



Développement de nouvelles expériences de corrélation en RMN haute-résolution mettant en œuvre un encodage spatial fréquentiel de l'échantillon

Daisy Pitoux

► To cite this version:

Daisy Pitoux. Développement de nouvelles expériences de corrélation en RMN haute-résolution mettant en œuvre un encodage spatial fréquentiel de l'échantillon. Chimie analytique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. <NNT : 2015PA112106>. <tel-01212497>

HAL Id: tel-01212497

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01212497>

Submitted on 6 Oct 2015

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

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



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :
CHIMIE DE PARIS SUD

*Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay
Equipe de Résonance Magnétique Nucléaire en milieu orienté*

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE

par

Daisy PITOUX

Développement de nouvelles expériences de corrélation en RMN haute-résolution
mettant en œuvre un encodage spatial fréquentiel de l'échantillon

Date de soutenance : 22/06/2015

Composition du jury :

Directeurs de thèse :	Denis MERLET Nicolas GIRAUD	Professeur (Université Paris-Sud) Maître de conférences (Université Paris-Sud)
Rapporteurs :	Patrick GIRAudeau Jean-Marc NUZILLARD	Maître de conférences (Université de Nantes) Directeur de recherche (Université de Reims Champagne-Ardenne)
Examineur :	Geoffrey BODENHAUSEN	Professeur (École Normale Supérieure de Paris, École Polytechnique Fédérale de Lausanne)

|Remerciements

Je n'aurais jamais pu accomplir ce travail doctoral sans le soutien de nombreuses personnes. Je profite donc de l'occasion qui m'est donnée ici pour exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude envers les nombreuses personnes qui m'ont permis de progresser dans cette période d'apprentissage.

En premier lieu, je tiens à remercier Denis Merlet et Nicolas Giraud pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral. Leur aide précieuse a été essentielle à l'aboutissement de cette thèse. Merci à eux pour leur disponibilité, leur bienveillance et leur soutien.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à Patrick Giraudeau de l'Université de Nantes et Jean-Marc Nuzillard de l'Université de Reims Champagne-Ardenne pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à l'égard de mon travail en acceptant la fonction de rapporteur. Je remercie également Geoffrey Bodenhausen pour avoir accepté d'être le président de ce jury de thèse.

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe avec lesquels j'ai collaboré au cours de ces trois années, Christie Aroulanda et Jean-Michel Ouvrard qui ont consacré de leur temps pour m'apporter des connaissances nouvelles. Je voudrais dire toute ma reconnaissance à Jonathan Farjon qui m'a apporté une aide inestimable tout au long de mon doctorat, ainsi qu'à Bertrand Plainchont qui a été un réel soutien ces derniers mois.

J'exprime ma gratitude à David Bonnaffé et Zhaoyu Hu de l'équipe de Méthodologie, Synthèse et Molécules Thérapeutiques de l'ICMMO pour m'avoir fourni les échantillons de saccharides, et plus particulièrement David Bonnaffé pour les discussions intéressantes que nous avons eues.

Un grand merci au groupe de cruciverbistes pour les bons moments partagés pendant les pauses-café. Je remercie plus généralement l'ensemble des membres du Laboratoire de Résonance Magnétique et de la plateforme technique pour la très bonne ambiance qui règne au sein de l'équipe. Durant ces trois années, travail a rimé avec plaisir et c'est en grande partie grâce à vous.

Merci à l'ensemble des doctorants et stagiaires que j'ai côtoyé au cours de ces trois années. Une pensée toute particulière pour Camille Samson et Mathieu Cyrille que j'ai eu le plaisir de co-encadrer durant leur stage.

Je remercie l'Agence Nationale de la Recherche qui a financé mon doctorat, ainsi que le projet de recherche sur lequel j'ai travaillé.

Un grand merci à Audrey, Emilie, Lucile, Monique, Maud et Pauline qui sont toujours là même si les moments partagés se sont faits plutôt rares ces dernières années.

Ma reconnaissance va à Laure, Monique et Patrice pour leur soutien affectif et l'intérêt qu'ils ont porté à mon sujet de recherche.

Enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements à ma famille et tout particulièrement mes parents qui m'accompagnent depuis toujours. Tout au long de mon cursus, ils m'ont soutenue, encouragée et ont su me donner les moyens de réussir. Qu'ils trouvent en cette thèse de doctorat l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de ma plus affectueuse reconnaissance.

Enfin, mes derniers mots vont à Florent pour son soutien indéfectible, sa patience et ses nombreux encouragements tout au long de mon doctorat.

|Table des matières

Remerciements	iii
Table des matières	vii
Table des figures	xiii
Notations & Abréviations	xix
Introduction Générale	1
Chapitre 1. Introduction	7
A. Progrès accomplis en RMN haute résolution.....	9
1. Les débuts de la RMN.....	9
2. La RMN 2D et la détermination structurale	12
3. La RMN <i>J</i> -résolue	13
4. La RMN utilisant des impulsions sélectives	19
B. La RMN encodée par gradient	24
1. Principe général.....	24
2. L'encodage spatial temporel	25
3. L'encodage spatial fréquentiel	26
4. Les applications de l'encodage spatial fréquentiel.....	27
C. Plan de thèse.....	31
Chapitre 2. Théorie de l'encodage spatial en fréquence.....	33
A. Simulation d'une expérience RMN encodée en fréquence par gradient	35
B. Reconstitution du spectre encodé spatialement.....	38
1. Simulation d'une unique cohérence du signal du proton H^A	38
2. Simulation du signal du proton H^A	39
3. Simulation du spectre encodé du système ABX	41
C. Dépendance du champ magnétique sur la sensibilité des expériences RMN encodées spatialement en fréquence	43
D. Discussion.....	46
E. Conclusion.....	46
Chapitre 3. Développements Méthodologiques.....	47

A.	L'expérience PCR-COSY	49
1.	Le principe de la PCR-COSY.....	49
2.	L'application.....	53
3.	Discussion.....	56
B.	L'expérience push-G-SERF	58
1.	Le principe de l'expérience push-G-SERF	58
2.	L'application sur une molécule d'étude, le trans-2-hexen-1-al.....	59
3.	Discussion.....	61
Chapitre 4.	Applications pour l'étude d'un oligosaccharide synthétique.....	63
A.	Influence du champ magnétique sur les expériences basées sur un encodage spatial en fréquence	67
1.	Evolutions δ -résolues	67
2.	Evolutions J -éditées.....	76
3.	Discussion.....	80
B.	Etude de la stéréochimie de l'oligosaccharide par RMN encodée.....	81
1.	Principe de l'extraction des valeurs de couplages par l'expérience G-SERF	83
2.	Attribution du spectre proton du trisaccharide.....	86
3.	Discussion.....	86
C.	L'expérience push-G-SERF appliquée au saccharide.....	88
1.	Résultats.....	88
2.	Discussion.....	89
Conclusion & Perspectives		91
Annexes.....		97
A.	Conditions expérimentales.....	99
1.	Spectre PCR-COSY.....	99
2.	Etude du trans-2-hexen-1-al	99
3.	Etude du trisaccharide	101

B.	Données supplémentaires	105
C.	Attribution du trisaccharide synthétique	106
D.	Programmes d'impulsions utilisés.....	111
1.	Programme d'impulsions de la PCR-COSY	111
2.	Programme d'impulsions de la push-G-SERF	113
	Références	117

|Table des figures

Figure 1. a) Séquence d'impulsions d'un bloc écho de spin refocalisant l'aimantation d'un proton. (b) Représentation vectorielle de cet écho de spin.....	13
Figure 2. a) Séquence d'impulsions de l'expérience J -résolue. (b) Spectre J -résolu enregistré sur un échantillon de trans-2-hexen-1-al à 7,05 T.....	18
Figure 3. a) Molécule d'aldéhyde cinnamique. (b) Spectre obtenu par excitation avec une impulsion non-sélective. (c) Spectre obtenu par excitation avec une impulsion sélective.....	20
Figure 4. Séquence d'impulsions de l'expérience SERF.....	21
Figure 5. Séquence d'impulsions de l'expérience SERFph.....	23
Figure 6. Principe de l'encodage spatial en fréquence. a) Molécule de l'aldéhyde cinnamique. (b) Spectre proton encodé. (c) Spectre proton standard.....	27
Figure 7. Séquence d'impulsions de l'expérience δ -résolue grâce à un schéma d'acquisition en temps-réel.....	28
Figure 8. Séquence d'impulsions de l'expérience G-SERFph.....	30
Figure 9. a) La séquence de l'impulsion encodée par gradient utilisée pour la simulation. (b) La structure du système de spin modèle.	35
Figure 10. Représentation de l'aimantation d'une unique cohérence du signal du proton H^A à (a) 14,1T et (b) 23,5 T.	39
Figure 11. Représentation de l'aimantation du signal du proton H^A à (a) 14,1 T et (b) 23,5 T.	40
Figure 12. Spectres 1H standards du système de spin modèle ABX à (a) 14,1 T et (b) 23,5 T et spectres 1H encodés du système de spin modèle ABX à (c) 14,1 T et (d) 23,5 T.....	41
Figure 13. Représentation de l'aimantation du système ABX à (a) 14,1 T et (b) 23,5 T.....	42
Figure 14. Relation entre sensibilité et force du champ magnétique nucléaire.	45
Figure 15. Les différents blocs de la PCR-COSY.....	50
Figure 16. L'expérience PCR-COSY.....	51
Figure 17. Le principe de l'expérience PCR-COSY.	52
Figure 18. a) Structure de $(\pm)(2,2\text{-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl})3\text{-trans-propenoate d'éthyle}$. (b) Spectre 2D PCR-COSY enregistré sur cette molécule.....	53
Figure 19. a) Région extraite du spectre PCR-COSY. (b) Ensemble des couplages impliquant le proton H^1 qui ont été sondés par l'expérience PCR-COSY.	54

Figure 20. Projections de la dimension F_1 du spectre PCR-COSY calculées autour des corrélations entre H^1 et (a) H^2 , (b) H^3 , (c) H^4 et (d) H^5 .	55
Figure 21. Elucidation de la structure fine du multiplet du proton H^1 .	55
Figure 22. La séquence d'impulsions de l'expérience push-G-SERF.	59
Figure 23. a) Structure du trans-2-hexen-1-al. (b) Le spectre G-SERF et c) le spectre push-G-SERF acquis sur le trans-2-hexen-1-al à 9,4 T. En (c), le spectre 1D « pure shift » est représenté au-dessus du spectre 2D.	60
Figure 24. Projections des colonnes calculées à partir des spectres G-SERF (en haut) et push-G-SERF (en bas) enregistrés sur le trans-2-hexan-1-al, pour les protons résonant à (a) 9,50, (b) 6,85 et (c) 2,31 ppm.	61
Figure 25. Structure moléculaire du trisaccharide synthétique et la notation de ses protons selon les différentes sous-unités.	65
Figure 26. Les spectres du proton encodés spatialement par gradient enregistrés à 14,1 T (a) et à 23,5 T (b) sur l'échantillon du trisaccharide. (c) La région du spectre du proton standard enregistré à 23,5 T présentant les plus importantes superpositions de signaux, avec son attribution.	66
Figure 27. La séquence d'impulsions de l'expérience ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY.	68
Figure 28. Région du spectre TOCSY (a) et ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY (b) enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 14, 1 T.	69
Figure 29. Région du spectre TOCSY (a) et ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY (b) enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 14, 1 T.	71
Figure 30. Régions élargies des spectres TOCSY (a) et ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY (b) enregistrés à 14,1 T.	73
Figure 31. Régions élargies des spectres TOCSY (a) et ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY (b) enregistrés à 23,5 T.	75
Figure 32. Spectres G-SERF enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 14,1 T (a et b) et à 23,5 T (c et d).	77
Figure 33. Le détail de la structure fine du multiplet du proton H_b qui peut être déduit des mesures de couplages réalisées sur les données G-SERF (Figure 32).	78

Figure 34. Régions des spectres G-SERF enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 14,1 T (a) et à 23,5 T (b).	79
Figure 35. a) Le spectre COSY enregistré sur le trisaccharide à 23,5 T. (b) L'agrandissement de la zone autour de la diagonale entre 3,2 et 3,7 ppm et chemins d'attribution.	82
Figure 36. a) Régions du spectre G-SERF enregistré sur le trisaccharide à 23,5 T.	83
Figure 37. Agrandissement des régions d'intérêt issues des spectres G-SERF enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 23,5 T.	84
Figure 38. Extractions des multiplets observés sur les expériences G-SERF	85
Figure 39. Ensemble des couplages dont les valeurs ont été extraites des différents spectres..	87
Figure 40. a) Structure du trisaccharide. (b) Le spectre G-SERF et (c) le spectre push-G-SERF enregistré sur le trisaccharide à 23,5 T.....	89

|Notations & Abréviations

1D	1 Dimension
2D	2 Dimensions
β	Angle de basculement
B_0	Champ magnétique statique
B_1	Champ radiofréquence
BIRD	Bilinear Rotation Decoupling
$CDCl_3$	Chloroforme deutéré
COSY	COrelation SpectroscopY
δ	Déplacement chimique
D	Couplage dipolaire
DMSO- d_6	Diméthylsulfoxyde deutéré
EBurp	Excitation Band selective Uniform Response Pure phase
ϕ	Phase de détection ou d'impulsion
FID	Free Induction Decay (décroissance libre de l'induction)
γ	Rapport gyromagnétique
$G_{x,y \text{ ou } z}$	Gradient selon x, y ou z
GAG	GlycosAminoGlycanes
G-SERF	homonuclear Gradient SElective ReFocusing experiment
H	Hamiltonien
1H	Proton
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
I	Intégration
Impulsion flip-back	Impulsion de basculement-retour
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire

J	Couplage scalaire
K	Kelvin
MAS	Magic Angle Spinning ou rotation à l'angle magique
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
p_1	Durée de l'impulsion
PCR-COSY	Passive Coupling Refocusing - COrrrelation SpectroscopY
PFM	Pulsed Field Gradient
ppm	Partie Par Million
PSYCHE	Pure Shift Yielded by CHirp Excitation
push-G-SERF	PURE Shift Gradient-encoded homonuclear SElective ReFocusing
QSEQ	Quadrature Sequential Mode
ρ	Opérateur densité
ReBurp	REfocalisation Band selective Uniform Response Pure phase
rf	RadioFréquence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
S/B	Rapport Signal sur Bruit
SERF	homonuclear SElective ReFocusing experiment
SW_{exc}	Fenêtre spectrale d'excitation
T	Tesla
t_1	Délai d'évolution indirecte
t_2	Délai d'évolution directe ou d'acquisition
TOCSY	TOTAL Correlation SpectroscopY
TPPI	Time-Proportional Phase Incrementation
ν	Fréquence de résonance
ZS (Méthode de)	Zangger et Sterk (Méthode de)

| Introduction Générale

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une technique d'analyse qui a de nombreuses applications en chimie, biologie ou médecine. En plus d'un demi-siècle d'existence, la spectroscopie basée sur ce phénomène physique est devenue une méthode d'investigation unique pour l'étude des molécules les plus variées, qu'elles soient dissoutes dans un liquide, une phase cristal-liquide ou un solide. Pour les chimistes, la RMN est avant tout une source d'informations inestimable couramment utilisée pour déterminer la structure moléculaire des composés organiques ou inorganiques. Cependant, la complexité des spectres RMN pouvant être obtenus expérimentalement limite l'étude des molécules les plus complexes. Le développement de champs magnétiques de plus en plus intenses et de spectromètres de plus en plus sophistiqués apportent une solution efficace à ce problème. Mais malgré tout, l'approche du développement instrumental a ses limites et de nombreux échantillons restent encore difficiles à analyser.

Afin d'étudier des molécules de complexité croissante, de nombreux développements méthodologiques ont vu le jour. Tout d'abord, l'avènement de la RMN multidimensionnelle qui a rendu visibles les informations de corrélations entre les spins, tout en améliorant la dispersion des pics.¹ Puis, le développement de séquences d'impulsions multidimensionnelles de plus en plus perfectionnées qui a notamment permis de séparer les évolutions des déplacements chimiques et des couplages.² Parmi elles, l'expérience *J*-résolue³ est à l'origine de spectres donnant accès à une mesure précise et simplifiée des valeurs de couplages scalaires. Néanmoins, la superposition ou la juxtaposition des signaux *J*-résolus, ainsi que l'abondance des données à analyser, peut rendre l'étude longue et difficile pour les molécules les plus complexes.

Une des possibilités pour répondre à ce problème est de limiter le nombre de corrélations contribuant au spectre en substituant les impulsions non-sélectives de l'expérience *J*-résolue par des impulsions sélectives.⁴ De cette idée est issue l'expérience SERF (SElective ReFocusing experiment)⁵ où seul le couplage entre les spins des protons sélectionnés évolue grâce à une

¹ J. Jeener, in *International Ampere Summer School*, Basko Polje, Yugoslavia, **1971**. ; W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.

² M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 373-378.

³ W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst, *The Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*, 4226-4227.

⁴ R. Freeman, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1397-1412. ; H. Geen, R. Freeman, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1991**, *95*, 93-141.

⁵ T. Facke, S. Berger, *J. Magn. Reson.* **1995**, *115*, 114-116. ; J. M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.* **2007**, *187*, 193-198.

refocalisation sélective des autres évolutions de couplages. Le spectre ainsi obtenu est composé de multiplets permettant la mesure précise de la valeur de couplages entre les spins sélectionnés. Cependant, le nombre d'expériences nécessaires afin d'accéder à l'ensemble des informations de couplage d'une molécule est non négligeable et donc nécessite un temps expérimental conséquent. Toutefois, l'utilisation de gradients d'encodage spatial en fréquence permet de manipuler sélectivement les différentes cohérences de spin dans des régions localisées de l'échantillon et donc d'acquérir simultanément plusieurs expériences sélectives. L'expérience G-SERF (Gradient SElective ReFocusing experiment) ⁶ a ainsi montré qu'il était possible de réaliser une série d'échos de spin sélectifs localisés différemment dans l'espace. Le spectre ainsi obtenu regroupe l'ensemble des informations de couplages scalaires impliquant un ou plusieurs spins sélectionnés.

Dans les expériences SERF et G-SERF, les couplages scalaires évoluent pendant que les évolutions des déplacements chimiques sont refocalisées, mais l'inverse est tout aussi possible. Ainsi, Zangger et Sterk ⁷ ont montré que l'évolution du déplacement chimique pur de chaque proton d'une molécule pouvait être encodée dans une série de coupes distinctes de l'échantillon RMN. Ce principe a été repris par Morris et ses collaborateurs qui ont présenté une méthode de découplage homonucléaire dans la dimension directe à partir d'un traitement spécifique des données. ⁸ Mais récemment, les avancées apportées aux logiciels d'acquisition des données RMN ont permis l'insertion de séquences de découplage encodées pendant l'acquisition, permettant d'obtenir le découplage homonucléaire en temps réel dans la dimension directe. ⁹ Ce principe a aussi bien été adapté à des expériences à une dimension qu'à des expériences multidimensionnelles

⁶ N. Giraud, L. Beguin, J. Courtieu, D. Merlet, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3481-3484. ; D. Merlet, L. Beguin, J. Courtieu, N. Giraud, *J. Magn. Reson.* **2011**, *209*, 315-322.

⁷ K. Zangger, H. Sterk, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 486-489.

⁸ J. A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3901-3903. ; G. A. Morris, J. A. Aguilar, R. Evans, S. Haiber, M. Nilsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12770-12772. ; J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 9716-9717. ; J. A. Aguilar, A. A. Colbourne, J. Cassani, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 6460-6463. ; M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 6990-6992. ; M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11867-11869.

⁹ N. H. Meyer, K. Zangger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 7143-7146. ; L. Castanar, P. Nolis, A. Virgili, T. Parella, *Chemistry* **2013**, *19*, 17283-17286.

afin d'améliorer la dispersion des signaux¹⁰ ou pour réintroduire sélectivement des informations de couplages dans la dimension directe.¹¹

Cette thèse s'inscrit dans l'idée d'utiliser l'encodage spatial en fréquence pour développer de nouvelles expériences RMN de corrélations. Elle se divise en quatre chapitres.

Le premier chapitre de ce manuscrit introduit le contexte scientifique général avec une attention toute particulière pour la RMN J -résolue. Dans un deuxième temps, il présente le principe de la résonance magnétique nucléaire encodée par gradient à travers la description de l'encodage spatial temporel et l'encodage spatial fréquentiel.

Le deuxième chapitre présente une étude théorique de l'encodage spatial en fréquence. Premièrement, le formalisme utilisé pour prédire les spectres RMN résultant d'une excitation encodée en fréquence par gradient est présenté. Puis, le signal issu d'une impulsion encodée est simulé à l'aide du formalisme présenté précédemment. Pour finir, la dépendance du champ magnétique sur la sensibilité de ces expériences est théoriquement étudiée.

Le troisième chapitre présente deux nouvelles expériences de corrélation développées pendant mon doctorat. Tout d'abord, l'expérience PCR-COSY (Passive Coupling Refocusing - COrrrelation SpectroscopY) dans laquelle le principe d'encodage spatial est étendu à une deuxième dimension de l'espace afin d'obtenir en un seul spectre l'ensemble des informations de couplages scalaires de manière résolue pour une molécule. Puis, l'expérience push-G-SERF (pure shift Gradient encoded homonuclear SElective ReFocusing spectroscopy) qui combine la manipulation sélective des évolutions J -résolues dans des régions localisées de l'échantillon pendant la dimension indirecte et le découplage homonucléaire en temps réel pendant l'acquisition.

Le quatrième chapitre est consacré à l'étude d'un système moléculaire complexe : le maltotriose. Ce saccharide est un intermédiaire de synthèse composé de trois unités saccharidiques à l'origine de spectres RMN présentant d'importants recouvrements de signaux et pour lesquels l'extraction des couplages homonucléaires est un réel défi. Nous verrons que l'utilisation de la RMN encodée pour étudier ce trisaccharide a permis d'accéder à ses valeurs de couplages et ainsi de confirmer sa structure moléculaire.

¹⁰ N. H. Meyer, K. Zangger, *Chem Commun (Camb)* **2014**, 56, 1488-1490.

¹¹ N. Gubensak, W. M. Fabian, K. Zangger, *Chem Commun (Camb)* **2014**, 56, 12254-12257. ; N. Lokesh, S. R. Chaudhari, N. Suryaprakash, *Chem Commun (Camb)* **2014**, 56, 15597-15600.

|Chapitre 1. Introduction

A. Progrès accomplis en RMN haute résolution

1. Les débuts de la RMN

Rabi observe pour la première fois le phénomène de résonance magnétique nucléaire en 1938 grâce à ses études sur les jets atomiques et il reçoit le Prix Nobel de physique en 1944 pour cette découverte fondatrice. Quelques mois plus tard, en 1945, le phénomène de résonance magnétique nucléaire est mesuré sur des échantillons de matière condensée par deux équipes américaines. La découverte est faite simultanément par deux approches différentes. D'une part, par l'équipe de Purcell, Torrey et Pound à l'université d'Harvard,¹² via une approche spectroscopique montrant l'absorption d'énergie due à la transition entre les niveaux d'énergie Zeeman. Et d'autre part, par l'équipe de Bloch, Hansen et Packard à l'université de Stanford¹³ à travers une approche magnétique démontrant l'existence d'une induction magnétique nucléaire. Bloch et Purcell reçoivent le prix Nobel de physique en 1952 grâce à ces travaux.

Intéressant essentiellement les physiciens à ses débuts, la découverte de deux notions fondamentales fait entrer la RMN dans le domaine de la physico-chimie : les concepts de déplacement chimique et de couplage. En 1950, deux équipes indépendantes découvrent le phénomène de déplacement chimique, celle de Dickinson¹⁴ et celle de Proctor et Yu.¹⁵ Ils remarquent que l'aimantation macroscopique précesse autour de B_0 à la fréquence de résonance (fréquence de Larmor) lorsque le système est placé dans un champ magnétique intense (B_0) puis excité et que cette fréquence de résonance dépend à la fois de la fréquence du champ magnétique et de l'environnement chimique des noyaux étudiés. Cela établit que l'environnement chimique d'un proton, et donc la structure d'une molécule, est déterminable en étudiant la fréquence de résonance des noyaux. Quelques mois plus tard, en 1951, les deux équipes distinctes d'Hahn et Maxwell¹⁶ et de Gutowsky et McCall¹⁷ découvrent les couplages scalaires. Ils annoncent que les

¹² E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Physical Review* **1946**, *69*, 37-38.

¹³ F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Physical Review* **1946**, *69*, 127-127. ; F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Physical Review* **1946**, *70*, 474-485.

¹⁴ W. C. Dickinson, *Physical Review* **1950**, *77*, 736-737.

¹⁵ W. G. Proctor, F. C. Yu, *Physical Review* **1950**, *77*, 717-717.

¹⁶ E. L. Hahn, D. E. Maxwell, *Physical Review* **1951**, *84*, 1246-1247.

¹⁷ H. S. Gutowsky, D. W. McCall, *Physical Review* **1951**, *82*, 748-749.

spins nucléaires des différents noyaux d'une molécule interfèrent entre eux, ce qui engendre des structures fines sur les spectres interprétables en termes structuraux. Véritables sondes de la structure des molécules, le déplacement chimique et le couplage sont de nos jours à la base de l'analyse structurale par la RMN.

A cette époque, un spectromètre haute-résolution est encombrant, difficile à utiliser et très onéreux pour un laboratoire de chimie. Afin de populariser l'utilisation de la RMN, Varian commercialise en 1961 le premier spectromètre destiné aux chimistes organiciens : le spectromètre à électroaimants A60.¹⁸ Cependant, le champ magnétique maximal d'un électro-aimant est d'environ 100 MHz alors qu'il est encore nécessaire d'augmenter le champ magnétique pour améliorer la dispersion des signaux et la sensibilité des expériences. Pour répondre à cette nécessité, Weaver développe un nouveau modèle d'aimant : l'aimant supraconducteur à la température de l'hélium liquide. Ainsi en 1964, Varian commercialise le premier spectromètre à aimant supraconducteur fournissant un champ à 220 MHz. Ces spectromètres RMN sont à « ondes continues », c'est-à-dire que la fréquence de l'onde électromagnétique d'excitation reste constante alors que la valeur du champ magnétique est progressivement balayée. La durée des expériences est relativement longue et la technique est peu sensible. En 1963, Anderson explore un nouveau concept en développant un spectromètre à multiples canaux dans le but de sommer plusieurs acquisitions et ainsi améliorer la sensibilité. Ce projet fut abandonné en faveur du concept basé sur la transformée de Fourier.

La « RMN impulsionnelle » fut présentée trois ans plus tard par Anderson et Ernst.¹⁹ Son principe repose sur l'interaction des noyaux avec un champ radiofréquence (r_f) puissant et de courte durée, appelé impulsion (B_1). Lorsque la fréquence du champ B_1 coïncide avec la fréquence de résonance des noyaux, les spins de ces noyaux sont excités. Lorsque B_1 redevient nul et que seul subsiste le champ principal, l'aimantation macroscopique effectue des mouvements de rotation à la fréquence de Larmor auxquels s'ajoute l'effet de la relaxation. Le flux magnétique engendré par la précession de l'aimantation est détecté par la bobine de détection placée dans le plan perpendiculaire à B_0 , ce qui induit un signal électrique de fréquence ν_0 et l'amplitude proportionnelle à l'aimantation macroscopique. Ce signal est alors converti en spectre

¹⁸ National Historic Chemical Landmark at Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California.

¹⁹ R. R. Ernst, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93.

interprétable par une transformée de Fourier. L'avantage majeur de la RMN impulsionnelle est de permettre l'étude d'une large gamme de fréquences en un minimum de temps. Bien que le brevet fût détenu par Varian, Bruker fut le premier à développer un spectromètre uniquement dédié à la RMN par transformée de Fourier en 1972.

La RMN par transformée de Fourier a révolutionné les méthodes analytiques dans les laboratoires pour l'étude de petites molécules. Cependant, la résolution des expériences s'est avérée être un problème limitant pour étudier les molécules les plus complexes, notamment dans le cas des spectres du proton qui combinent une gamme de déplacements chimiques restreinte et des éclatements de raies importants dus aux couplages scalaires proton-protons. En 1973, Jeener présente le concept de la RMN multidimensionnelle par la méthode de la double transformée de Fourier au cours d'une école d'été en Yougoslavie.²⁰ Son idée est de répartir le signal RMN dans plusieurs dimensions et de faire apparaître les corrélations entre les spins, l'expérience COSY (COrelation SpectroscopY) est née. Le concept est repris et développé par Ernst et ses collaborateurs en 1976, ce qui a conduit à la publication d'un article marquant la naissance de la spectroscopie RMN à deux dimensions.²¹ Ernst a été récompensé par le prix Nobel de chimie en 1991 pour l'ensemble de ses travaux qui ont permis le développement de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire.

Cette avancée majeure a marqué le début du développement de spectromètres commerciaux de plus en plus élaborés, de champs magnétiques de plus en plus élevés et d'ordinateurs de plus en plus puissants. Cela a notamment permis d'étendre l'utilisation de la RMN à l'étude des macromolécules telles que les protéines et de repousser les limites liées à la taille des molécules grâce au développement de séquences d'impulsions de plus en plus perfectionnées. Aujourd'hui, la RMN permet non seulement de déterminer la structure tridimensionnelle de protéines, mais également d'étudier leur dynamique interne et leur stabilité conformationnelle. Les travaux de Wüthrich dans ce domaine²² ont été salués par le prix Nobel de chimie en 2002. En chimie des

²⁰ J. Jeener, in *International Ampere Summer School*, Basko Polje, Yugoslavia, **1971**.

²¹ W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.

²² T. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 281-294. ; Y. Q. Qian, M. Billeter, G. Otting, M. Muller, W. J. Gehring, K. Wuthrich, *Cell* **1989**, *55*, 573-580. ; R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wuthrich, *Nature* **1996**, *382*, 180-182. ; K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 12366-12371.

solides, le développement de la spectroscopie de haute résolution par la méthode MAS (Magic Angle Spinning ou rotation à l'angle magique) a fait entrer la RMN dans le domaine de la caractérisation des solides.²³ La liste des utilisations de la résonance magnétique est loin d'être exhaustive. Dans ce qui suit, nous allons tout particulièrement nous intéresser à la RMN utilisée à des fins structurales.

2. La RMN 2D et la détermination structurale

La spectroscopie RMN est une méthode analytique de choix pour étudier la structure des molécules organiques, biologiques ou inorganiques, notamment la RMN bidimensionnelle. Les premières expériences 2D mettent en jeu l'évolution des déplacements chimiques (δ) et des couplages scalaires (J) ou dipolaires (D) qu'ils soient homonucléaires ou hétéronucléaires. Parmi les expériences homonucléaires, on retrouve les expériences COSY²⁴ (CORrelation SpecroscopY) utilisées pour obtenir des informations de corrélations scalaires et les expériences NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)²⁵ pour accéder aux informations de corrélations dipolaires. Parmi les expériences permettant d'étudier les corrélations entre des spins de natures différentes (^1H - ^{13}C , ^1H - ^{15}N , ...), les expériences les plus communes sont l'expérience HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)²⁶ et l'expérience HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation).²⁷ Au cours du temps, ces expériences ont donné lieu à différentes versions qui sortent du cadre de ce travail.

Il est cependant important de noter que la mesure précise des couplages scalaires ^1H - ^1H est très importante dans le processus de détermination structurale.²⁸ En effet, le couplage scalaire est une interaction entre plusieurs spins à travers les liaisons chimiques. Les valeurs de couplages scalaires et leur signe renseignent sur la structure et la conformation des liaisons reliant les deux spins couplés. Ils apportent donc des informations sur la structure locale de la molécule et

²³ E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659-1659. ; I. J. Lowe, *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285-287.

²⁴ W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.

²⁵ A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1-6.

²⁶ G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185-189.

²⁷ A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-2094.

²⁸ M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34*, 1671-1695.

notamment sa conformation, via la loi de Karplus.²⁹ Cependant, la mesure des couplages scalaires peut s'avérer difficile pour des signaux complexes où plusieurs couplages entrent en jeu ou lorsque les spectres présentent d'importantes superpositions de signaux. Dans ces cas, il devient utile de simplifier le signal en manipulant sélectivement les évolutions de déplacements chimiques et de couplages. L'une des expériences RMN permettant de séparer ces interactions de spin est la séquence d'impulsions *J*-résolue.

3. La RMN *J*-résolue

3.1 L'écho de spin

En 1950, Hahn décrit pour la première fois le principe d'écho de spin et développe une théorie permettant de décrire la relaxation dans les liquides.³⁰ La séquence d'impulsions permettant de générer un écho de spin est présentée en **Figure 1. a** et sera dans un premier temps décrite en utilisant la méthode de représentation vectorielle (**Figure 1. b**).

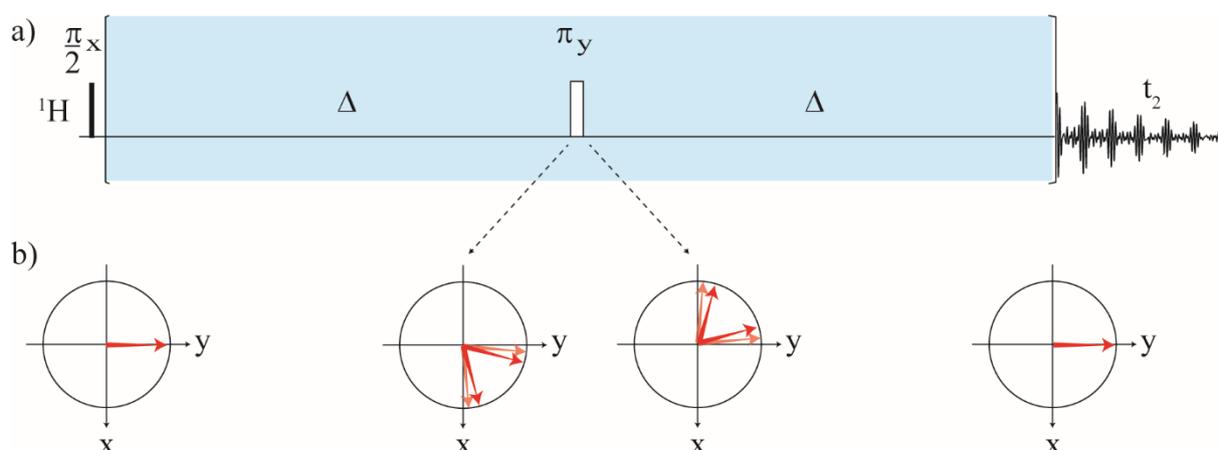


Figure 1. a) Séquence d'impulsions d'un bloc écho de spin refocalisant l'aimantation d'un proton. Les rectangles noir et blanc représentent, respectivement, une impulsion d'excitation de 90° et une impulsion de refocalisation. **(b)** Représentation vectorielle de cet écho de spin. Les flèches rouges représentent l'aimantation qui se déphase pendant le premier délai Δ , puis se rephase après l'impulsion de 180° , durant le second délai Δ .

²⁹ M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15. ; M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.

³⁰ E. L. Hahn, *Physical Review* **1950**, *86*, 580-594.

Dans cette expérience, une impulsion radiofréquence bascule l'aimantation de 90° dans le plan transverse au champ magnétique B_0 . Durant le délai Δ , l'aimantation évolue sous l'effet de la relaxation de spin et des inhomogénéités. Alors que la relaxation mène à une perte d'aimantation irréversible, le déphasage lié aux inhomogénéités est refocalisé par une impulsion de refocalisation qui inverse les vecteurs d'aimantation par rapport à l'axe de l'impulsion.³¹ L'acquisition de l'expérience avec différentes durées Δ permet de mesurer la relaxation T_2 en s'affranchissant des effets d'inhomogénéités à l'origine du temps de relaxation T_2^* .

De nos jours, ce bloc d'écho de spin est à la base de nombreuses séquences d'impulsions plus sophistiquées où il peut être utilisé pour refocaliser les inhomogénéités, mais également pour refocaliser les évolutions de déplacements chimiques ou de couplages. La représentation vectorielle ne permettant pas de décrire précisément les évolutions de spin au cours de la séquence d'impulsion en présence de couplages scalaires, le formalisme des opérateurs produit sera utilisé par la suite pour décrire les expériences.

3.2 Echo de spin pour un système d'un spin

Dans un premier temps, considérons un système d'un seul spin $\frac{1}{2}$. L'opérateur densité de ce spin est noté \hat{I} . La séquence appliquée à ce système est présentée **Figure 1. a**.

- A l'état initial, l'opérateur densité est proportionnel \hat{I}_z . Après une impulsion non-sélective sur l'axe x d'angle d'impulsion α , le système est décrit par :

$$\hat{I}_z \xrightarrow{\frac{\pi}{2} \hat{I}_x} \hat{I}_y$$

- Pendant le délai Δ , le système effectue un mouvement de précession libre selon l'Hamiltonien $\hat{H} = 2\pi\nu_I \Delta \hat{I}_z$, où ν_I est la fréquence de résonance du noyau I.

$$\hat{I}_y \xrightarrow{2\pi\nu_I \Delta \hat{I}_z} \cos(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_y + \sin(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_x$$

- L'impulsion π selon l'axe y agit sur le terme $\sin(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_x$:

$$\begin{aligned} \cos(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_y + \sin(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_x &\xrightarrow{\pi \hat{I}_y} \cos(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_y + \sin(2\pi\nu_I \Delta) [\cos \pi \hat{I}_x + \sin \pi \hat{I}_z] \\ &\Leftrightarrow \cos(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_y + \sin(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_x \xrightarrow{\pi \hat{I}_y} \cos(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_y - \sin(2\pi\nu_I \Delta) \hat{I}_x \end{aligned}$$

³¹ M. H. Levitt, R. Freeman, *Journal of Magnetic Resonance* (1969) **1979**, 35, 473-476.

- Pendant le deuxième délai Δ , $\cos(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y$ devient :

$$\cos(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y \xrightarrow{2\pi\nu_I\Delta\hat{I}_z} \cos(2\pi\nu_I\Delta)\cos(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y + \cos(2\pi\nu_I\Delta)\sin(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_x$$

et $-\sin(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_x$ devient :

$$-\sin(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_x \xrightarrow{2\pi\nu_I\Delta\hat{I}_z} -\cos(2\pi\nu_I\Delta)\sin(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_x + \sin(2\pi\nu_I\Delta)\sin(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y$$

- A la fin de l'écho de spin, l'état du système est décrit par :

$$\begin{aligned} \cos(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y - \sin(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_x &= \cos(2\pi\nu_I\Delta)\cos(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y + \sin(2\pi\nu_I\Delta)\sin(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y \\ &= \cos^2(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y + \sin^2(2\pi\nu_I\Delta)\hat{I}_y \end{aligned}$$

Soit :

$$S_I(t_1) \propto \hat{I}_y \quad (1.1)$$

Dans le cas d'un système de spin composé d'un unique spin $\frac{1}{2}$, la séquence d'écho de spin permet donc de refocaliser l'évolution du déplacement chimique du spin étudié. Dans cet exemple, le spin étant seul, il n'est impliqué dans aucun couplage scalaire. Cependant, la séquence d'écho de spin agit également sur l'évolution des couplages scalaires et cette action diffère en fonction du type de systèmes étudiés. L'évolution des couplages au cours de l'écho de spin va être décrite dans un premier temps pour un système de spins couplés hétéronucléaires, puis dans un second temps pour un système de spins homonucléaires.

3.3 Echo de spin pour un système de deux spins couplés hétéronucléaires

Considérons maintenant un système de deux spins $\frac{1}{2}$ couplés entre eux et de nature différente, I et S. L'opérateur densité du spin I sera noté \hat{I} et celui du spin S sera noté \hat{S} . Les deux spins sont hétéronucléaires et les impulsions ne sont appliquées qu'au noyau I. La séquence appliquée à ce système est présentée **Figure 1. a**. L'évolution du déplacement chimique au cours de l'écho de spin ayant été étudiée dans le paragraphe précédent, elle sera omise dans ces calculs.

- Après l'impulsion d'excitation selon x, l'aimantation évolue sous l'effet du couplage scalaire J pendant le délai Δ :

$$\hat{I}_y \xrightarrow{\pi J_{IS}\Delta 2\hat{I}_z\hat{S}_z} \cos(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}\Delta) 2\hat{I}_x\hat{S}_z$$

- L'impulsion de refocalisation étant à la fréquence du noyau I, seul le terme $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ est affecté :

$$\cos(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}\Delta) 2\hat{I}_x\hat{S}_z \xrightarrow{\pi\hat{I}_y} \cos(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y - \sin(\pi J_{IS}\Delta) 2\hat{I}_x\hat{S}_z$$

- A la fin du second délai Δ :

$$\cos(\pi J_{IS}\Delta) \hat{I}_y \xrightarrow{\pi J_{IS}\Delta 2\hat{I}_z \hat{S}_z} \cos(\pi J_{IS}\Delta) \cos(\pi J_{IS}\Delta) \hat{I}_y + \cos(\pi J_{IS}\Delta) \sin(\pi J_{IS}\Delta) 2\hat{I}_x \hat{S}_z$$

et :

$$- \sin(\pi J_{IS}\Delta) 2\hat{I}_x \hat{S}_z \xrightarrow{\pi J_{IS}\Delta 2\hat{I}_z \hat{S}_z} - \cos(\pi J_{IS}\Delta) \sin(\pi J_{IS}\Delta) 2\hat{I}_x \hat{S}_z + \sin(\pi J_{IS}\Delta) \sin(\pi J_{IS}\Delta) \hat{I}_y$$

soit :

$$\begin{aligned} & \cos(\pi J_{IS}\Delta) \hat{I}_y - \sin(\pi J_{IS}\Delta) 2\hat{I}_x \hat{S}_z \xrightarrow{\pi J_{IS}\Delta 2\hat{I}_z \hat{S}_z} \\ & [\cos(\pi J_{IS}\Delta) \cos(\pi J_{IS}\Delta) + \sin(\pi J_{IS}\Delta) \sin(\pi J_{IS}\Delta)] \hat{I}_y \\ & + [\cos(\pi J_{IS}\Delta) \sin(\pi J_{IS}\Delta) - \cos(\pi J_{IS}\Delta) \sin(\pi J_{IS}\Delta)] 2\hat{I}_x \hat{S}_z \\ & = [\cos(\pi J_{IS}\Delta) \cos(\pi J_{IS}\Delta) + \sin(\pi J_{IS}\Delta) \sin(\pi J_{IS}\Delta)] \hat{I}_y \end{aligned}$$

A la fin de l'écho de spin, l'état du système est donc décrit par :

$$S_I(t_1) \propto \hat{I}_y \quad (1. 2)$$

Dans le cas d'un système de deux spins $\frac{1}{2}$ couplés et de natures différentes, la séquence d'écho de spin refocalise donc l'évolution des déplacements chimiques (Paragraphe 3.2) et l'évolution des couplages scalaires.

3.4 Echo de spin pour un système de deux spins $\frac{1}{2}$ couplés homonucléaires

Pour finir, considérons un système de deux spins $\frac{1}{2}$ couplés entre eux et de même nature, I et S. Les deux spins sont homonucléaires donc les impulsions sont appliquées indifféremment aux deux spins. La séquence appliquée à ce système est présentée **Figure 1. a**. A noter que dans la partie 3.1, il a été démontré que le déplacement chimique est refocalisé par une telle séquence, son évolution sera donc omise par la suite. De plus, l'opérateur densité du spin I sera noté \hat{I} et celui du spin S sera noté \hat{S} . Dans cet exemple, seul le signal du spin I est étudié.

- Après l'impulsion d'excitation selon x, l'aimantation évolue sous l'effet du couplage scalaire pendant le délai Δ :

$$\hat{I}_y \xrightarrow{\pi J_{IS}\Delta 2\hat{I}_z \hat{S}_z} \cos(\pi J_{IS}\Delta) \hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}\Delta) 2\hat{I}_x \hat{S}_z$$

- L'impulsion de refocalisation selon l'axe y agit doublement sur le terme $2\hat{I}_x \hat{S}_z$, mais pas avec le terme \hat{I}_y :

$$\cos(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}\Delta)2\hat{I}_x\hat{S}_z \xrightarrow{\pi\hat{I}_y+\pi\hat{S}_y} \cos(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}\Delta)2\hat{I}_x\hat{S}_z$$

- A la fin du second délai Δ :

$$\cos(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y \xrightarrow{\pi J_{IS}\Delta 2\hat{I}_z\hat{S}_z} \cos(\pi J_{IS}\Delta)\cos(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y + \cos(\pi J_{IS}\Delta)\sin(\pi J_{IS}\Delta)2\hat{I}_x\hat{S}_z$$

et :

$$\sin(\pi J_{IS}\Delta)2\hat{I}_x\hat{S}_z \xrightarrow{\pi J_{IS}\Delta 2\hat{I}_z\hat{S}_z} \cos(\pi J_{IS}\Delta)\sin(\pi J_{IS}\Delta)2\hat{I}_x\hat{S}_z - \sin(\pi J_{IS}\Delta)\sin(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y$$

soit :

$$\begin{aligned} & \cos(\pi J_{IS}\Delta)\hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}\Delta)2\hat{I}_x\hat{S}_z \xrightarrow{\pi J_{IS}\Delta 2\hat{I}_z\hat{S}_z} \\ & [\cos(\pi J_{IS}\Delta)\cos(\pi J_{IS}\Delta) - \sin(\pi J_{IS}\Delta)\sin(\pi J_{IS}\Delta)]\hat{I}_y \\ & + [\cos(\pi J_{IS}\Delta)\sin(\pi J_{IS}\Delta) + \cos(\pi J_{IS}\Delta)\sin(\pi J_{IS}\Delta)]2\hat{I}_x\hat{S}_z \end{aligned}$$

avec

$$\cos(\pi J_{IS}2\Delta)\hat{I}_y + [\cos(\pi J_{IS}\Delta)\sin(\pi J_{IS}\Delta) + \cos(\pi J_{IS}\Delta)\sin(\pi J_{IS}\Delta)]2\hat{I}_x\hat{S}_z$$

A la fin de l'écho de spin, l'état du système est décrit par :

$$S_I(t_1) \propto \cos(\pi J_{IS}2\Delta)\hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}2\Delta)2\hat{I}_x\hat{S}_z \quad (1.3)$$

Dans le cas d'un système de deux spins $\frac{1}{2}$ couplés homonucléaires, la séquence écho de spin refocalise donc l'évolution des déplacements chimiques (Paragraphe 3.2), mais laisse évoluer les couplages scalaires entre les deux spins I et S pendant le délai 2Δ .

3.5 Les spectres J -résolus

A partir de cette séquence d'écho de spin, la séquence 2D J -résolue a été développée et proposée en 1976 par Aue et ses collaborateurs.³² (**Figure 2. a**) Elle permet de répartir les informations de déplacement chimique et de constante de couplage dans deux dimensions différentes. Pendant le délai t_1 de cette expérience, les couplages homonucléaires évoluent alors que les déplacements chimiques sont refocalisés. (Equation (1. 3)) Pendant l'acquisition (t_2), les spins évoluent librement sous l'effet des couplages et des déplacements chimiques qui correspond à l'Hamiltonien $\hat{H} = 2\pi\nu_I\hat{I}_z + 2\pi\nu_S\hat{I}_z + \pi J_{IS}2\hat{I}_z\hat{S}_z$:

$$S(t_1, t_2) \propto e^{i\pi J_{IS}\cdot t_1} \cdot e^{-i(2\pi\nu_I + \pi J_{IS})\cdot t_2} + e^{-i\pi J_{IS}\cdot t_1} \cdot e^{-i(2\pi\nu_I - \pi J_{IS})\cdot t_2} \quad (1.4)$$

³² W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst, *The Journal of Chemical Physics* **1976**, 64, 4226-4227.

Le spectre 2D J -résolue présente dans la dimension directe les informations de déplacements chimiques et de couplages et dans la dimension indirecte les informations de couplages avec une résolution optimisée grâce à la refocalisation des inhomogénéités. (**Figure 2. b**) Cette expérience est principalement utilisée pour mesurer précisément les constantes de couplages à partir des multiplets de la dimension indirecte. Elle a également été la première méthode développée pour obtenir indirectement un spectre RMN du proton totalement découplé en utilisant la projection de spectres J -résolus.

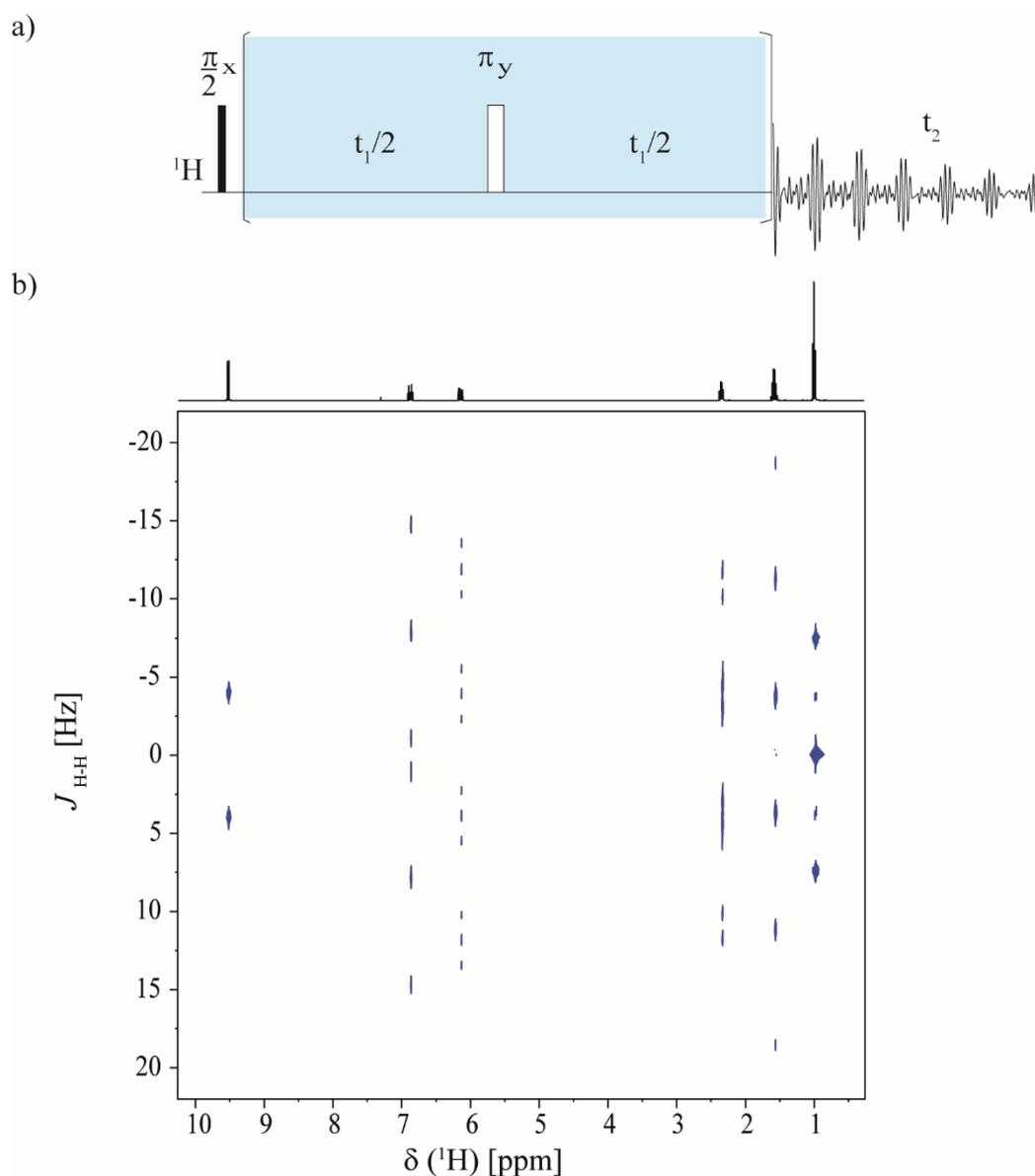


Figure 2. a) Séquence d'impulsions de l'expérience J -résolue. Les rectangles noir et blanc représentent, respectivement, une impulsion d'excitation de 90° et une impulsion de refocalisation. (**b**) Spectre J -résolu enregistré sur un échantillon de trans-2-hexen-1-al à 7,05 T.

Les échos de spins, y compris l'expérience *J*-résolue illustrent en quoi les informations de déplacements chimiques et de couplages peuvent être séparées, permettant une attribution des protons plus rapide et une mesure des couplages scalaires simplifiée.³³ Cependant dans le cas de grandes molécules, la superposition ou la juxtaposition des signaux, ainsi que le nombre important de valeurs de couplages peut rendre l'analyse des données ardue. Sachant que le nombre de corrélations dépend surtout du type de champ radiofréquence utilisé pour manipuler l'aimantation nucléaire et ce quel que soit les détails de la séquence d'impulsion,³⁴ une deuxième catégorie de séquences d'impulsions a été explorée par le passé. Les impulsions courtes qui affectent tous les protons d'une large gamme de fréquence et qui génèrent donc de nombreux signaux sont remplacées par des impulsions sélectives permettant de manipuler les cohérences impliquant un nombre de spins restreint et ainsi réduire le nombre de corrélations contribuant au spectre.³⁵

4. La RMN utilisant des impulsions sélectives

Le principe de l'impulsion sélective est illustré sur l'aldéhyde cinnamique. (**Figure 3**) Une impulsion non-sélective permet d'acquérir un spectre correspondant à l'excitation de l'ensemble des noyaux ¹H d'une molécule. Dans le cas de notre molécule, nous obtenons un spectre avec trois protons nommés A, M et X, ainsi que les protons aromatiques. (**Figure 3. b**) Quant à elle, une impulsion d'excitation sélective permet d'exciter une gamme de fréquence de résonance restreinte. Ainsi, une impulsion sélective d'excitation d'une centaine de hertz et centrée au niveau de la fréquence de résonance du proton A génère un spectre composé uniquement du signal du proton A. (**Figure 3. c**)

Une série d'expériences utilisant des impulsions sélectives et basées sur la séquence d'impulsion *J*-résolue a été développée, dont l'expérience SERF (SElective ReFocusing experiment).³⁶

³³ M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 373-378.

³⁴ R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Second ed., Clarendon Press, Oxford, **1987**.

³⁵ R. Freeman, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1397-1412. ; H. Geen, R. Freeman, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1991**, *95*, 93-141.

³⁶ T. Facke, S. Berger, *J. Magn. Reson.* **1995**, *115*, 114-116. ; N. Giraud, L. Beguin, J. Courtieu, D. Merlet, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3481-3484.

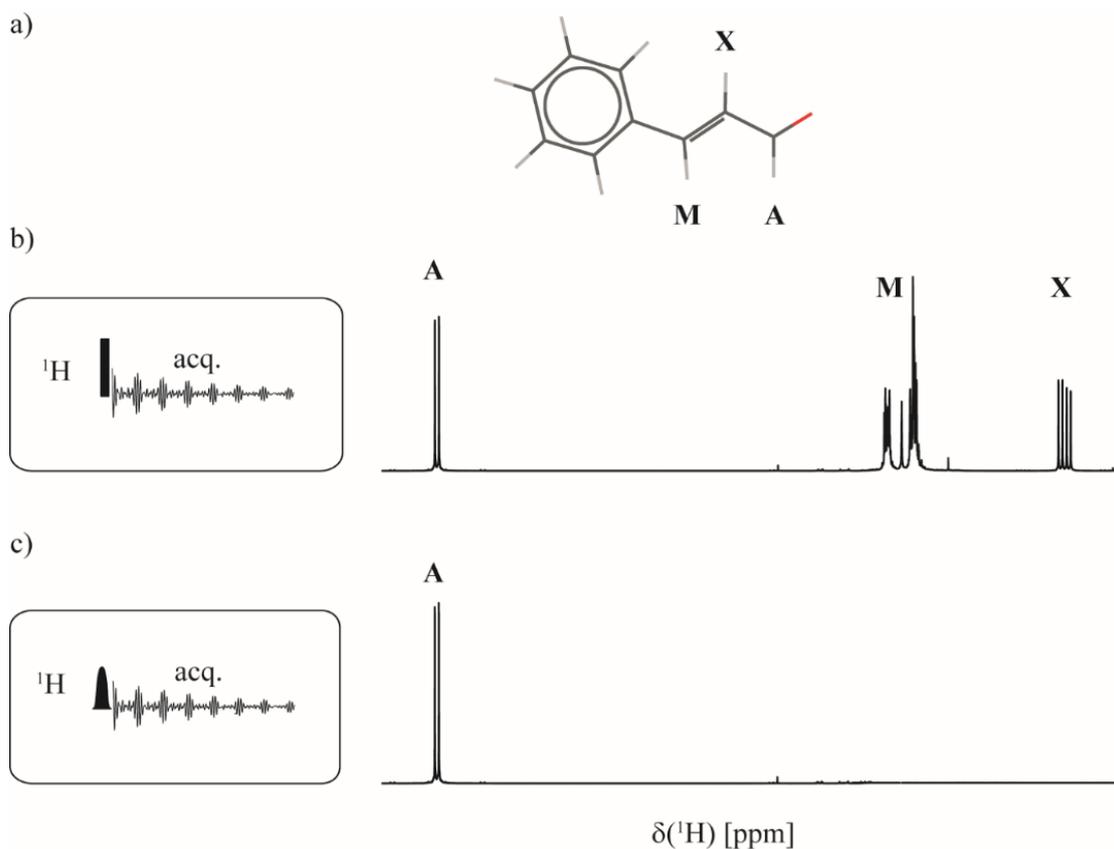


Figure 3. a) Molécule d'aldéhyde cinnamique. (b) Spectre obtenu par excitation avec une impulsion non-sélective. (c) Spectre obtenu par excitation avec une impulsion sélective.

4.1 L'expérience SERF

La séquence d'impulsions de l'expérience SERF est présentée **Figure 4**. Il faut remarquer que contrairement à la séquence initiale, les impulsions de refocalisation sont appliquées successivement.³⁷ La raison est que les spectromètres modernes ne permettent plus de réaliser les deux impulsions sur le même canal et en même temps. Une alternative est d'utiliser une impulsion modulée, mais cette méthode ne permet pas de manipuler indépendamment l'aimantation des noyaux, ce qui est nécessaire pour les expériences encodées présentées par la suite.

La séquence d'impulsions agit comme pour l'expérience *J*-résolue, mais les impulsions de refocalisation sélectives affectent uniquement les deux noyaux I et S. Une première impulsion sélective excite le noyau I dont le signal doit être détecté. Durant le délai $t_{1/2}$, l'aimantation de

³⁷ T. Facke, S. Berger, *J. Magn. Reson.* **1995**, *115*, 114-116. ; J. M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.* **2007**, *187*, 193-198.

ce noyau évolue sous l'effet de son déplacement chimique et de ses couplages. Les deux impulsions successives de refocalisation sélective affectent les cohérences du spin I et celles du spin S permettant de refocaliser l'évolution des déplacements chimiques et de tous les couplages sauf celui impliquant les deux noyaux sélectionnés. Pendant l'acquisition (t_2), les cohérences de spins évoluent librement sous l'effet de l'ensemble des couplages et des déplacements chimiques. Le signal obtenu contient uniquement l'information de couplage entre les noyaux sélectionnés I et S dans la dimension indirecte :

$$S(t_1, t_2) \propto e^{i\pi J_{IS}.t_1}.e^{-i(2\pi\nu_I + \pi J_{IS}).t_2} + e^{-i\pi J_{IS}.t_1}.e^{-i(2\pi\nu_I - \pi J_{IS}).t_2} \quad (1.5)$$

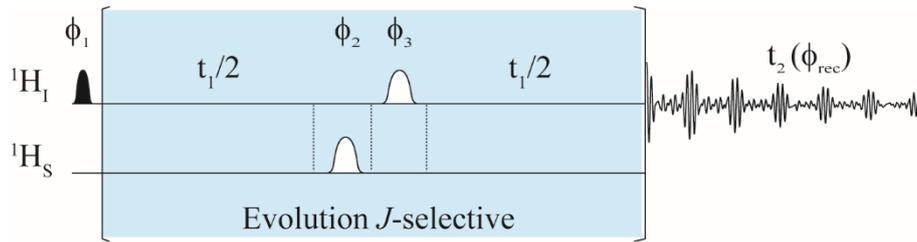


Figure 4. Séquence d'impulsions de l'expérience SERF. Les formes sinusoïdales noire et blanches représentent, respectivement, une impulsion d'excitation et une impulsion de refocalisation. $\phi_1=0$, $\phi_2=1$, $\phi_3=1$, $\phi_{\text{rec}}=0$.

4.2 L'expérience SERFph

Il a été démontré précédemment qu'à la fin d'un écho de spin pour un système de deux spins $\frac{1}{2}$ couplés homonucléaires, le signal obtenu est :

$$S_I(t_1) \propto \cos(\pi J_{IS}t_1) \hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}t_1) 2\hat{I}_x\hat{S}_z \quad (1.3)$$

Le terme \hat{I}_y donne pour le spin I un doublet dans lequel les deux pics sont en absorption (pour une acquisition suivant l'axe y) et le terme $2\hat{I}_x\hat{S}_z$ donne un doublet avec les deux pics en dispersion. Le spectre obtenu consiste donc en la superposition de ces deux doublets, ce qui engendre des pics non phasables, dits en « phase twist ». La nécessité de représenter ces pics en valeur absolue entraîne un élargissement conséquent des raies. Pour rendre phasable un spectre en phase twist, différentes méthodes de traitement du signal sont référencées dans la littérature.

L'utilisation d'une prédiction linéaire pour obtenir des signauxphasés³⁸ ou un algorithme permettant de traiter le signal d'une séquence J -résolue en éliminant la partie en dispersion du signal.³⁹ La méthode expérimentale choisie pour obtenir une version phasable de l'expérience SERF est l'utilisation d'un filtre z ⁴⁰ à la fin du bloc de refocalisation sélective afin de supprimer les termes en antiphase.

La première impulsion du filtre z transforme les termes \hat{I}_y en \hat{I}_z :

$$\cos(\pi J_{IS}t_1)\hat{I}_y + \sin(\pi J_{IS}t_1)2\hat{I}_x\hat{S}_z \xrightarrow{-\frac{\pi}{2}I_x} \cos(\pi J_{IS}t_1)\hat{I}_z + \sin(\pi J_{IS}t_1)2\hat{I}_x\hat{S}_z$$

puis le gradient supprime toutes les cohérences exceptées celles sur z :

$$\cos(\pi J_{IS}t_1)\hat{I}_z$$

La deuxième impulsion du filtre z transforme les termes \hat{I}_z en \hat{I}_y :

$$\cos(\pi J_{IS}t_1)\hat{I}_z \xrightarrow{\frac{\pi}{2}I_x} \cos(\pi J_{IS}t_1)\hat{I}_y$$

A la fin du temps t_1 :

$$S_I(t_1) \propto \cos(\pi J_{IS}t_1)\hat{I}_y$$

et à la fin du temps t_2 :

$$S(t_1, t_2) \propto \frac{1}{2} \cos(\pi J_{IS}t_1) (e^{-i(2\pi\nu_I + \pi J_{IS})t_2} + e^{-i(2\pi\nu_I - \pi J_{IS})t_2}) \quad (1.6)$$

De plus, à la fin de l'écho de spin, une impulsion de refocalisation a été ajoutée pour symétriser la séquence.⁴¹ Cela permet de refocaliser l'évolution des déplacements chimiques pendant la première impulsion de refocalisation sur le noyau S. La séquence que nous utilisons est représentée

Figure 5.

Cette séquence a été utilisée avec succès pour l'extraction de couplages en milieu isotrope,⁴² mais également dans le cas de la visualisation énantiomérique dans un milieu cristal-liquide chiral.⁴³ Cependant, lorsque l'on étudie une molécule à n protons totalement couplés entre eux, il est nécessaire de réaliser jusqu'à $n^*(n-1)/2$ expériences SERF pour obtenir l'ensemble des

³⁸ J.-M. Nuzillard, *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1996**, *118*, 132-135. ; P. Sakhaii, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **2014**, *242*, 220-223.

³⁹ P. Mutzenhardt, F. Guenneau, D. Canet, *J. Magn. Reson.* **1999**, *141*, 312-321.

⁴⁰ M. J. Thrippleton, J. Keeler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 3938-3941.

⁴¹ S. Cadars, A. Lesage, N. Hedin, B. F. Chmelka, L. Emsley, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16982-16991.

⁴² N. Giraud, L. Beguin, J. Courtieu, D. Merlet, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3481-3484.

⁴³ L. Beguin, J. Courtieu, L. Ziani, D. Merlet, *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 1096-1101. ; L. Beguin, N. Giraud, J. M. Ouvrard, J. Courtieu, D. Merlet, *J. Magn. Reson.* **2009**, *199*, 41-47.

informations de couplages de ce réseau. Cette méthode basée sur l'expérience SERFph est donc relativement longue à acquérir. De nos jours, la grande sensibilité des spectromètres RMN modernes pour la détection des protons (aimants à très hauts champs, cryosondes...) fait que la durée des expériences de corrélation classiques est avant tout déterminée par des contraintes liées au nombre de points à accumuler dans la dimension indirecte pour atteindre la résolution souhaitée, plutôt que d'un nombre de scans importants à accumuler. D'où le développement de techniques inspirées de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettant de réaliser des progrès considérables dans le domaine de la spectroscopie RMN en rendant possible l'acquisition simultanée de plusieurs expériences.

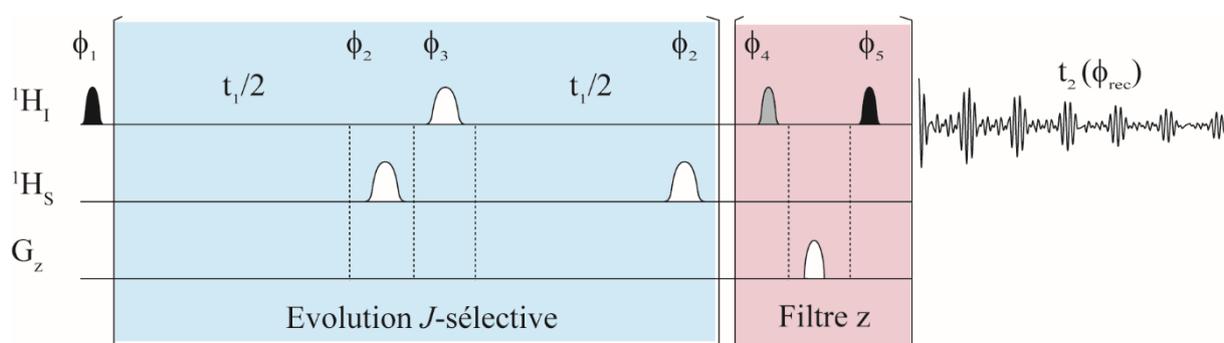


Figure 5. Séquence d'impulsions de l'expérience SERFph. Les formes sinusoïdales noires, grises et blanches sur les canaux ^1H représentent, respectivement, une impulsion sélective d'excitation, une impulsion sélective « flip-back » et une impulsion sélective de refocalisation. La forme sinusoïdale blanche sur le canal de gradient de champ pulsé G_z , correspond à une impulsion de gradient de forme sinusoïdale. $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = x, x, -x, -x$; $\phi_3 = x, x, -x, -x$; $\phi_4 = -x, x, x, -x$; $\phi_5 = x, y, -x, -y$; $\phi_{\text{rec}} = y, -x$.

B. La RMN encodée par gradient

1. Principe général

Ces techniques d'encodage sont basées sur l'application simultanée d'un gradient de champ magnétique de faible puissance et d'une impulsion sélective. Contrairement à une impulsion sélective qui excite l'ensemble des noyaux de l'échantillon à une fréquence de résonance donnée, l'impulsion sélective associée à un gradient de champ pulsé excite les différents noyaux en fonction de leur position dans l'échantillon. Cela permet d'individualiser chacun des noyaux de la molécule et donc d'agir indépendamment sur les différentes cohérences de spin.

Une description simplifiée qui est communément admise pour décrire l'encodage spatial est que lorsque l'on applique un gradient d'encodage suivant l'axe z , la fréquence de résonance des noyaux varie en fonction de leur position dans l'échantillon, comme décrit par l'équation suivante :

$$\nu^i_0(z) = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + G_z(z - z_0))(1 - \sigma^i) \quad (1.7)$$

où B_0 est le champ magnétique du spectromètre, G_z la puissance du gradient selon l'axe z , z la position verticale de la molécule dans l'échantillon, z_0 la position du centre de la bobine et σ la constante d'écran du proton i .

Si on applique simultanément un gradient et une impulsion sélective de porteuse ν_1 , le proton est excité si l'équation suivante est vérifiée :

$$\nu_1 = \nu_0(z) = \frac{\gamma}{2\pi} (B_0 + G_z(z - z_0)) = \nu_0 + \frac{\gamma}{2\pi} G_z(z - z_0)(1 - \sigma) \quad (1.8)$$

Il faut noter que pour les expériences encodées, le signal ne provient que d'une région restreinte de l'échantillon. L'intensité du signal détecté est donc considérablement réduite. Elle est de l'ordre de :

$$\frac{\Omega_B}{\gamma G_z l} \quad (1.9)$$

où Ω_B est la sélectivité de l'impulsion sélective, γ le rapport gyromagnétique, G_z la puissance du gradient et l la longueur de l'échantillon encodé. ⁴⁴

⁴⁴ A. J. Pell, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 293-299.

En règle générale, les paramètres de l'encodage spatial sont définis de façon à avoir la meilleure sensibilité possible. La longueur l de l'échantillon encodée est limitée par la zone de détection de la bobine et γ dépend du noyau étudié, ces deux paramètres sont donc fixes pour une expérience et un spectromètre donnés. La force du gradient G_z dépend principalement de la largeur spectrale à encoder. Ce paramètre est calibré à partir d'une expérience d'excitation sélective encodée en le faisant varier pour avoir un spectre proton encodé avec une amplitude maximale et un minimum de distorsion. La sélectivité de l'impulsion Ω_B consiste à déterminer le meilleur compromis entre sélectivité et intégrité du signal. Ce qu'il faut retenir, c'est plus l'impulsion sera sélective, meilleure sera la sélection de multiplets proches, mais plus la tranche sera fine et plus la sensibilité sera faible.

Cette approche est utilisée pour diverses applications RMN, que ce soit pour éditer une évolution en fonction du temps, ou pour réaliser un encodage spatial en fréquence. Dans le premier cas le spectre entier de la molécule doit être encodé dans chaque coupe, alors que dans le deuxième cas chaque partie du spectre est encodée dans une coupe différente de l'échantillon.

2. L'encodage spatial temporel

On rappelle qu'une expérience de RMN multidimensionnelle est basée sur l'acquisition de sous-expériences 1D destinées à enregistrer de manière indépendante les évolutions de spins pendant plusieurs délais différents. Ces sous-expériences sont composées d'une succession de quatre périodes : la préparation, l'évolution (l'évolution indirecte t_1 et l'évolution directe ou acquisition t_2), la période de mélange et la détection. Elles permettent de reconstituer l'évolution indirecte indépendamment de celle acquise durant le délai t_2 . L'inconvénient de cette méthode est que le temps expérimental est directement proportionnel au nombre de sous-expériences 1D et donc à la résolution du spectre dans la dimension indirecte souhaitée.

Dans le but de répondre aux objectifs des spectroscopistes RMN de diminuer la durée nécessaire pour analyser un échantillon donné, la RMN ultra-rapide,⁴⁵ également connue sous le nom « Ultrafast » ou « single scan NMR », a été développée. Elle consiste à acquérir simultanément

⁴⁵ L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 15858-15862. ; Y. Shrot, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11385-11396. ; P. Giraudeau, S. Akoka, *J. Magn. Reson.* **2007**, *186*, 352-357.

les différentes sous-expériences dans des régions distinctes de l'échantillon, au lieu de les enregistrer les unes à la suite des autres comme dans l'approche standard. Cela est rendu possible par l'utilisation de l'encodage spatial qui permet d'exciter les différentes coupes de l'échantillon, les unes après les autres. L'aimantation évolue alors pendant un délai t_1 différent dans chaque coupe de l'échantillon. Cela consiste à réaliser un encodage spatial d'un délai d'évolution à travers l'échantillon. Cette méthode permet de réduire de façon considérable la vitesse d'acquisition des expériences multidimensionnelles, elle a notamment été utilisée pour des expériences COSY, HSQC, TOCSY, ⁴⁶ *J*-résolues, ⁴⁷ etc.

3. L'encodage spatial fréquentiel

À la différence de l'encodage temporel qui associe à chaque coupe une période d'évolution temporelle, l'encodage spatial fréquentiel associe une gamme de fréquence de résonance précise. Le principe de l'encodage spatial fréquentiel est illustré avec la molécule présentée **Figure 6. a**. Sous l'effet du gradient de champ, la fréquence de résonance des spins varie en fonction de leur position dans l'échantillon. L'impulsion sélective excite simultanément les différentes fréquences de résonance dans les différentes coupes de l'échantillon. (**Figure 6. b**) Dans le cas d'une excitation simple, l'acquisition de l'ensemble des coupes génère un spectre contenant les mêmes informations qu'un spectre proton standard. (**Figure 6. c**) En revanche dans l'expérience avec encodage, la manipulation des différentes cohérences de spins dans différentes régions de l'échantillon est rendue possible. Cette méthode a été développée par Zangger et Sterk, d'où son nom, la méthode ZS. ⁴⁸

La méthode ZS est à la base d'une série d'expériences permettant de manipuler séparément les protons de la molécule et ainsi refocaliser, laisser évoluer ou réintroduire les différentes interactions homonucléaires qui sont présentées dans ce qui suit.

⁴⁶ P. Pelupessy, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12345-12350. ; P. Pelupessy, L. Duma, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 169-174.

⁴⁷ P. Giraudeau, S. Akoka, *J. Magn. Reson.* **2007**, *186*, 352-357. ; P. Giraudeau, S. Akoka, *J. Magn. Reson.* **2008**, *190*, 339-345.

⁴⁸ K. Zangger, H. Sterk, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 486-489.

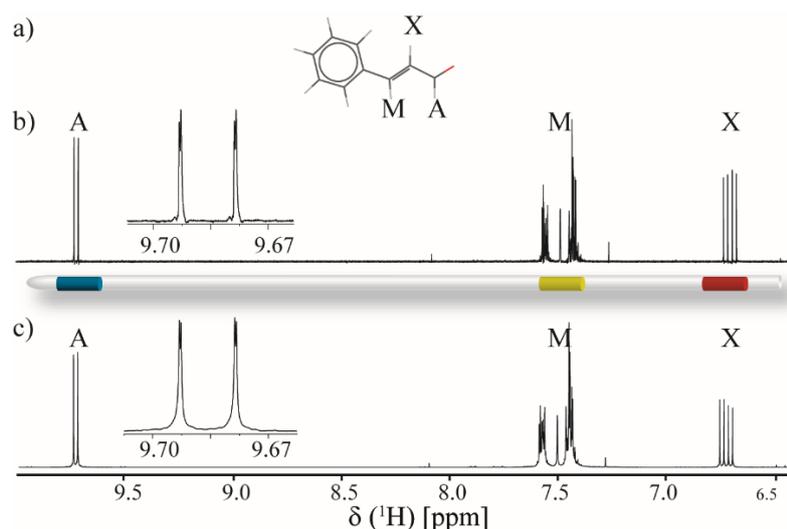


Figure 6. Principe de l'encodage spatial en fréquence. **a)** Molécule de l'aldéhyde cinnamique. **(b)** Spectre proton encodé. **(c)** Spectre proton standard.

4. Les applications de l'encodage spatial fréquentiel

4.1 Les expériences avec découplage homonucléaire

Comparé à d'autres noyaux détectables en RMN, le spectre proton présente une faible dispersion des déplacements chimiques, associée à la présence d'importants couplages scalaires, ce qui génère fréquemment des spectres présentant des problèmes de superposition de pics. Une des méthodes pour diminuer significativement ce problème est de supprimer les couplages spin-spin homonucléaires, afin d'obtenir des spectres RMN contenant uniquement l'information de déplacement chimique. Différentes méthodes permettent de réaliser un découplage homonucléaire à partir de spectres 2D. Parmi elles, la méthode de Pell et Keeler basée sur l'utilisation de spectres 2D J -résolus en absorption⁴⁹ ou de spectres anti z -COSY⁵⁰; la méthode BIRD (Bilinear rotation decoupling)⁵¹ et l'approche « constant time ».⁵²

⁴⁹ W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst, *The Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*, 4226-4227. ; A. J. Pell, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 293-299.

⁵⁰ A. J. Pell, R. A. Edden, J. Keeler, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 296-316.

⁵¹ J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, A. Pines, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *93*, 504-509. ; J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 9716-9717. ; A. Lupulescu, G. L. Olsen, L. Frydman, *J. Magn. Reson.* **2012**, *218*, 141-146.

⁵² A. Bax, A. F. Mehlkopf, J. Smidt, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1979**, *35*, 167-169. ; A. Bax, R. Freeman, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1981**, *44*, 542-561. ; B. T. Farmer II, L. R. Brown, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1987**, *71*, 365-370.

Dans ce contexte, la capacité à obtenir des spectres avec découplage homonucléaire par la méthode ZS a été démontrée dès la fin des années 90 par Zangger et Sterk.⁵³

Quelques années plus tard, Morris et ses collaborateurs ont obtenu les premiers spectres 1D δ -résolus basés sur l'utilisation de la méthode ZS, à partir d'un traitement approprié de la dimension indirecte d'une expérience multidimensionnelle.⁵⁴ Grâce aux développements récents des spectromètres permettant de mettre en œuvre des impulsions pendant l'acquisition, la méthode ZS s'est récemment montrée efficace pour réaliser l'acquisition en temps-réel des évolutions δ -résolue.⁵⁵ Dans ce dernier cas, le signal d'induction libre, plus communément appelé FID (Free Induction Decay) est reconstruit à partir d'une série de tronçons de données successifs entre lesquels un découplage homonucléaire des protons est réalisé. (**Figure 7**)

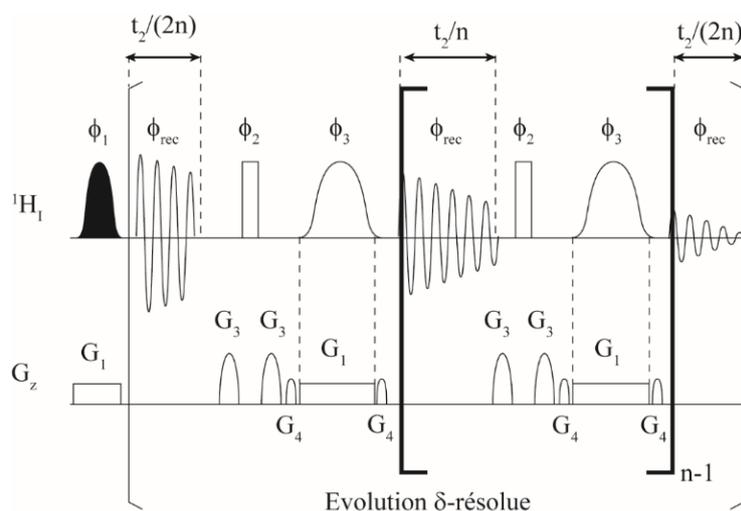


Figure 7. Séquence d'impulsions de l'expérience δ -résolue grâce à un schéma d'acquisition en temps-réel. Les formes sinusoïdales noires et blanches sur les canaux ^1H représentent, respectivement, une impulsion sélective d'excitation et de refocalisation. Les rectangles blancs correspondent à un gradient de champ pulsé de forme rectangulaire. Les formes sinusoïdales blanches sur le canal de champ pulsé G_z correspondent à un gradient selon l'axe z de forme sinusoïdale.

⁵³ K. Zangger, H. Sterk, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 486-489.

⁵⁴ J. A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3901-3903. ; M. Nilsson, G. A. Morris, *Chem. Commun.* **2007**, 933-935. ; J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 9716-9717.

⁵⁵ P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, R. Kerssebaum, G. E. Wagner, K. Zangger, *J. Magn. Reson.* **2013**, *233*, 92-95.

La méthode ZS s'est établie, ces dernières années, comme une méthode robuste et générale pour ôter les couplages scalaires homonucléaires des spectres protons. Elle a été mise en œuvre pour acquérir des spectres 2D TOCSY avec découplage homonucléaire dans les deux dimensions spectrales,⁵⁶ des expériences HSQC en temps constant découplées proton⁵⁷ ou pour supprimer les pics de la diagonale en NOESY et TOCSY.⁵⁸ Dans le cadre de l'analyse de mélanges de composés, cette approche a également apporté une amélioration de la lisibilité des spectres obtenus par des expériences de diffusion, en permettant l'acquisition de spectres DOSY sans structure en multiplet dans la dimension directe.⁵⁹ Elle peut également intervenir dans le suivi de réactions chimiques.⁶⁰

4.2 Les expériences de couplage sélectif

L'encodage spatial en fréquence peut également être utilisé pour réintroduire sélectivement les couplages scalaires entre un proton donné et ses partenaires de couplages.⁶¹ L'expérience G-SERF (**Figure 8**) donne un accès direct à l'attribution et à la mesure de tout le réseau de couplages ^1H - ^1H existant autour du spin donné. Les couplages scalaires sont attribués et mesurés à partir d'une série de multiplets entièrement résolus qui apparaissent aux déplacements chimiques des partenaires de couplage. Cette méthode dite « *J*-éditée » s'est avérée être un outil utile pour analyser des composés organiques de petite à moyenne taille⁶² et notamment pour l'étude de mélanges d'énantiomères dissous dans un solvant cristal liquide chiral, pour lesquels les interactions dipolaires homonucléaires constituent des informations structurales précieuses.⁶³ Très récemment, deux nouvelles séquences d'impulsions nommées « Quick G-SERF » et « real time SERF » ont apporté une réelle contribution à la RMN *J*-éditée, en permettant la

⁵⁶ N. H. Meyer, K. Zangger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 7143-7146.

⁵⁷ N. H. Meyer, K. Zangger, *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 1488-1490.

⁵⁸ S. Glanzer, E. Schrank, K. Zangger, *J. Magn. Reson.* **2013**, *232*, 1-6.

⁵⁹ S. Glanzer, K. Zangger, *Chemistry* **2014**, *26*, 11171-11175.

⁶⁰ T. Niklas, D. Stalke, M. John, *Chem Commun* **2015**, *51*, 1275-1277. ; G. E. Wagner, P. Sakhaii, W. Bermel, K. Zangger, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3155-3157.

⁶¹ N. Giraud, L. Beguin, J. Courtieu, D. Merlet, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3481-3484.

⁶² Lokesh, N. Suryaprakash, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8550-8553.

⁶³ D. Merlet, L. Beguin, J. Courtieu, N. Giraud, *J. Magn. Reson.* **2011**, *209*, 315-322.

réintroduction sélective des couplages scalaires, directement dans le spectre 1D δ -résolue grâce à un schéma adapté d'acquisition en temps-réel.⁶⁴

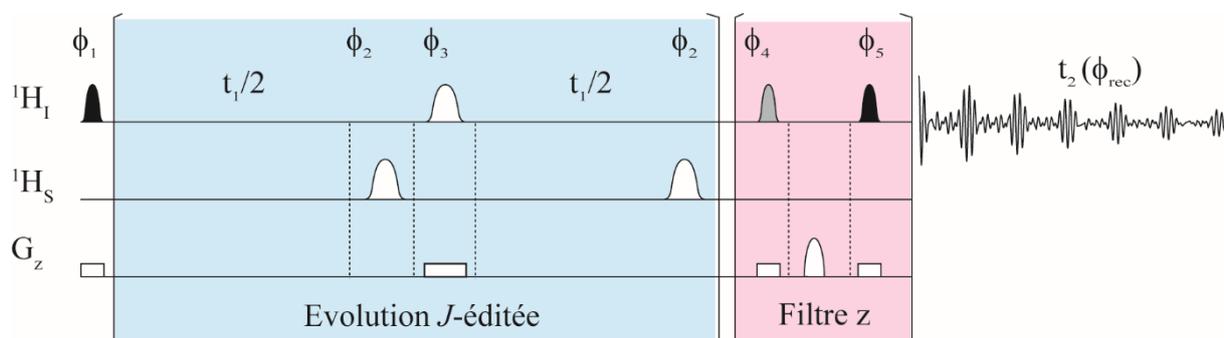


Figure 8. Séquence d'impulsions de l'expérience G-SERFph. Les formes sinusoïdales noires, grises et blanches sur les canaux ^1H représentent, respectivement, une impulsion d'excitation de 90° , une impulsion flip-back de 90° et une impulsion de refocalisation de 180° . Les rectangles blancs correspondent à un gradient de champ pulsé de forme rectangulaire. La forme sinusoïdale blanche sur le canal G_z correspond à un gradient de champ pulsé de forme sinusoïdale. $\phi_1 = x, -x$; $\phi_2 = x, x, -x, -x$; $\phi_3 = x, x, -x, -x$; $\phi_4 = -x, x, x, -x$; $\phi_5 = x, y, -x, -y$; $\phi_{\text{rec}} = y, -x$.

⁶⁴ N. Gubensak, W. M. Fabian, K. Zangger, *Chem Commun (Camb)* **2014**, 50, 12254-12257. ; N. Lokesh, S. R. Chaudhari, N. Suryaprakash, *Chem Commun (Camb)* **2014**, 50, 15597-15600.

C. Plan de thèse

Le but de ma thèse est de développer de nouvelles expériences de corrélations basées sur un encodage spatial en fréquence dans le but de simplifier l'extraction des valeurs de couplages scalaires de molécules complexes.

Le premier chapitre présente le contexte scientifique et les différentes bases techniques utilisées dans ce manuscrit.

Le deuxième chapitre est consacré à la présentation des développements méthodologiques à travers la présentation de deux nouvelles expériences de corrélation, l'expérience PCR-COSY (Passive Coupling Refocusing - COrrrelation SpectroscopY) et la push-G-SERF (pure shift Gradient encoded homonuclear SElective ReFocusing spectroscopy) et la description de l'encodage spatial par la simulation.

Le troisième chapitre est dédié à l'étude stéréochimique d'un oligosaccharide synthétique grâce aux expériences encodées G-SERF, push-G-SERF et TOCSY découplée protons et de l'étude de l'influence du champ magnétique sur les expériences encodées.

Chapitre 2. Théorie de l'encodage spatial en fréquence

A. Simulation d'une expérience RMN encodée en fréquence par gradient

Dans cette section, le formalisme utilisé pour simuler les spectres RMN résultant d'une excitation encodée spatialement en fréquence est présenté. L'ensemble des spectres théoriques correspond à la simulation d'une unique impulsion encodée par gradient (**Figure 9. a**) sur le système de spin modèle de type ABX correspondant à une partie d'un groupement allyle. (**Figure 9. b**)

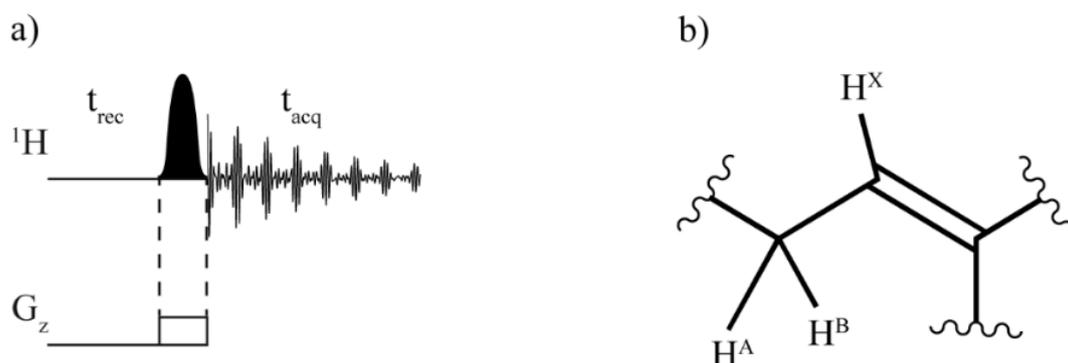


Figure 9. **a)** La séquence de l'impulsion encodée par gradient utilisée pour la simulation. t_{rec} correspond au délai de relaxation et t_{acq} au temps d'acquisition. Sur le canal proton (^1H), la forme sinusoïdale noire correspond à une impulsion d'excitation modulée en amplitude et en phase. Sur le canal gradient (G_z), le rectangle blanc fait référence à l'application d'un gradient de champ de forme rectangulaire selon l'axe z . **(b)** La structure du système de spin modèle sur lequel l'encodage spatial en fréquence est simulé. Les déplacements chimiques des spins H^{A} , H^{B} et H^{X} sont respectivement 4,08 ppm, 4,28 ppm et 5,94 ppm. Les couplages scalaires homonucléaires sont $J^{\text{A-B}} = -13,4$ Hz, $J^{\text{A-X}} = 5,9$ Hz et $J^{\text{B-X}} = 4,9$ Hz.

L'action d'un champ rf de faible puissance appliqué simultanément à un gradient de champ pulsé revient à fractionner l'échantillon RMN en coupes virtuelles dans lesquelles les molécules subissent un champ magnétique $B(z)$ dépendant de leur position dans l'échantillon :

$$B(z) = B_0 + G_z \cdot (z - z_0)$$

où B_0 est le champ magnétique statique, G_z est la force du gradient de champ pulsé le long de l'axe z et $(z - z_0)$ est la position de la molécule dans l'échantillon le long de l'axe.

Pendant l'application de l'impulsion encodée, l'évolution de l'opérateur densité $\rho(z,t)$ décrivant l'état du système de spin est calculée en résolvant l'équation de Liouville-Von Neumann dans chaque coupe :

$$\frac{d}{dt}\rho(z,t) = -i[H(z,t),\rho(z,t)] \quad (4.1)$$

où $H(z,t)$ est l'Hamiltonien dépendant de la position et du temps qui prend en compte l'ensemble des interactions de spin, à savoir le déplacement chimique, les couplages scalaires et les interactions avec le champ rf . A noter que les effets de la relaxation et de la diffusion translationnelle sont négligés afin de simplifier le calcul.

Dans cette équation, l'Hamiltonien de l'impulsion modulée en amplitude et en phase $H_{rf}(z,t)$ est exprimé dans le référentiel tournant à la fréquence du transmetteur :

$$H_{rf}(z,t) = 2\pi\Delta\nu(z)I_z + 2\pi\nu_1(t)\{I_x \cos \varnothing + I_y \sin \varnothing\} \quad (4.2)$$

où $\nu_1(t) = \frac{-\gamma_I B_1^{rf}(t)}{2\pi}$ est la fréquence de nutation et \varnothing la phase du champ oscillant $B_1^{rf}(t)$. L'offset de l'impulsion sélective $\Delta\nu(z)$ est la différence entre la fréquence de résonance $\nu_0(z)$ du spin I dans la coupe considérée et la fréquence de transmission ν_{rf} :

$$\Delta\nu(z) = \nu_0(z) - \nu_{rf} = \frac{\gamma_I \cdot \{B_0 + G_z \cdot z\} \{1 - \sigma_I\}}{2\pi} - \nu_{rf} \quad (4.3)$$

où σ_I est la constante d'écran électronique du spin I .

Ce formalisme décrit l'impulsion encodée comme un balayage de l'offset du champ rf , ce qui coïncide avec la description simplifiée qui est communément faite de l'encodage spatial en fréquence. ⁶⁵

Dans le cas d'une impulsion modulée en amplitude et en phase, l'Hamiltonien décrivant l'action du champ rf est dépendant du temps. Or, pour résoudre l'équation (4.2) il est nécessaire de se placer dans des conditions non dépendantes du temps. Pour cela, l'approche standard consiste à diviser la durée de l'impulsion en n intervalles de temps Δt pendant lesquels l'amplitude

⁶⁵ K. Zangger, H. Sterk, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 486-489.

$\omega_1(j\Delta t)(j = 0, n - 1)$ et donc $H(z, j\Delta t)$ peuvent être considérés comme constants.⁶⁶ Dans ces conditions, la solution locale de l'équation de Liouville-Von Neumann dans la coupe virtuelle à la position z est :

$$\rho(z, t) = U_z(t, 0)\rho(z, 0)U_z^\dagger(t, 0) \quad (4. 4)$$

où le propagateur unitaire $U_z(t, 0)$ décrivant le processus de dynamique de spin à la position z de 0 à t peut être exprimé comme un produit ordonné dans le temps :

$$U_z(t, 0) = \prod_{j=0}^{n-1} \exp\{-iH(z, j\Delta t) \cdot \Delta t\} \quad (4. 5)$$

Après l'impulsion encodée par gradient (*i.e.* pendant l'acquisition), le champ magnétique principal (B_0) est considéré comme homogène et l'Hamiltonien incorpore les interactions de déplacement chimique ^1H et de couplage. Le signal global détecté par la bobine de détection correspond à la somme des FID (free induction decay) issus de chaque coupe virtuelle de l'échantillon.

L'opérateur densité local $\rho(z, t)$ est calculé pour chaque coupe virtuelle à travers les étapes successives de l'expérience en utilisant Mathematica 8.0. (Wolfram Research, Inc.)⁶⁷ A partir de ces simulations, un signal RMN a été digitalisé suivant le schéma de quadrature désiré et les parties réelles et imaginaires résultantes du signal d'induction libre, plus communément appelé FID (Free Induction Decay), sont insérées dans un fichier de données compatible avec le traitement des données par le logiciel TopSpin de BrukerTM. Ce programme de simulation a été développé au sein de l'équipe de RMN en milieu orienté.

⁶⁶ M. Bak, J. T. Rasmussen, N. C. Nielsen, *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296-330.

⁶⁷ I. Wolfram Research, 8.0 ed., Wolfram Research, Inc. , Champaign, Illinois, **2010**.

B. Reconstitution du spectre encodé spatialement

1. Simulation d'une unique cohérence du signal du proton H^A

L'action d'une impulsion sélective encodée par un gradient de champ magnétique sur un système de spin modèle de type ABX a été étudiée en utilisant le formalisme décrit précédemment. Dans ce but, l'aimantation correspondant à la cohérence $A_+B_\alpha X_\alpha$ du signal du proton H^A a été évaluée pour deux champs magnétiques statiques (14,1 T et 23,5 T) à la fin de l'étape d'excitation pour chaque coupe virtuelle de l'échantillon. Dans les deux cas, l'échantillon virtuel est divisé en 1521 coupes de taille égale. Pour chacun des champs, la force du gradient est ajustée de telle manière que le spectre proton du système de type ABX (Fenêtre spectrale de 2,55 ppm) soit encodé exactement le long de ces coupes. A chaque coupe est attribuée un offset dépendant de sa position verticale dans l'échantillon. La sélectivité des impulsions encodées étant imposée par la largeur des signaux RMN et donc par la force des couplages scalaires qui est indépendante du champ magnétique, la durée de l'impulsion sélective a été gardée identique pour les deux champs. L'impulsion d'excitation utilisée est une EBurp2 qui présente l'avantage d'avoir une phase constante sur la région d'excitation. La durée a été paramétrée à 50 ms, afin d'avoir une fenêtre d'excitation d'une centaine de Hertz. Les résultats sont présentés en **Figure 10. a** (14,1 T) et **Figure 10. b** (23,5 T).

Pour les deux champs magnétiques, une section dans laquelle l'aimantation a une cohérence en phase est observée autour de la zone où le champ rf est en résonance avec le noyau considéré, alors qu'en dehors de cette zone une perte de cohérence est observée. La largeur de cette région correspond à la sélectivité de l'impulsion encodée, à savoir une centaine de Hertz pour les deux champs magnétiques. Ayant conservé la même fenêtre spectrale en ppm pour les deux champs magnétiques, le signal est encodé dans une région plus fine à 23,5 T qu'à 14,1 T. De plus, on observe pour les deux champs magnétiques que lorsque l'impulsion irradie une coupe encodée au déplacement chimique du proton B, l'amplitude de la cohérence $A_+B_\alpha X_\alpha$ augmente à nouveau bien que l'on soit en dehors de la zone d'excitation du noyau A à proprement parlé. Cet effet est d'autant plus important que le champ est faible et il n'est pas observé dans la zone où l'impulsion excite le proton X. On peut donc en déduire que le transfert de cohérence durant l'impulsion est dû au fait que le sous-système AB est fortement couplé.

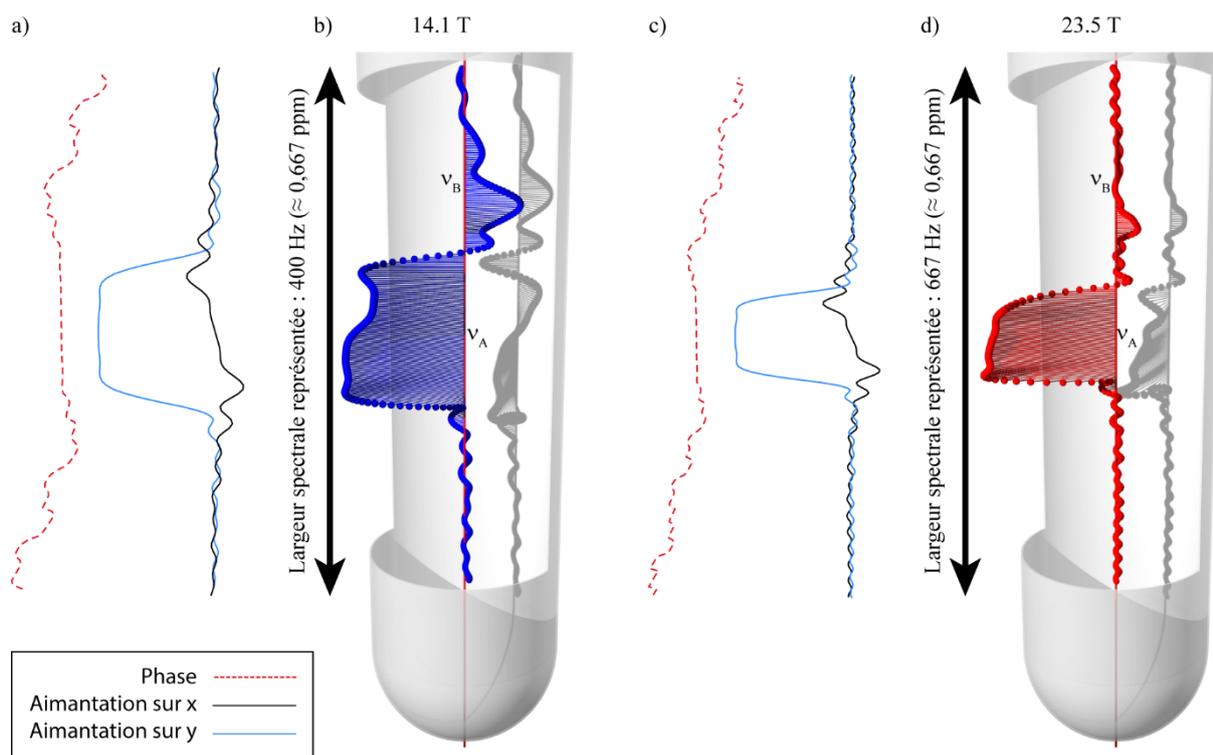


Figure 10. Représentation de l'aimantation d'une unique cohérence du signal du proton H^A . Représentation théorique en 2D de la phase (en rouge) et de l'aimantation selon l'axe x (en noir) et y (en bleu) à (a) 14.1 T et (c) 23,5 T, issu de l'outil « shapetool » de TOPSPIN. Evolution de l'aimantation en 3D calculée dans chaque coupe virtuelle à la fin de l'impulsion d'excitation sélective encodée d'une durée de 50 ms, pour la cohérence $A_+B_\alpha X_\alpha$ du spin du proton H^A à (b) 14,1T et (d) 23,5 T. Une impulsion modulée EBurp2 de 1000 points a été utilisée pour l'excitation sélective. L'échantillon virtuel est divisé en 1521 coupes de taille égale. (Seules les 507 coupes encodées autour des déplacements chimiques de H^A et H^B sont affichées).

2. Simulation du signal du proton H^A

Pour chaque coupe virtuelle constituant l'échantillon simulé, la somme des cohérences ($A_+B_\alpha X_\alpha$, $A_+B_\alpha X_\beta$, $A_+B_\beta X_\alpha$ et $A_+B_\beta X_\beta$) provenant de l'excitation de l'aimantation globale du proton A a été calculée. Une sélection de spectres simulés provenant de différentes zones de l'échantillon, ainsi que leur intégration sont présentés sur la **Figure 11**. Comme ce qui a été observé précédemment pour une cohérence, cette simulation met en évidence une zone dans laquelle le signal simulé est en absorption pure. Cette zone est large d'une centaine de Hertz, comme pour la simulation d'une cohérence unique, ce qui à nouveau correspond à la sélectivité de l'impulsion utilisée. En dehors de cette région, la phase du spectre est fortement affectée et l'amplitude du signal décroît rapidement. Cela permet notamment de montrer que lors de l'utilisation des

techniques basées sur un encodage spatial fréquentiel par gradient, le signal provient d'une zone restreinte de l'échantillon qui décroît lorsque le champ magnétique statique augmente.

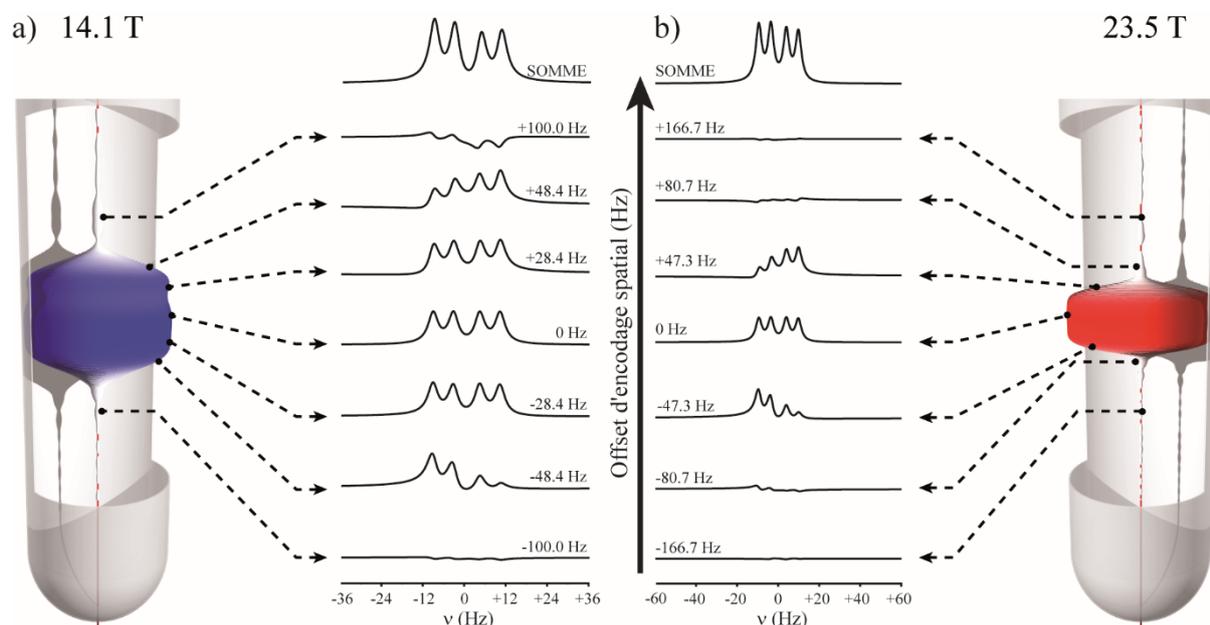


Figure 11. Représentation de l'aimantation du signal du proton H^A . Spectres du proton H^A issus de différentes coupes virtuelles distribuées le long de l'axe z , simulés à (a) 14,1 T et (b) 23,5 T. Pour chaque sous-spectre, la différence entre l'offset du champ local rf et la fréquence de résonance de H^A est indiquée. Le spectre résultant de la somme des coupes virtuelles est représenté en haut de chaque colonne des sous-spectres. Ce spectre a été redimensionné pour des questions de place, les problèmes de sensibilité relatifs à son intégration étant discutés par la suite.

L'addition des contributions de chaque coupe virtuelle mène au spectre encodé attendu à 14,1 T (**Figure 12. c**) et à 23,5 T (**Figure 12. d**). Bien que la somme des sous-spectres générés dans chaque coupe virtuelle mène à un spectre total phasé, il est nécessaire de remarquer que quelques sous-coupes apportent des signaux déformés, mais ces distorsions se compensent entre elles. De plus, il est important de noter que comme pour l'expérience, le spectre encodé présente un effet de toit perturbé (**Figure 12. a et b**). Ce phénomène s'explique par le fait que chaque proton est encodé dans une coupe différente, ce qui affecte le signal des protons fortement couplés.

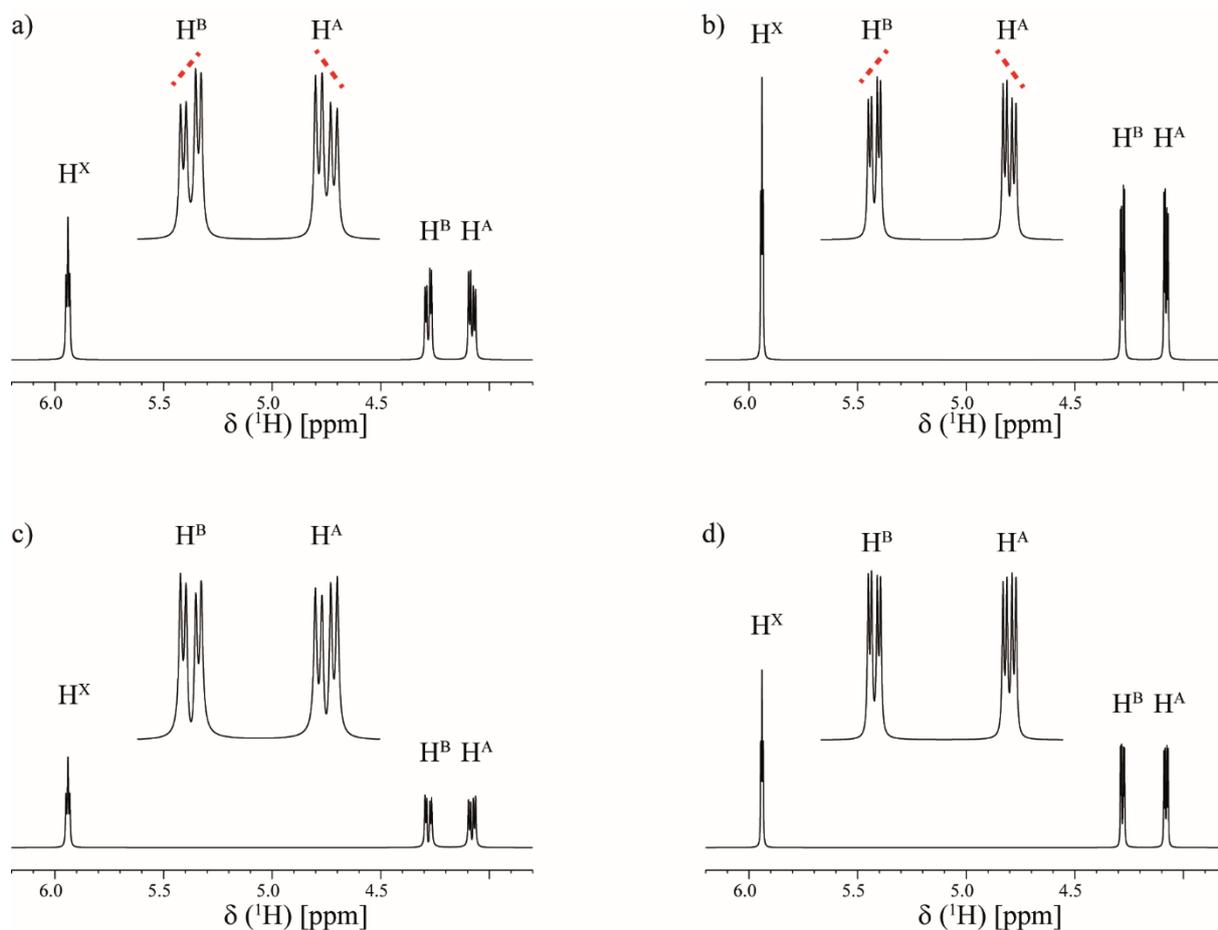


Figure 12. Spectres ^1H standards du système de spin modèle ABX à (a) 14,1 T et (b) 23,5 T et spectres ^1H encodés du système de spin modèle ABX à (c) 14,1 T et (d) 23,5 T.

3. Simulation du spectre encodé du système ABX

Finalement, la localisation du signal total provenant d'une impulsion sélective encodée à travers l'échantillon RMN a été étudiée. En **Figure 13**, le profil d'amplitude du signal RMN est représenté à 14,1 T et 23,5 T. Trois zones sont observées autour des positions auxquelles ν^A , ν^B et ν^X sont encodées, dans lesquelles un signal d'amplitude significative est détecté.

L'analyse précise des cohérences générées par cette excitation sélective encodée à travers l'échantillon a permis d'observer que chaque proton H^A , H^B ou H^X est excité dans la section associée à sa fréquence de résonance respective, ce qui est le fondement de l'encodage spatial en fréquence. De plus, on remarque que la sélectivité spectrale devient ici un problème de résolution spatiale. En effet, bien qu'à 23,5 T les trois sections transversales encodées soient clairement séparées les unes des autres, à 14,1 T les sections transversales dans lesquelles H^A et H^B sont

encodées se superposent légèrement l'une à l'autre. Ce résultat confirme qu'à faible champ magnétique, il peut être problématique de déclencher des évolutions sélectives impliquant une refocalisation d'un couplage entre H^A et H^B car il n'est pas possible d'agir localement sur ces cohérences avec suffisamment de sélectivité.

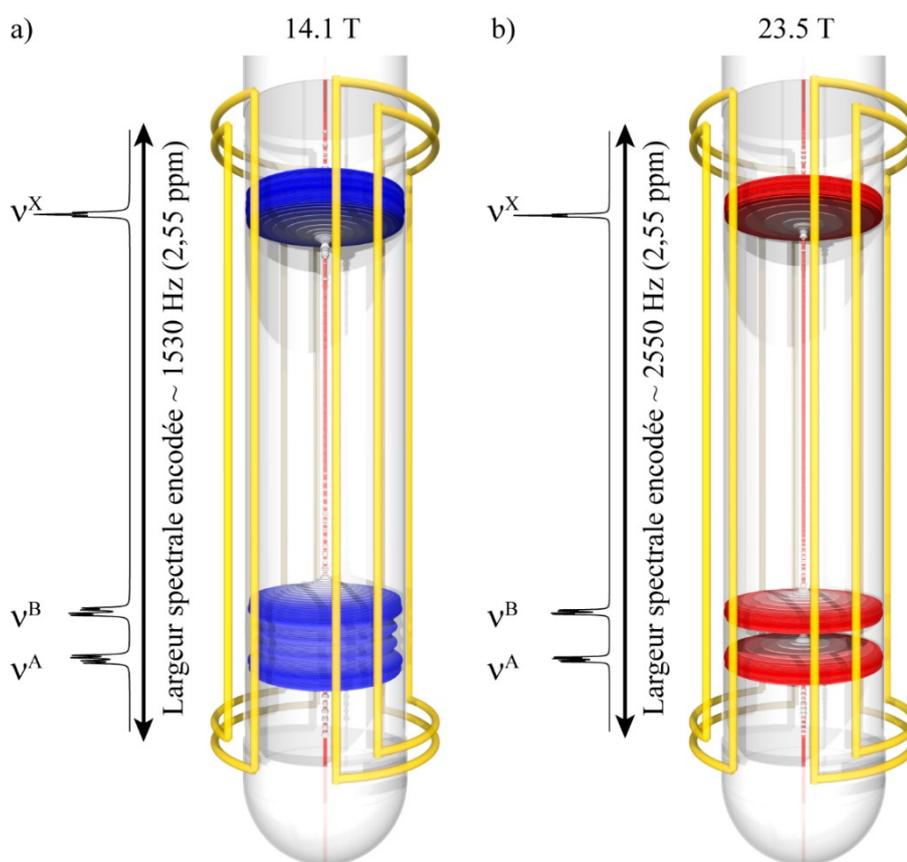


Figure 13. Représentation de l'aimantation du système ABX. Les variations de l'amplitude du signal RMN, représentées par des coordonnées cylindriques, qui sont générées à (a) 14,1 T et (b) 23,5 T à partir de la simulation de l'excitation encodée par gradient du système de spin modèle. Ces amplitudes ont été mesurées pour chaque coupe virtuelle à partir du premier point du FID calculé. A chaque champ magnétique statique, le spectre 1H est affiché le long du tube RMN pour illustrer l'encodage spatial en fréquence.

C. Dépendance du champ magnétique sur la sensibilité des expériences RMN encodées spatialement en fréquence

Dans cette section, le but est de quantifier la relation entre sensibilité de l'expérience encodée par gradient et la force du champ magnétique statique principal. Les techniques basées sur un encodage spatial en fréquence ont pour inconvénient principal leur faible sensibilité. En règle générale, l'augmentation du champ magnétique génère, en plus d'une meilleure dispersion des signaux, une amélioration de la sensibilité des expériences RMN. Cependant, dans le cas des expériences encodées, il a été montré dans les paragraphes précédents que l'augmentation du champ magnétique s'accompagne d'une diminution du volume des coupes. La question est donc de savoir si l'acquisition de spectres encodés spatialement en fréquence à haut champ magnétique est toujours bénéfique pour les expériences basées sur un encodage spatial en fréquence. Pour répondre à cette question, l'évolution de la sensibilité d'une expérience d'impulsion encodée par gradient a été étudiée à quatre champs magnétiques différents qui représentent la gamme de spectromètres qui sont actuellement commercialisés (7,05 T, 9,4 T, 14,1 T et 23,5 T). A noter que réaliser expérimentalement un tel protocole est une tâche difficile car cela correspond à isoler l'unique influence du champ magnétique B_0 sur le signal induit dans chaque bobine de réception d'une série de spectromètres. Cela n'implique notamment que la contribution des autres paramètres tels que le facteur de remplissage de la tête de sonde, l'homogénéité de l'impulsion r_f , ainsi que de B_0 soit parfaitement connue pour chaque spectromètre. L'utilisation d'une sonde refroidie par cryogénie, qui réduit directement le bruit thermique généré par les composants électroniques, ajoute de la complexité à cette question. Le recours aux simulations présentées ce paragraphe permet donc de décrire la relation entre sensibilité de l'expérience encodée par gradient et la force du champ magnétique statique principal.

L'intégration du signal du proton H^A généré après une impulsion encodée par gradient a été calculée pour chaque champ magnétique mentionné précédemment et normalisée par l'intégration du signal provenant de la même excitation semi-sélective générée sans encodage spatial en fréquence. La force du gradient a été calibrée selon la procédure de calibration de routine qui consiste à ce que le spectre proton corresponde exactement à la fenêtre spectrale qui est encodée le long de l'échantillon virtuel. L'ensemble des autres paramètres reste identique pour chaque

champ magnétique. La normalisation permet d'éliminer la contribution de la sensibilité intrinsèque de la sonde et de la population de Boltzmann du spin observé. Le rapport résultant $I_{\text{encodée}}/I_{\text{sélective}}$ fournit donc une quantification directe de la portion de l'échantillon dans laquelle a été encodé le proton H^A .

Les résultats sont présentés **Figure 14. a**. La gamme des valeurs de $I_{\text{encodée}}/I_{\text{sélective}}$ s'étend de 4% à 18% et diminue avec B_0 , ce qui reflète l'affinement des zones encodées avec l'augmentation de la force du champ magnétique. De plus, comme $I_{\text{encodée}}$ est proportionnel à la largeur de la coupe,⁶⁸ le rapport résultant devrait être, en première approximation, proportionnel à B_0^{-1} . La courbe de tendance correspondante a été ajustée au rapport calculé à 23,5 T car à ce champ, la résolution spatiale est suffisamment haute pour éviter les recouvrements partiels des zones où les protons H^A et H^B sont encodés, ce qui permet une mesure de la sensibilité plus précise. Bien que les rapports obtenus à hauts champs magnétiques (14,1 T et 23,5 T) suivent la courbe de tendance, ceux déterminés à plus bas champs (7,05 T et 9,4 T) sont plus élevés que prévu. Une étude plus minutieuse de systèmes de spins plus ou moins fortement couplés a montré que cet écart par rapport au comportement idéal s'explique également par la contribution d'effets de second ordre. A partir de ces premiers résultats, l'exploration de la dépendance de la sensibilité d'une expérience composée d'une impulsion encodée par gradient unique sur B_0 a été faite. Dans le cas d'une expérience homonucléaire et si l'on considère une largeur de pics et des performances de sondes comparables, la dépendance du rapport signal sur bruit (S/B) en fonction du champ magnétique (B_0) est⁶⁹ :

$$\frac{S}{B} \propto n \cdot \gamma^{5/2} \cdot B_0^{3/2} \quad (4.6)$$

où n est le nombre de noyaux observés dans l'échantillon et γ le rapport gyromagnétique des noyaux observés.

Pour un échantillon de concentration homogène, la valeur de l'intégration doit donc prendre en compte l'influence du champ magnétique ($B_0^{3/2}$).

Ainsi les résultats présentés en **Figure 14. b** montrent d'une part que malgré la sélection de coupes plus fines, le passage à plus haut champ permet de bénéficier d'un gain en sensibilité

⁶⁸ N. Giraud, L. Beguin, J. Courtieu, D. Merlet, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3481-3484.

⁶⁹ M. H. Levitt, *Spin Dynamics, Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, First ed., Wiley-Interscience, Chichester, **2001**.

modéré. D'autre part, comme pour la courbe précédente, une déviation est observée pour les champs magnétiques les plus faibles (7,05 T et 9,4 T) par rapport à la courbe de tendance. Cela suggère de nouveau un problème de sélection de coupe. Ces résultats soulignent donc la pertinence de mettre en œuvre les expériences basées sur un encodage spatial en fréquence à hauts champs magnétiques, dans la mesure où cela contribue à améliorer les trois paramètres suivants : la dispersion des fréquences de résonance (*i.e.* la résolution spectrale), la résolution spatiale du processus de sélection de coupe et la sensibilité.

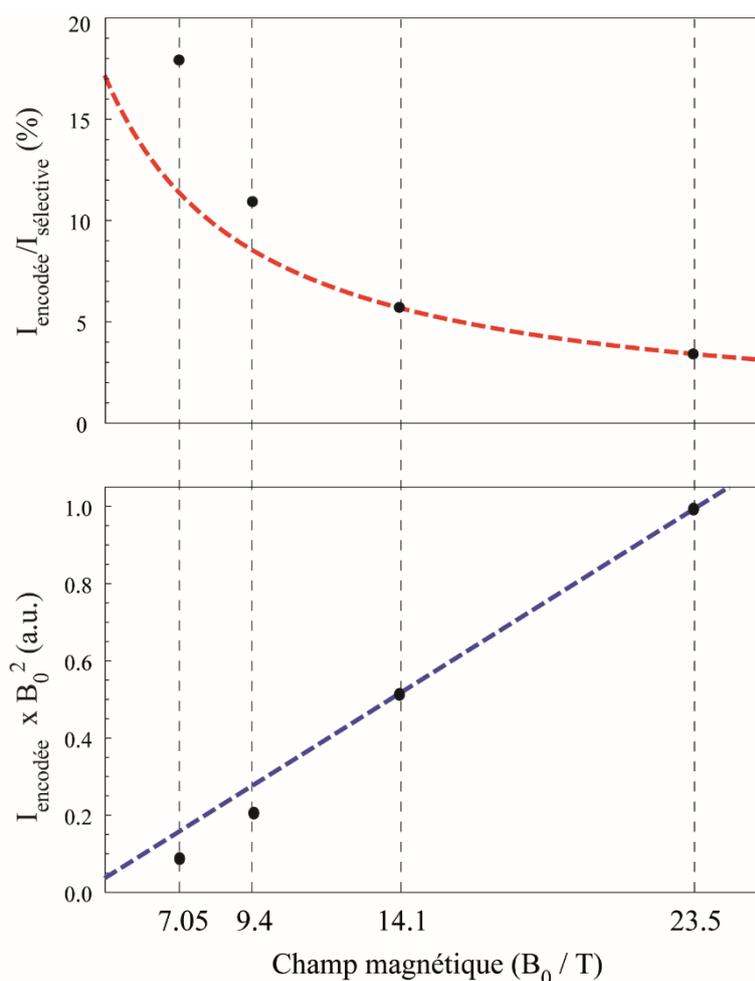


Figure 14. Relation entre sensibilité et force du champ magnétique nucléaire déterminée à partir de données simulées. **a)** Le rapport entre l'intégration du signal du proton H^A résultant d'une excitation sélective avec ($I_{\text{encodée}}$) et sans encodage spatial en fréquence ($I_{\text{sélective}}$) à quatre champs magnétiques différents (7,05 T, 9,4 T, 14,1 T et 23,5 T). La courbe de tendance correspondant au comportement idéal du rapport d'intégration est représentée par une ligne en pointillée rouge. **(b)** L'évolution de l'intégration du signal H^A encodé par gradient, pondéré par $B_0^{3/2}$. La courbe de tendance correspondant à l'évolution idéale de l'intégration est représentée par une ligne pointillée bleue. Ces courbes ont été ajustées au rapport calculé à 23,5 T.

D. Discussion

La principale limitation des techniques hautes résolutions basées sur la méthode ZS concerne la perte en sensibilité quand les protons avec des déplacements chimiques très proches doivent être excités car cela implique l'utilisation d'impulsions très sélectives.⁷⁰ La solution présentée dans cette partie est d'enregistrer les expériences encodées à plus haut champ magnétique. D'une part, la meilleure dispersion des signaux permet d'améliorer la sélectivité des impulsions sélectives tout en conservant la même fenêtre d'excitation. D'autre part, l'augmentation du champ magnétique induit un gain en sensibilité, qui est de l'ordre de 30 % à 23,5 T par rapport à des expériences enregistrées à 14,1 T. Cependant, ce gain est relativement faible par rapport au gain espéré dans le cas d'expériences non encodées qui est de l'ordre de 115 %. Néanmoins, l'encodage spatial est pleinement compatible avec la plupart des techniques d'amélioration de la sensibilité telles que les sondes refroidies par cryogénie⁷¹ qui sont de nos jours disponibles sur les spectromètres modernes.

E. Conclusion

La modélisation de l'impulsion d'excitation encodée a permis de réaliser une analyse détaillée du concept d'encodage spatial en fréquence. La résolution spatiale ainsi que la sensibilité du signal RMN ont été étudiées pour différentes amplitudes de champ magnétique. Il a ainsi été démontré l'intérêt d'acquérir les spectres encodés à haut champ magnétique afin d'améliorer, d'une part la dispersion des signaux et donc la performance de l'encodage spatial en fréquence et d'autre part la sensibilité des expériences encodées.

⁷⁰ M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11867-11869.

⁷¹ H. Kovacs, D. Moskau, M. Spraul, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 131-155.

Chapitre 3. Développements Méthodologiques

A. L'expérience PCR-COSY

Tout d'abord, il y a eu le développement de l'expérience SERF basée sur un écho de spin sélectif qui fournit un spectre permettant d'extraire l'information de couplage entre deux protons sélectionnés. Puis, il y a eu l'expérience G-SERF fondée sur une série d'écho de spins sélectifs qui permet d'obtenir un spectre contenant l'ensemble des informations de couplages impliquant un proton sélectionné. Dans le but d'étudier un système composé de n protons non équivalents et tous couplés entre eux, il est donc nécessaire de réaliser $n(n-1)/2$ expériences SERF ou $n-1$ expériences G-SERF afin d'être certain d'avoir accès à l'ensemble des valeurs de couplage scalaire. Dans la continuité, l'expérience PCR-COSY (Passive Coupling Refocusing - COrrelation SpectroscopY) a été développée afin d'obtenir l'ensemble des informations de couplage en une seule et unique expérience.

1. Le principe de la PCR-COSY

Cette expérience est basée sur deux approches différentes. La première est une approche δ -résolue qui consiste à refocaliser les évolutions de couplage scalaire afin de ne conserver que les informations de corrélation. Elle est basée sur l'utilisation d'un bloc écho de spin combinant une impulsion sélective encodée avec une impulsion non sélective. (**Figure 15. a**) La deuxième partie est une approche J -éditée qui consiste à refocaliser les évolutions de déplacement chimique afin de ne conserver que les informations de couplage scalaire. Elle est basée sur l'utilisation d'un bloc écho de spin combinant deux impulsions sélectives, dont l'une d'entre elles est encodée afin de sélectionner les partenaires de couplage à travers l'échantillon. (**Figure 15. b**)

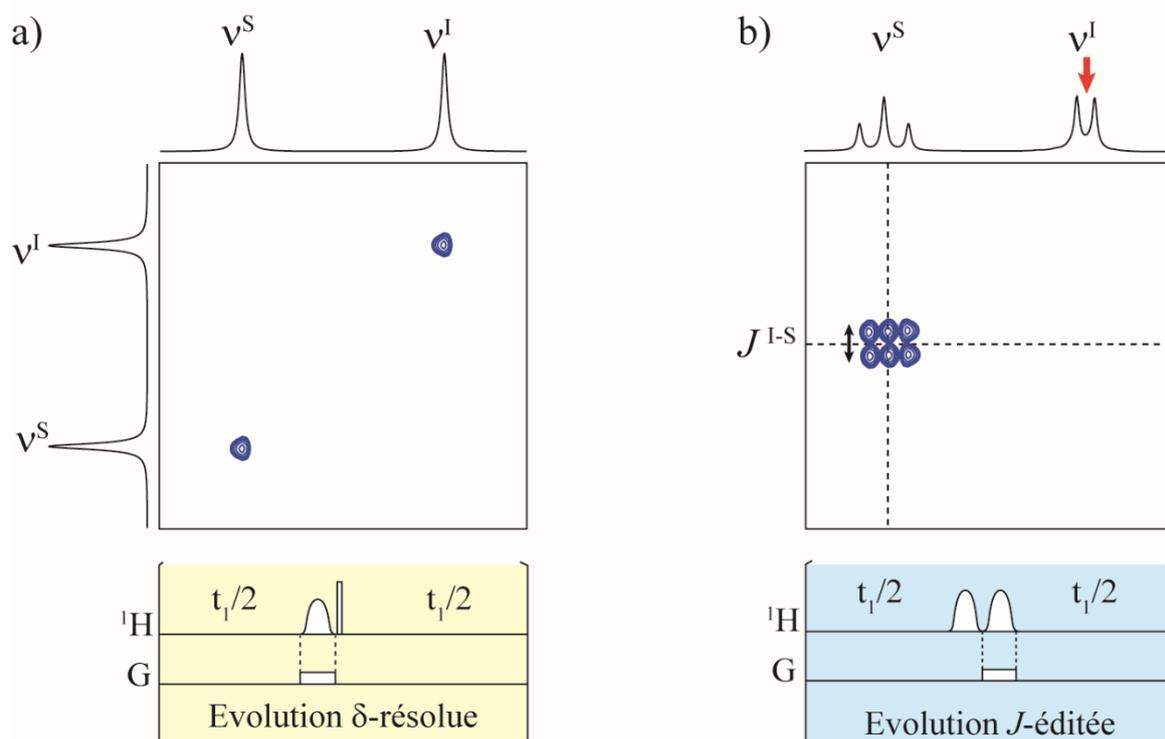


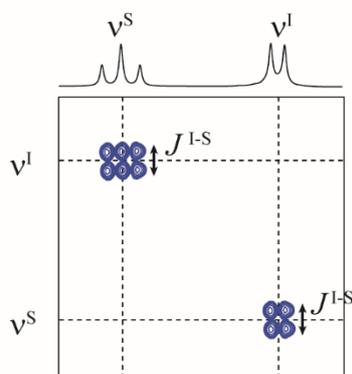
Figure 15. Les différents blocs de la PCR-COSY **a)** Le spectre théorique et la séquence d'impulsions correspondant à l'évolution δ -résolue en t_1 . **(b)** Le spectre théorique G-SERF et la séquence d'impulsions correspondant à l'évolution J -éditée en t_1 . Sur le canal proton (^1H), les formes sinusoïdales et le rectangle blancs correspondent respectivement à une impulsion de refocalisation π sélective et non-sélective. Sur le canal de gradient de champ pulsé (G), les rectangles blancs correspondent à l'application d'un gradient de forme rectangulaire. Le système utilisé dans l'exemple est un système AMX, mais seuls deux des signaux sont présentés sur les spectres théoriques.

Le principe de la PCR-COSY est de combiner ces deux approches afin de rassembler sur un même spectre les informations de corrélation de l'approche δ -résolue avec les informations J -résolues de l'approche J -éditée, tout en rendant ce contenu analytique facilement accessible. **(Figure 16. a)** Dans ce but, le principe de l'encodage spatial en fréquence est étendu à une deuxième dimension de l'espace. L'expérience issue de ce concept est la PCR-COSY⁷² (Passive Coupling Refocusing - COrrrelation SpectroscopY). Elle est composée de deux blocs d'évolution : un bloc δ -résolu et un bloc J -édité dans le cadre d'une expérience multidimensionnelle encodée en fréquence **(Figure 16. b)**. Les délais d'évolution du bloc δ -résolu et du bloc J -édité sont

⁷² N. Giraud, D. Pitoux, J.-M. Ouvrard, D. Merlet, *Chemistry - A European Journal* **2013**, *19*, 12221-12224.

synchronisés afin de permettre la mesure directement sur le spectre des valeurs de couplages à partir des doublets dans la dimension F_1 . Pour cela, les couplages évoluent cinq fois plus longtemps que les déplacements chimiques.

a)



b)

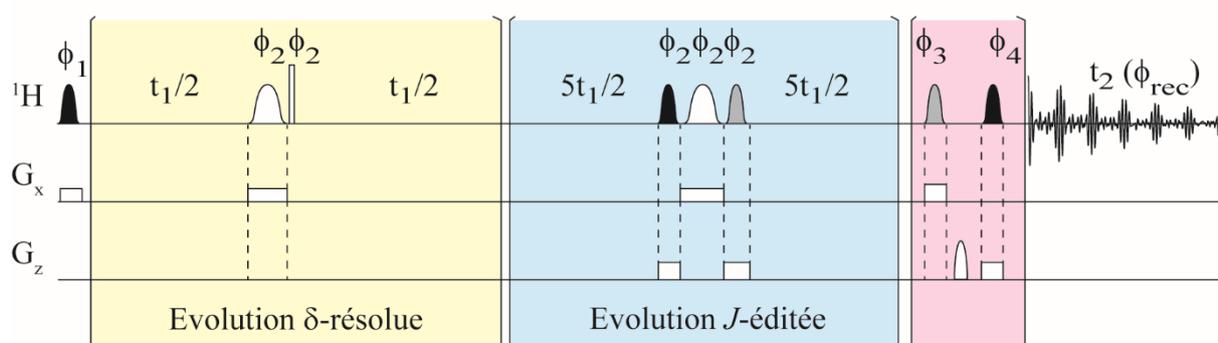


Figure 16. L'expérience PCR-COSY. **a)** Le spectre théorique de l'expérience PCR-COSY. Seuls les signaux de deux des protons apparaissent sur ce spectre théorique. **(b)** La séquence d'impulsions de l'expérience PCR-COSY. Sur le canal proton (^1H), les formes sinusoïdales noires, grises et blanches correspondent respectivement à une impulsion sélective d'excitation $\pi/2$, à une impulsion sélective de basculement-retour (« flip-back ») $\pi/2$ et à une impulsion sélective de refocalisation π ; le rectangle blanc correspond à une impulsion non-sélective de refocalisation π . Sur les canaux des gradients de champ pulsés (G_x et G_z), les rectangles blancs correspondent à l'application d'un gradient de forme rectangulaire (sur x ou z , respectivement) et la forme sinusoïdale blanche correspond à un gradient de forme sinusoïdale sur z . Le cyclage de phase est $\phi_1 = (x, x, x, x, -x, -x, -x, -x)$; $\phi_2 = x$; $\phi_3 = (x, -x)$; $\phi_4 = (x, x, -x, -x)$ et $\phi_{\text{rec}} = (x, x, x, x, -x, -x, -x, -x)$.

Cette séquence d'impulsions est basée sur l'utilisation de deux gradients de champs pulsés, un selon l'axe x et un second selon l'axe z qui permettent aux impulsions sélectives d'exciter sélectivement les spins de fréquences de résonances différentes dans des zones différentes et localisées de l'échantillon. Le principe de ce double encodage spatial en fréquence est illustré

Figure 17. Pendant la période ①, une impulsion sélective encodée selon x excite les protons

ayant une fréquence de résonance $\nu(x)$, dans chaque section verticale x de l'échantillon. Cette impulsion est suivie d'un bloc δ -résolu qui mène à l'évolution des déplacements chimiques découplés protons. Durant la période ②, un bloc J -édité basé sur un encodage spatial selon z est implémenté. Seule l'évolution du couplage scalaire entre les protons ayant une fréquence de résonance $\nu(x)$ et $\nu(z)$ évolue dans le « pixel » correspondant à l'intersection $(x ; z)$. La période ③ correspond au transfert de polarisation du proton de fréquence de résonance $\nu(x)$ vers le proton de fréquence de résonance $\nu(z)$, suivie de l'acquisition du signal. Cette expérience est utilisée pour attribuer et mesurer l'ensemble des couplages ^1H - ^1H à partir d'un seul spectre 2D. Le double encodage spatial en fréquence permet de corrélérer indépendamment chaque paire de noyau dans une région localisée de l'échantillon et cela pour l'ensemble des paires de noyaux de la molécule, durant le même délai d'évolution t_1 . Cette approche montre ainsi qu'il est possible de sélectionner précisément l'information spectrale qui nous intéresse dans le même domaine temporel. Dans notre cas, il s'agit de la sélection d'un déplacement chimique et d'un couplage.

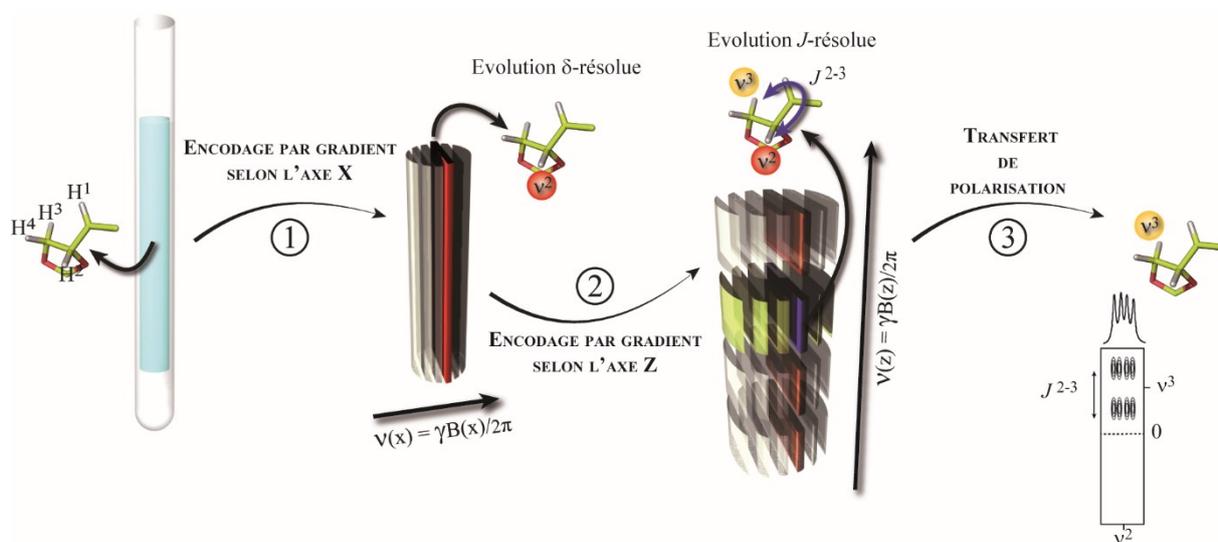


Figure 17. Le principe de l'expérience PCR-COSY qui est illustré avec le signal généré entre les protons H^2 et H^3 dans le système de spin modèle. Une première impulsion encodée spatialement selon l'axe x mène à l'excitation, à la position x , des spins nucléaires $\text{H}(x)$ avec une fréquence de résonance $\nu(x)$. La section verticale dans laquelle les protons H^2 sont excités est colorée en rouge. Une période d'évolution sélective des déplacements chimiques s'ensuit. Puis, l'encodage suivant l'axe z permet de sélectionner des protons différents ; par exemple, la section horizontale dans laquelle est encodée H^3 est présentée en jaune. Un bloc J -édité permet l'évolution sélective du couplage entre $\text{H}(x)$ et $\text{H}(z)$. Le pixel correspondant à l'intersection (x, z) dans laquelle H^2 et H^3 sont corrélés pendant cette période est coloré en bleu.

2. L'application

Le système de spin discuté en **Figure 17** correspond à une modélisation d'une partie du (\pm)(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)3-trans-propenoate d'éthyle. (Figure 18. a) Le spectre PCR-COSY de cette molécule acquis en un jour en utilisant une sonde BBO muni d'une bobine gradient trois axes est présenté en **Figure 18. b**. Le premier point à relever est que le spectre PCR-COSY a globalement la même structure qu'un spectre COSY standard. Ce spectre fournit donc les mêmes informations de corrélation et donc d'attribution que celles apportées par une expérience COSY standard et est analysable avec la même méthode.

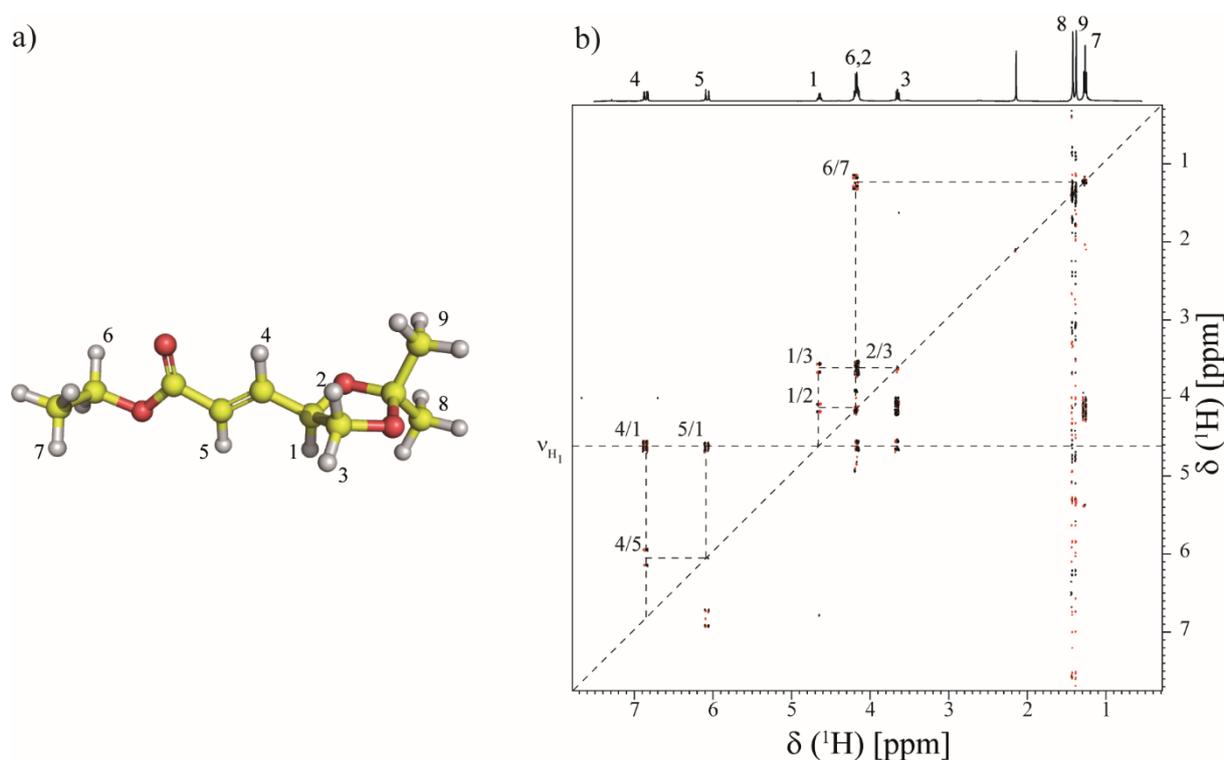


Figure 18. a) Structure de (\pm)(2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)3-trans-propenoate d'éthyle. (b) Spectre 2D PCR-COSY enregistré sur cette molécule.

Le deuxième point à relever est que, comme pour l'expérience G-SERF, l'implémentation d'un bloc de refocalisation sélectif encodé spatialement nous donne des multiplets résolus dans la dimension indirecte. Un agrandissement du spectre correspondant au déplacement chimique du proton 1 en dimension F_1 est présenté sur la **Figure 19. a**. Une série de doublets peuvent être observés aux fréquences de résonances des protons H^2 , H^3 , H^4 et H^5 , ce qui illustre la simplification

apportée pour l'analyse des couplages présents au sein d'une molécule, à partir du spectre proton (Figure 19.b).

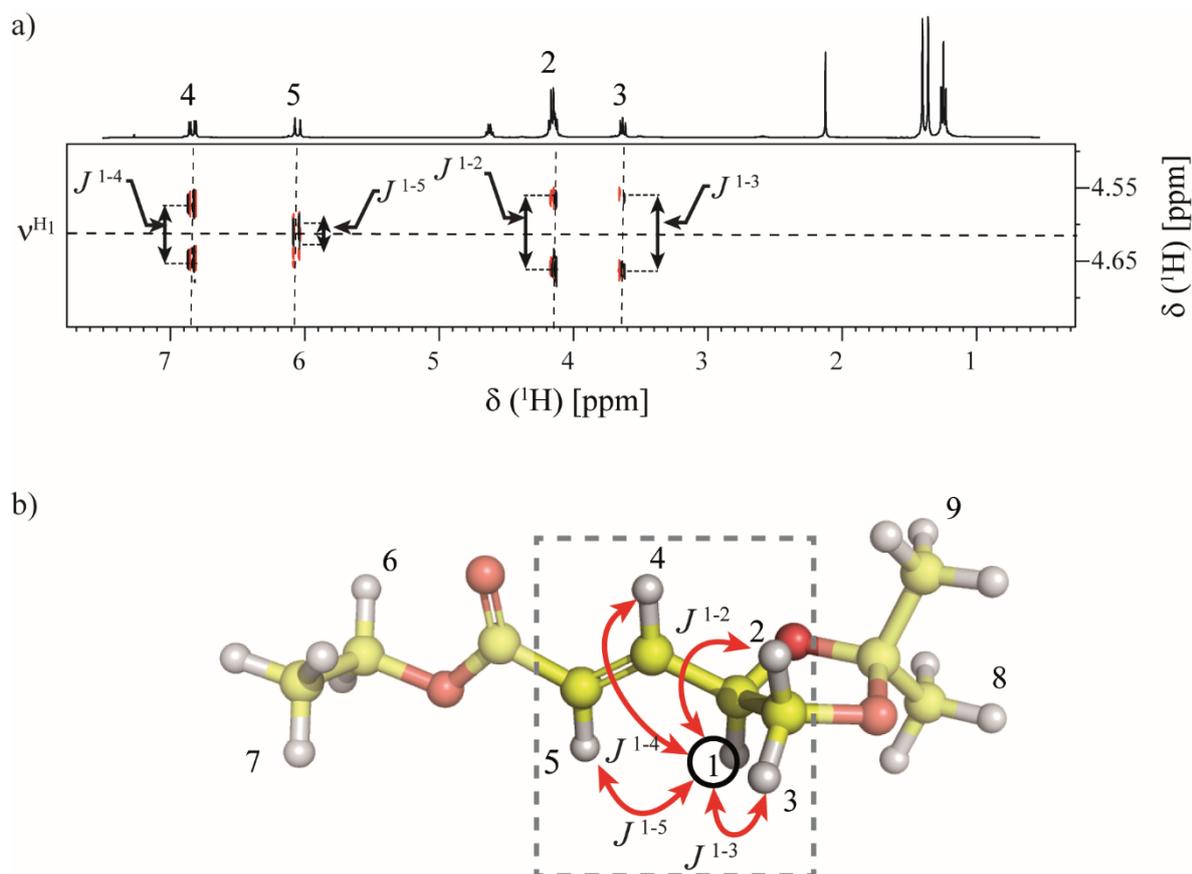


Figure 19. a) Région extraite du spectre PCR-COSY montré Figure 18 et correspondant aux corrélations observées à la fréquence de résonance du proton H¹, dans la dimension indirecte. (b) Ensemble des couplages impliquant le proton H¹ qui ont été sondés par l'expérience PCR-COSY.

Les projections extraites à partir du spectre PCR-COSY (20.a-d) permettent de mesurer les constantes de couplages pour le proton 1 (20.e). On obtient un couplage J^{1-2} de 7,3 Hz, un couplage J^{1-3} de 8.1 Hz, un couplage J^{1-4} de 5,5 Hz et un couplage J^{1-5} de 1,0 Hz. Ces valeurs permettent bien la reconstruction du multiplet observé pour le proton H¹ dans le spectre proton 1D standard. Sans les valeurs de couplages issues de la PCR-COSY, il aurait été difficile d'élucider la structure fine du multiplet de H¹ qui apparaît comme un quadruplet large peu résolu dû aux valeurs de couplages relativement proches. (Figure 21) De plus, la résolution intrinsèque, c'est-à-dire la largeur des raies, est comparable à celle d'un spectre proton standard acquis et traité dans les mêmes conditions, ce qui permet une mesure précise des petits couplages en particulier entre H¹ et H⁵ (20.d)

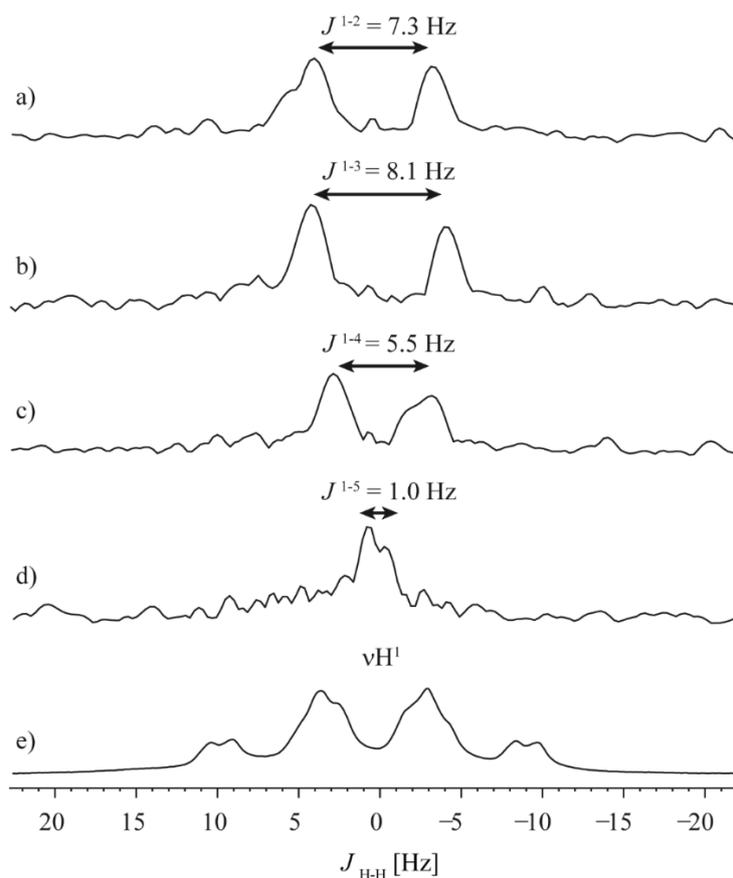


Figure 20. Projections de la dimension F_1 du spectre PCR-COSY calculées autour des corrélations entre H^1 et (a) H^2 , (b) H^3 , (c) H^4 et (d) H^5 . (e) La région du spectre proton 1D correspondant au signal H^1 .

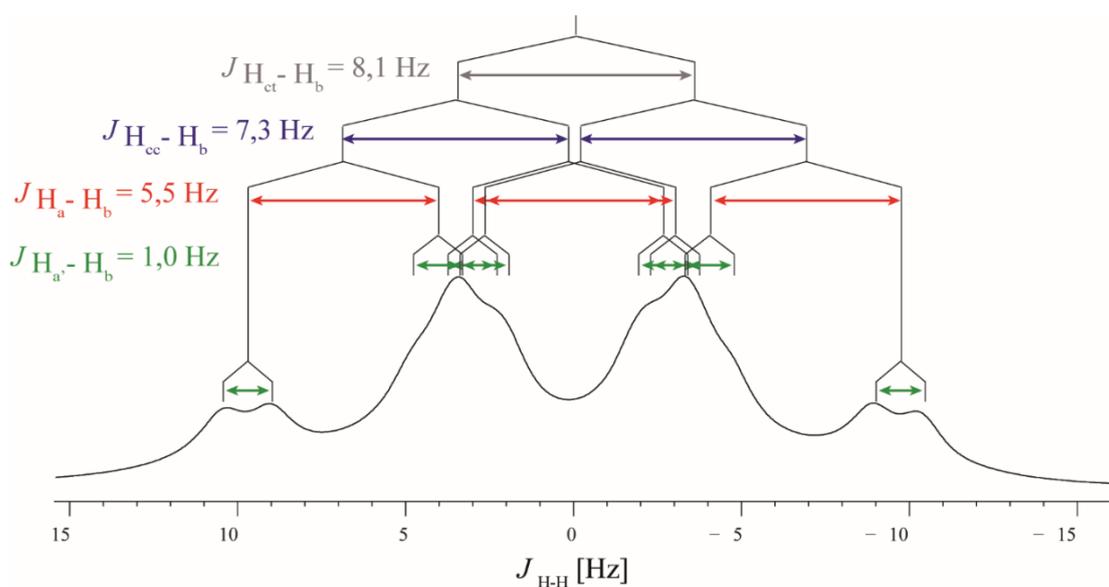


Figure 21. Elucidation de la structure fine du multiplet du proton H^1 .

3. Discussion

La sensibilité est un problème important en RMN. Dans le cas d'expériences encodées, les protons de même fréquence de résonance sont encodés dans une région restreinte de l'échantillon. Le signal détecté à partir de ces coupes s'en voit donc réduit. Cela explique que l'expérience PCR-COSY est moins sensible comparée à des expériences 2D standards pour lesquelles chaque corrélation est générée par la totalité de l'échantillon. Dans le cas de notre étude, le spectre que nous encodons a une largeur spectrale de 6 ppm dans une dimension spatiale et nous utilisons des impulsions sélectives de sélectivité optimisée de 0,2 ppm. Cela revient à diluer chaque site proton, de même fréquence de résonance, par un facteur 33. A cela s'ajoute un second encodage spatial avec les mêmes conditions expérimentales. L'encodage dans deux dimensions de l'espace revient ainsi à diluer chaque site proton par un facteur 33^2 , soit à détecter environ un millième de l'échantillon.

Avant tout, nous remarquons que ce problème est inhérent à l'ensemble des expériences qui utilisent des gradients de champs pulsés pour générer un encodage spatial de l'échantillon. Ces problèmes de sensibilité peuvent être efficacement résolus, en utilisant des sondes refroidies par cryogénie par exemple. L'implémentation de la séquence d'impulsions présentée ici, associée à des techniques d'amélioration de la sensibilité permettrait d'acquérir les spectres PCR-COSY en quelques heures sur des molécules de petite ou moyenne tailles, y compris sur des échantillons peu concentrés.

Pour conclure, la PCR-COSY est une nouvelle expérience RMN de corrélation homonucléaire qui fournit aux chimistes un moyen simple pour attribuer les protons et mesurer l'ensemble de leurs couplages scalaires dans une molécule donnée, en utilisant un seul spectre 2D. Cette expérience est basée sur une utilisation originale des techniques de refocalisation sélective. Elle permet l'édition de l'ensemble des couplages d'une molécule, de façon résolue. De plus, il faut souligner l'intérêt de combiner, de manière contrôlée, les différentes évolutions de spin pour accéder aux informations concernant des sites protons difficiles à atteindre spectralement. Dans le cas de protons appartenant à différents systèmes de spins, il devient possible d'améliorer la dispersion des pics en utilisant celle des partenaires de couplages, pendant que l'élimination des couplages scalaires permet d'atteindre chaque sous-réseau des spins protons. Plus généralement, cette

approche répond aux enjeux majeurs concernant l'attribution et la mesure des interactions spin-spin en proposant une façon originale de regrouper l'ensemble de ces informations dans un spectre unique et simplement analysable. Le concept à la base de cette technique de corrélation ouvre la voie à de futures améliorations à la fois de la résolution et de l'information structurale accessible dans des spectres de corrélation. Il pourrait avant tout permettre d'accélérer les protocoles d'analyses structurales basées sur les données de RMN.

B. L'expérience push-G-SERF

Développer une expérience permettant de générer des spectres de corrélation 2D avec une résolution optimisée dans les deux dimensions n'est pas simple et cela pour deux raisons. Tout d'abord car l'ensemble des séquences d'impulsions de corrélations requièrent l'évolution des couplages scalaires pendant le délai d'évolution t_1 pour corréler les noyaux protons. Cela est clairement incompatible avec l'utilisation d'évolutions découplées pendant t_1 . La deuxième raison est que pour obtenir un pic de corrélation totalement résolu, les signaux protons doivent être découplés pendant t_1 , puis la corrélation doit être générée pendant le temps de mélange, et enfin les signaux protons doivent être découplés pendant t_2 . Un tel spectre « idéal » a été développé par Foroozandeh et al et ne peut être obtenu qu'indirectement par la spectroscopie TOCSY, à travers un traitement des données expérimentales par covariance.⁷³

Dans cette partie, une nouvelle expérience qui combine le potentiel analytique des spectres multidimensionnels de corrélation avec les améliorations de résolution apportées par les spectroscopies δ -résolue et J -résolue est présentée. Elle fournit un spectre résolu dans les deux dimensions afin de simplifier l'extraction des couplages scalaires, notamment dans des zones des spectres présentant d'importants recouvrements de signaux.

1. Le principe de l'expérience push-G-SERF

Cette expérience est basée sur la manipulation sélective de l'information de déplacements chimiques et de couplages scalaires dans deux dimensions spectrales différentes. La séquence d'impulsions de l'expérience push-G-SERF⁷⁴(pure shift gradient-encoded homonuclear selective refocusing) est présentée en **Figure 22**.

Comme pour l'expérience G-SERF, les couplages scalaires impliquant un proton sélectionné évoluent pendant le délai t_1 , alors que les autres couplages sont refocalisés. Pendant le délai t_2 de cette expérience, l'acquisition des données est entrecoupée par une séquence permettant de refocaliser les couplages scalaires. Le FID (Free Induction Decay) est alors reconstitué à partir de fragments de données d'acquisition assez courts pour considérer que les couplages scalaires

⁷³ M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11867-11869.

⁷⁴ D. Pitoux, B. Plainchont, D. Merlet, Z. Hu, D. Bonnaffe, J. Farjon, N. Giraud, *Chemistry* **2015**, *21*, 9044-9047.

n'ont pas le temps d'évoluer. Le traitement des données se fait de manière classique, par transformée de Fourier. A la fin du délai d'évolution t_1 , un filtre z est mis en œuvre afin d'avoir un spectre 2D phasable ce qui permet d'en améliorer la résolution spectrale.

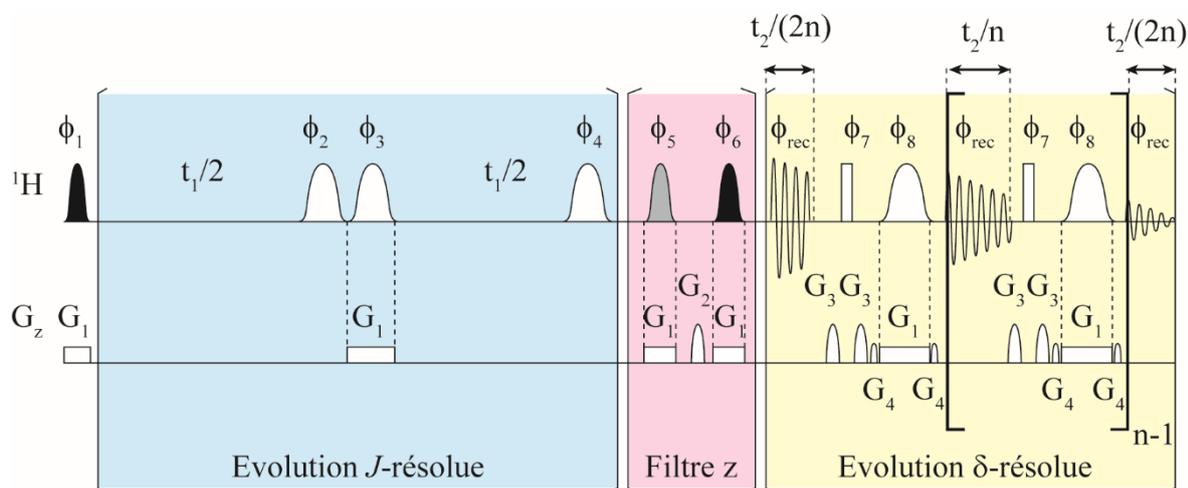


Figure 22. La séquence d'impulsions de l'expérience push-G-SERF. Sur le canal proton (^1H), les formes sinusoidales noires, grises et blanches correspondent respectivement à une impulsion sélective d'excitation, à une impulsion sélective « flip-back » et à une impulsion sélective de refocalisation. Sur le canal de gradient de champ pulsé (G_z), les rectangles blancs correspondent à l'application d'un gradient de forme rectangulaire selon z et les formes sinusoidales blanches à un gradient sur z de forme sinusoidale. Le cyclage de phase est $\phi_1 = (x, -x)$; $\phi_2 = (x, x, -x, -x)$; $\phi_3 = (x, x, -x, -x)$; $\phi_4 = (x, x, -x, -x)$; $\phi_5 = (x, -x, -x, x)$; $\phi_6 = (x, y, -x, -y)$; $\phi_7 = (x, -x)$; $\phi_8 = (-x, x)$ et $\phi_{\text{rec}} = (-y, x)$.

2. L'application sur une molécule d'étude, le trans-2-hexen-1-al

Des spectres push-G-SERF et G-SERF ont été enregistrés à 9,4 T sur un échantillon de trans-2-hexen-1-al pour étudier l'ensemble des couplages impliquant le proton H^2 . (**Figure 23. a**)

Les deux spectres présentent les mêmes informations de couplage dans la dimension indirecte, mais dans la dimension directe de l'expérience push-G-SERF, les multiplets ont été remplacés par des singulets, ce qui facilite la mesure des déplacements chimiques. (**Figure 23. b et c**)

Dans la dimension F_2 , des largeurs de raies de 1 Hz pour la G-SERF et 5 Hz pour la push-G-SERF ont été mesurées à partir des projections calculées. L'élargissement des raies pour le spectre push-G-SERF s'explique par la relaxation transversale qui se produit pendant les blocs de découplage homonucléaire insérés entre les fragments de FID.

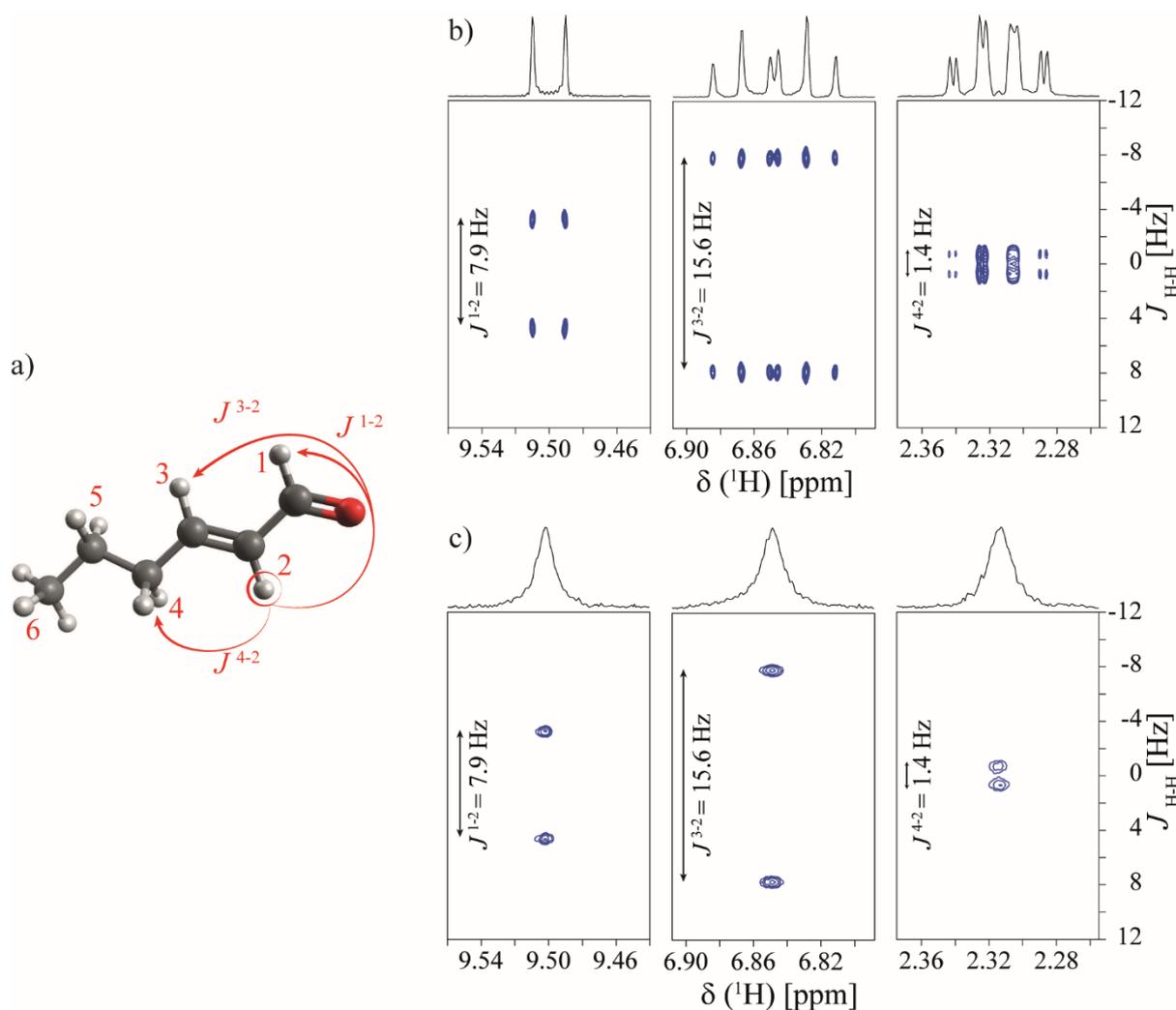


Figure 23. a) Structure du *trans*-2-hexen-1-al. (b) Le spectre G-SERF et c) le spectre push-G-SERF acquis sur le *trans*-2-hexen-1-al à 9,4 T pour étudier les couplages impliquant le proton H^2 ($H^2 = 6,1$ ppm). Les spectres ont été respectivement acquis en 24 et 43 min (Durées différentes liées à un D_1 différent). En (c), le spectre 1D « pure shift » est représenté au-dessus du spectre 2D.

De plus, sur la **Figure 24** sont présentés les projections en dimension F_1 pour les protons H^2 , H^3 et H^4 (**Figure 24. a, b et c**, respectivement) sur les spectres GSERF et push-G-SERF. Les doublets obtenus par les deux séquences sont identiques. La séquence de refocalisation sélective a bien permis de refocaliser les couplages non désirés, ainsi que les inhomogénéités en partie responsables de la largeur des signaux, ce qui permet d'avoir une largeur de raie de l'ordre du Hertz dans la dimension indirecte pour les deux séquences d'impulsions. Une telle résolution spectrale rend possible la mesure des faibles constantes de couplage scalaire, comme $J^{4-2} = 1,4$

Hz, (**Figure 24. c**) ce qui serait impossible sur un spectre d'expériences Quick G-SERF⁷⁵ ou real-time SERF 1D,⁷⁶ où la largeur de raies des expériences 1D est au contraire accentuée par les effets de la relaxation transverse et par les artefacts provenant de l'acquisition directe fragmentée.

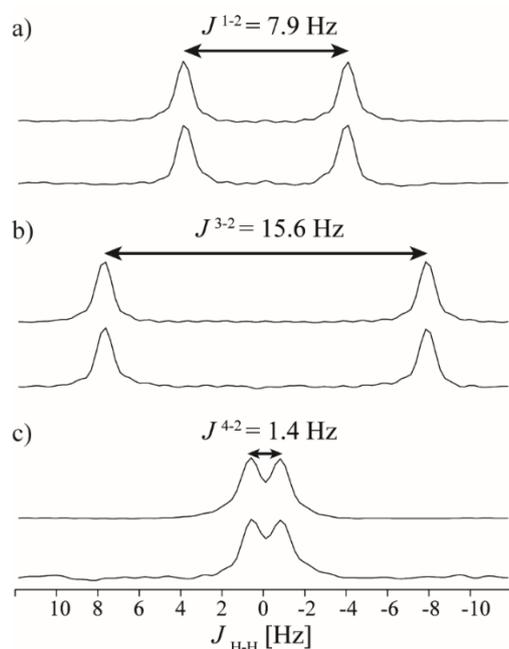


Figure 24. Projections des colonnes calculées à partir des spectres G-SERF (en haut) et push-G-SERF (en bas) enregistrés sur le trans-2-hexan-1-al, pour les protons résonant à (a) 9,50, (b) 6,85 et (c) 2,31 ppm.

3. Discussion

La push-G-SERF est une nouvelle expérience RMN de corrélation homonucléaire permettant aux chimistes de mesurer simplement les valeurs de déplacement chimique et de couplage scalaire. Cette expérience utilise des techniques de refocalisation sélective et de découplage homonucléaire permettant d'obtenir un spectre totalement résolu dans chaque dimension spectrale. Elle pourrait notamment être mise en œuvre en routine.

⁷⁵ N. Lokesh, S. R. Chaudhari, N. Suryaprakash, *Chem Commun (Camb)* **2014**, 50, 15597-15600.

⁷⁶ N. Gubensak, W. M. Fabian, K. Zangger, *Chem Commun (Camb)* **2014**, 50, 12254-12257.

Chapitre 4. Applications
pour l'étude d'un
oligosaccharide synthétique

Les glucides jouent un rôle primordial dans la chimie des êtres vivants ⁷⁷ et leur diversité structurale leur permet d'être impliqués dans des processus variés. Ils sont notamment source d'énergie pour les cellules, précurseurs dans la synthèse des acides aminés ou des acides gras et leurs contributions majeures à d'innombrables processus de protection et de reconnaissance cellulaire expliquent leurs implications dans le développement de nombreuses maladies. ⁷⁸ Dans ce contexte, des stratégies de synthèses de glycosaminoglycanes (GAG) mimétiques ont été développées pour étudier la sélectivité des interactions GAG/ protéine. Le maltotrioside protégé **1** (**Figure 25**) est un intermédiaire de synthèse clé qui a été produit au sein du groupe du Professeur David Bonnaffé (équipe MSMT de l'ICMMO), d'où la nécessité d'obtenir des informations structurales précises. Il est notamment indispensable de contrôler l'absence d'anomérisation fortuite et la régiosélectivité des différentes étapes de synthèse utilisées pour introduire les groupes protecteurs ou le groupement allyle sur l'unité réductrice en position β .

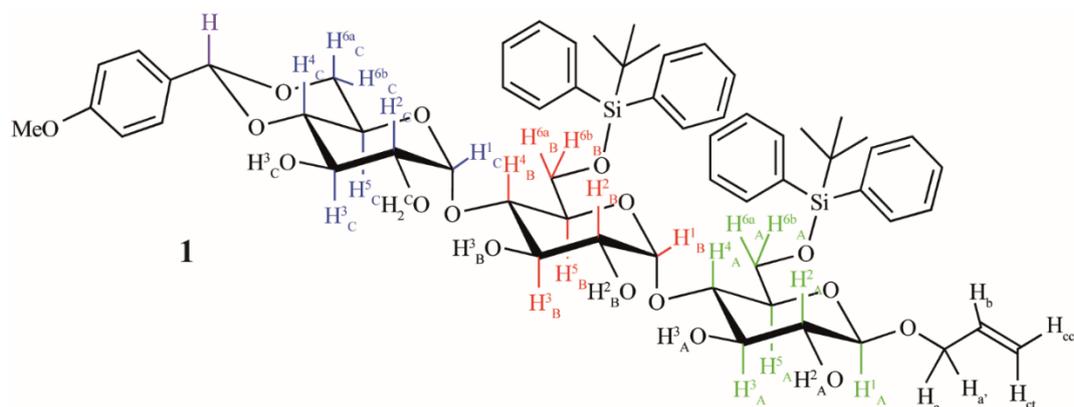


Figure 25. Structure moléculaire du trisaccharide synthétique **1** et la notation de ses protons selon les différentes sous-unités.

Le spectre ^1H encodé enregistré sur **1** à 14,1 T est présenté **Figure 26.a**. De fortes superpositions spectrales apparaissent entre 3,3 et 3,7 ppm et ce même à plus haut champ magnétique (23,5 T ; **Figure 26. b**). En effet, cette molécule est composée d'une répétition de trois unités saccharidiques, par conséquent 15 des 27 protons de cette molécule résonnent dans une gamme de déplacements chimiques de 0,35 ppm. (**Figure 26. c**)

⁷⁷ J. D. Esko, U. Lindahl, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 169-173. ; H. Lortat-Jacob, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 543-548.; D. Bonnaffé, *Comptes Rendus Chimie* **2011**, *14*, 59-73.

⁷⁸ J. Ø. Duus, C. H. Gotfredsen, K. Bock, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4589-4614.

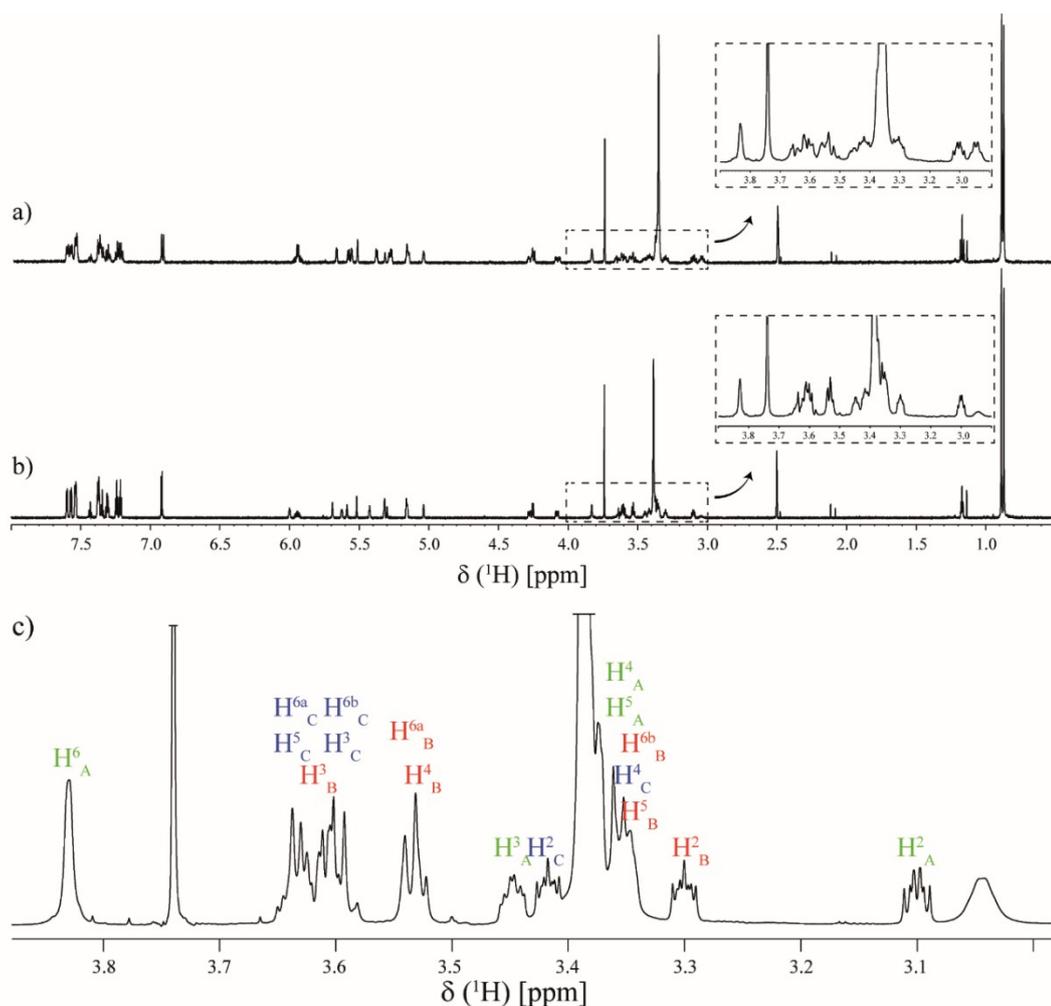


Figure 26. Les spectres du proton encodés spatialement par gradient enregistrés à 14,1 T (a) et à 23,5 T (b) sur l'échantillon du trisaccharide. (c) La région du spectre du proton standard enregistré à 23,5 T présentant les plus importantes superpositions de signaux, avec son attribution.

Le trisaccharide synthétique est donc un composé de choix pour illustrer l'intérêt des différentes méthodologies développées dans le chapitre précédent. Dans cette étude, la question est de déterminer si l'augmentation du champ magnétique peut apporter plus qu'une amélioration de la dispersion spectrale dans le cas d'expériences basées sur un encodage spatial en fréquence. Dans un premier temps, l'influence du champ magnétique sur les techniques de découplage et de refocalisation sélective basées sur un encodage spatial en fréquence est étudiée. Puis, une stratégie pour attribuer le spectre proton du trisaccharide à partir d'expériences encodées est présentée. Pour finir, l'expérience push-G-SERF présentée dans le chapitre précédent sera utilisée sur cet échantillon complexe.

A. Influence du champ magnétique sur les expériences basées sur un encodage spatial en fréquence

Dans cette partie, l'étude expérimentale de l'influence du champ magnétique sur les expériences RMN utilisant un encodage spatial en fréquence est présentée. Un des intérêts d'augmenter le champ magnétique est d'améliorer la dispersion des signaux sur les spectres RMN. Le sujet de cette étude est de déterminer si travailler à plus haut champ apporte plus qu'une simple dispersion de signaux dans le cas d'expériences encodées. Afin de répondre à cette question, deux classes de blocs de refocalisation d'écho de spin, à savoir δ -résolue et J -éditée, seront comparées à deux champs magnétiques différents.

1. Evolutions δ -résolues

Le bloc de refocalisation classiquement mis en œuvre pour réaliser des évolutions δ -résolues est composé d'une impulsion sélective π encodée par gradient avec une impulsion non-sélective π au milieu du délai d'évolution indirect. Il est important de remarquer que l'efficacité du découplage homonucléaire dépend principalement de la capacité de l'encodage spatial en fréquence à exciter chaque proton dans des coupes distinctes de l'échantillon. Cette technique est mise en œuvre dans la dimension indirecte d'un spectre TOCSY.⁷⁹ Une version légèrement modifiée de la version originale ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY⁸⁰ a été mise en œuvre. Contrairement à la version originale de la séquence d'impulsions initialement proposée par Zangger et Sterk, l'impulsion π non-sélective au centre du bloc d'évolution δ -résolu n'est pas encodée par un gradient de champ pulsé. (**Figure 27**)

⁷⁹ L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1983**, 53, 521-528.

⁸⁰ K. Zangger, H. Sterk, *J. Magn. Reson.* **1997**, 124, 486-489.

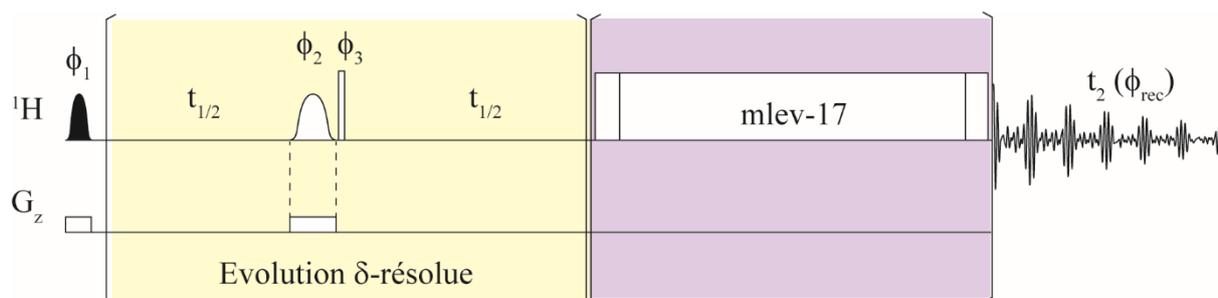


Figure 27. La séquence d'impulsions de l'expérience ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY. Sur le canal proton (^1H), les formes sinusoïdales noires et blanches correspondent respectivement à une impulsion sélective d'excitation $\pi/2$ et de refocalisation π , le rectangle blanc correspond à une impulsion non-sélective π . Sur le canal de gradient de champ pulsé (G_z), les rectangles blancs correspondent à un gradient z de forme rectangulaire. Le cyclage de phase est $\phi_1 = (x, -x, -x, x)$; $\phi_2 = (x, x, -x, -x)$; $\phi_3 = (x, x, -x, -x)$ et $\phi_{\text{rec}} = (x, -x, -x, x)$.

Des spectres TOCSY standards ont été enregistrés en parallèle des expériences ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY, d'une part pour montrer l'intérêt de la version encodée de l'expérience TOCSY et d'autre part afin de les utiliser comme spectres de références pour confirmer la position des corrélations. Dans un premier temps, les spectres TOCSY et les spectres ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY ont été enregistrés à 14.1 T sur le trisaccharide synthétique. La région entre 4,8 et 6,3 ppm en F_1 et entre 2,8 et 4,6 ppm en F_2 est présentée en **Figure 28. a** (TOCSY) et **Figure 28. b** (ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY). Les deux spectres présentent essentiellement les mêmes corrélations, cependant le spectre standard TOCSY présente des corrélations avec des structures en multiplets dans les deux dimensions spectrales, alors que les corrélations du spectre ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY ont une structure en singulet le long de la dimension indirecte. Ainsi, pour la corrélation entre H_{ct} (5,31 ppm) et H_{a} (4,28 ppm) la structure en multiplet de plus de 20 Hz de large qui est observée sur le spectre TOCSY est réduite à une structure en singulet sur son équivalent encodé. Dans ce cas, le découplage homonucléaire mène à une meilleure séparation de la corrélation H_{ct} - H_{a} et de sa corrélation voisine entre OH_{A}^2 (5,32 ppm) et H_{A}^1 (4,25 ppm). (Encadré **Figure 28**)

La région autour de la diagonale entre 2,8 et 4,6 ppm présentée en **Figure 29. a** (TOCSY) et **Figure 29. b** (ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY) présente également une réduction de la largeur des pics dans la dimension indirecte dans le cas de l'expérience encodée par rapport à l'expérience non-encodée. En revanche, certaines corrélations présentes sur le spectre TOCSY ne figurent pas sur le spectre ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY représenté, telles que $H^3_A-H^1_A$ (3,45-4,25 ppm), $H^3_A-H^6_A$ (3,45-3,83 ppm), $H^2_A-H^3_A$ (3,10-3,45 ppm). Les expériences TOCSY et ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY étant enregistrées avec respectivement 4 et 8 scans, cela démontre expérimentalement la plus faible sensibilité des expériences encodées par rapport à la version non-encodée.

La région autour de la diagonale entre 3,2 et 3,7 ppm présente d'importants recouvrements de signaux. Cette région est présentée pour l'expérience TOCSY en **Figure 30. a** et pour l'expérience ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY en **Figure 30. b**. Dans un premier temps, la faible dispersion des signaux dans cette région ne permet pas de distinguer les corrélations entre H^5_B et H^3_B (3,35 et 4,61 ppm), entre H^4_C et H^3_C (3,36 et 3,60 ppm) et entre H^4_C et H^5_C (3,36 et 3,64 ppm) les unes des autres, que ce soit dans l'expérience TOCSY ou dans l'expérience ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY. Cela montre la nécessité d'augmenter la dispersion des signaux. Dans un deuxième temps, pour les protons ayant des déplacements chimiques proches, la performance du découplage homonucléaire est diminuée au point que certaines corrélations ne peuvent être détectées sur le spectre ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY (**Figure 30. b**) alors qu'elles l'étaient sur le spectre TOCSY. (**Figure 30. a**) C'est notamment le cas pour le pic de corrélation entre H^4_B et H^3_B (3,54 et 3,61 ppm) ce qui met en avant la nécessité d'améliorer la sélectivité spatiale des impulsions dans les processus d'encodage spatial en fréquence. Comme cela a été démontré dans le chapitre 2, une des méthodes pour augmenter la sélectivité des impulsions, tout en augmentant la dispersion des signaux, est d'enregistrer les expériences à plus haut champ magnétique tout en gardant les autres paramètres constants.

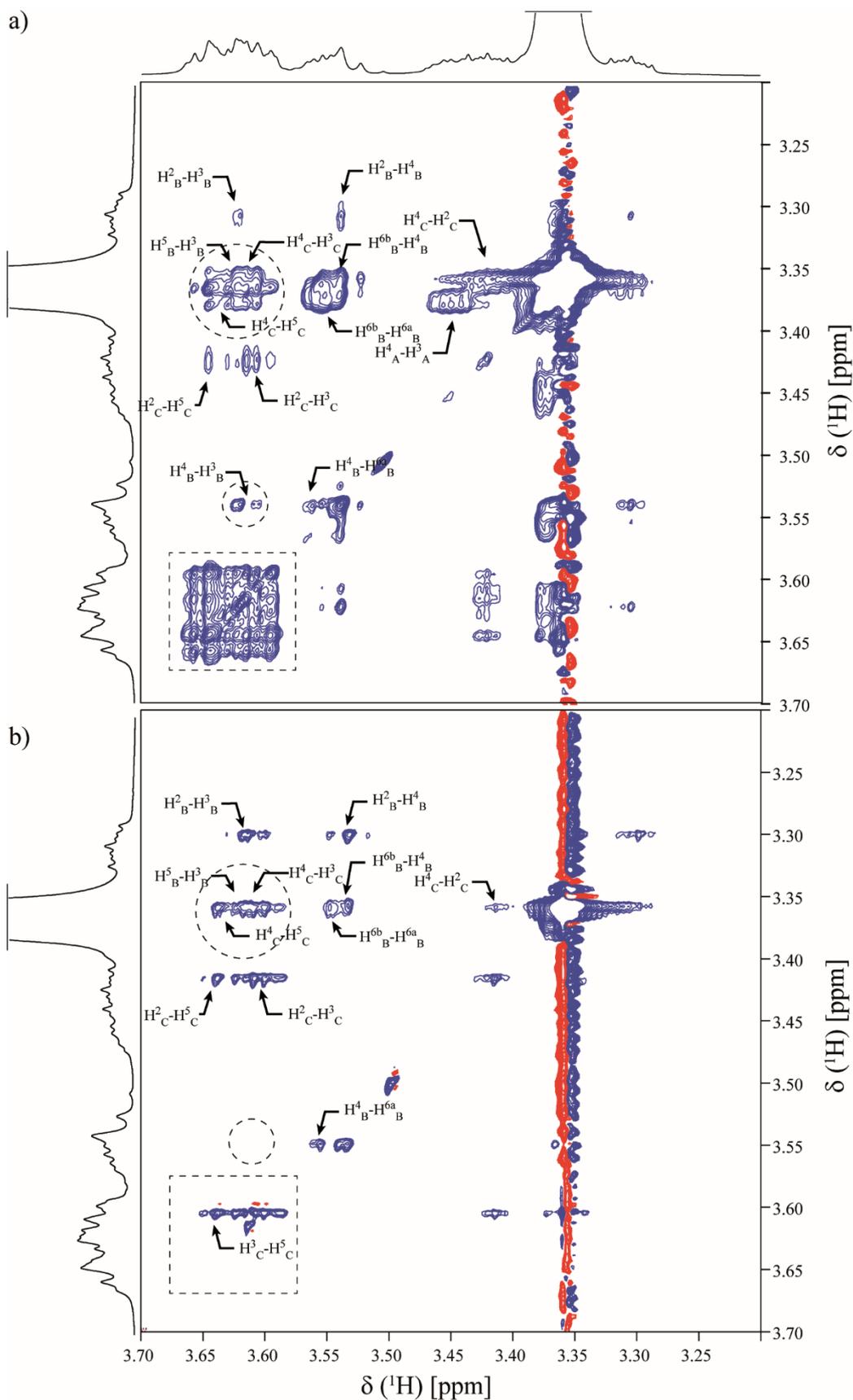


Figure 30. Régions élargies des spectres TOCSY (a) et ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY (b) enregistrés à 14,1 T.

Les expériences TOCSY et ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY, de la même zone que précédemment, enregistrées à 23,5 T sont respectivement présentées en **Figure 31. a et b**. Dans un premier temps, malgré la meilleure dispersion des fréquences de résonances des protons qui contribue à améliorer la qualité des spectres TOCSY, des superpositions de pics sont toujours observées pour les corrélations entre H^5_B et H^3_B (3,35 et 4,61 ppm), entre H^4_C et H^3_C (3,36 et 3,60 ppm) et entre H^4_C et H^5_C (3,36 et 3,64 ppm). En revanche, la même région du spectre ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY montre comme prévu la simplification des structures des multiplets dans la dimension indirecte permettant d'obtenir des signaux résolus. Dans un deuxième temps, on remarque que le pic de corrélation entre H^4_B et H^3_B (3,54 et 3,61 ppm) est présent sur le spectre ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY enregistré à 23,5 T, alors qu'il était absent sur celui enregistré à 14,1 T. Le découplage homonucléaire est donc plus efficace pour l'expérience ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY enregistré à 23,5 T que pour l'expérience équivalente enregistrée à 14,1 T. Cela suggère que signaux sont encodés dans des coupes distinctes à 23,5 T, ce qui n'était pas le cas à 14,1 T. Les seules distorsions visibles résultent d'une dérive du champ magnétique statique qui n'a pas été totalement compensée par le dispositif de lock.

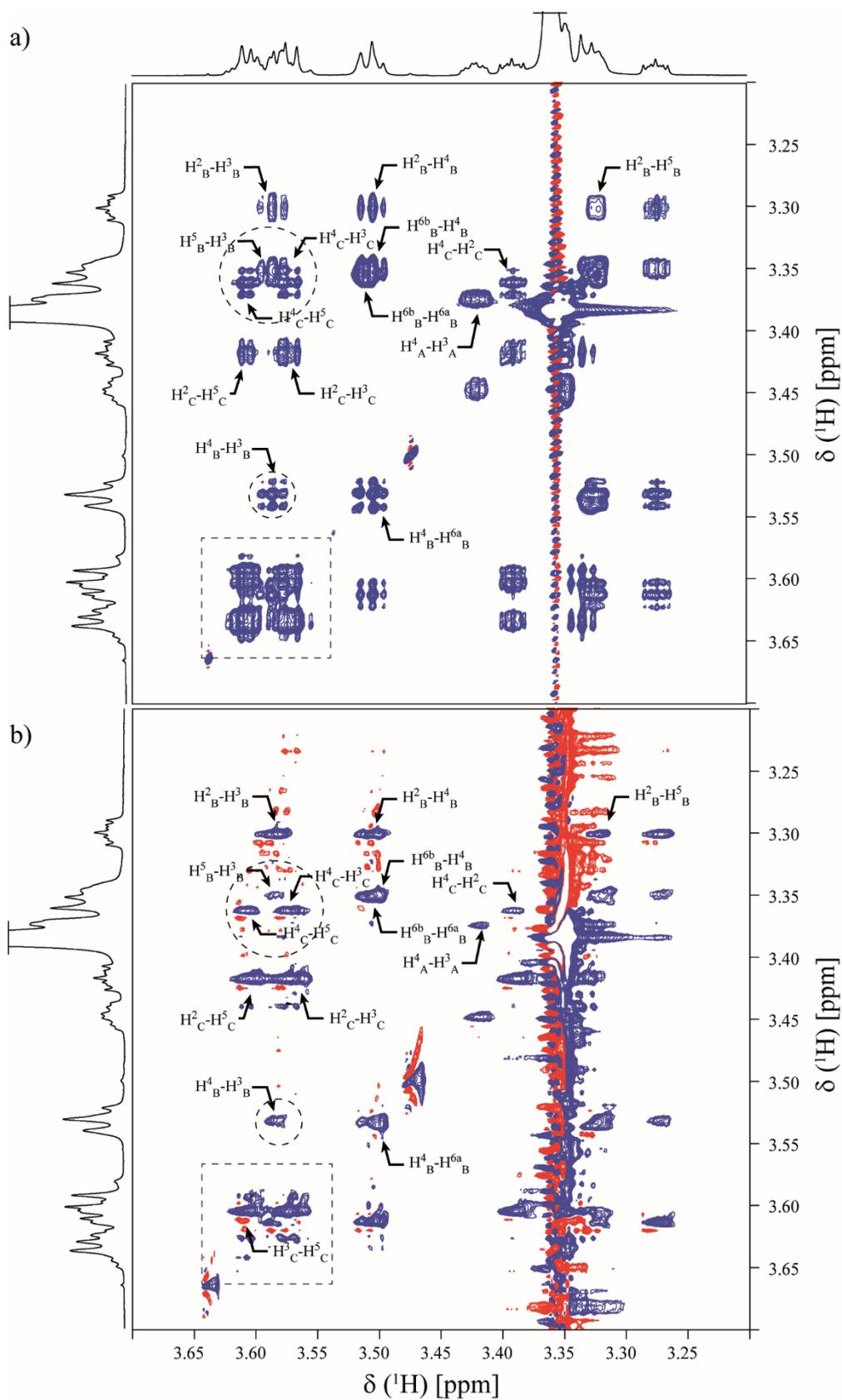


Figure 31. Régions élargies des spectres TOCSY (a) et ω -1-broadband homonuclear decoupled TOCSY (b) enregistrés à 23,5 T.

Pour conclure cette première partie, les résultats montrent que l'augmentation du champ magnétique améliore d'une part la dispersion des signaux, mais également les performances des séquences de découplage homonucléaire basées sur un encodage spatial en fréquence grâce à la sélection de chaque signal dans des coupes distinctes de l'échantillon.

2. Evolutions J -éditées

Dans cette section, l'influence du champ magnétique sur la spectroscopie J -éditée est étudiée à travers l'acquisition de spectres G-SERF acquis sur le trisaccharide synthétique à 14,1 et 23,5 T. Les spectres sont représentés sur les **Figure 32. a, b, c et d**. L'impulsion de refocalisation non-encodée est paramétrée pour éditer les couplages impliquant le proton H_b (5,94 ppm). Pour les deux champs magnétiques, une série de multiplets est observée aux déplacements chimiques de chaque partenaire de couplage et permet de facilement attribuer les couplages scalaires entre H_b et H_{ct} (5,32 ppm, $J_{H_b-H_{ct}}=17,3$ Hz), H_{cc} (5,15 ppm, $J_{H_b-H_{cc}}=10,5$ Hz), $H_{a'}$ (4,28 ppm, $J_{H_b-H_{a'}}=4,9$ Hz) et H_a (4,08 ppm, $J_{H_b-H_a}=6,1$ Hz).

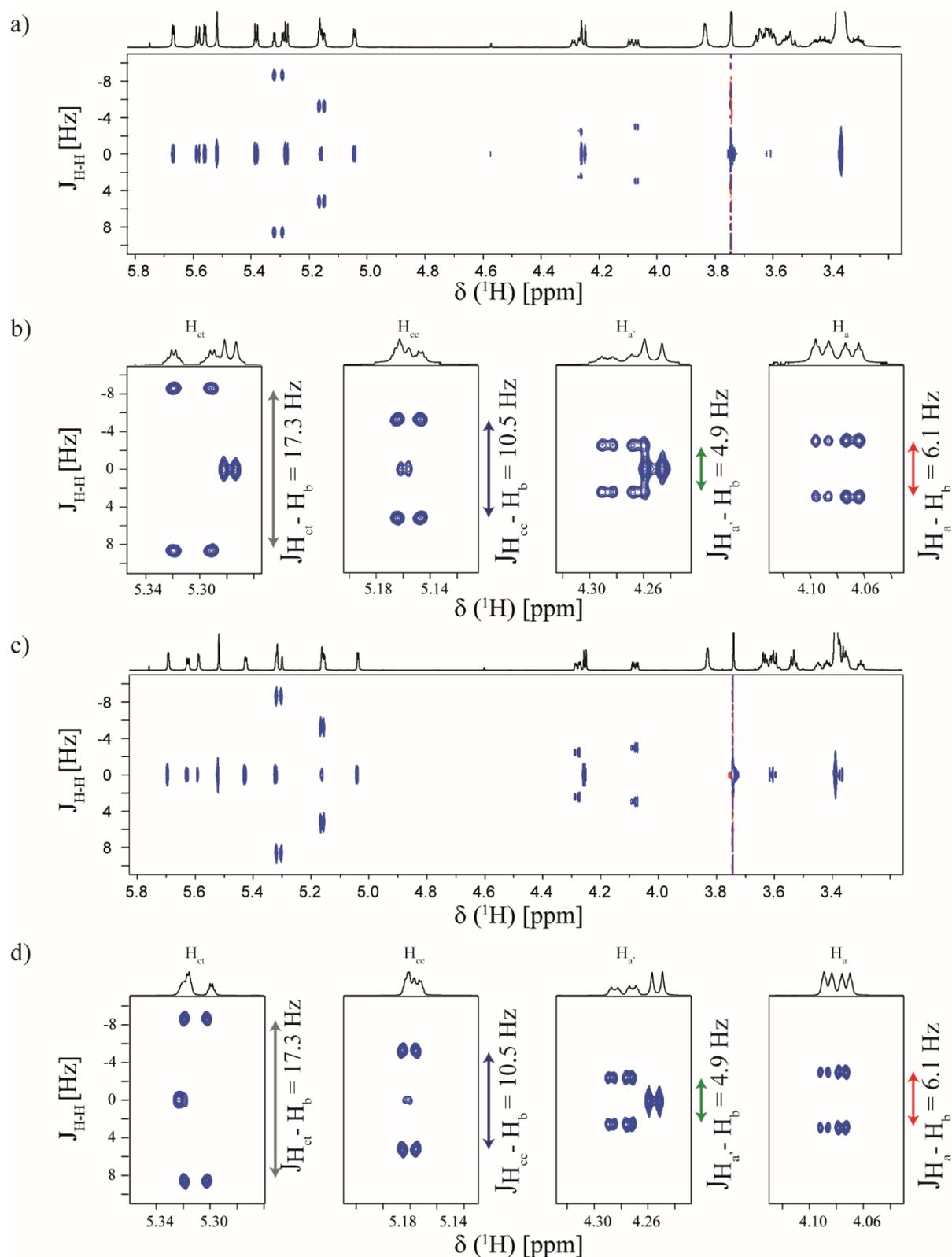


Figure 32. Spectres G-SERF enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 14,1 T (a et b) et à 23,5 T (c et d). La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion de refocalisation non-encodée a été paramétrée à la fréquence de résonance de H_b (5,94 ppm). La durée de l'impulsion semi-sélective a été calibrée pour exciter 20 Hz. Chaque spectre a été acquis en 4 h.

Ces couplages permettent de reconstruire la structure fine du multiplet observé pour H_b sur le spectre 1H standard, (**Figure 33**) ce qui illustre la simplification apportée par l'expérience G-SERF dans le processus d'analyse des couplages scalaires. Comme pour les expériences δ -résolues basées sur un encodage spatial en fréquence, la qualité des expériences J -éditées s'appuie sur la capacité des impulsions encodées par gradient à réaliser un encodage spatial en fréquence avec une résolution spatiale suffisante. Pour cela, il est nécessaire que l'écart entre les fréquences de résonance des protons couplés avec H_b soit plus large que la sélectivité des impulsions sélectives encodées dans le bloc de refocalisation. Cette condition est totalement remplie même à 14,1 T, où l'écart le plus petit mesuré entre H_{ct} et H_{cc} (96 Hz) est plus large que la sélectivité des impulsions π encodées (20 Hz), ce qui assure que H_b et ses partenaires de couplages sont sélectionnés dans des coupes différentes de l'échantillon.

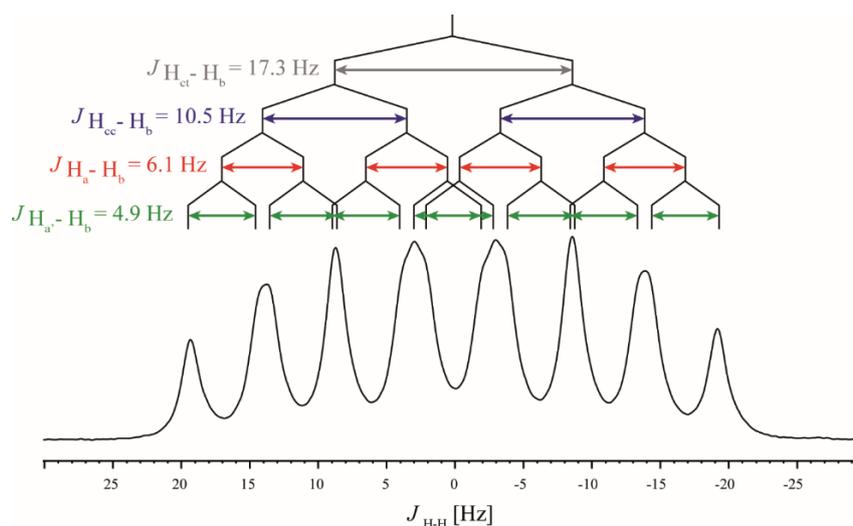


Figure 33. Le détail de la structure fine du multiplet du proton H_b qui peut être déduit des mesures de couplages réalisées sur les données G-SERF (**Figure 32**). Le signal expérimental correspond au signal du proton H_b observé sur le spectre proton standard enregistré à 23,5 T.

Une autre série d'expériences G-SERF a été réalisée pour éditer les partenaires de couplages impliquant H^3_B et H^3_C qui résonnent autour de 3,61 ppm. Cela représente un obstacle intéressant pour la mise en place d'un encodage spatial en fréquence efficace car cinq protons ont des déplacements chimiques proches de 3,61 ppm (H^3_B , H^3_C , H^5_C , H^6_C et $H^{6'}_C$). Sur le spectre G-SERF acquis à 14,1 T (**Figure 34. a**), une série de doublets est attribuée aux couplages scalaires entre OH^3_B et H^3_B (5,67 ppm, $J_{OH^3_B-H^3_B}=2,8$ Hz), entre H^4_B et H^3_B (3,54 ppm, $J_{H^4_B-H^3_B}=8,6$ Hz) et

entre H^2_B et H^3_B (3,30 ppm, $J_{H^2_B-H^3_B}=9,4$ Hz) d'une part et entre OH^3_C et H^3_C (5,38 ppm, $J_{OH^3_C-H^3_C}=5,1$ Hz) et entre H^2_C et H^3_C (3,42 ppm, $J_{H^2_C-H^3_C}=9,1$ Hz) d'autre part. Cependant, il n'y a pas de multiplet correspondant au couplage entre H^3_C , H^4_C , H^5_C , H^6_C et H^6_C .

Les mêmes spectres G-SERF ont été enregistrés à 23,5 T (**Figure 34. b**). En plus des doublets déjà observés à 14,1 T, un autre multiplet est obtenu au déplacement chimique de H^4_C (3,36 ppm) et son éclatement correspond à la somme des couplages scalaires avec H^3_C et H^5_C (3,36 ppm, $J_{H^4_C-H^3_C} + J_{H^4_C-H^5_C}=17,7$ Hz) ce qui suggère que H^3_C et H^5_C ont été sélectionnés dans la même coupe permettant l'évolution des couplages scalaires pendant l'écho de spin sélectif encodé. Il faut noter que la multiplicité de ce signal ne correspond pas à une multiplicité dite classique, ce qui suggère un problème lié à la sélectivité de l'impulsion d'excitation.

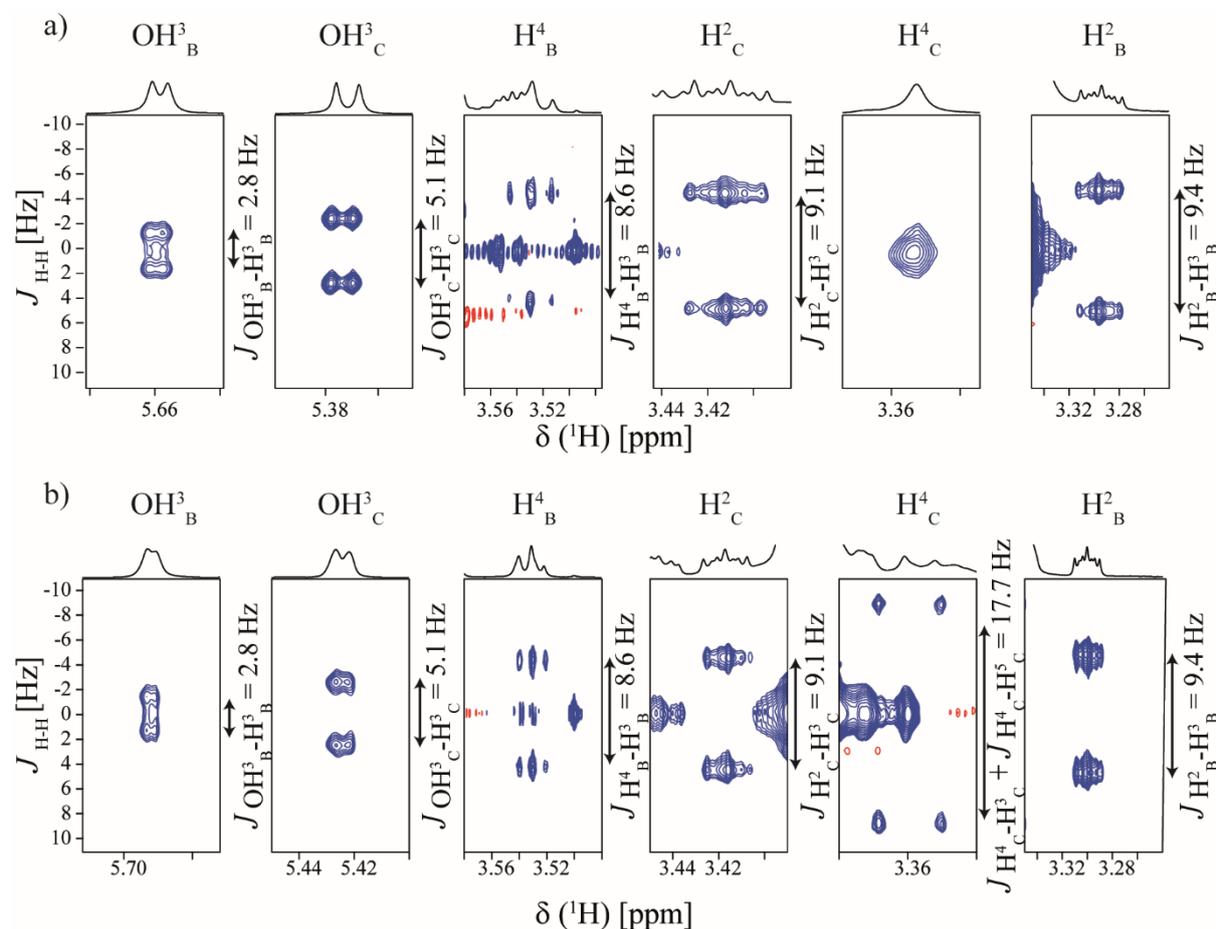


Figure 34. Régions des spectres G-SERF enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 14,1 T (a) et à 23,5 T (b). La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion de refocalisation non-encodée a été réglé à la fréquence de résonance de H^3_B et H^3_C (3,61 ppm). La durée de l'impulsion semi-sélective a été calibrée pour exciter 20 Hz. Chaque spectre a été acquis en 4 h.

Pour conclure pour cette partie, des spectres G-SERF ont été enregistrés sur deux systèmes de spins indépendants à partir d'un trisaccharide synthétique à deux champs magnétiques différents. La complexité spectrale de cette molécule a permis d'illustrer l'importance de la sélectivité des impulsions sélectives utilisées dans des séquences d'impulsions de refocalisation sélectives basées sur un encodage spatial en fréquence. Cette étude montre ainsi l'apport des hauts champs magnétiques pour réaliser une refocalisation sélective dans chaque région restreinte de l'échantillon entre des protons de déplacements chimiques très proches.

3. Discussion

Dans cette partie, l'effet de la force du champ magnétique sur les expériences encodées spatialement en fréquence, que ce soit des expériences de corrélation avec découplage homonucléaire dans la dimension indirecte ou des expériences J -éditée, a été étudié. Cette étude a tout d'abord montré le potentiel des expériences basées sur un encodage spatial en fréquence à améliorer la dispersion des signaux, que ce soit l'expérience ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY ou l'expérience G-SERF. Elle a notamment montré l'importance d'encoder chaque signal dans des coupes distinctes de l'échantillon et cela même pour les signaux de déplacements chimiques très proches dans le but d'avoir un encodage efficace. En effet, les améliorations de résolution résultant des techniques de découplage homonucléaire et de refocalisation sélective sont systématiquement meilleures quand l'expérience est réalisée à plus haut champ magnétique car la meilleure dispersion des signaux permet une meilleure sélectivité spatiale des impulsions encodées. Pour finir, les améliorations obtenues à très haut champ à travers les expériences de corrélation avec découplage homonucléaire dans la dimension indirecte et J -éditée ouvrent la voie à un protocole simple et efficace pour extraire les déplacements chimiques et les couplages scalaires homonucléaires des spectres protons surchargés, ce qui devrait faciliter l'analyse structurale de glucides complexes par RMN.

B. Etude de la stéréochimie de l'oligosaccharide par RMN

encodée

Les importants recouvrements de signaux autour de 3,5 ppm sont à l'origine de difficultés pour analyser les spectres issus des expériences de corrélation standards telle que l'expérience COSY (**Figure 35. a et b**). En effet, les chemins d'attribution établis grâce à ce type d'expérience se superposent, ce qui ne permet pas une attribution simple et rapide. De plus, l'attribution sans ambiguïtés de l'ensemble des signaux du spectre proton d'oligosaccharides se révèle souvent difficile. Diverses stratégies ont été proposées dans le passé pour réaliser une étude complète et précise de ce type de composé, mais elles nécessitent généralement l'acquisition de plusieurs spectres de corrélation homonucléaires et hétéronucléaires spécifiques.⁸¹ Le but de cette partie est de démontrer que la spectroscopie encodée par gradient est une méthode générale et efficace permettant de fournir une attribution totale du spectre proton et une mesure résolue des couplages scalaires de molécules telles que les oligosaccharides. Les expériences utilisées pour cette étude sont celles présentées dans la partie précédente, à savoir les expériences G-SERF et ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY.

⁸¹ B. Plainchont, A. Martinez, S. Tisse, J. P. Bouillon, F. Pilard, J. M. Wieruszkeski, G. Lippens, D. Jeannerat, J. M. Nuzillard, *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 781-787.

1. Principe de l'extraction des valeurs de couplages par l'expérience G-SERF

Dans le but d'extraire les valeurs de couplages nécessaires à l'étude structurale du trisaccharide, l'expérience G-SERF est utilisée. Un spectre G-SERF a été enregistré sur le trisaccharide à 23,5 T afin d'éditer l'ensemble des couplages impliquant les protons résonnant autour de 3,61 ppm (H^3_B et H^3_C). (**Figure 36. a**) Les agrandissements des régions d'intérêt du spectre G-SERF (**Figure 36. b**) présentent une série de doublets résolus dans la dimension indirecte correspondant aux couplages scalaires entre OH^3_B et H^3_B (5,67 ppm, $J = 2,8$ Hz), entre OH^3_C et H^3_C (5,38 ppm, $J = 5,1$ Hz), entre H^4_B et H^3_B (3,54 ppm, $J = 8,6$ Hz), entre H^2_C et H^3_C (3,42 ppm, $J = 9,1$ Hz), entre H^4_C et H^3_C , entre H^4_C et H^5_C (3,36 ppm, $J_{H^4_C-H^3_C} + J_{H^4_C-H^5_C} = 8,6$ Hz) et entre H^2_B et H^3_B (3,30 ppm, $J = 9,4$ Hz). Dans un premier temps, il est important de constater que dans cette expérience, les couplages ont été mesurés sur des doublets apparaissant aux déplacements chimiques des partenaires de couplages dont la dispersion assure une attribution sans ambiguïté. Dans un deuxième temps, la présence d'une dimension J -résolue dans le spectre de corrélation permet une mesure précise des couplages scalaires et évite la superposition de signaux étant donné que le signal de tout proton non-couplé au proton édité prend la forme d'un singulet.

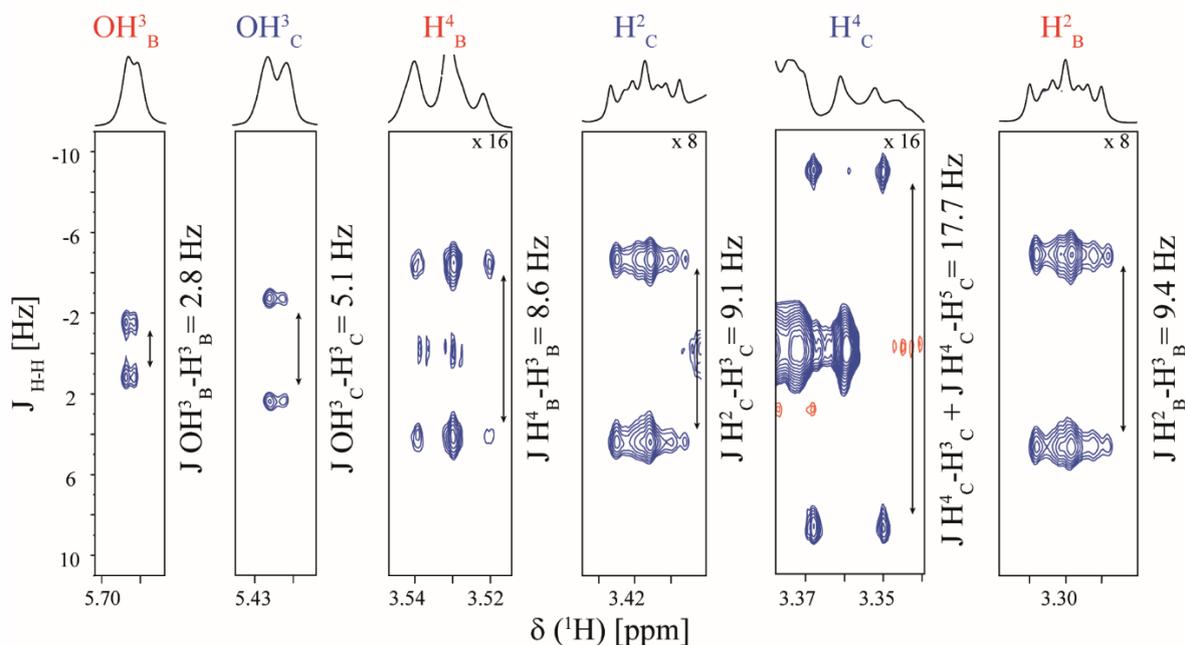


Figure 36. a) Régions du spectre G-SERF enregistré sur le trisaccharide synthétique à 23,5 T. La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion de refocalisation non-encodée a été paramétrée à la fréquence de résonance de 3,61 ppm.

Une deuxième stratégie utilisant la spectroscopie J -éditée peut être mise en œuvre dans cette étude pour répondre au problème de dispersion des signaux. L'expérience G-SERF précédente exploite la dispersion des déplacements chimiques des partenaires de couplages alors que l'impulsion de refocalisation sélectionne des protons se situant dans une région présentant d'importants recouvrements de signaux. A l'inverse, cette seconde stratégie consiste à sélectionner des protons avec des déplacements chimiques résolus afin d'éviter les couplages dans des régions présentant d'important recouvrements de signaux. Ainsi les G-SERF présentées sur la **Figure 37** permettent d'extraire respectivement les couplages entre H^3_B et H^2_B (3,61 ppm, $J = 9,4$ Hz) (a), entre H^3_C et H^4_C (3,60 ppm, $J = 9,0$ Hz), entre H^{6a}_B et H^{6b}_B (3,54 ppm, $J = 9,4$ Hz) et entre H^4_B et H^5_B (3,54 ppm, $J = 9,4$ Hz) (b), entre H^3_C et H^2_C (3,60 ppm, $J = 9,1$ Hz) (c) et entre H^3_B et H^4_B (3,61 ppm, $J = 8,6$ Hz) (d) du massif présent à 3,6 ppm.

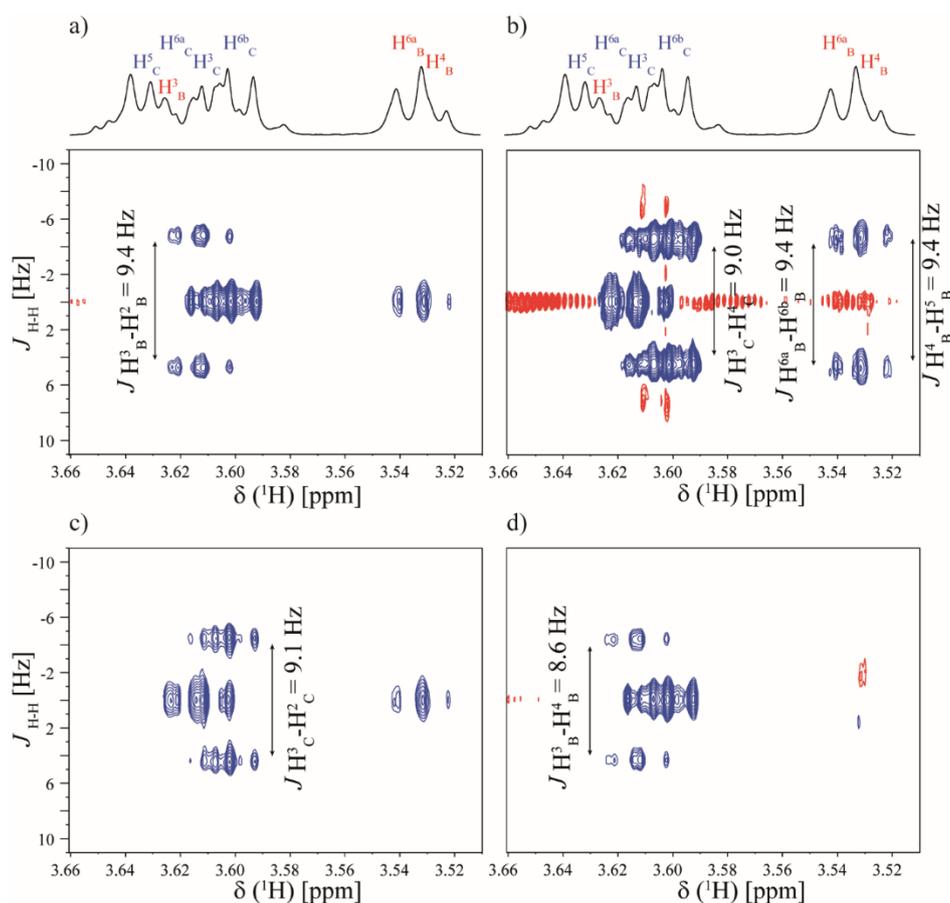


Figure 37. Agrandissement des régions d'intérêt issues des spectres G-SERF enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 23,5 T. La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion de refocalisation non-encodée a été réglé à la fréquence de résonance de 3,31 ppm (a), 3,35 ppm (b), 3,42 ppm (c) et 3,54 ppm (d).

L'édition des couplages dans des zones présentant d'importants recouvrements permet également d'isoler le signal du partenaire de couplage. Ainsi, les spectres présentés sur la **Figure 37** ont permis d'isoler les signaux des protons H^3_B (a et d), H^4_B et H^{6a}_B (b) et H^3_C (b et c). De plus, à partir des valeurs de couplages déterminées grâce aux différentes expériences G-SERF, il devient possible de détailler la structure fine des multiplets extraits (**Figure 38**).

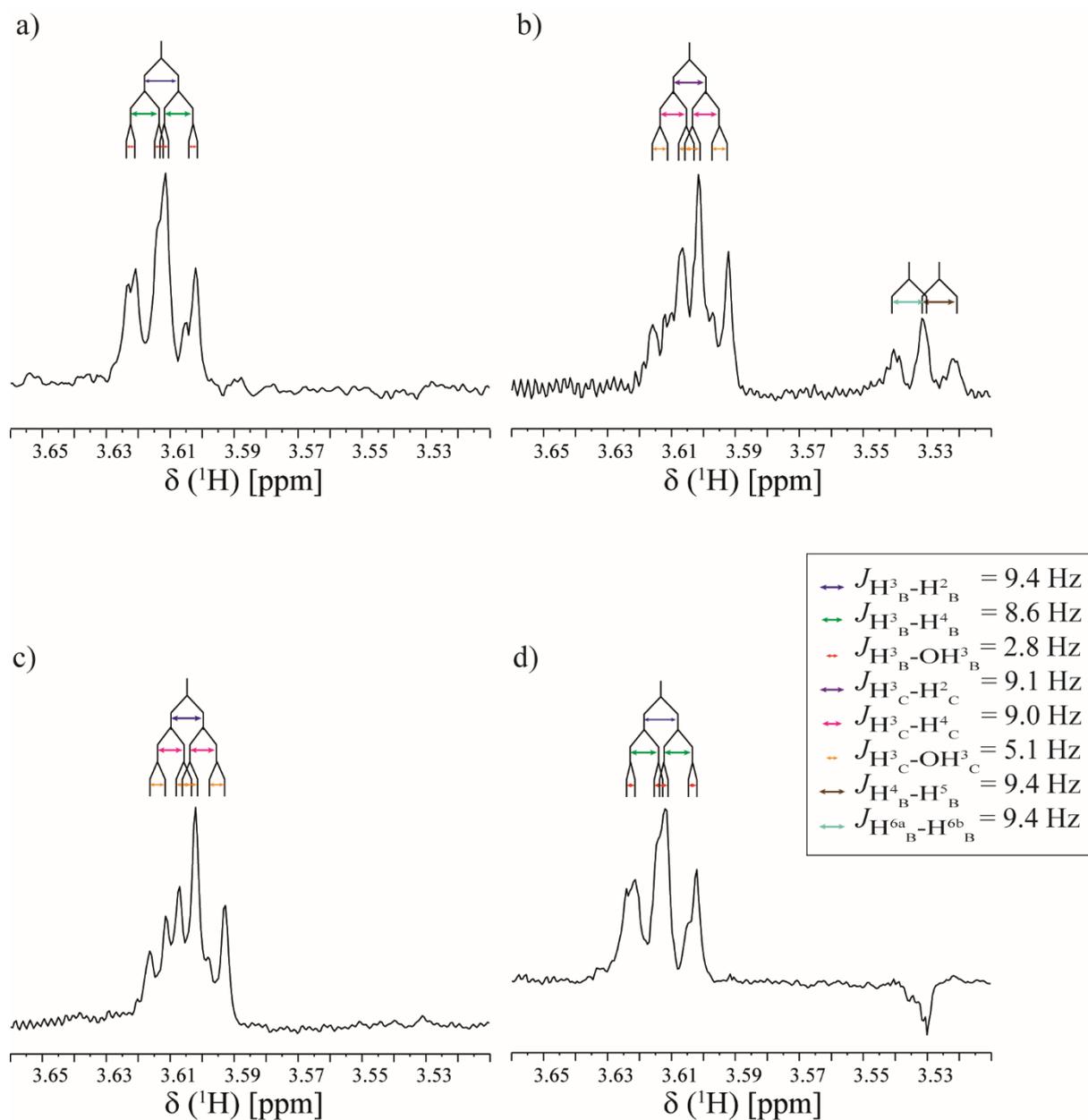


Figure 38. Extractions des multiplets observés sur les expériences G-SERF présentées dans la **Figure 37**. Le détail de la structure fine du multiplet du proton H^3_B (a et d), H^4_B et H^{6a}_B (b) et H^3_C (b et c) est déduit des mesures de couplages réalisées sur les données G-SERF (**Figure 36** et **Figure 37**).

2. Attribution du spectre proton du trisaccharide

Suite à ces résultats, la spectroscopie J -éditée a été mise en œuvre dans un protocole analytique simplifié (les données complètes enregistrées sur le trisaccharide sont fournies en annexe). Tous les sites protons de cette molécule ont pu être attribués à partir des informations apportées par le spectre ω 1-broadband homonuclear decoupled TOCSY (**Figure 28** et **31**) d'une part et par l'ensemble des spectres G-SERF enregistrés d'autre part. (La liste des déplacements chimiques du proton est fournie en annexe). Plusieurs ambiguïtés d'attribution comme entre H^4_B (3,61 ppm) et H^5_B (3,54 ppm) ont notamment pu être levées grâce aux informations issues des expériences G-SERF, d'une part car cette expérience sonde spécifiquement le couplage entre le proton sélectionné et ses partenaires de couplage et d'autre part car la valeur de la constante de couplage fournit également des informations structurales. (**Figure 36. b**, **Figure 37. b et d**)

3. Discussion

L'attribution complète du spectre proton a permis de confirmer la régiosélectivité des réactions d'addition des fonctions protectrices sur les groupes OH^6 de chaque sous-unité saccharidique. De plus, 20 couplages $^3J_{HH}$ ont pu être mesurés, ce qui représente 80% de l'ensemble des couplages scalaires sur les cycles. (**Figure 39**) Les valeurs de ces couplages homonucléaires ont permis de lever certaines ambiguïtés structurales liées à la stéréochimie de la molécule. La mesure des couplages $J_{H^1_A-H^2_A} = 7,7$ Hz, $J_{H^1_B-H^2_B} = 3,7$ Hz et $J_{H^1_C-H^2_C} = 3,7$ Hz a permis de déterminer la configuration des carbones anomériques de chaque sous-unité saccharidique, qui coïncide avec la structure trisaccharidique attendue. De plus, le grand nombre de couplages $^3J_{HH}$ qui ont pu être mesurés pour chaque cycle a permis de confirmer la conformation 4C_1 de chaque cycle.

Cette spectroscopie J -éditée est donc une méthode efficace pour mesurer de manière totalement résolue les couplages scalaires homonucléaires de spectres fortement superposés. Elle peut être utilisée en complément d'autres expériences de corrélations hétéronucléaires ou homonucléaires qui sont actuellement mises en œuvre en routine pour étudier des oligosaccharides. Dans cette étude, l'attribution a été réalisée à partir de deux spectroscopies basées sur un encodage spatial en fréquence, la spectroscopie J -éditée associée à la spectroscopie utilisant l'encodage spatial pour réaliser un découplage homonucléaire dans la dimension indirecte, ce qui démontre que les

expériences encodées par gradient constituent une alternative aux protocoles d'analyse standards pour ce type de composés organiques. Plus généralement, ces résultats confirment que l'approche par encodage spatial en fréquence constitue une méthode permettant d'améliorer la qualité des spectres de corrélation de macromolécules pour lesquelles les spectromètres à haut champ sont en principe destinés.

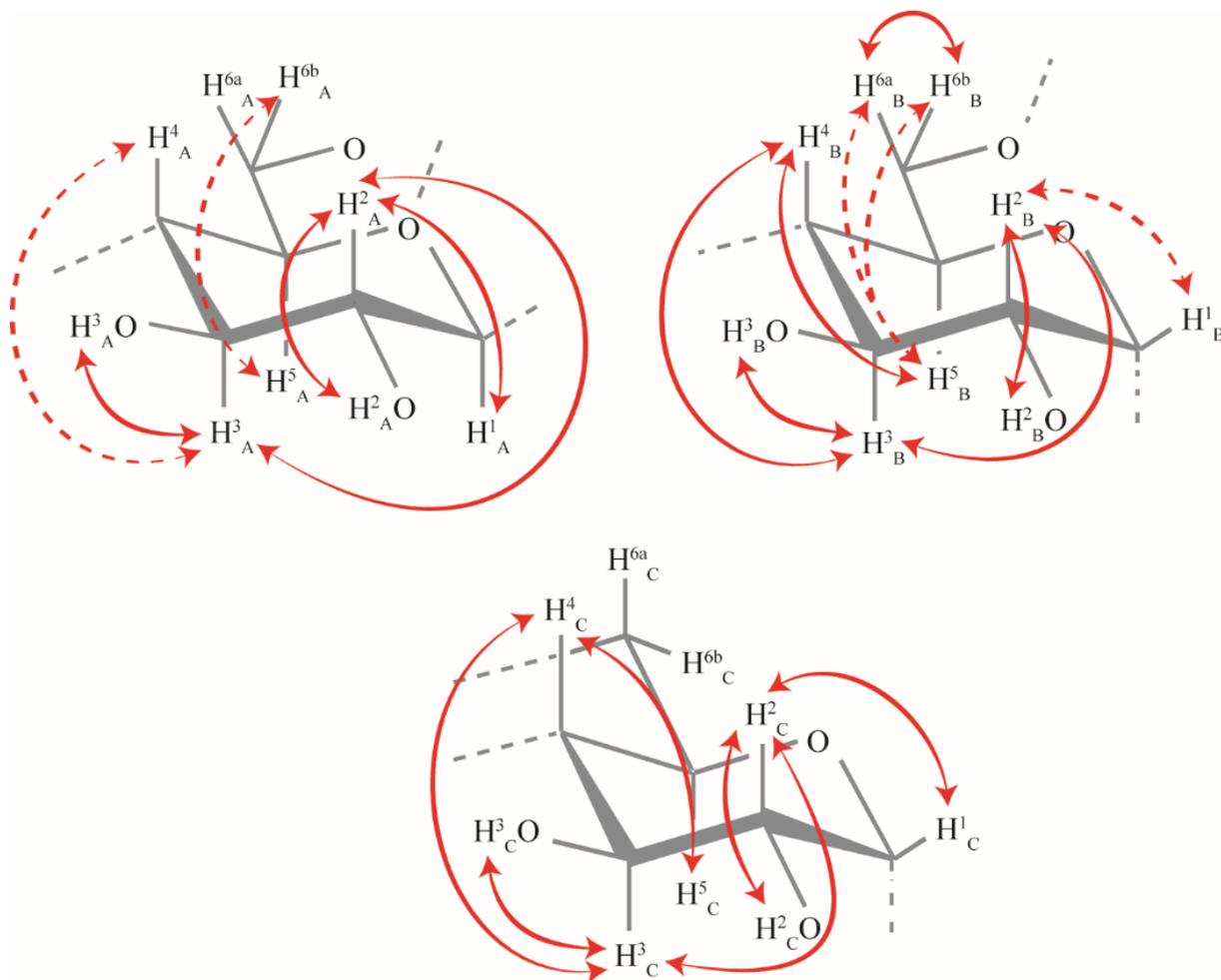


Figure 39. Ensemble des couplages dont les valeurs ont été extraites des différents spectres. Les flèches pleines correspondent aux couplages observés avec les expériences G-SERF. Les flèches en pointillées correspondent aux couplages directement observés sur le spectre proton.

C. L'expérience push-G-SERF appliquée au saccharide

La nouvelle expérience de corrélation push-G-SERF présentée dans le chapitre précédent a également été utilisée sur le trisaccharide synthétique. L'existence de protons présentant de nombreux partenaires de couplages fait de cette molécule un premier sujet d'étude intéressant pour observer l'efficacité de l'expérience push-G-SERF sur des molécules plus complexes. En effet, dans le cas de spectres fortement superposés l'expérience G-SERF peut être limitée par la présence de multiplets dans la dimension directe d'où l'intérêt d'utiliser une expérience avec un découplage homonucléaire dans cette dimension. Pour illustrer l'intérêt de l'expérience push-G-SERF, cette expérience ainsi que la G-SERF ont été acquises à 23,5 T sur le trisaccharide synthétique.

1. Résultats

Les résultats présentés correspondent aux expériences permettant d'éditer les couplages impliquant le proton H^2_C (**Figure 40. a**). Les spectres ainsi obtenus présentent des signaux sous forme de doublets dans la dimension indirecte pour chaque proton couplé à H^2_C , à savoir H^1_C , OH^2_C et H^3_C . ($J_{OH^2_C-H^2_C} = 6,1$ Hz, $J_{H^1_C-H^2_C} = 3,7$ Hz, $J_{H^3_C-H^2_C} = 9,1$ Hz) Dans la dimension directe, les signaux se présentent soit sous la forme de multiplets pour l'expérience G-SERF (**Figure 40.b**), soit sous la forme de singulets pour la push-G-SERF (**Figure 40. c**). Sur ces deux spectres J -édités, on remarque que le couplage entre H^2_C et H^3_C peut être extrait d'une région du spectre où les déplacements chimiques de quatre protons sont regroupés dans une zone restreinte de 0,1 ppm. Par ailleurs, si on s'intéresse aux projections de ces spectres, on remarque que l'expérience G-SERF présente d'importants recouvrements pour les cinq signaux H_5^C , H_6^C , H_6^C , H_3^B et H_3^C qui sont partiellement éliminés par l'expérience push-G-SERF. Cependant, ces cinq singulets ne sont pas totalement résolus à cause de l'élargissement causé par l'insertion de la séquence de découplage au cours de l'acquisition. Cela démontre dans un premier temps l'intérêt d'utiliser des expériences δ -résolues afin de réduire la superposition des signaux grâce à une refocalisation des multiplets, mais dans un deuxième temps la nécessité d'associer les méthodes de découplage homonucléaire à des expériences multidimensionnelles afin d'améliorer

la dispersion des signaux. En effet, l'extraction de ce couplage serait difficilement réalisable sur des spectres à une dimension tels que les spectres real-time SERF ou Quick G-SERF 1D.

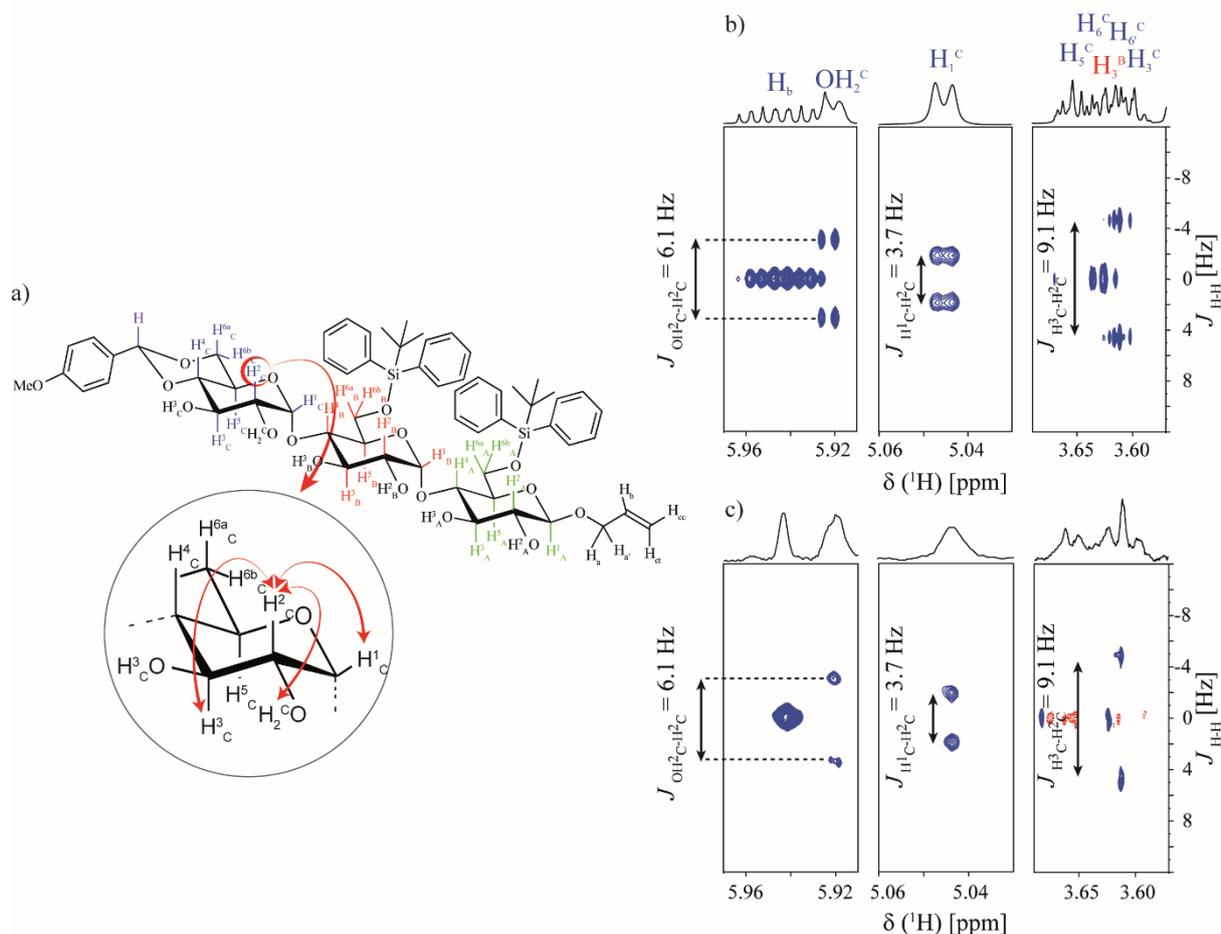


Figure 40. a) Structure du trisaccharide. (b) Le spectre G-SERF et (c) le spectre push-G-SERF enregistré sur le trisaccharide à 23,5 T pour extraire les couplages impliquant le proton H_2^C ($\delta_{H_2^C} = 3,43$ ppm). Chaque spectre 2D a été acquis en 30 min. En (c), le spectre δ -résolu est présenté au-dessus.

2. Discussion

Les améliorations apportées aux spectromètres RMN modernes dans le domaine de la sensibilité permettent le développement d'une nouvelle génération d'expériences de corrélations multidimensionnelles basées sur la méthode ZS, pouvant être utilisées pour la détermination structurale de molécules complexes. De plus, cette expérience est compatible avec de récentes avancées qui ont été développées pour améliorer la sensibilité des expériences encodées par

gradients.⁸² A noter que dans le cas du trisaccharide synthétique, les spectres ont été obtenus avec un rapport signal sur bruit satisfaisant en 30 minutes à 23,5 T, avec une cryosonde sur un échantillon de concentration à 17 milli molaires. Cela peut être comparé avec les résultats obtenus par Suryaprakash et ses collaborateurs qui ont acquis un spectre 1D Quick G-SERF à 800 MHz en 5 minutes, également avec une sonde cryogénique, sur la strychnine avec une concentration de 30 milli molaires.⁸³ Zangger et ses collaborateurs ont également reporté l'acquisition d'un spectre SERF real-time sur un échantillon de cyclo-phénylalanine-proline de concentration de 265 milli molaires acquis à 500 MHz, sans sonde cryogénique et en 12 minutes.⁸⁴ En prenant en compte la contribution de la force du champ magnétique et de la concentration de l'échantillon pour la sensibilité, il apparaît que le temps supplémentaire nécessaire pour acquérir un spectre 2D de corrélations n'est pas un facteur limitant.

Pour conclure, cette séquence d'impulsions est intéressante pour les chimistes recherchant une méthode simple et efficace regroupant en une expérience les informations de déplacements chimiques et de couplages de manière à accélérer le processus d'analyse structurale de molécules complexes.

⁸² P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, R. Kerssebaum, G. E. Wagner, K. Zangger, *J. Magn. Reson.* **2013**, *233*, 92-95. ; Lokesh, N. Suryaprakash, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8550-8553.

⁸³ N. Lokesh, S. R. Chaudhari, N. Suryaprakash, *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 15597-15600.

⁸⁴ N. Gubensak, W. M. Fabian, K. Zangger, *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 12254-12257.

| Conclusion & Perspectives

Mon travail de thèse avait pour objectif principal de développer de nouvelles expériences RMN basées sur un encodage spatial en fréquence, dans le but de répondre aux difficultés liées au manque de dispersion des signaux dans les expériences de corrélation standards. Dans ce but, la première étape a été d'étudier le principe de l'encodage spatial en fréquence, puis de développer de nouvelles expériences de corrélation et enfin les appliquer à des systèmes présentant des spectres proton complexes.

Dans un premier temps, une étude théorique détaillée du principe de l'encodage spatial en fréquence a été réalisée grâce à la simulation de spectres RMN du proton encodés par gradient. Pour cela, chaque coupe de l'échantillon a été simulée en faisant varier la fréquence porteuse du champ magnétique ν_f utilisé pour l'impulsion sélective. Ces simulations ont été réalisées à différentes valeurs de champ magnétique. Les données ont été analysées quantitativement pour décrire le concept de coupe sur lequel sont basées les expériences encodées. Ainsi à haut champ, l'amélioration de la dispersion des pics associée à la sélection physique de coupes plus fines permet d'exciter plus facilement chacun des protons dans des coupes distinctes de l'échantillon. Cela améliore l'efficacité de l'encodage, auquel s'ajoute un gain en sensibilité modéré.

Par ailleurs, une nouvelle expérience de corrélation, la PCR COSY, a été développée pour acquérir un spectre 2D permettant une attribution des signaux et une mesure des couplages scalaires simplifiées. Son principe est basé sur l'association de techniques de refocalisation sélective avec un encodage spatial en fréquence multidimensionnel. Cette séquence d'impulsions permet d'accéder aux informations de corrélation et de l'ensemble des valeurs de couplages d'un réseau de spin grâce à la combinaison des évolutions δ -résolue et J -éditée. Plus généralement, cette approche permet d'attribuer et de mesurer les interactions de spin dans des systèmes de spins abondant en combinant l'ensemble des informations structurales en un unique spectre facilement analysable, permettant ainsi d'accélérer l'analyse structurale basée sur les données RMN.

Une seconde expérience RMN de corrélation homonucléaire qui fournit une méthode simplifiée et résolue pour extraire les couplages scalaires de spectres présentant d'importants recouvrements de signaux a été présentée. Cette expérience, la push-G-SERF, est basée sur la combinaison de deux techniques mettant en œuvre un encodage spatial en fréquence, une technique de refocalisation sélective associée à une technique de découplage homonucléaire. Le résultat est

l'édition totalement résolue de l'ensemble des couplages impliquant un proton sélectionné. Plus précisément, le spectre obtenu contient l'information J -résolue dans la dimension indirecte et l'information δ -résolue dans la dimension directe. Cette approche répond aux difficultés liées aux superpositions de signaux générées par les multiplicités parfois importantes dues aux couplages scalaires. Le concept de cette expérience montre la possibilité de combiner des expériences de corrélation et de découplage homonucléaire dans le but d'obtenir des spectres totalement résolus. Pour finir, une étude expérimentale permettant d'illustrer l'intérêt d'acquérir des spectres encodés en fréquence à haut champ magnétique a été réalisée. Afin d'étudier la dépendance du champ magnétique pour les expériences encodées, deux classes d'évolutions (δ -résolue et J -éditée) qui sont de nos jours mises en œuvre dans les expériences de RMN haute résolution ont été étudiées. Cette étude porte plus particulièrement sur la dispersion des pics obtenus à différents champs magnétiques pour les spectres ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY et G-SERF enregistrés sur un trisaccharide synthétique. Les améliorations observées sur la qualité du découplage homonucléaire des spectres ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY et sur la quantité d'informations apportées par les spectres G-SERF démontre l'intérêt d'augmenter le champ magnétique afin d'exciter chaque proton dans des coupes distinctes de l'échantillon. De plus, l'expérience push-G-SERF démontre le potentiel de l'encodage spatial en fréquence pour mettre en œuvre un découplage homonucléaire au cours de l'acquisition. L'étude du trisaccharide démontre la robustesse de la RMN encodée pour l'étude de molécules présentant d'importants recouvrements de signaux. Cette méthode pourrait être mise en œuvre en routine dans le but de faciliter et accélérer l'étude des saccharides composés de plusieurs unités de répétitions saccharidiques. Cette méthode pourrait également être étendue à l'analyse de différentes classes de molécules complexes et de différentes tailles.

Pour conclure, un délai d'évolution supplémentaire a été introduit dans les expériences multidimensionnelles afin de permettre la séparation des évolutions de spins dans différentes dimensions temporelles. L'encodage spatial en fréquence peut ainsi être considéré comme une nouvelle dimension spectrale en elle-même. Il permet alors de réaliser simultanément différentes évolutions de spin (δ et J) sur des spins résolus spectralement, dans le but de générer un spectre avec exactement les informations structurales souhaitées. Or, le principal inconvénient des expériences basées sur un encodage spatial en fréquence est leur manque de sensibilité. Afin de

répondre à ce problème, des expériences préliminaires ont d'ores et déjà été réalisées en collaboration avec Dr. Jonathan Farjon, afin d'allier les intérêts de la RMN encodée avec les améliorations de sensibilité apportées par des méthodes SOFAST ou BEST et en collaboration avec Dr. Christie Aroulanda pour développer la RMN encodée hyperpolarisée.

| Annexes

A. Conditions expérimentales

1. Spectre PCR-COSY

Le spectre PCR-COSY du (\pm) (2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)3-trans-propenoate d'éthyle a été acquis sur un spectromètre Bruker Avance opérant à 9,4 T ($\nu_{1H} = 400.13$ MHz), équipé d'une sonde BBO de 5 mm avec trois bobines de gradient de champ x, y et z. L'échantillon a été préparé en diluant 60 mg de (\pm) (2,2-diméthyl-1,3-dioxolan-4-yl)3-trans-propenoate d'éthyle dans 560 mg de $CDCl_3$. La température de la sonde a été réglée à 296 K.

Les impulsions semi-sélectives utilisées sont respectivement des impulsions à modulation d'amplitude de type EBurp2, EBurp2 inversées et ReBurp de d'excitation, d'excitation et de refocalisation. La durée des impulsions semi-sélectives a été réglée à 50 ms, ce qui correspond à une sélectivité d'environ 75 Hz. L'amplitude du gradient utilisé pour réaliser l'encodage spatial en fréquence est réglé à $G_x=1,4$ G.cm⁻¹ et $G_z=0,98$ G.cm⁻¹. Les gradients d'encodage ont été calibrés dans le but de garder les intensités relatives autant que possible identiques à celle du spectre proton standard. En ce qui concerne le gradient d'encodage selon x, à cause des problèmes de symétrie relatifs à la forme du tube, les intensités relatives mesurées sur des signaux encodés dans les tranches extérieures sont d'environ 25% plus faibles que pour les tranches intérieures. Pour améliorer la mesure des valeurs de couplages à partir des doublets dans la dimension F_1 , les couplages évoluent cinq fois plus longtemps que les déplacements chimiques. La détection en quadrature est obtenue en utilisant la méthode QSEQ (quadrature sequential). Chacun des 512 incréments a été acquis en 64 scans, avec un délai de recyclage de 1,5 secondes et 2048 points en t_2 . Les points de données en t_1 ont été extrapolés à 1024 points en utilisant une prédiction linéaire. Les données ont finalement été traitées par zéro-filling pour obtenir 2048 points en t_1 et 2048 points en t_2 . La correction automatique de ligne de base a été appliquée dans les deux dimensions.

2. Etude du trans-2-hexen-1-al

Pour l'échantillon, 34 mg de tran-2-hexen-1-al ont été dissous dans 800 mg de $CDCl_3$. Les spectres RMN ont été acquis sur un spectromètre Bruker Avance III de 9,4 T ($\nu_{1H} = 400.13$ MHz), équipé

d'une sonde PRODIGY de 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ avec une bobine de gradient sur z . La température de la sonde a été réglée à 300 K.

Spectres G-SERF. La séquence utilisée pour enregistrer les spectres G-SERF est présentée dans le chapitre 1. Des impulsions EBurp2 (respectivement, ReBurp et Time reversal EBurp2) ont été utilisées pour l'excitation (respectivement, la refocalisation et le flip-back) d'une durée de 50 ms. La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion π sélective non-encodée a été réglée à la fréquence de résonance du proton dont on voulait éditer les partenaires de couplage. L'échantillon a été encodé spatialement par un gradient de champ pulsé z rectangulaire de puissance $G_1=1,06 \text{ G.cm}^{-1}$. Un gradient de champ pulsé de forme sinusoïdale d'une durée de 1 ms, suivi d'un délai de 0,2 ms a été utilisé dans le filtre z avec une force $G_2=5,3 \text{ G.cm}^{-1}$.

Pour chacun des 64 incréments en t_1 , 9614 points ont été acquis, avec 8 scans et un délai de recyclage de 1 seconde. La fenêtre spectrale de la dimension directe a été réglée à 12,02 ppm et celle de la dimension indirecte à 30 Hz. Une carte 2D phasable a été obtenue en utilisant un mode d'acquisition QSEQ (Quadrature Sequential Mode).

Les données ont été traitées par du zéro-filling pour obtenir 128 points en t_1 et 16384 points en t_2 , par apodisation avec une fonction exponentielle utilisant un élargissement de 0,3 Hz dans la dimension directe et 0,7 Hz dans la dimension indirecte et par une correction automatique de la ligne de base dans les deux dimensions.

Spectres Push-G-SERF. Les mêmes paramètres que ceux de la G-SERF ont été utilisés. Pendant l'acquisition, des échos de spin afin de réaliser un découplage homonucléaire sont réalisés. Des impulsions ReBurp de 50 ms et des impulsions dures de 23,5 μs ont été utilisées pour la refocalisation. Les gradients utilisés pour sélectionner le chemin de transfert de cohérence sont $G_3=3,18 \text{ G.cm}^{-1}$ et $G_4= 5,03 \text{ G.cm}^{-1}$. G_3 et G_4 sont appliqués pendant 1 ms suivie d'un délai de 150 μs . Au total, 40 fragments de FID de 25 ms chacun ont été enregistrés pendant l'acquisition, résultant en un temps d'acquisition total de 1 seconde.

3. Etude du trisaccharide

Pour l'échantillon, 10 mg du trisaccharide ont été dissous dans 600 mg de DMSO- d_6 . Les spectres RMN ont été acquis sur un spectromètre Bruker Avance III de 23,5 T ($^1\text{H} = 1000.13$ MHz), équipé d'une sonde cryogénique de 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ avec une bobine de gradient sur z ou sur un spectromètre RMN Bruker AVANCE II de 14,1 T ($^1\text{H} = 600.13$ MHz), équipé d'une sonde cryogénique de 5 mm avec une bobine de gradient de champ z. La température de la sonde a été réglée à 300 K.

3.1 Influence du champ magnétique sur les expériences basées sur un encodage spatial en fréquence

Spectres protons encodés. Chaque spectre a été enregistré avec 16 scans et un délai de recyclage de 10 s, en utilisant des impulsions semi-sélectives de forme EBurp2 d'une durée de 100 ms associées à un gradient de champ rectangulaire selon z. L'angle de nutation de l'impulsion a été calibré à 90° . La force du gradient d'encodage a été réglée à $0,99$ G.cm $^{-1}$.

Spectres TOCSY. Pour chacun des 2048 incréments en t_1 , un signal d'induction libre de 4096 points (respectivement 8192 points) a été acquis à 14,1 T (respectivement 23,5 T) avec 4 scans et un délai de recyclage de 2 s. Les fenêtres spectrales sont d'environ 9 ppm dans les deux dimensions. Une période de mélange MLEV-17 de 200 ms entourée par 2,5 ms de spin-lock a été utilisée. Les données ont été traitées en utilisant du zéro-filling jusqu'à 4096 points en t_1 et 8192 points en t_2 , une apodisation avec une fonction exponentielle utilisant un élargissement de pic de 0,3 Hz et une correction automatique de ligne de base dans les deux dimensions.

Spectres ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY. La résolution digitale dans chaque dimension, la période de mélange, ainsi que les paramètres de traitement sont identiques aux expériences TOCSY. Chaque incrément en t_1 a été acquis en 8 scans pour avoir une meilleure sensibilité. Des impulsions EBurp2 et ReBurp respectivement de durées 50 ms et 100 ms ont été utilisées pour des impulsions encodées $\pi/2$ et π . Dans le but de réduire le temps nécessaire pour enregistrer les expériences à 23,5 T, les protons aromatiques ne sont pas encodés, ce qui optimise

la sensibilité. Les amplitudes de gradient utilisées pour l'encodage sont de $0,28 \text{ G.cm}^{-1}$ à $14,1 \text{ T}$ et $0,46 \text{ G.cm}^{-1}$ à $23,5 \text{ T}$.

Spectres G-SERF. La séquence utilisée est présentée au chapitre 1. Des impulsions EBurp2 (respectivement, ReBurp et Time reversal EBurp2) ont été utilisées pour l'excitation (respectivement, la refocalisation et le flip-back) d'une durée de 50 ms (respectivement, 100 ms et 50 ms). La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion π sélective non-encodée a été réglée à la fréquence de résonance du spin proton dont on souhaite éditer les partenaires de couplage. Les forces de gradient d'encodage utilisées sont les mêmes que celles pour les expériences ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY. Un gradient de forme sinusoïdale d'une durée de 1 ms et de puissance $6,6 \text{ G.cm}^{-1}$ suivi par un délai de 0,15 ms a été utilisé dans le filtre z. Pour chacun des 64 incréments en t_1 , un signal d'induction libre de 8192 points a été acquis avec 64 scans et un délai de recyclage de 2 s. Les fenêtres spectrales directe et indirecte ont été réglées respectivement à 9,01 ppm et 30 Hz. Les spectres phasables ont été obtenus en utilisant le mode de quadrature QSEQ. Les données ont été traitées par zero-filling jusqu'à 128 points en t_1 , une apodisation avec une fonction exponentielle utilisant un élargissement de pics de 1,0 Hz et 0,3 Hz, respectivement dans la dimension directe et dans la dimension indirecte. Une correction de ligne de base a été appliquée dans les deux dimensions.

3.2 Etude de la stéréochimie de l'oligosaccharide par RMN encodée

Spectres COSY. Pour chacun des 512 incréments en t_1 , un signal d'induction libre de 8192 points a été acquis à $23,5 \text{ T}$ avec 1 scan et un délai de recyclage de 2 s. Les fenêtres spectrales sont d'environ 9 ppm dans les deux dimensions. Les données ont été traitées en utilisant du zero-filling jusqu'à 16384 points en t_2 et 1024 points en t_1 , une apodisation avec une fonction QSINE utilisant un élargissement de pic de 0,3 Hz et une correction automatique de ligne de base dans les deux dimensions.

Spectres G-SERF. La séquence utilisée est présentée dans le chapitre 1. Des impulsions EBurp2 (respectivement, ReBurp et Time reversal EBurp2) ont été utilisées pour l'excitation

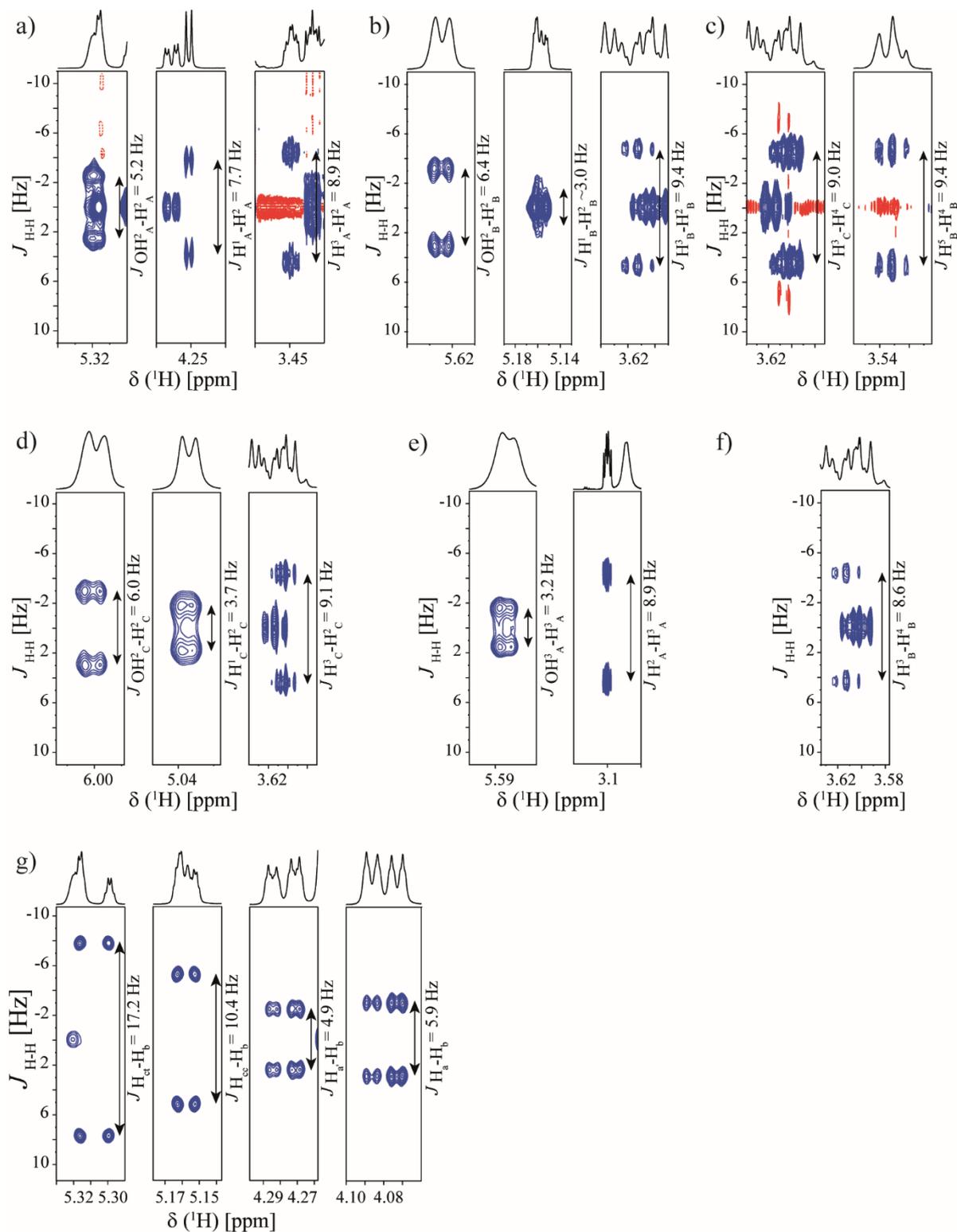
(respectivement, la refocalisation et le flip-back) d'une durée de 50 ms (respectivement, 100 ms et 50 ms). La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion π sélective non-encodée a été réglée à la fréquence de résonance du spin proton dont on voulait éditer les partenaires de couplage. Les forces de gradient d'encodage utilisées sont les mêmes que celles des expériences ω_1 -broadband homonuclear decoupled TOCSY. Un gradient de forme sinusoïdale d'une durée de 1 ms et de puissance $6,6 \text{ G.cm}^{-1}$ suivi par un délai de 0,15 ms a été mis en œuvre dans le filtre z. Pour chacun des 64 incréments en t_1 , un signal d'induction libre de 8192 points a été acquis avec 64 scans et un délai de recyclage de 2 s. Les fenêtres spectrales directe et indirecte ont été réglées respectivement à 9,01 ppm et 30 Hz. Les spectres phasables ont été obtenus en utilisant le mode QSEQ. Les données ont été traitées par zero-filling jusqu'à 4096 points en t_1 , une apodisation avec une fonction exponentielle utilisant un élargissement de pics de 1,0 Hz et 0,3 Hz respectivement dans la dimension directe et dans la dimension indirecte. Une correction de ligne de base a été appliquée dans les deux dimensions.

3.3 L'expérience push-G-SERF

Spectres G-SERF. La séquence utilisée est présentée dans le chapitre 1. Des impulsions EBurp2 (respectivement, ReBurp et Time reversal EBurp2) ont été utilisées pour l'excitation (respectivement, la refocalisation et le flip-back) d'une durée de respectivement 50 ms, 100 ms et 50 ms. La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion π sélective non-encodée a été réglée à la fréquence de résonance du spin proton dont on voulait éditer les partenaires de couplage. La force de gradient d'encodage utilisée est de $0,46 \text{ G.cm}^{-1}$. Un gradient de forme sinusoïdale d'une durée de 1 ms et de puissance $6,6 \text{ G.cm}^{-1}$ suivi par un délai de 0,15 ms a été utilisé dans le filtre z. Pour chacun des 64 incréments en t_1 , un signal d'induction libre de 8192 points a été acquis avec 8 scans et un délai de recyclage de 2 s. Les fenêtres spectrales directe et indirecte ont été réglées respectivement à 9,01 ppm et 30 Hz. Les spectres phasables ont été obtenus en utilisant le mode de QSEQ. Les données ont été traitées par zero-filling jusqu'à 8192 points en t_2 et 128 en t_1 , une apodisation avec une fonction exponentielle utilisant respectivement un élargissement de pics de 1,0 Hz et 0,3 Hz et une correction de ligne de base dans les deux dimensions.

Spectres Push-G-SERF. Les mêmes paramètres que ceux de la G-SERF ont été utilisés, exceptés qu'un signal d'induction libre de 9998 points a été acquis avec une fenêtre spectrale directe de 9,99 ppm et un délai de recyclage de 1 s. Pendant l'acquisition, des échos de spin afin de réaliser un découplage homonucléaire sont réalisés. Des impulsions ReBurp de 50 ms et des impulsions dures de 9 μ s ont été utilisées pour la refocalisation. Les gradients utilisés pour sélectionner le chemin de transfert de cohérence sont $G_3=3,94 \text{ G.cm}^{-1}$, and $G_4= 6,24 \text{ G.cm}^{-1}$. G_3 et G_4 sont appliqués pendant 1 ms suivie d'un délai de 150 μ s. Au total, 15 fragments de FID de 33 ms chacun ont été enregistrés pendant l'acquisition, résultant en un temps d'acquisition total de 0,5 s.

B. Données supplémentaires



S 1. Agrandissements des régions d'intérêt issues des spectres G-SERF enregistrés sur le trisaccharide synthétique à 23,5 T. La fréquence porteuse du champ magnétique rf utilisée pour l'impulsion de refocalisation non-encodée a été réglée à la fréquence de résonance de 3,10 ppm (a), 3,30 ppm (b), 3,35 ppm (c), 3,42 ppm (d), 3,45 ppm (e), 3,545 ppm (f) et 5,94 ppm (g).

C. Attribution du trisaccharide synthétique

RMN ^1H (23,5 T, DMSO- d_6) : $\delta = 7.60$ (dd, $J = 7.9$, $J = 1.2$ Hz, 2H, H_{arom}); 7.57 (dd, $J = 7.9$, $J = 1.2$ Hz, 2H, H_{arom}); 7.55-7.53 (m, 4H, H_{arom}); 7.43 (tt, $J = 7.4$, $J = 1.3$ Hz, 1H, H_{arom}); 7.39-7.36 (m, 4H, H_{arom}); 7.34 (m, 2H, H_{arom}); 7.32-7.29 (m, 3H, H_{arom}); 7.24 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_{arom}); 7.21 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, H_{arom}); 6.91 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, $\underline{\text{Ph}}\text{OCH}_3$); 6.00 (d, $J_{\text{OH}^2\text{C}}$, $\text{H}^2\text{C} = 6.0$ Hz, 1H, OH^2C); 5.94 (dddd, J_{H_b} , $\text{H}_{\text{ct}} = 17.2$, J_{H_b} , $\text{H}_{\text{cc}} = 10.4$, J_{H_b} , $\text{H}_a = 5.9$, J_{H_b} , $\text{H}_{a'} = 4.9$ Hz, 1H, H_b); 5.69 (d, $J_{\text{OH}^3\text{B}}$, $\text{H}^3\text{B} = 2.8$ Hz, 1H, OH^3B); 5.62 (d, $J_{\text{OH}^2\text{B}}$, $\text{H}^2\text{B} = 6.4$ Hz, 1H, OH^2B); 5.59 (d, $J_{\text{OH}^3\text{A}}$, $\text{H}^3\text{A} = 3.2$ Hz, 1H, OH^3A); 5.52 (s, 1H, $\underline{\text{CH}}\text{PhOCH}_3$); 5.42 (d, $J_{\text{OH}^3\text{C}}$, $\text{H}^3\text{C} = 5.1$ Hz, 1H, OH^3C); 5.32 (d, $J_{\text{OH}^2\text{A}}$, $\text{H}^2\text{A} = 5.2$ Hz, 1H, OH^2A); 5.31 (dq, $J_{\text{H}_{\text{ct}}}$, $\text{H}_b = 17.2$, $J_{\text{H}_{\text{ct}}}$, $\text{H}_{\text{cc}} = J_{\text{H}_{\text{ct}}}$, $\text{H}_a = J_{\text{H}_{\text{ct}}}$, $\text{H}_{a'} = 1.6$ Hz, 1H, H_{ct}); 5.16 (d, $J_{\text{H}^1\text{B}}$, $\text{H}^2\text{B} = 3.7$ Hz, 1H, H^1B); 5.15 (dq, $J_{\text{H}_{\text{cc}}}$, $\text{H}_b = 10.4$, $J_{\text{H}_{\text{cc}}}$, $\text{H}_{\text{ct}} = J_{\text{H}_{\text{cc}}}$, $\text{H}_a = J_{\text{H}_{\text{cc}}}$, $\text{H}_{a'} = 1.6$ Hz, 1H, H_{cc}); 5.04 (d, $J_{\text{H}^1\text{C}}$, $\text{H}^2\text{C} = 3.7$ Hz, 1H, H^1C); 4.28 (ddt, $J_{\text{H}_{a'}}$, $\text{H}_a = 13.4$, $J_{\text{H}_{a'}}$, $\text{H}_b = 4.9$, $J_{\text{H}_{a'}}$, $\text{H}_{\text{ct}} = J_{\text{H}_{a'}}$, $\text{H}_{\text{cc}} = 1.6$ Hz, 1H, $\text{H}_{a'}$); 4.25 (d, $J_{\text{H}^1\text{A}}$, $\text{H}^2\text{A} = 7.7$ Hz, 1H, H^1A); 4.08 (ddt, J_{H_a} , $\text{H}_{a'} = 13.4$, J_{H_a} , $\text{H}_b = 5.9$, J_{H_a} , $\text{H}_{\text{cc}} = J_{\text{H}_a}$, $\text{H}_{\text{ct}} = 1.6$ Hz, 1H, H_a); 3.83 (br s, 2H, H^{6a}A , H^{6b}A); 3.74 (s, 3H, $\underline{\text{CH}}_3\text{O-Ph}$); 3.65-3.61 (m, 2H, H^5C , H^{6a}C); 3.61 (ddd, $J_{\text{H}^3\text{B}}$, $\text{H}^2\text{B} = 9.4$, $J_{\text{H}^3\text{B}}$, $\text{H}^4\text{B} = 8.6$, $J_{\text{H}^3\text{B}}$, $\text{OH}^3\text{B} = 2.8$ Hz, 1H, H^3B); 3.60 (m, 1H, H^{6b}C); 3.60 (ddd, $J_{\text{H}^3\text{C}}$, $\text{H}^2\text{C} = 9.1$, $J_{\text{H}^3\text{C}}$, $\text{H}^4\text{C} = 9.0$, $J_{\text{OH}^3\text{C}}$, $\text{H}^3\text{C} = 5.1$ Hz, 1H, H^3C); 3.54 (d, $J_{\text{H}^{6a}\text{B}}$, $\text{H}^{6b}\text{B} = 9.4$ Hz, 1H, H^{6a}B); 3.54 (dd, $J_{\text{H}^4\text{B}}$, $\text{H}^5\text{B} = 9.4$, $J_{\text{H}^4\text{B}}$, $\text{H}^3\text{B} = 8.6$ Hz, 1H, H^4B); 3.45 (td, $J_{\text{H}^3\text{A}}$, $\text{H}^2\text{A} = J_{\text{H}^3\text{A}}$, $\text{H}^4\text{A} = 8.9$, $J_{\text{H}^3\text{A}}$, $\text{OH}^3\text{A} = 3.2$ Hz, 1H, H^3A); 3.42 (ddd, $J_{\text{H}^2\text{C}}$, $\text{H}^3\text{C} = 9.1$, $J_{\text{H}^2\text{C}}$, $\text{OH}^2\text{C} = 6.0$, $J_{\text{H}^2\text{C}}$, $\text{H}^1\text{C} = 3.7$ Hz, 1H, H^2C); 3.37 (m, $J_{\text{H}^4\text{A}}$, $\text{H}^3\text{A} = 8.9$ Hz, 2H, H^4A , H^5A); 3.36 (dd, $J_{\text{H}^4\text{C}}$, $\text{H}^3\text{C} = 9.0$, $J_{\text{H}^4\text{C}}$, $\text{H}^5\text{C} = 8.7$ Hz, 1H, H^4C); 3.35 (d, $J_{\text{H}^{6b}\text{B}}$, $\text{H}^{6a}\text{B} = 11.5$ Hz, 1H, H^{6b}B); 3.35 (d, $J_{\text{H}^5\text{B}}$, $\text{H}^4\text{B} = 9.4$ Hz, 1H, H^5B); 3.30 (ddd, $J_{\text{H}^2\text{B}}$, $\text{H}^3\text{B} = 9.4$, $J_{\text{H}^2\text{B}}$, $\text{OH}^2\text{B} = 6.4$, $J_{\text{H}^2\text{B}}$, $\text{H}^1\text{B} = 3.7$ Hz, 1H, H^2B); 3.10 (ddd, $J_{\text{H}^2\text{A}}$, $\text{H}^1\text{A} = 7.7$, $J_{\text{H}^2\text{A}}$, $\text{H}^3\text{A} = 8.9$, $J_{\text{H}^2\text{A}}$, $\text{OH}^2\text{A} = 5.2$ Hz, 1H, H^2A); 0.89 (s, 9H, $\underline{\text{tBu}}\text{Si}$); 0.87 (s, 9H, $\underline{\text{tBu}}\text{Si}$)

Nom	Cycle A	Cycle B	Cycle C
H ¹	4,25	5,16	5,04
H ²	3,10	3,30	3,42
OH ²	5,32	5,62	6,00
H ³	3,45	3,61	3,60
OH ³	5,59	5,69	5,42
H ⁴	3,37	3,54	3,36
H ⁵	3,37	3,35	3,64
H ^{6a}	3,83	3,54	3,64
H ^{6b}	3,83	3,35	3,60

Groupement allyle		Autres	
H _a	4,08	Ph-O-CH ₃	3,74
H _{a'}	4,28	CH-Ph(OR) ₂	5,52
H _b	5,94	CH ₃	0,89
H _{ct}	5,31	CH ₃	0,87
H _{cc}	5,15		

T 1. Attribution des déplacements chimiques du proton à 300 K. Compte tenu des importantes superpositions de plusieurs signaux, les valeurs de déplacements chimiques sont fournies avec seulement deux décimales.

J_{HH} (Hz)	$H^{6a,b}_A$	H^5_A	H^4_A	OH^3_A	H^3_A	OH^2_A	H^2_A	H^1_A
H^1_A							7.7	
H^2_A					8.9	5.2		
OH^2_A								
H^3_A			8.9	3.2				
OH^3_A								
H^4_A								
H^5_A	0-5*							
$H^{6a,b}_A$								

T 2. Tableau regroupant les valeurs des constantes de couplages scalaires mesurées (Hz) pour le cycle A. La précision des mesures est estimée à 0,5 Hz. Elle est principalement limitée par la résolution digitale dans la dimension J -résolue des spectres G-SERF. Les valeurs colorées indiquent les couplages scalaires mesurés sur les spectres G-SERF. Les autres valeurs de couplages ont soit été facilement mesurées sur le spectre proton, soit ont été déduites de l'analyse des extractions de ligne à partir des corrélations résolues des spectres G-SERF. * Le couplage entre H^6_A et H^5_A a été estimé à partir de l'analyse du spectre 1D du proton H^6_A qui est un signal large (~ 7 Hz de large) ce qui suggère un fort couplage compris entre 0 et 5 Hz.

J_{HH} (Hz)	H^{6b}_B	H^{6a}_B	H^5_B	H^4_B	OH^3_B	H^3_B	OH^2_B	H^2_B	H^1_B
H^1_B								3.7	
H^2_B						9.4	6.4		
OH^2_B									
H^3_B				8.6	2.8				
OH^3_B									
H^4_B			9.4						
H^5_B		0.0							
H^{6a}_B	9.4								
H^{6b}_B									

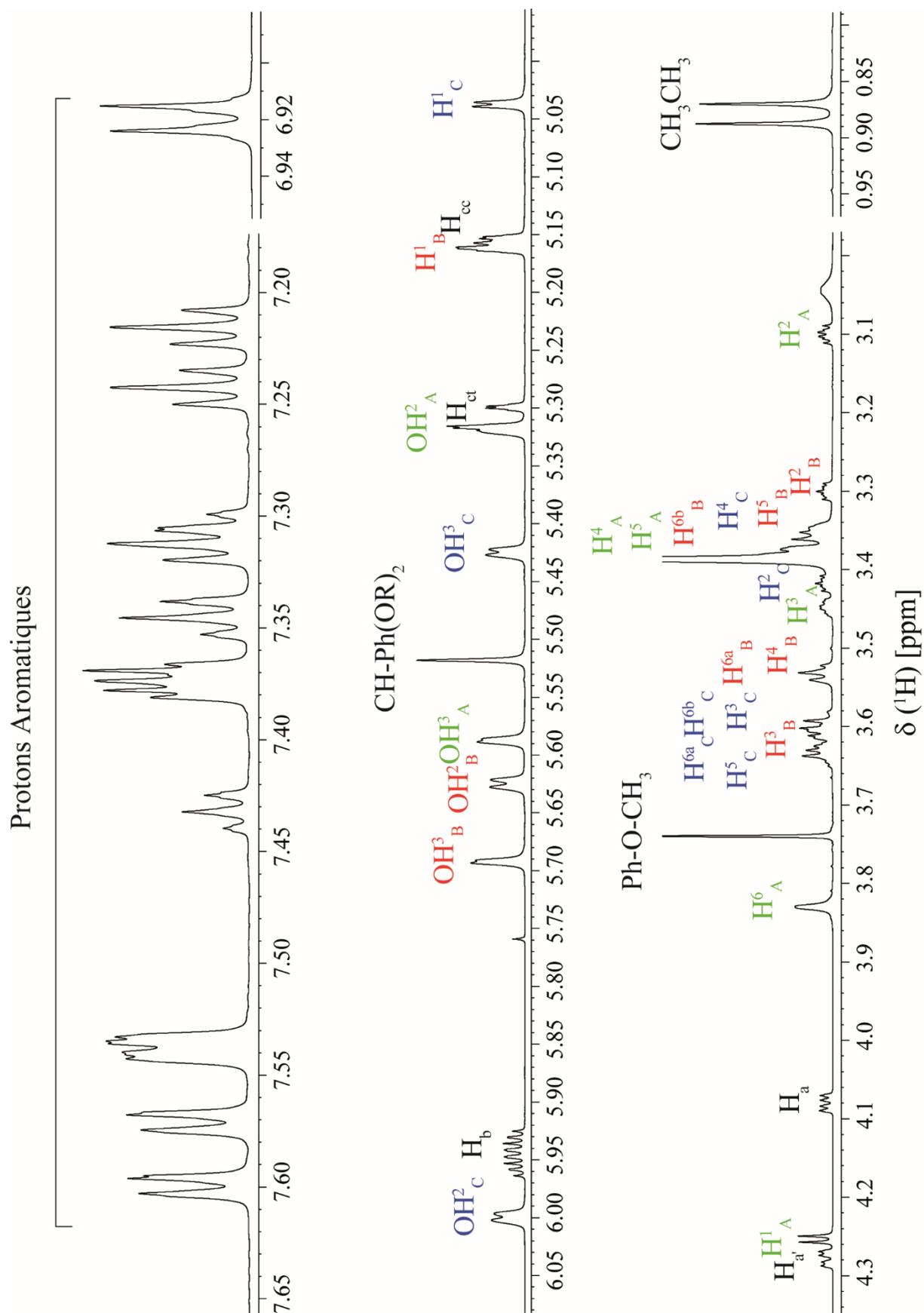
T 3. Tableau regroupant les valeurs des constantes de couplages scalaires mesurées (Hz) pour le cycle B.

J_{HH} (Hz)	H^{6b}_C	H^{6a}_C	H^5_C	H^4_C	OH^3_C	H^3_C	OH^2_C	H^2_C	H^1_C
H^1_C								3.7	
H^2_C						9.1	6.0		
OH^2_C									
H^3_C				9.0	5.1				
OH^3_C									
H^4_C			8.7*						
H^5_C									
H^{6a}_C									
H^{6b}_C									

T 4. Tableau regroupant les valeurs des constantes de couplages scalaires mesurées (Hz) pour le cycle C. * Le couplage entre H^4_C et H^5_C a été calculé à partir du multiplet observé à 3,36 ppm sur le spectre G-SERF **Figure 11. b** et de la connaissance du couplage entre H^3_C et H^4_C .

J_{HH} (Hz)	H_{cc}	H_{ct}	H_b	$H_{a'}$	H_a
H_a	1.5	1.5	5.9	13.4	
$H_{a'}$	1.5	1.5	4.9		
H_b	10.4	17.2			
H_{ct}	1.5				
H_{cc}					

T 5. Tableau regroupant les valeurs des constantes de couplages scalaires mesurées (Hz) pour le groupement protecteur allyle.



S 2. Le spectre ¹H enregistré à 23,5 T et attribution des protons.

D. Programmes d'impulsions utilisés

1. Programme d'impulsions de la PCR-COSY

```
;avance-version
```

```
;2D sequence
```

```
#include <Avance.incl>
```

```
#include <Grad.incl>
```

```
"d11=30m"
```

```
"in0=inf1/10"
```

```
"d21=250u"
```

```
"d17=100u"
```

```
1 ze
```

```
2 d1 p11:f1
```

```
3 d11
```

```
  (p16:gp1) (p11:sp1 ph1:r):f1
```

```
  d21
```

```
  d0
```

```
  (p2 ph3):f1
```

```
  d21
```

```
  (p16:gp1) (p11:sp2 ph1:r):f1
```

```
  d0
```

```
  d21
```

```
  d0
```

```
  (p16:gp2) (p11:sp3 ph4:r):f1
```

```
  d21
```

```
  (p16:gp1) (p11:sp2 ph5:r):f1
```

```
  d21
```

```
  (p16:gp2) (p11:sp4 ph6:r):f1
```

```
  d0
```

```
d0
d0
d0
d0
(p16:gp1) (p11:sp5 ph7:r):f1
d21
(p16:gp2) (p11:sp3 ph8:r):f1
d21
go=2 ph31
d11 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit

ph1=0 0 0 0 2 2 2 2
ph2=0 0
ph3=0 0
ph4=0 0
ph5=0 0
ph6=0 0
ph7=0 2 0 2 0 2 0 2
ph8=0 0 2 2 0 0 2 2
ph31=1 3 3 1 3 1 1 3

;sp1 : encoded X nucleus - 90/270 soft pulse power level
;p11 : encoded X nucleus - 90/270 soft pulse
;sp2 : encoded X nucleus - 180 soft pulse power level
;p12 : encoded X nucleus - 180 soft pulse
;sp3 : encoded X nucleus - 90 flip-back soft pulse
;p13 : encoded X nucleus - 90flip-back soft pulse
;sp4 : recoupled A nucleus - 180 soft pulse power level
;p14 : recoupled A nucleus - 180 soft pulse
```

2. Programme d'impulsions de la push-G-SERF

For Avance III

```
#include <Avance.incl>
#include <De.incl>
#include <Delay.incl>
#include <Grad.incl>
```

dwellmode explicit

```
"in0=inf1/4"
"l1=l0-1"
"d0=3u"
"d2=aq/10"
"d3=d2/2"
"d11=3u"
"d12=6.5u"
"d21=150u"
"d16=150u"
"p2=2*p1"
"p21=p11"
"p23=p13"
"p25=p15"
```

1 ze

2 3m

4u BLKGRAD

d1 rpp2

50u UNBLKGRAD

d12 pl0:f1

(p21:gp1) (p11:sp1 ph1:r) ; I

d21

d0

(p12:sp2 ph2:r) ; S

4u

(p23:gp1) (p13:sp3 ph3:r) ; I

d21

d0
 (p14:sp4 ph4:r) ; S
 5u
 (p25:gp1) (p15:sp5 ph5:r) ; I
 d21
 (p16:gp2)
 d21
 (p21:gp1) (p11:sp1 ph6:r) ; I
 d21 pl1:f1

ACQ_START(ph30,ph31)

0.05u DWL_CLK_ON
 0.1u REC_UNBLK
 d3:r
 0.1u REC_BLK
 0.05u DWL_CLK_OFF

p17:gp3
 d16 pl1:f1
 p2 ph7
 p17:gp3
 d16

p17:gp4
 d16 pl0:f1
 10u
 d11 gron1
 (p18:sp8 ph8)
 d11 groff
 10u
 p17:gp4
 d16

3 0.05u DWL_CLK_ON
 0.1u REC_UNBLK
 d2:r
 0.1u REC_BLK
 0.05u DWL_CLK_OFF

p17:gp3

d16 pl1:f1
p2 ph7
p17:gp3
d16

p17:gp4
d16 pl0:f1
10u
d11 gron1
(p18:sp8 ph8)
d11 groff
10u
p17:gp4
d16

lo to 3 times l1

0.05u DWL_CLK_ON
0.1u REC_UNBLK
d3
25m
0.1u REC_BLK
0.05u DWL_CLK_OFF

rcyc=2

2m wr #0 if #0 id0 zd
lo to 2 times td1
exit

ph1 = 0 2 0 2
ph2 = 0 0 2 2
ph3 = 0 0 2 2
ph4 = 0 0 2 2
ph5 = 0 2 2 0
ph6 = 0 1 2 3
ph7 = 0 2
ph8 = 2 0
ph30=0
ph31=3 0 3 0

```

;sp1: 90deg encoded pulse power level on I
;sp2: 180deg selective pulse power level on S
;sp3: 180deg encoded pulse power level on I
;sp4: 180deg selective pulse power level on S
;sp5: 90deg flip-back encoded pulse power level on I
;sp8: 180deg encoded pulse power level on I

;spnam1: Shape pulse for 90deg encoded pulse on I
;spnam2: Shape pulse for 180deg selective pulse on S
;spnam3: Shape pulse for 180deg encoded pulse on I
;spnam4: Shape pulse for 180deg selective pulse on S
;spnam5: Shape pulse for 90deg flip-back encoded pulse on I
;spnam8: Shape pulse for 180deg encoded pulse on I

;spoffs1: Offset of I (encoded)
;spoffs2: Offset of S
;spoffs3: Offset of I (encoded)
;spoffs4: Offset of S
;spoffs5: Offset of I (encoded)
;spoffs8: Offset of I (encoded)

;p1 : f1 channel - high power pulse
;p11: 90deg encoded pulse on I
;p12: 180deg pulse on S
;p13: 180deg encoded pulse on I
;p14: 180deg pulse on S
;p15: 90deg flip-back encoded pulse on I
;p16: Gradient duration (z-filter) [1 ms]
;p17: Gradient duration (push)
;p18: 180deg encoded pulse on I

;gpz3: CTP
;gpz4: CTP

;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay
;NS : 4 * n
;l1 : number of concatenated loops
;td1 : number of experiments
;FnMODE: QSEQ

```

|Références

- J. Jeener, in *International Ampere Summer School*, Basko Polje, Yugoslavia, **1971**.
- W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.
- M. Ottiger, F. Delaglio, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1998**, *131*, 373-378.
- W. P. Aue, J. Karhan, R. R. Ernst, *The Journal of Chemical Physics* **1976**, *64*, 4226-4227.
- R. Freeman, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1397-1412.
- H. Geen, R. Freeman, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1991**, *95*, 93-141.
- T. Facke, S. Berger, *J. Magn. Reson.* **1995**, *113*, 114-116.
- J. M. Nuzillard, *J. Magn. Reson.* **2007**, *187*, 193-198.
- N. Giraud, L. Beguin, J. Courtieu, D. Merlet, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3481-3484.
- D. Merlet, L. Beguin, J. Courtieu, N. Giraud, *J. Magn. Reson.* **2011**, *209*, 315-322.
- K. Zangger, H. Sterk, *J. Magn. Reson.* **1997**, *124*, 486-489.
- J. A. Aguilar, S. Faulkner, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3901-3903.
- G. A. Morris, J. A. Aguilar, R. Evans, S. Haiber, M. Nilsson, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12770-12772.
- J. A. Aguilar, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 9716-9717.
- J. A. Aguilar, A. A. Colbourne, J. Cassani, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51*, 6460-6463.
- M. Foroozandeh, R. W. Adams, N. J. Meharry, D. Jeannerat, M. Nilsson, G. A. Morris, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 6990-6992.
- M. Foroozandeh, R. W. Adams, M. Nilsson, G. A. Morris, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11867-11869.
- N. H. Meyer, K. Zangger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 7143-7146.
- L. Castanar, P. Nolis, A. Virgili, T. Parella, *Chemistry* **2013**, *19*, 17283-17286.
- N. H. Meyer, K. Zangger, *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 1488-1490.
- N. Gubensak, W. M. Fabian, K. Zangger, *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 12254-12257.
- N. Lokesh, S. R. Chaudhari, N. Suryaprakash, *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 15597-15600.
- E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Physical Review* **1946**, *69*, 37-38.
- F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Physical Review* **1946**, *69*, 127-127.
- F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Physical Review* **1946**, *70*, 474-485.
- W. C. Dickinson, *Physical Review* **1950**, *77*, 736-737.
- W. G. Proctor, F. C. Yu, *Physical Review* **1950**, *77*, 717-717.
- E. L. Hahn, D. E. Maxwell, *Physical Review* **1951**, *84*, 1246-1247.
- H. S. Gutowsky, D. W. McCall, *Physical Review* **1951**, *82*, 748-749.
- R. R. Ernst, *Rev. Sci. Instrum.* **1966**, *37*, 93.
- T. Havel, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1985**, *182*, 281-294.
- Y. Q. Qian, M. Billeter, G. Otting, M. Muller, W. J. Gehring, K. Wuthrich, *Cell* **1989**, *59*, 573-580.
- R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wuthrich, *Nature* **1996**, *382*, 180-182.
- K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, *94*, 12366-12371.
- E. R. Andrew, A. Bradbury, R. G. Eades, *Nature* **1958**, *182*, 1659-1659.
- I. J. Lowe, *Phys. Rev. Lett.* **1959**, *2*, 285-287.

- A. Kumar, R. R. Ernst, K. Wüthrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, *95*, 1-6.
- G. Bodenhausen, D. J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185-189.
- A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-2094.
- M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler, *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *34*, 1671-1695.
- M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.
- M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2870-2871.
- E. L. Hahn, *Physical Review* **1950**, *86*, 580-594.
- M. H. Levitt, R. Freeman, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1979**, *35*, 473-476.
- R. R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Second ed., Clarendon Press, Oxford, **1987**.
- J.-M. Nuzillard, *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1996**, *118*, 132-135.
- P. Sakhaii, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **2014**, *242*, 220-223.
- P. Mutzenhardt, F. Guenneau, D. Canet, *J. Magn. Reson.* **1999**, *141*, 312-321.
- M. J. Thrippleton, J. Keeler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 3938-3941.
- S. Cadars, A. Lesage, N. Hedin, B. F. Chmelka, L. Emsley, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16982-16991.
- L. Beguin, J. Courtieu, L. Ziani, D. Merlet, *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 1096-1101.
- L. Beguin, N. Giraud, J. M. Ouvrard, J. Courtieu, D. Merlet, *J. Magn. Reson.* **2009**, *199*, 41-47.
- A. J. Pell, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **2007**, *189*, 293-299.
- L. Frydman, T. Scherf, A. Lupulescu, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 15858-15862.
- Y. Shrot, L. Frydman, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11385-11396.
- P. Giraudeau, S. Akoka, *J. Magn. Reson.* **2007**, *186*, 352-357.
- P. Pelupessy, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12345-12350.
- P. Pelupessy, L. Duma, G. Bodenhausen, *J. Magn. Reson.* **2008**, *194*, 169-174.
- P. Giraudeau, S. Akoka, *J. Magn. Reson.* **2008**, *190*, 339-345.
- A. J. Pell, R. A. Edden, J. Keeler, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 296-316.
- J. R. Garbow, D. P. Weitekamp, A. Pines, *Chem. Phys. Lett.* **1982**, *95*, 504-509.
- A. Lupulescu, G. L. Olsen, L. Frydman, *J. Magn. Reson.* **2012**, *218*, 141-146.
- A. Bax, A. F. Mehlkopf, J. Smidt, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1979**, *35*, 167-169.
- A. Bax, R. Freeman, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1981**, *44*, 542-561.
- B. T. Farmer II, L. R. Brown, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1987**, *71*, 365-370.
- M. Nilsson, G. A. Morris, *Chem. Commun.* **2007**, 933-935.
- P. Sakhaii, B. Haase, W. Bermel, R. Kerssebaum, G. E. Wagner, K. Zangger, *J. Magn. Reson.* **2013**, *235*, 92-95.
- S. Glanzer, E. Schrank, K. Zangger, *J. Magn. Reson.* **2013**, *232*, 1-6.
- S. Glanzer, K. Zangger, *Chemistry* **2014**, *20*, 11171-11175.
- T. Niklas, D. Stalke, M. John, *Chem Commun* **2015**, *51*, 1275-1277.
- G. E. Wagner, P. Sakhaii, W. Bermel, K. Zangger, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 3155-3157.
- Lokesh, N. Suryaprakash, *Chem. Commun.* **2014**, *56*, 8550-8553.
- M. Bak, J. T. Rasmussen, N. C. Nielsen, *J. Magn. Reson.* **2000**, *147*, 296-330.
- I. Wolfram Research, 8.0 ed., Wolfram Research, Inc., Champaign, Illinois, **2010**.

-
- M. H. Levitt, *Spin Dynamics, Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, First ed., Wiley-Interscience, Chichester, **2001**.
- H. Kovacs, D. Moskau, M. Spraul, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2005**, *46*, 131-155.
- N. Giraud, D. Pitoux, J.-M. Ouvrard, D. Merlet, *Chemistry - A European Journal* **2013**, *19*, 12221-12224.
- D. Pitoux, B. Plainchont, D. Merlet, Z. Hu, D. Bonnaffe, J. Farjon, N. Giraud, *Chemistry* **2015**, *21*, 9044-9047.
- J. D. Esko, U. Lindahl, *J. Clin. Invest.* **2001**, *108*, 169-173.
- H. Lortat-Jacob, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 543-548.
- D. Bonnaffé, *Comptes Rendus Chimie* **2011**, *14*, 59-73.
- J. Ø. Duus, C. H. Gotfredsen, K. Bock, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4589-4614.
- L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1983**, *53*, 521-528.
- B. Plainchont, A. Martinez, S. Tisse, J. P. Bouillon, F. Pilard, J. M. Wieruszkeski, G. Lippens, D. Jeannerat, J. M. Nuzillard, *Magn. Reson. Chem.* **2011**, *49*, 781-787.