque proton anomérique, on détermine le proton 4 corrélé de façon dipolaire et on remonte ensuite au proton 1 de cette unité. Le séquençage peut ainsi être réalisé de façon univoque.

On peut vérifier que  $A_1^r$  ne donne pas de tache avec son proton 4 puisqu'il est à l'extrémité terminale réductrice. Par contre, la tache  $A_1^r - OCH_3$  est parfaitement visible et indique sans ambiguité la position de cette unité. De même  $A_4^{nr}$  ne donne aucune corrélation dipolaire avec un proton anomérique en raison de la localisation de cette unité à l'extrémité non réductrice.

Si les conditions expérimentales sont favorables (ajustement de la température pour que le NOE ne soit pas nul ou très faible par exemple), cette démarche permet une détermination très efficace de la séquence. Elle repose sur l'attribution sûre et précise des protons 4 pour chaque unité et justifie donc totalement que le maximum d'efforts soit fait pour les identifier de façon univoque.

L'expérience NOESY présentée montre que de nombreuses autres taches de corrélation existent et n'ont pas été utilisées pour la détermination de séquence. Les proximités entre protons mises en évidence par ce procédé peuvent être utilisées pour donner des renseignements sur la conformation moyenne en solution. Cet aspect sort du cadre fixé pour cette thèse et ne sera pas détaillé. On peut plutôt résumer les résultats obtenus par un schéma indiquant les effets observés. On notera toutefois l'existence d'un effet Overhauser intense entre I₂ et I₅ caractéristique d'une conformation ²S₀ pour cette unité (figure XII-5).



(a) Rappel du contour de l'expérience de RELAIS quadruple pour l'identification de tous les protons de chaque unité.

(b) Contour du HOESY (τ_m = 700 ms) à 283 K. Seuls les contours négatifs sont tracés. Le schéma utilisé pour le séquençage complet du pentasaccharide est indiqué en pointillés.





- a) Effets Overhauser Hucléaires observés sur le pentasaccharide P1 à 283 K.
- b) Représentation de la conformation  ${}^{2}S_{0}$ .

#### XI-5) Interactions dipolaires dans le champ tournant

#### XII-5-1) Introduction :

Nous avons vu dans les chapitres précédents que l'intensité de l'effet Overhauser nucléaire dépendait de nombreux paramètres, dont le terme  $\omega_{0} \tau_{c}$  qui est, en étude homonucléaire sur un composé pur (sans trace de paramagnétiques), le facteur limitant pour l'observation des signaux représentatifs des interactions dipolaires entre noyaux proches dans l'espace. En effet, dans de nombreux cas, les composés étudiés (et là en particulier nos oligosaccharides à 500 MHz) présentent des temps de corrélation tels que l'on se trouve près de la condition  $\omega_0 \tau_c = 1$ . Dans cette situation, le NOE est quasiment nul, et nous venons de voir qu'il faut recourir à des changements de conditions expérimentales température, solvant - pour pouvoir obtenir des résultats interprétables. Ces contraintes de modification du milieu peuvent cependant être gênantes, pour plusieurs raisons, qui tiennent du fait que l'on s'éloigne des paramètres "in-vivo". Cela est encore plus problématique dans le cas où l'on veut mesurer ou mettre en évidence des conformations en solution.

Pour pallier à ces inconvénients, la solution est de modifier le champ apparent dans lequel les interactions dipolaires interviennent (pour changer le terme  $\omega$ ), sans bien sûr que cela se fasse au détriment de la résolution du spectre, c'est à dire qu'il faut utiliser deux champs : un pour l'excitation des noyaux, et l'autre pour le développement des effets Overhauser.

Pour une telle expérience, on utilise donc le champ radiofréquence B1, et ceci rapelle immédiatement les expériences de transfert scalaire dans le champ tournant, puisque l'on retrouve les conditions de Hartmann-Hahn. En effet, l'autre façon de considérer cette expérience est la suivante : pendant l'impulsion de spin-lock, les spins sont bloqués dans le champ radiofréquence et les termes de flip-flop de l'Hamiltonien dipolaire (en  $I_1^*I_2^-$  et  $I_1^-I_2^+$ ) interviennent pour augmenter la vitesse d'interaction entre les noyaux, par l'intermédiaire des densités spectrales qui seront changées. XII-5-2) Expériences de mesure du facteur d'exaltation :

A) Relaxation dans le champ Bo :

Considérons un système homonucléaire de 2 spins 1/2 A et B. D'après l'équation [8] du chapitre XII, on a :

$$\eta_{A} = \frac{W_{2} - W_{0}}{W_{0} + 2W_{A} + W_{2}}$$

Or, puisque :

$$\begin{pmatrix} \frac{1}{T_{1561}} \begin{pmatrix} = \frac{1}{T_{1h6t6ro}} \end{pmatrix} = W_0 + 2W_A + W_2 = R_A \\ \frac{1}{T_{1homo}} = 2(W_2 + W_A) = R_A + \sigma_{AB}$$

on peut écrire : 
$$\eta_{A} = \frac{\frac{1}{T_{1homo}} - \frac{1}{T_{1sél}}}{\frac{1}{T_{1sél}}} = \frac{\sigma_{AB}}{R_{A}}$$

De la même manière, le facteur d'exaltation Overhauser dans le champ tournant est le rapport de la relaxation croisée sur la relaxation directe ; le raisonnement sera donc identique (5).

Revenons aux échanges dipolaires classiques (dans Bo) ; les expériences à réaliser pour mesurer directement le facteur d'exaltation sont donc, 1°- une expérience de mesure de Ti type inversion-recouvrement, mais avec un délai de mélange optimisé pour fournir un effet NOE maximum, 2°- la même expérience où le premier pulse est transformé en un pulse sélectif. Un simple calcul peut fournir ensuite l'effet Overhauser nucléaire.



(1) expérience type mesure de T₁ par inversion-recouvrement
(2) expérience type mesure de T₁ sélectif.

$$\frac{1}{T_{1561}} = 2 \frac{\gamma_A^4 \pi^2 \tau_c}{20 r^6} \left( 1 + \frac{3}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{6}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right)$$

$$\frac{1}{T_{1homo}} - \frac{1}{T_{1sél}} = 2 \frac{\gamma_A^4 \pi^2 \tau_c}{20 r^6} \left( \frac{6}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} - 1 \right)$$

B) Relaxation dans le champ tournant :

Tout d'abord , de la même manière que dans le cas précédent il fallait mesurer  $T_i$ , là, il est nécessaire de connaître  $T_{ip}$  avant toute mesure du facteur d'exaltation.

(1) Mesure de T₁₀ :

L'expérience est très simple et peut être schématisée par la séquence décrite sur la figure XII-7.



BU

# Expérience de mesure de T₁₀.

Le champ B1 de spin-lock est appliqué pendant un temps variable T.

L'aimantation est d'abord basculée selon l'axe Oy par une impulsion non sélective et "verrouillée" par le champ radiofréquence B₁. Ce champ est maintenu pendant un temps  $\tau$ durant lequel une partie de l'aimantation disparaît par relaxation quasi-transverse. Pour chaque valeur de  $\tau$ , la magnétisation transverse résiduelle est alors mesurée. L'intensité du signal est donnée par :

$$M(\tau) = M_0 e^{-\frac{\tau}{T_{1\rho}}}.$$

La décroissance exponentielle de M permet donc de déterminer T₁₀.

(2) Mesure de T₁₀ sélectif :

On ne peut pas réaliser simplement cette expérience en ne changeant que le premier pulse 90° par un pulse sélectif, car pour que les conditions de Hartmann-Hahn soient présentes, il faut que tous les spins (participant aux interactions) soient bloqués dans le champ tournant B1, et donc qu'avant l'impulsion de spin-lock, ils soient déjà dans le plan transverse. On effectue donc une autre séquence :



Expérience de T₁₀"sélectif".

Lors de cette expérience, seule la relaxation croisée  $\sigma_{AB}$ intervient pour faire décroître le signal. Donc, pour obtenir le facteur d'exaltation Overhauser dans le champ tournant, il faut appliquer l'équation :

$$\eta_{ROE} = \frac{\sigma_{AB}}{R_A} = \frac{T_{1p} "sél"}{T_{1p} - T_{1p} "sél"}$$

XII-5-3) Determination des courbes  $\eta_{MAX} = f(\omega \tau_c)$ :

Les courbes théoriques donnant  $\eta_{\text{HAX}}$  en fonction du terme  $\omega \tau_c$ sont obtenues à partir des équations des temps de relaxation du chapitre précédent, soit, pour le NOE classique, celles qui concernent le T1 hétéronucléaire et le T1 homonucléaire. Pour l'effet Overhauser dans le champ B1, les équations sont celles qui régissent le T1p hétéro- et homonucléaire. Cependant pour la plupart des molécules  $\omega_1 \tau_c \ll 1$ , c'est à dire que la puissance du champ tournant B1 étant beaucoup plus faible que celle de Bo, les vecteurs sont quasiment alignés sur l'axe y ; leur relaxation est très similaire à la relaxation transverse, et en première approximation, on pourra considérer T2.

Exemple :

et :

 $B_0 = 500$  MHz,  $B_1 = 1$  KHz si on a - $\tau_{2} = 10^{-9}s$ at  $\omega_0 = 3,15 \ 10^9 \text{ rad/s} \longrightarrow \omega_0 \tau_c = 3,15 \ \text{rad}$ alors :

 $\omega_1 \simeq 6300 \ rad/s \longrightarrow \omega_1 \tau_c = 6,3 \ 10^{-6} rad \ll 1$ 

Ainsi, on peut écrire par approximation :

$$R_{A} = \frac{1}{T_{2DD}} = \frac{\gamma^{+}\pi^{2}\tau_{c}}{20 r^{6}} \begin{bmatrix} 5 + \frac{9}{1 + \omega_{0}^{2}\tau_{c}^{2}} + \frac{6}{1 + 4 \omega_{0}^{2}\tau_{c}^{2}} \end{bmatrix}$$

Rappelons que l'équation est celle qui correspond au cas hétéronucléaire (avec l'approximation  $\omega_A = \omega_B = \omega_0$ ), car le pulse 180° est sélectif.



#### FIGURE XI-9

Graphique donnant l'alture des courbes de HOE (facteur d'exaltation lors de la relaxation dans le champ statique B0) et le ROE (relaxation dans le champ tournant) en fonction de ωσς.

#### XII-5-4) Expérience à deux dimensions : ROESY

L'expérience de ROESY se construit très facilement à partir de celle de mesure du  $T_{1\rho}$ , car il suffit de séparer le pulse 90° et l'impulsion de spin-lock par un délai d'évolution variable ti propre aux expériences à deux dimensions. De ce fait, les spins sont basculés dans le plan transverse par le premier pulse, puis évoluent en fonction de leurs déplacements chimiques respectifs, se séparant dans la seconde dimension. Ensuite l'impulsion de spin-lock les bloque dans le champ tournant pour que la relaxation croisée selon  $T_{1\rho}$  puisse s'accomplir. La durée du spin-lock est fixe déterminée grâce à une mesure préliminaire de  $T_{1\rho}$ .

#### XII-5-5) Inconvénients du ROESY :

Si l'on se rapporte à l'expérience de HOHAHA (cf. chapitre  $\Sigma II$ ) dont la séquence est très proche de celle du ROESY – bien que la durée du spin-lock soit beaucoup plus grande dans cette dernière – on voit que plusieurs phénomènes parasites se produisent pendant l'impulsion de spin-lock (6).

En effet, avec les signaux normaux d'interactions dipolaires dans le champ tournant apparaissent aussi des signaux de corrélation scalaire directe (type COSY), et des signaux de transfert scalaire isotrope (type HOHAHA).

L'équation [1] du paragraphe  $\Omega I - 5 - 3$  montre que l'on peut résoudre le deuxième problème, c'est à dire éliminer les effets de Hartmann-Hahn scalaires, en prenant certaines précautions :

- utilisation de champs radiofréquences les plus faibles possible (en prenant garde d'irradier tous les signaux du spectre correctement),
- décalage de la fréquence centrale du pulse (pour éviter que le terme  $\left| \Delta v_A^2 \Delta v_B^2 \right|$  ne soit minime).

On voit immédiatement que ces deux points rendent l'expérience de ROESY très délicate à réaliser, puisque le fait de décaler le centre du pulse demande que l'on envoie une puissance plus grande, (ce qui est le facteur limitant sur beaucoup de spectromètres actuels), donc s'oppose à la première condition. De ce fait, dans la matrice de ROESY, on récupèrera la plupart du temps des pics dûs à des interactions scalaires, qui seront heureusement phasés différemment des signaux normaux. Ainsi, si l'on phase négativement les pics ROESY, on a :

les pics COSY en antiphase (donc leur intégrale est nulle),
les pics HOHAHA positifs (ainsi que la diagonale).

Signalons d'autre part que pour les échantillons subissant des échanges chimiques ou possédant des T2 très courts, l'expérience n'est alors que très difficilement réalisable. Le problème de la diffusion de spin peut de plus s'avérer crucial et empêcher l'application du ROESY sur de grosses molécules.

Dans notre cas particulier d'oligosaccharides, les signaux étant regroupés sur une petite gamme spectrale (3 ppm) et les temps de relaxation transverse restant suffisamment proches des Ti, nous avons pu réaliser cette expérience sans trop de problèmes sur un appareil ne disposant pas de champ radiofréquence très puissant (WM 500, cf. chapitre XIV).

# XII-6) Application aux oligosaccharides :

# XII-6-1) <u>Mesure de T₁₀</u> :

Nous avons vu que de même que l'efficacité de l'interaction dipolaire dans le champ Bo dépend de T₁, les échanges dans le champ tournant B₁ sont contrôlés par T_{1p}, et, de fait sa valeur doit être déterminée avant toute tentative de mesure des échanges dipolaires dans B₁.

La figure XII-10 montre le résultat obtenu pour le pentasaccharide P1, en ce qui concerne les protons anomériques.





Hesure de T_{1p} des protons anomériques du pentasaccharide P1 à 500 MHz et 295 K. Les valeurs indiquées sous chaque spectre partiel correspondent à la durée du spin-lock.

Dans le cas des oligosaccharides, les valeurs moyennes de  $T_{ip}$ pour les protons anomériques sont de l'ordre de 0.5 à 1 s suivant les unités. Ce paramètre définit l'ordre de grandeur des temps caractéristiques qui seront nécessaires pour les échanges dipolaires dans le champ tournant.

#### XI-6-2) Expérience de ROESY :

L'expérience ROESY a été appliquée au pentasaccharide Pi, et une expérience NOESY a été effectuée exactement dans les les mêmes conditions de temps d'accumulation, de résolution et de température. Ces deux techniques sont utilisées en mode phasé ; la comparaison des deux est donnée sur la figure XI-11.



FIGURE XE-11

Contour (a) d'une expérience HOESY  $(\tau_m = 0.7 s)$  et (b) d'une expérience ROESY = 0.2 s) pour le pentasaccharide  $P_1$  à (T_{SL} 296 K. Souls los niveaux négatifs sont tracés pour le HOESY, alors que le ROESY ne journit que des signaux positifs.

La comparaison des résultats est très en faveur de l'expérience ROESY. Dans les conditions utilisées (296 K), les effets Overhauser dans le champ Bo sont très faibles et négatifs. Nous avons vu dans le chapitre consacré au NOESY qu'il est nécessaire de refroidir les solutions vers 10°C pour obtenir des effets significatifs sur ce type de composé à 500 MHz, en raison de la valeur défavorable de  $\omega \tau_c$ . Dans le cas de l'expérience ROESY, au contraire, les effets sont beaucoup moins sensibles à ces paramètres, et de plus le passage par O n'est pas possible. Cette approche permet donc de s'affranchir des problèmes expérimentaux souvent rencontrés dans les expériences d'interactions dipolaires classiques pour des molécules de taille moyenne. Les résultats obtenus avec le ROESY sont identiques, au moins qualitativement, mais la qualité est très supérieure. On peut noter en particulier la très nette tache de corrélation dipolaire entre  $A_1^{nr}$  et OCH₃. Cette tache est présente dans le NOESY à 283 K, mais elle est très faible en raison de la mobilité propre du groupe méthyl ; le terme gouvernant le n.O.e entre les protons H1 et OCH3 n'est pas le temps de corrélation propre de la molécule entière, mais celui plus court du vecteur H₁ - CH₃. A titre indicatif, le n.O.e observé à 283 K (par des mesures classiques monodimensionnelles) n'est environ que 20% de la

valeur calculable à partir des autres effets sur la partie "rigide" du pentasaccharide. Dans le ROESY, les effets de temps de corrélation sont beaucoup atténués et on observe une tache de corrélation dipolaire dont l'intensité est plus proche de la valeur attendue par la proximité de ces protons.

En conclusion, il est évident que pour des molécules de taille moyenne fournissant des effets Overhauser très faibles à température ambiante, l'utilisation des échanges dipolaires dans le champ B₁ (ROESY) fournit de très bons résultats, et évite d'avoir recours à des artifices destinés à modifier de façon importante la valeur de  $\tau_c$ , c'est à dire la mobilité moléculaire. Ceci permet d'étudier les composés bio-actifs dans des conditions de solvant et de température plus représentatifs de leur environnement naturel (7).

# REFERENCES :

1)	S. Macura, R. R. Ernst : Molec. Phys. <b>41,</b> n°1, 95 (1980)
2)	A. Kalk et H. J. C. Berendsen : J. Magn. Res. <b>24,</b> 343 (1976)
3)	S. Macura, K. Wüthrich et R. R. Ernst : J. Magn. Res. <b>46,</b> 269 (1982)
4)	S. Macura, K. Wüthrich et R. R. Ernst : J. Magn. Res. <b>47</b> , 351 (1982)
5)	A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, J. Lee, C. D. Warren and R. W. Jeanloz : J. Am. Chem. Soc. <b>106,</b> 811 (1984)
6)	A. Bax and D. G. Davis : J. Magn. Res. <b>63,</b> 207 (1985)
7)	D. Marion : F.E.B.S. Lett. <b>192</b> , n°1 (1985)



CHAPITRE XIV

CONDITIONS EXPERIMENTALES



XIQ-1) Préparation des échantillons :

Les oligosaccharides présentés dans ce travail ont été étudiés à pH 7 en solution aqueuse . La plupart des mesures ayant été réalisées dans l'eau lourde, les protons labiles ont été échangés contre des deutérons par lyophilisation répétée dans l'eau lourde (99,98 % D), la dernière étant réalisée directement dans le tube de mesure. En ce qui concerne les mesures en RMN du carbone 13, les produits solides sont simplement dissouts dans l'eau lourde. Afin d'éliminer d'éventuelles traces de métaux paramagnétiques très néfastes, en particulier pour les expériences de nOe, les oligosaccharides sont au préalable traités par une faible quantité de résine chélatante Chelex 100 et filtrés sur Millipore.

Pour les expériences en RMN du proton , une trace de TSP (Triméthyl-silyl- 2-2-3-3 tétradeutéro propionate, sel de sodium) est ajoutée comme référence interne. Pour les mesures en RMN du carbone 13, le méthanol est utilisé comme référence interne secondaire. Toutes les expériences concernant le proton ont été réalisées avec des solutions dans la gamme de concentration 5-15 mM en tube de 5 mm. Pour le carbone 13, la concentration est de l'ordre de 10-30 mM en tube de 10 mm.

#### XIQ-2) Appareillage :

Toutes les mesures en RMN protonique ont été effectuées sur un spectromètre BRUKER WM500 opérant à 500 MHz pour le proton. Cet appareil est équipé d'un calculateur Aspect 3000 avec Array processor et Process controller. Il a de plus été modifié de manière à pouvoir réaliser les expériences de type reverse et les mesures dans le référentiel tournant. Cet appareil est équipé d'un convertisseur analogique-digital de 16 bits. La durée de l'impulsion correspondant à un angle de basculement de 90 degrés (pour le proton) est de l'ordre de 12 microsecondes. Pour les expériences de transferts sélectifs utilisant une excitation de type DANTE, le canal émission est atténué de manière à allonger l'impulsion dans le domaine 40-50 microsecondes. A l'exception des mesures de NOESY (effectuées

le plus souvent à 283 K), les expériences ont été réalisées à 296 K.

Les mesures en RMN du carbone ont systématiquement été effectuées à l'aide d'un spectromètre BRUKER MSL 300 opérant à 300.13 MHz pour le proton et 75.47 MHz pour le carbone . Toutes les expériences ont été conduites à 300 °K en utilisant une sonde sélective carbone 10 mm. Les durées des impulsions sont de 9 microsecondes pour le carbone et 18 microsecondes pour le proton (via le canal de découplage atténué de 4 dB) en mode basse puissance. Pour toutes les expériences utilisant des transferts d'aimantation proton-carbone, une valeur moyenne de 150 Hz a été utilisée pour le couplage direct C-H.

#### XIQ-3) Paramètres d'acquisition en RMN du proton :

Les spectres classiques ainsi que les expériences de transferts 1D ont été enregistrés sur 16K (points complexes), le temps total de recyclage étant typiquement de 1-2 secondes. La plupart des FID obtenus ont été traités par multiplication Lorentzienne-Gaussienne optimisée. Les spectres de transferts 1D sont de plus traités en mode valeur absolue pour améliorer leur présentation. Ces spectres sont en effet difficilement phasables sauf si on leur adjoint un filtre Z qui conduit toutefois à une importante perte de signal. Il en est de même pour les spectres obtenus dans l'eau légère par les séquences composites.

Les expériences bidimensionelles sont, soit réalisées en mode absolu (COSY, relais multiples et corrélation à deux quanta), ROESY, HOHAHA). Pour les soit en mode phasé (NOESY, type scalaire, 256 incréments de ti sont corrélations de utilisés et la matrice est finalement de 1Kx1K (points réels) après zéro-filling. Pour les corrélations via les transitions à deux quanta, 300-400 incréments sont utilisés pour fournir une matrice finale de 512x2K. Les fonctions d'apodisation de type sine-bell sont utilisées dans les deux dimensions. En ce qui concerne les expériences de corrélation dipolaire, 128 valeurs temps incrémentable sont prises en compte. Les fonctions du d'apodisation de type sine-bell sont décalées de  $\pi/20$  dans les

deux dimensions. Le temps de mélange est choisi en fonction du temps de relaxation T1 moyen des protons anomériques. Des valeurs situées dans la gamme 400-700 msec de l'ordre de 400-700 msec ont été utilisées dans le cas présent. Des mesures annexes des effets Overhauser 1D ont montré que dans ces conditions l'effet de la diffusion de spin est très faible. Afin de supprimer les corrélations scalaires lors de ces expériences, le temps de mélange est changé de façon aléatoire à l'intérieur d'une fourchette correspondant à ± 20 msec. Tous les effets Overhauser présentés dans ce travail sont négatifs l'exception bien sûr des effets enregistres dans le (à référentiel tournant) et seuls les contours négatifs sont donc présentés.

#### XIQ-4) Paramètres d'acquisition en RMN du Carbone 13 :

Les spectres standard sont accumulés sur 8K points complexes et traités de la même façon que les spectres protoniques. Les expériences de corrélation hétéronucléaire sont réalisées avec 256 incréments de ti et présentées en mode valeur absolue. Les fonctions d'apodisation de type sine-bell sont décalées de  $\pi/10$  dans les deux dimensions F1 et F2.







avons montré dans ce travail les différentes Nous approches permettant de déterminer sans ambiguïtés la structure d'oligosaccharides dérivés de l'héparine. Chaque technique présente des avantages et des inconvénients, et il est nécessaire d'adopter une stratégie cohérente pour obtenir des informations univoques. 11 est possible de déterminer totalement une structure en utilisant exclusivement la RMN du proton et en mettant en ceuvre des méthodes dont l'efficacité prouvée. La situation est un peu différente si des études est conformationelles ultérieures sont requises, dans le cadre d'une analyse de relations structure-activité par exemple. Dans cas. une détermination très précise des constantes de ce couplage et des valeurs quantitatives des effets Overhauser nucléaires sera nécessaire.

En présence d'un composé inconnu, ou d'un mélange, la détermination de la nature de toutes les unités constituantes le plus souvent accessible par les méthodes de corrélation est scalaires de type COSY. Une grande partie des ambiguïtés peut être levée par les expériences de relais simples ou multiples. Une façon de procéder qui s'est révélée particulièrement efficace consiste à acquérir simultanément le COSY et le RELAIS SIMPLE à l'aide de microprogrammes enchaînés. Cette méthode permet d'optimiser le temps machine disponible et de comparer très facilement les résultats obtenus, dans la mesure où les deux expériences sont réalisées dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques. Les méthodes multirelayées sont utiles en complément et sont également mises en oeuvre sous forme de microprogrammes enchaînés. Elles peuvent par ailleurs, si le nombre d'ambiguïtés résiduelles est faible, être remplacées par une corrélation totale de type HOHAHA. Les techniques de corrélation par les transitions à deux quanta constituent une voie complémentaire qui devrait être plus utilisée qu'elle ne l'est à l'heure beaucoup actuelle. Ces méthodes de corrélation permettent très souvent analyse très complète en une seule expérience et leur une intérét devient évident pour l'analyse de composés de forte masse moléculaire pour lesquels les phénomènes de relaxation reduisent l'efficacité des relais scalaires multiples. Elles trouvent enfin un intérét considérable pour l'identification de protons labiles dans l'eau légère.

détermination de la nature et des conformations des La unités passe obligatoirement par l'obtention des constantes de couplage qui ne peuvent qu'être estimées par les expériences bidimensionelles à cause de limitations intrinsèques de résolution. Pour les molécules complexes, les expériences de type J-resolved sont de peu de secours à cause d'artéfacts inhérents à la méthode qui peuvent conduire à des interprétations erronées. Dans le cas, très fréquent, où les protons anomériques des diverses unités fournissent des signaux séparés, il est clairement démontré ici que les techniques de transferts monodimensionnels sont extrêmement efficaces et permettent d'accéder sans ambiguïté aux déplacements chimiques et aux couplages avec une résolution très élevée. Ce type d'expériences peut être réalisé très facilement sur les appareils commerciaux et devrait rapidement apparaître comme une technique de choix même pour remplacer les méthodes de double irradiation classiques. Leurs performances sont toutefois réduites pour les composés de masse moléculaire importante.

La reconstruction complète de l'édifice à partir des éléments constitutifs mis en évidence par les diverses techniques décrites ci-dessus est du ressort des expériences de corrélation dipolaires telles que le NOESY. La séquence peut ainsi être déterminée et les données quantitatives d'effets Overhauser serviront de base au calcul de la conformation moyenne adoptée par la molécule en solution. Ces mesures sont toutefois souvent rendues difficiles par la faiblesse des effets observés pour les oligosaccharides de taille moyenne. Afin d'éviter de se placer dans des conditions "biologiquement" significatives, de solvant ou de température par exemple, peu la détermination des interactions dipolaires dans le référentiel tournant (ROESY) constitue une parade très efficace malgré les contraintes expérimentales qui ne peuvent en faire une expérience de routine à l'heure actuelle.

On dispose donc d'un arsenal complet de méthodes efficaces qui, associé à une stratégie d'analyse réfléchie, garantit des déterminations fiables et très précises. La l'utilité techniques démonstration de des originales développées dans ce travail a été réalisée en prenant des oligo-saccharides comme exemples. Il est évident que ces

approches sont applicables à la plupart des problèmes de détermination de structures rencontrés en RMN, en particulier en ce qui concerne les composés oligomériques. Elles sont actuellement appliquées avec succès à des polypeptides, glycopeptides, oligo-nucléotides et même à des composés antitumoraux phosphorés (en RMN du ³¹P) et devraient être encore étendues dans un avenir proche.



# UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES - LILLE I

Thèse de Doctorat de l'Université de Lille I Spécialité : Biochimie

présentée par Patrick BERTHAULT

sous la direction de M. B. PERLY

Sujet : Application de la Résonance Magnétique Nucléaire à une et deux dimensions à l'étude structurale et conformationnelle des oligosaccharides. Conception et mise au point de nouvelles techniques.

L'étude des oligosaccharides en solution, composés naturels d'importance considérable puisqu'ils interviennent dans tous les processus métaboliques de la vie cellulaire, nécessite une connaissance exacte de leur nature chimique avant la détermination de relations structure-activité.

La Résonance Magnétique Nucléaire à haut champ permet d'obtenir ces informations en n'utilisant que de très faibles quantités d'échantillon, et constitue une méthode d'analyse non destructive autorisant l'observation des molécules dans des conditions représentatives du milieu naturel.

Cependant, la structure complexe des composés rend les spectres classiques difficilement interprétables, et de nouvelles techniques multiimpulsionnelles à une ou deux dimensions ont été développées pour contourner ces problèmes et parvenir à une analyse complète, tant du point de vue structural que conformationnel. Ces approches utilisent essentiellement les transferts d'aimantation dans le champ statique et dans le champ tournant ainsi que les propriétés des transitions à deux quanta. Elles permettent de définir des stratégies d'analyse très efficaces dont l'utilité est générale pour l'étude de composés oligomériques. L'efficacité de ces approches est démontrée sur quelques composés bioactifs isolés à partir de l'héparine.

<u>Mots-clés</u> : RMN, oligosaccharides, méthodologie, structure, conformation, séquences.