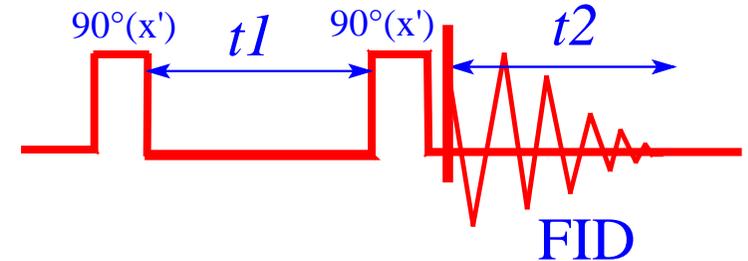


# Résonance Magnétique Nucléaire 2D

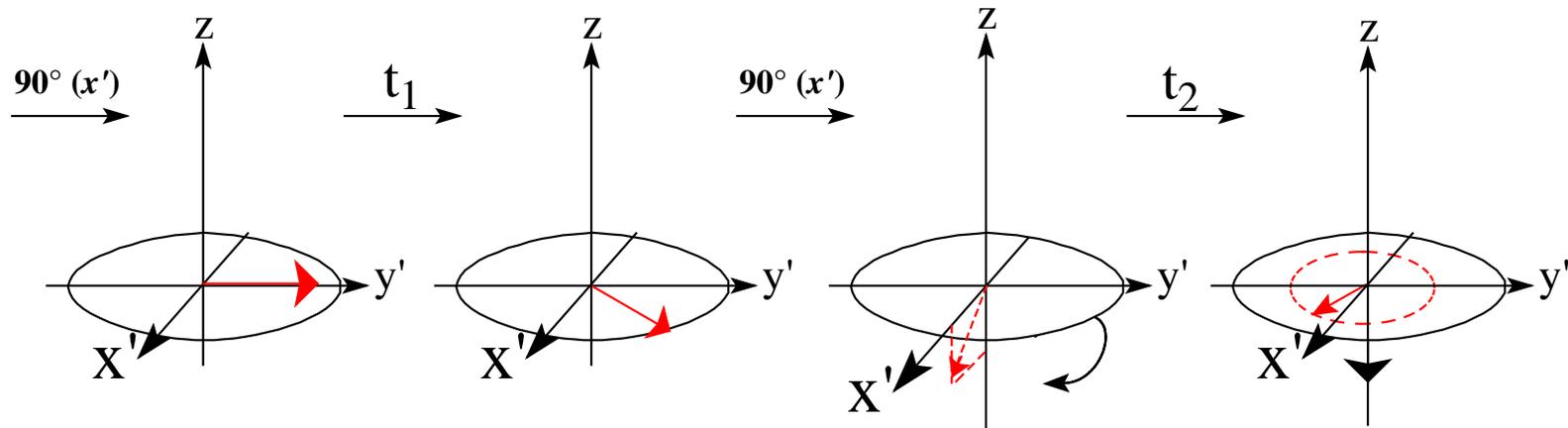
Le domaine de la RMN à deux dimensions (2D), puis à  $n$  dimensions s'est développé à partir de 1980 (Jeener). Depuis, son essor est considérable; mais nous nous limiterons ici aux principes généraux de la RMN 2D et à l'étude de quelques séquences impulsionnelles.

## ➤ Principe de la RMN 2D

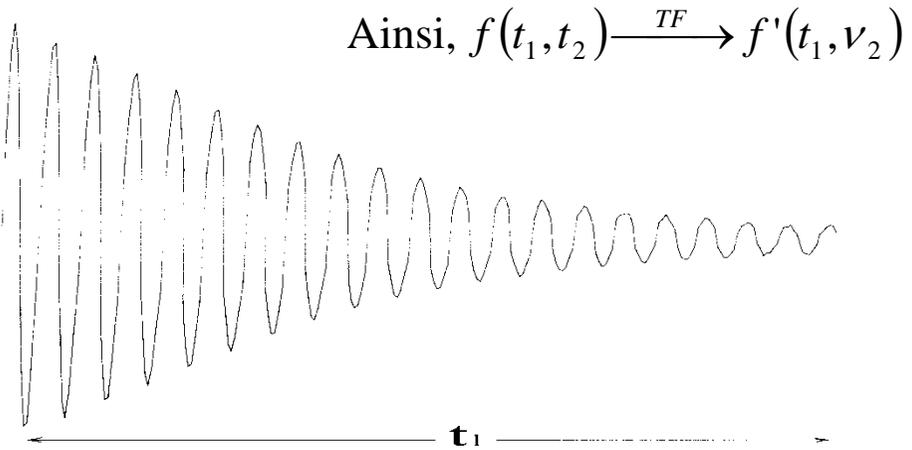


Soit un échantillon de  $\text{CHCl}_3$  étudié en RMN  $^1\text{H}$ . Le spectre 1D de cet échantillon ne présente qu'un seul signal à la fréquence de résonance  $\nu_0$  ( $\omega_0$ ). On réalise sur cet échantillon la séquence de RMN 2D la plus simple.

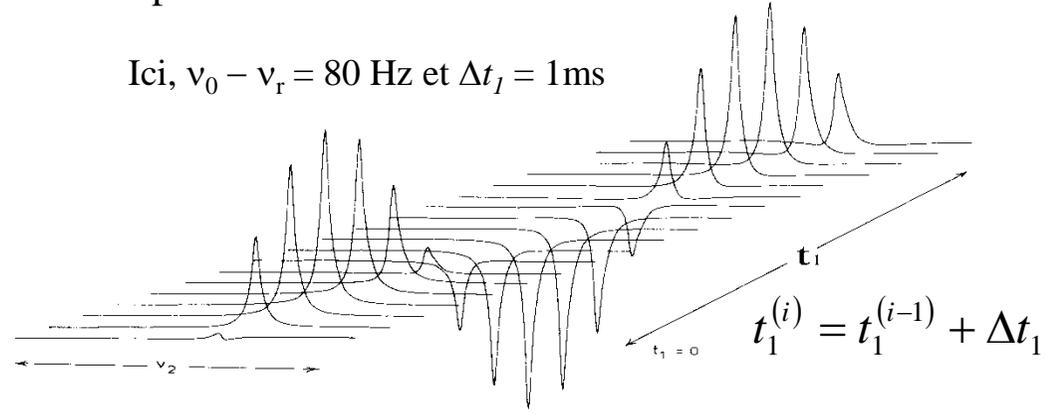
Cette séquence consiste en deux impulsions de  $90^\circ$  séparées par une période  $t1$  de précession libre et suivies d'une détection du FID pendant  $t2$ . L'évolution de l'aimantation pour cet échantillon de spins équivalents de fréquence  $\nu_0 - \nu_r$  (référentiel tournant) est décrite à l'aide du modèle vectoriel. Pour en simplifier la compréhension, nous négligeons complètement la relaxation longitudinale ( $R_1$ ) pendant  $t1$ .



Après le délai  $t_1$ ,  $\vec{M}$  a effectué une précession de  $\Omega t_1$  dans le plan  $x'y'$ . La seconde impulsion  $90^\circ(x')$  ramène l'aimantation dans le plan  $x'z$ . La composante  $\vec{M}_z$  après la seconde impulsion ne contribue pas au signal détecté pendant  $t_2$ . On détecte  $\vec{M}_\perp$ . L'amplitude du FID dépend de  $\vec{M}_\perp$  pendant  $t_2$ ; la hauteur de la raie lorentzienne obtenue par TF est proportionnelle à l'amplitude de  $\vec{M}_\perp$  à  $t_2 = 0$ , définie par l'évolution de  $\vec{M}$  pendant  $t_1$ . Donc, une série d'expériences réalisée en ajoutant à chaque fois un incrément  $\Delta t_1$ , c'est à dire avec des valeurs croissantes de la période d'évolution  $t_1$  ( $0, \Delta t_1, 2\Delta t_1, \dots$ ), donnera une série de FIDs. Ceci correspond à **un échantillonnage discret en fonction de  $t_1$** . La transformée de Fourier de chacun des FIDs donne un signal centré sur la fréquence  $\nu_0$  d'intensité variable en fonction de  $t_1$  (sinusoïde) : on a une modulation en amplitude.



Ici,  $\nu_0 - \nu_r = 80 \text{ Hz}$  et  $\Delta t_1 = 1 \text{ ms}$



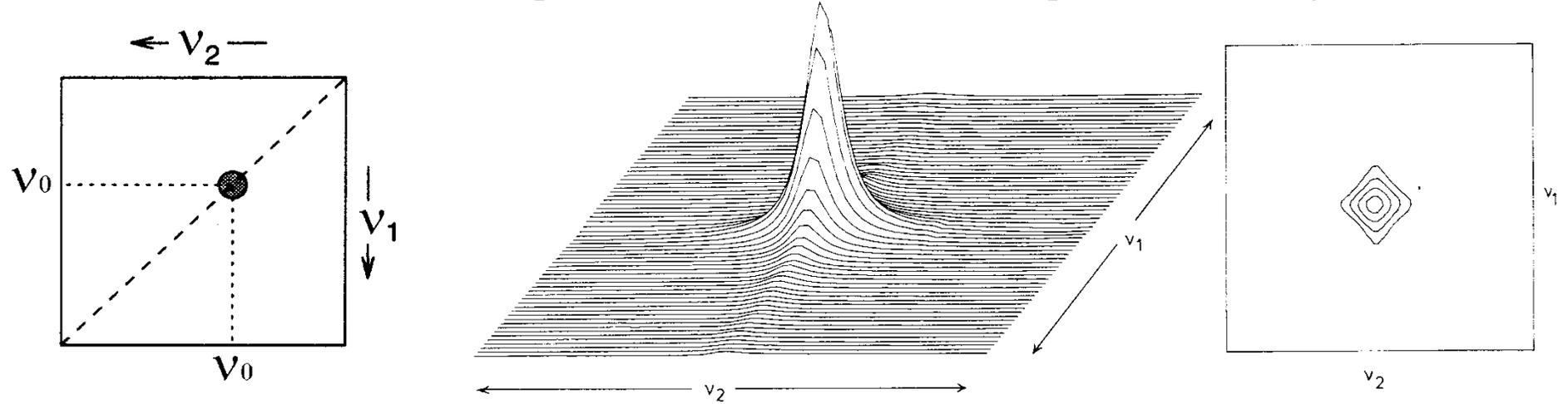
La courbe d'évolution de  $I$  pour  $\nu_2$  donne (et en particulier pour  $\nu_2 \text{max}$ ) une fonction sinusoïdale à décroissance exponentielle gouvernée par  $T_2^*$ . **C'est un FID ou interférogramme  $f'(t_1)$ .**

Si maintenant, on généralise le traitement non pas seulement à la colonne de points  $I_{\text{max}}$  mais à toutes les colonnes de points des FIDs, on génère un **ensemble bi-dimensionnel de données** fonction des deux variables de temps:  $t_1$  et  $t_2$ .

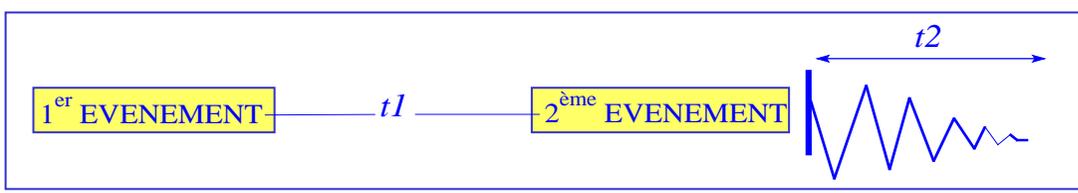
Une deuxième transformée de Fourier de telles données dans la 1<sup>ère</sup> dimension donne une raie lorentzienne à la fréquence  $\nu_0$ ,  $f'(t_1, \nu_2) \xrightarrow{TF} f''(\nu_1, \nu_2)$

On a donc généré un **ensemble bi-dimensionnel de données** fonction des deux variables de temps:  $f(t_1, t_2)$ . La TF de tous les FIDs conduit à un ensemble de spectres modulés en amplitude  $f'(t_1, \nu_2)$ ; puis, la TF des interférogrammes donne un spectre bi-dimensionnel  $f''(\nu_1, \nu_2)$ . En plus de ces deux dimensions en fréquence, il existe une 3<sup>e</sup> dimension qui est l'intensité du signal. La représentation tridimensionnelle n'étant pas pratique pour l'exploitation des spectres, on fait une projection sur un plan, où l'information d'intensité du pic est donnée sous forme de courbes de niveaux (contour).

Le spectre 2D ("carré") contient un seul pic situé sur la diagonale.



La séquence que nous venons d'analyser, n'est pas très informative, mais elle contient tous les éléments d'une expérience de RMN 2D prototype. Toutes les expériences RMN 2D seront construites sur le schéma de base suivant:



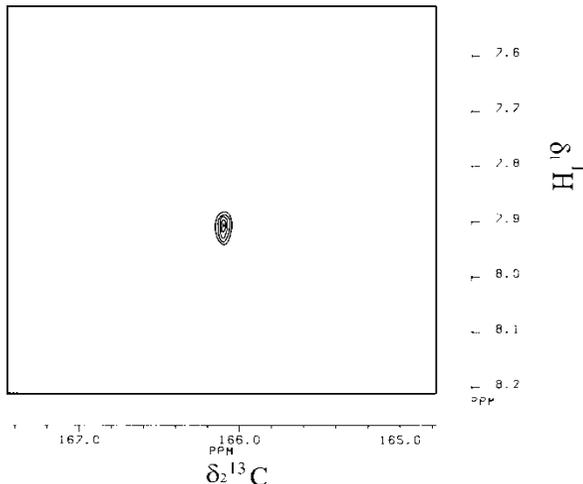
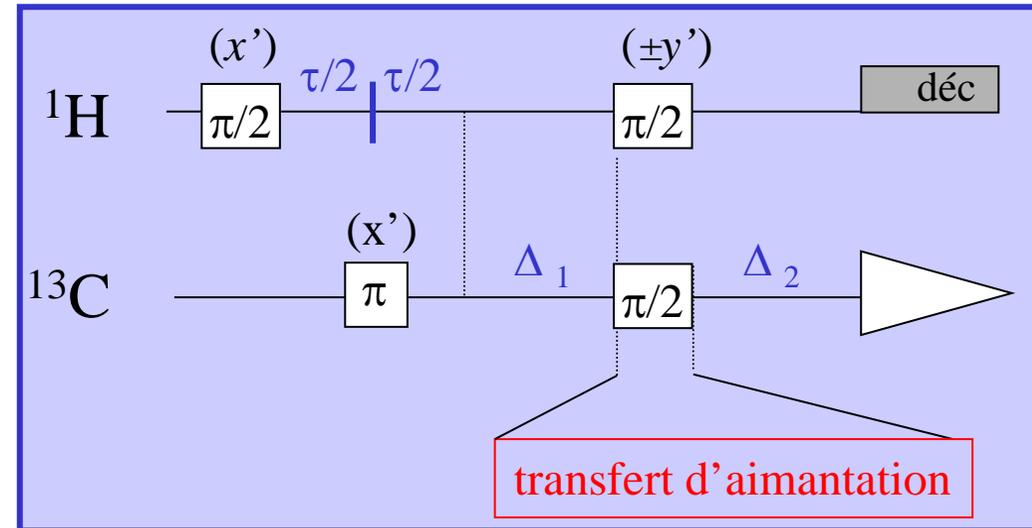
Les évènements 1 et 2 sont plus ou moins complexes selon les informations que l'on veut obtenir. La fréquence de l'aimantation qui évolue pendant  $t_2$  sera invariablement un déplacement chimique (+ couplages). La fréquence pendant  $t_1$  sera différente (déplacement chimique d'un second type de noyau, constante de couplage, etc...).

# A- Corrélations hétéronucléaires - Détection X

## Corrélation hétéronucléaire de déplacement chimique: XHCOOR

La corrélation hétéronucléaire de déplacements chimiques (*anglais: HSC: Heteronuclear Shift Correlation*) utilise le couplage scalaire hétéronucléaire *via* un transfert d'aimantation du noyau le plus sensible ( $^1\text{H}$ ) vers le noyau le moins sensible ( $\text{X} = ^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^{31}\text{P}, \dots$ ). Ici, on prendra l'exemple  $\text{X} = ^{13}\text{C}$ .

L'intervalle  $\tau$  permet le marquage du proton selon son déplacement chimique. L'impulsion  $\pi(x')$  qui se situe au milieu de cet intervalle (= écho de spin) induit la refocalisation des couplages H-C (et pas des déplacements chimiques); c'est à dire qu'*après  $\tau$ , l'effet du couplage est annulé*  $\Rightarrow$  sur le spectre, la dimension  $F_1$  présente des corrélations découplées. Le transfert d'aimantation est réalisé par les deux impulsions à  $\pi/2$ . Le découplage en  $F_2$  est réalisé par la mise en route du découpleur pendant l'acquisition.



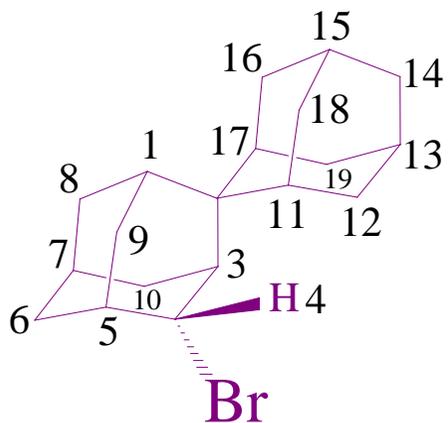
Dans cette séquence,  $t_1 = \tau$  (variable par incrément).

Il faut ajuster les délais d'évolution  $\Delta_1$  et  $\Delta_2$  de telle sorte que  $\Delta_1 = \Delta_2 = 1/(2J)$ . Le cyclage de phase pour la seconde impulsion  $\pi/2$  sur le canal  $^1\text{H}$  ( $\pm y'$ ) supprime l'aimantation transversale  $\vec{M}_{y'}(^{13}\text{C})$ .

Le spectre du couple H- $^{13}\text{C}$  est simple et présente **une seule corrélation** à l'intersection des deux fréquences:  $\nu(^1\text{H})$  et  $\nu(^{13}\text{C})$ .

# Corrélation hétéronucléaire: $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$

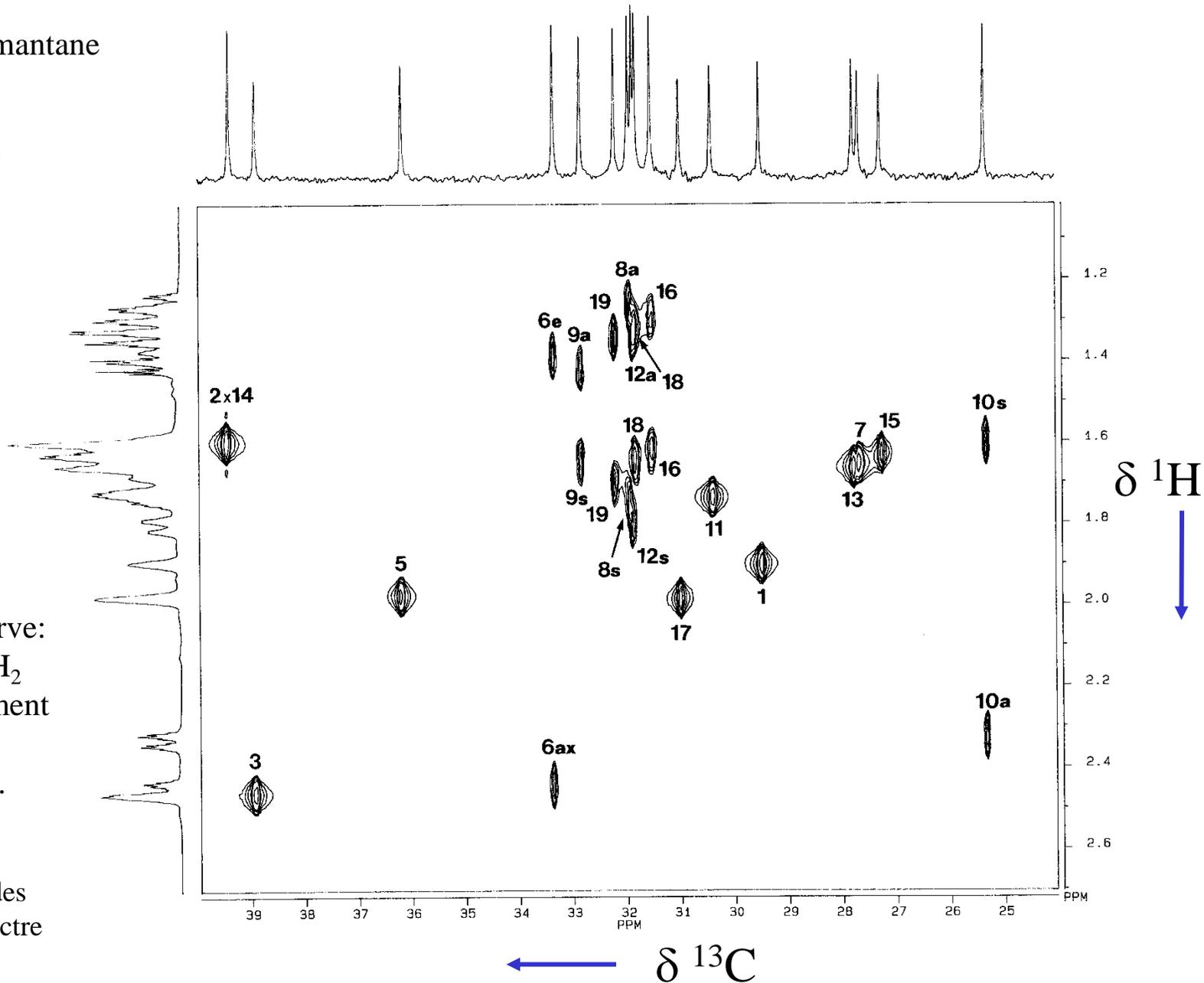
*anti*-4-bromo[1]diadamantane



Pour un même C, on observe:  
-2 corrélations pour un  $\text{CH}_2$   
dont les H sont chimiquement inéquivalents,  
-1 corrélation pour un CH.

*Remarque:*

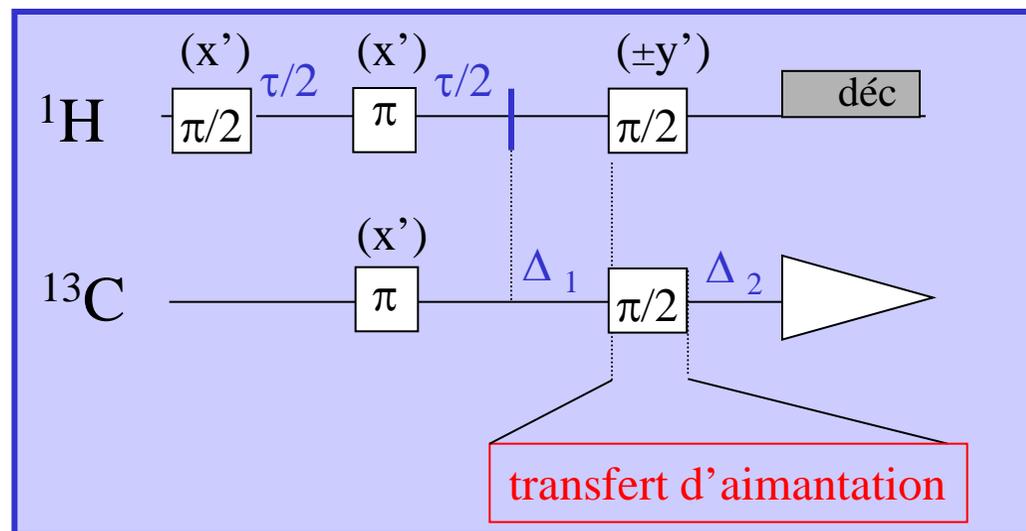
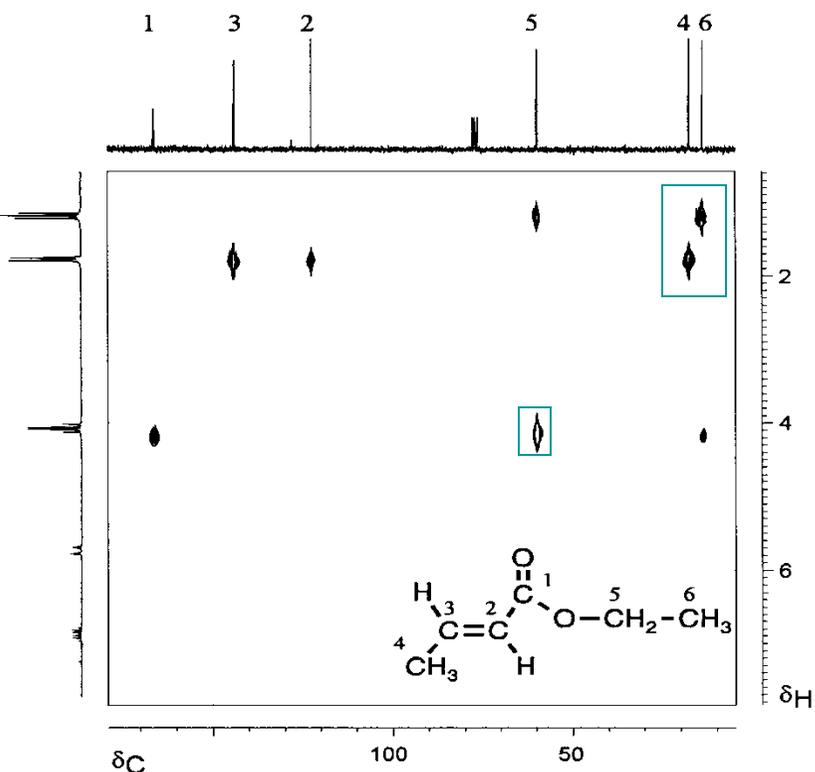
C2, C4 et H4 sont en dehors des gammes de fréquences du spectre donné.



## Corrélation hétéronucléaire de déplacement chimique pour couplages ${}^nJ$ avec $n > 1$ : COLOC

Lorsque les couplages scalaires sont lointains ( ${}^nJ$  avec  $n > 1$ ), le transfert d'aimantation  ${}^1H \rightarrow {}^{13}C$  devient faible. Il faut régler  $\Delta_1$  et  $\Delta_2$  sur des valeurs de  $J$  de 2 à 10 Hz, ce qui entraîne des délais d'évolution longs pendant lesquels l'aimantation transversale diminue en amplitude (relaxation  $R_1$  non négligeable). Il en résulte un spectre souvent bruité duquel on fait des extractions de spectres 1D (selon  $F_2$ ) pour chacun des carbones. La séquence XHCORR est modifiée selon:

La séquence est optimum pour les carbones quaternaires et les protons des carbones voisins.



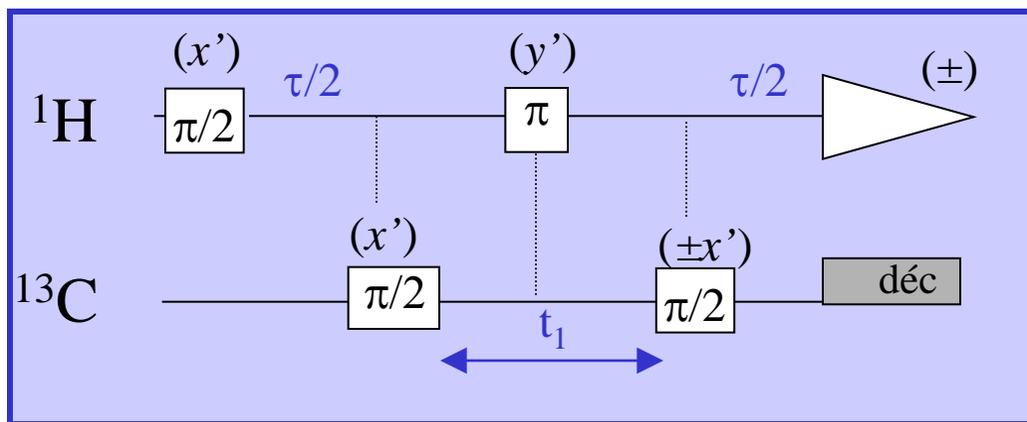
Cette expérience est complémentaire de l'expérience classique, vue avant. Les valeurs de  $\Delta_1$  et  $\Delta_2$  ne constituent pas un filtre absolu des couplages scalaires lointains de telle sorte que l'on recueille également des informations identiques à celles du spectre classique (corrélations encadrées).

## B- Corrélations hétéronucléaires en mode inverse - Détection H

Ces séquences ont pour objectif de révéler des corrélations, toujours par l'intermédiaire d'un couplage  $J$  entre un noyau  $X$  et les protons, en utilisant au mieux la sensibilité optimale inhérente à la détection des transitions protoniques. Le principe est d'éliminer du spectre  $^1\text{H}$ , les signaux "parents", majoritaires dans le cas où  $X = ^{13}\text{C}$  (1%),  $^{15}\text{N}$  (0,37%),...en abondance naturelle, tout en préservant les pics satellites résultant du couplage avec  $X$ .

### Corrélation Hétéronucléaire à transitions Multi-Quanta : HMQC

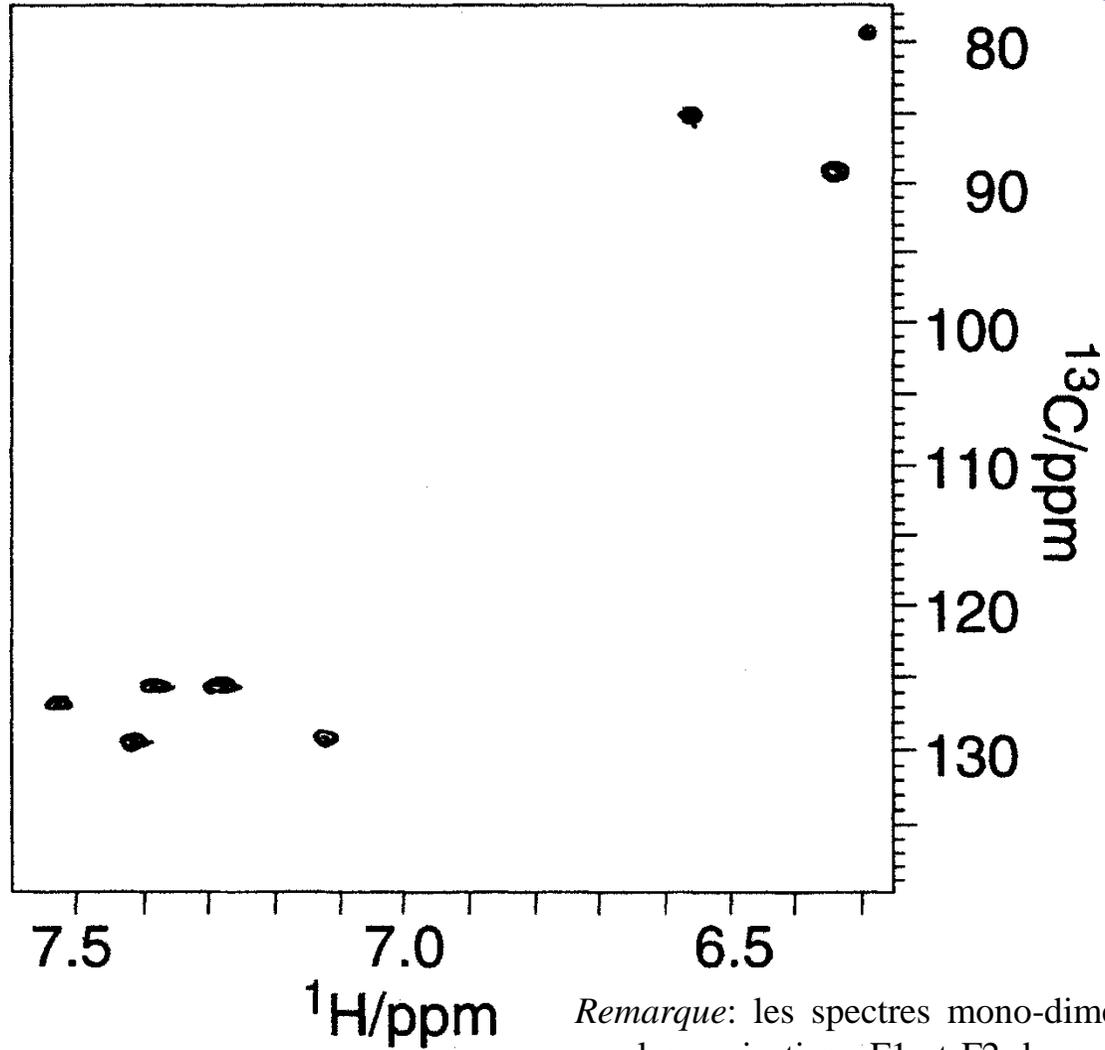
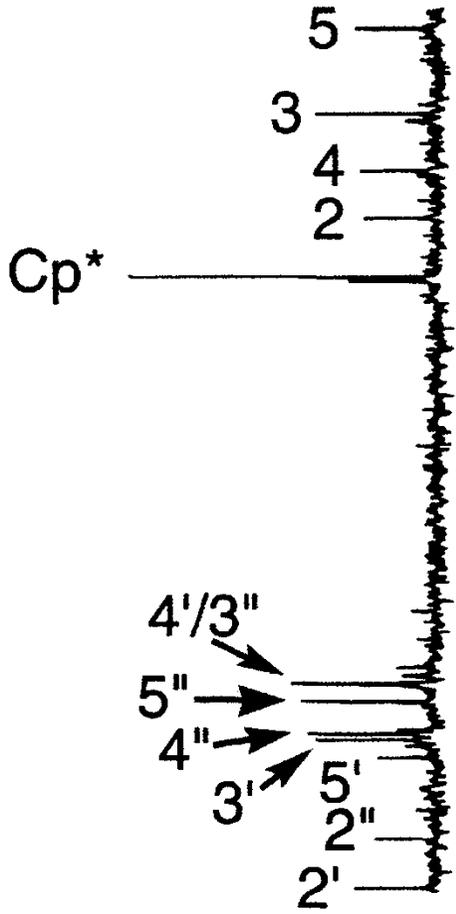
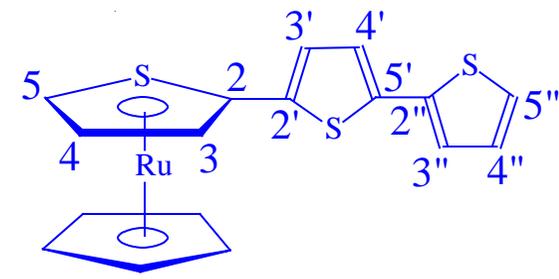
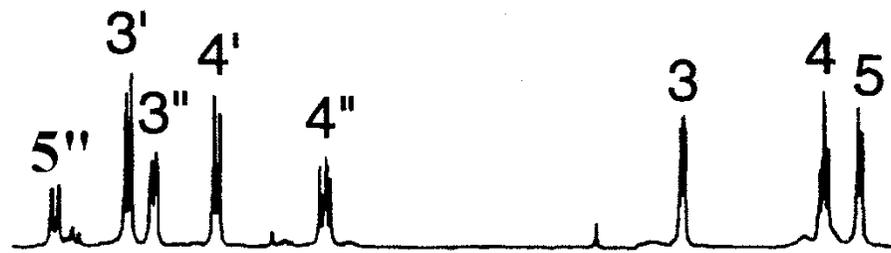
Le schéma de la séquence impulsionnelle HMQC est le suivant:



Le spectre résultant donne des informations similaires à celles de XHCORR. La différence réside dans les dimensions:  $\nu_1$  pour  $^{13}\text{C}$  et  $\nu_2$  pour  $^1\text{H}$ . De plus, le temps d'expérience est considérablement réduit.

On fixe  $\tau/2 = 1/(2J_{\text{H-C}})$ . Au début de l'intervalle  $t_1$ , les aimantations relatives à  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont dans le plan transversal  $(x'y')$  ce qui correspond à un état du système de spins caractérisé par une cohérence à 2 quanta.

A l'issue du premier délai  $\tau/2$ , le doublet protonique  $\{\text{H-C}\uparrow, \text{H-C}\downarrow\}$  est en antiphasse selon  $x'$  (à la résonance). Si aucune impulsion n'est appliquée au  $^{13}\text{C}$ , à la fin du second intervalle  $\tau/2$ , on observe ce doublet en phase selon  $-y'$ . L'ensemble des deux impulsions  $\pi/2$  ( $2 \times \pi/2 \approx \pi$ ) sur  $^{13}\text{C}$  conduit à un doublet protonique en phase selon  $+y'$ . Le fait d'alterner la phase de l'acquisition, permet de recueillir la totalité des signaux protoniques satellites de  $^{13}\text{C}$  et d'éliminer les signaux protoniques parents. Du fait du découplage, on obtient des singulets à la fréquence  $\nu$  donnée. Chaque singulet correspond aux satellites  $^{13}\text{C}$  autour de cette fréquence dans le spectre 1D du proton.

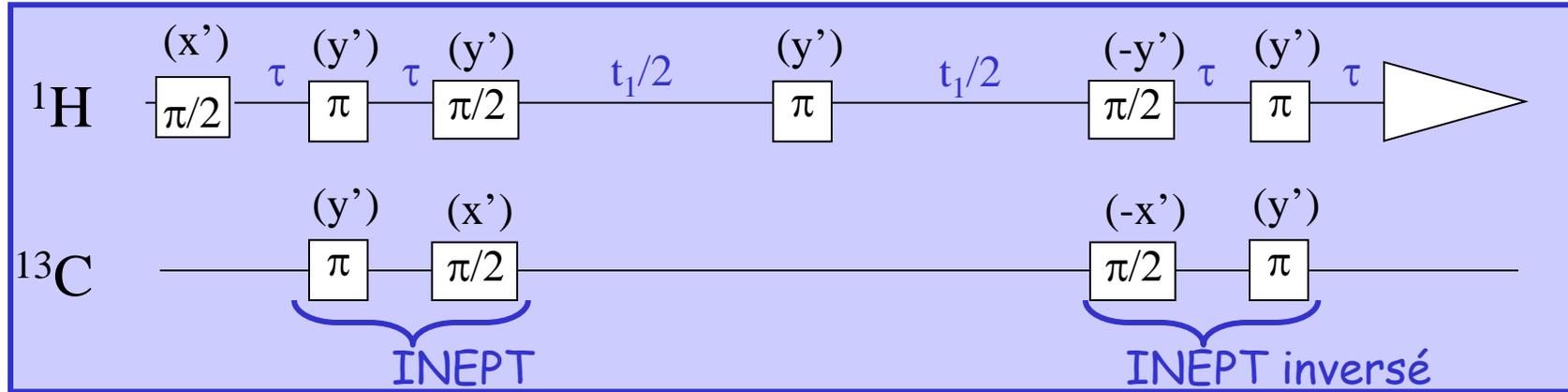


Les protons relatifs à Cp\*  
ont un déplacement chimique < 6,2 ppm.

Remarque: les spectres mono-dimensionnels sur le côté ne sont pas les projections F1 et F2 du spectre 2D mais des spectres 1D,  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .

## Corrélation Hétéronucléaire à Simple Quantum : HSQC

Cette séquence supplante maintenant largement la séquence HMQC. Elle sert de base à des séquences beaucoup plus complexes utilisées pour des expériences de RMN 3D. La séquence HSQC la plus simple est présentée ci-dessous.



Le premier bloc de la séquence est un INEPT qui permet un transfert de polarisation du  $^1\text{H}$  vers le  $^{13}\text{C}$ . Il est suivi d'un délai d'évolution  $t_1$  au milieu duquel une impulsion  $\pi$  refocalise les couplages  $J_{\text{H-C}}$  sans refocaliser les déplacements chimiques en  $^{13}\text{C}$ . Enfin, le dernier bloc est similaire à un INEPT inversé (impulsions et délais appliqués dans l'ordre inverse de celui de l'INEPT) excepté pour la première impulsion qui a été supprimée. Ce dernier bloc permet de générer une aimantation  $\bullet^*(^1\text{H})$  dans le plan  $(x'y')$  tout en alignant  $\bullet^*(^{13}\text{C})$  selon  $z$ . Ainsi, seule sera observable  $\bullet^*(^1\text{H})$ . Comme dans la séquence HMQC, le signal issu du  $^1\text{H}$  a été "modulé" par le noyau  $^{13}\text{C}$  puis est redirigé vers le  $^1\text{H}$  pour la détection.

# C- Corrélations homonucléaires

## COSY 90, COSY 45

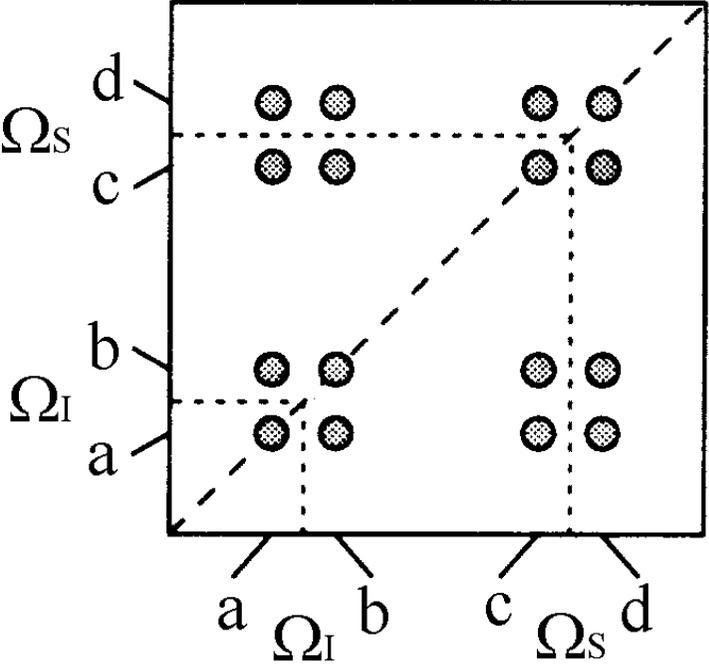
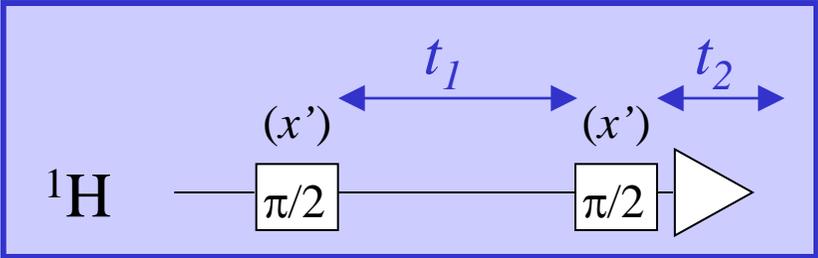
La séquence COSY (CORrelated SpectroscopY) met en évidence les couplages scalaires entre noyaux magnétiquement non équivalents. C'est la séquence de RMN 2D la plus usitée, incontournable pour l'attribution des signaux d'un spectre RMN 1D complexe.

La séquence **COSY 90** consiste en deux impulsions  $\pi/2(x')$  séparées par le délai  $t_1$ .

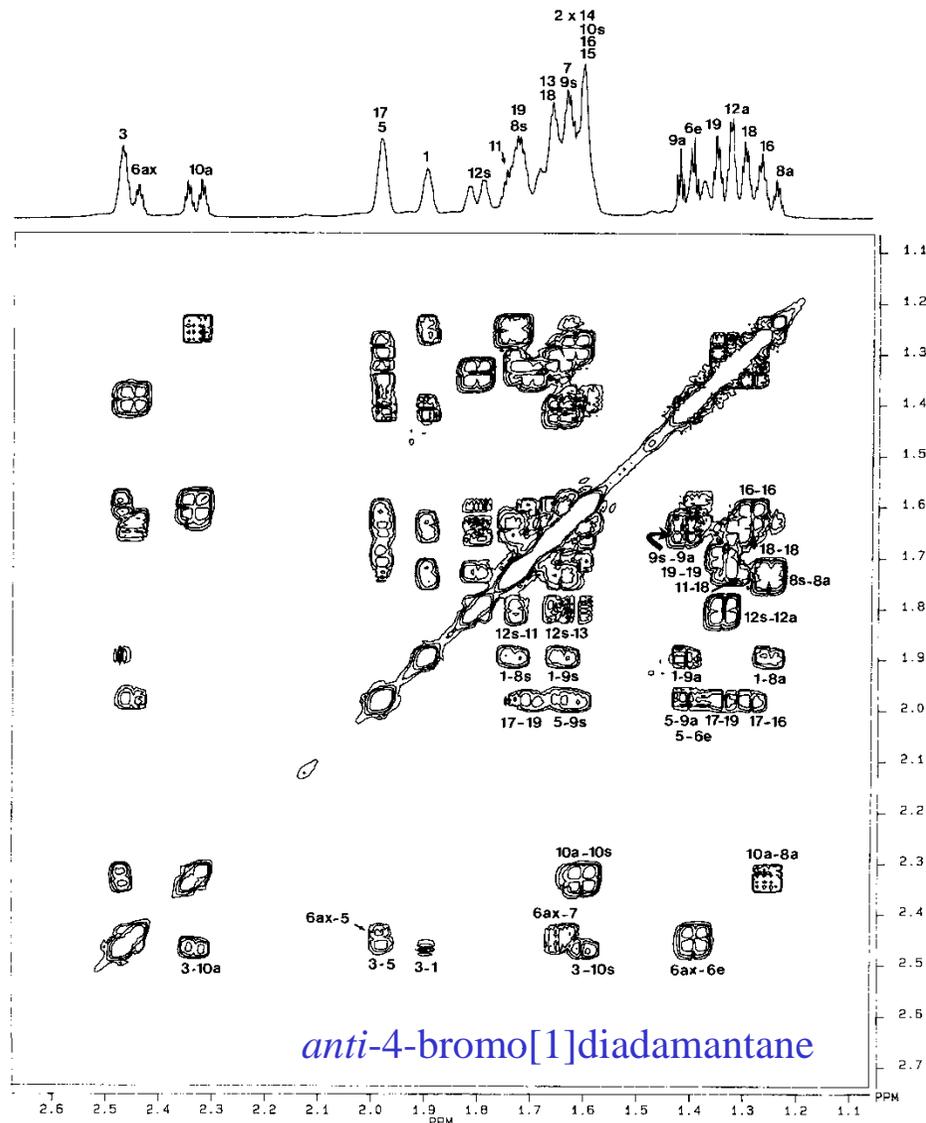
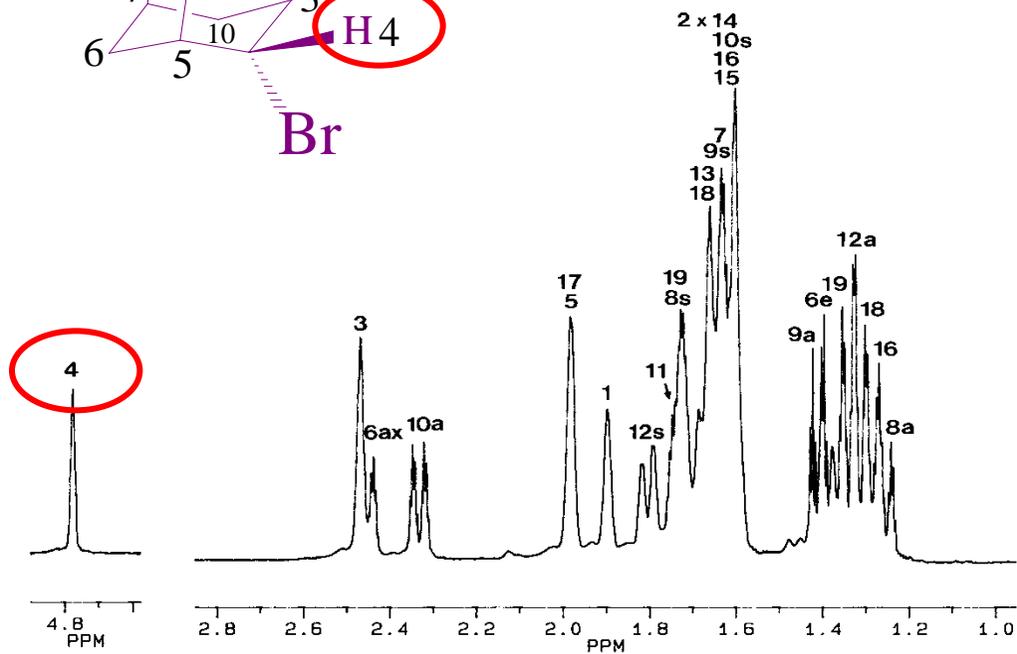
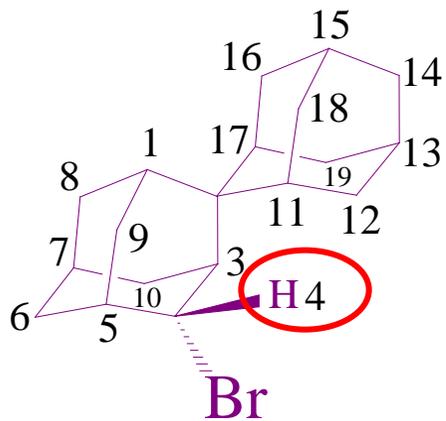
Pendant  $t_1$ , les vecteurs aimantation associés à  $\vec{M}_{//}$  et  $\vec{M}_{\perp}$  évoluent dans le plan transversal  $(x',y')$ .

La seconde impulsion de  $\pi/2$  génère des aimantations longitudinales modulées en amplitude et assure un transfert de polarisation de I vers S, via les couplages scalaires. Ceci conduit aux pics croisés (hors diagonale). Les pics diagonaux résultent de l'aimantation résiduelle non transférée ( $I \rightarrow S$  et  $S \rightarrow I$ ). Un traitement du signal en module donne des signaux indépendants de la phase.

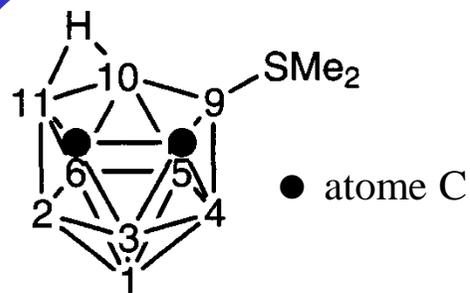
Le spectre obtenu est symétrique par rapport à la diagonale (mêmes informations).



# COSY 90

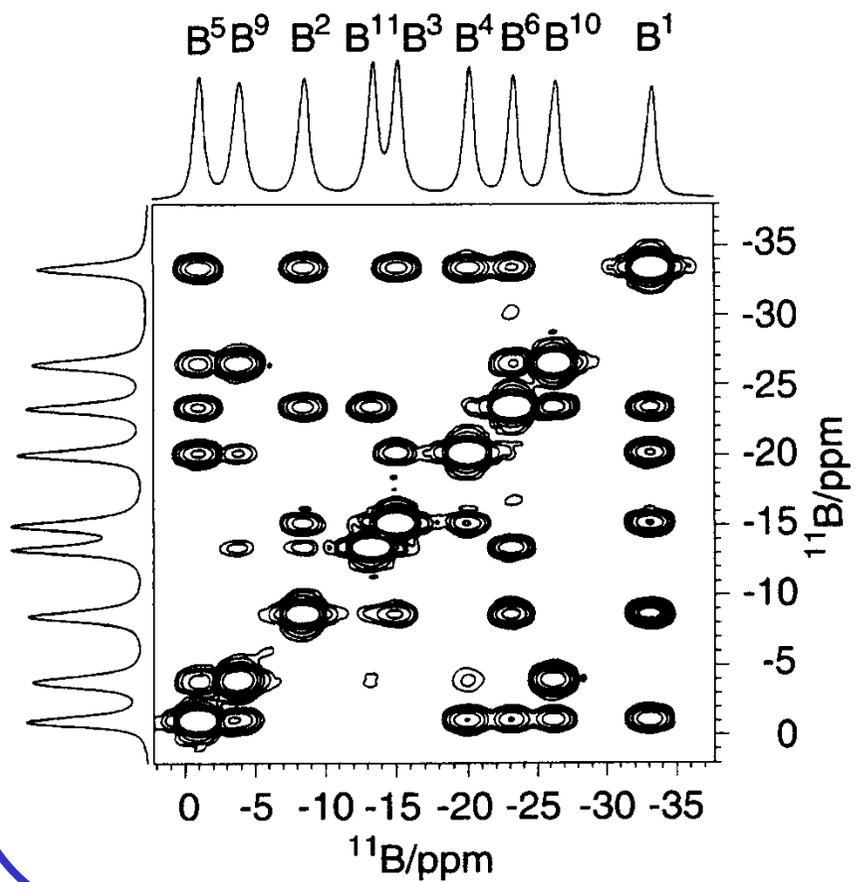


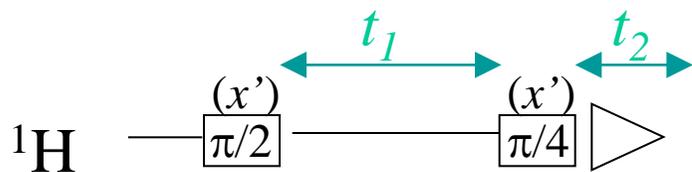
*anti*-4-bromo[1]diadamantane



# COSY 90

(avec découplage  $^1\text{H}$ )





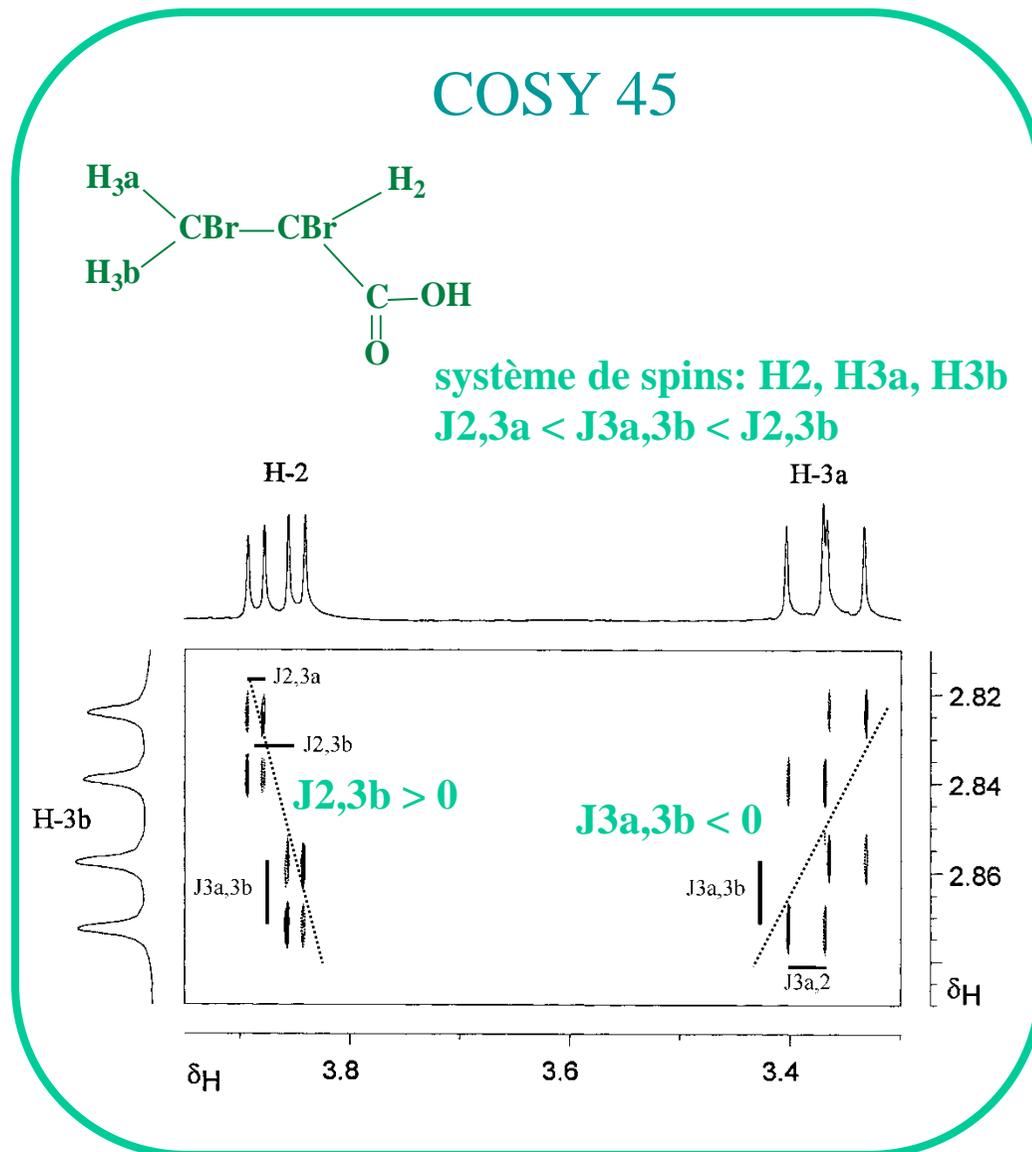
La COSY 45 permet de distinguer les couplages scalaires selon le signe de la constante  $J$ .

L'orientation (pente) des pics de corrélation est fonction du signe de  $J$ .

Sur le spectre ci-contre, le pic croisé  $\nu_i \nu_j$  est tel que: le signal  $\nu_i$  est dédoublé:

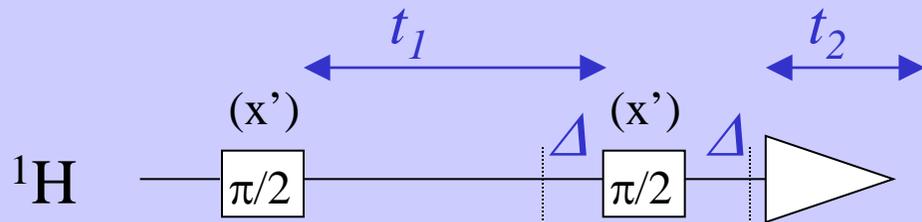
- par  $J_{ik}$  (sans décalage)
- par  $J_{ij}$  (avec décalage en abscisse et ordonnée).

La droite joignant les centres des composantes dues aux couplages  $ik$  et  $jk$  permet de déterminer le signe de  $J$ . Le signe de la pente de cette droite est fonction du signe de  $J$  tel que: une constante  $J_{ij} > 0$  est caractérisée par une pente  $< 0$ .

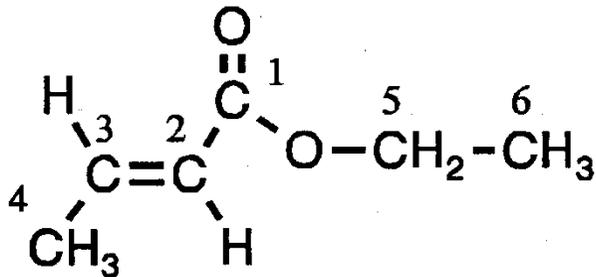


## LR-COSY

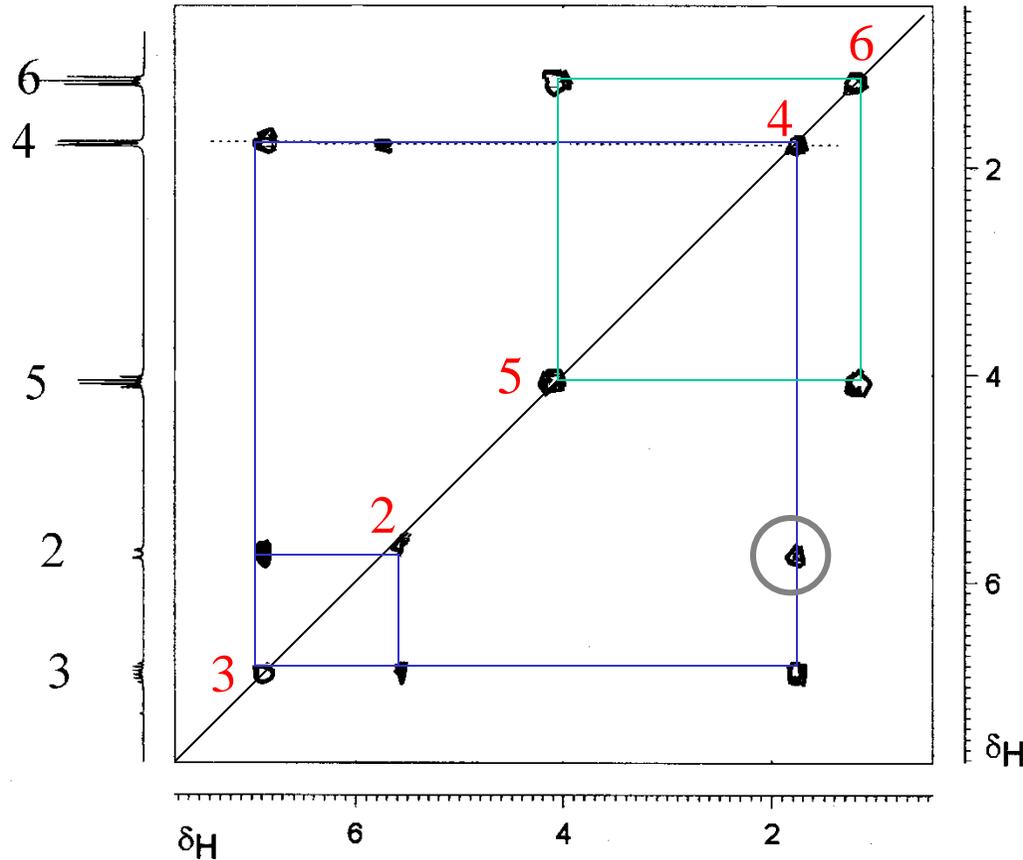
La séquence LR-COSY (Long Range COrelated SpectroscopY) est utilisée pour mettre en évidence des couplages scalaires *via* un nombre de liaisons supérieur à 3. Ces corrélations avec de faibles valeurs de constante  $J$  ( $< 2$  Hz) ne sont pas détectables dans la séquence COSY 90 classique.



Cette expérience est complémentaire de l'expérience COSY 90 classique, vue avant. Les valeurs de  $\Delta$  ne constituent pas un filtre absolu des couplages scalaires lointains de telle sorte que l'on recueille également des informations identiques à celles du spectre classique.

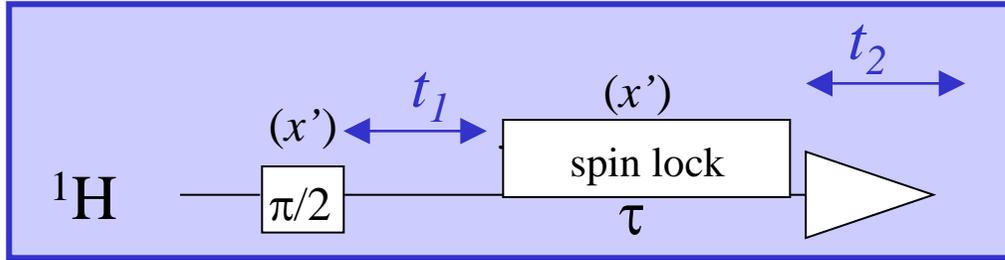


Dans le LR-COSY, les périodes d'évolution et de détection sont augmentées par l'introduction du délai fixe  $\Delta$ .

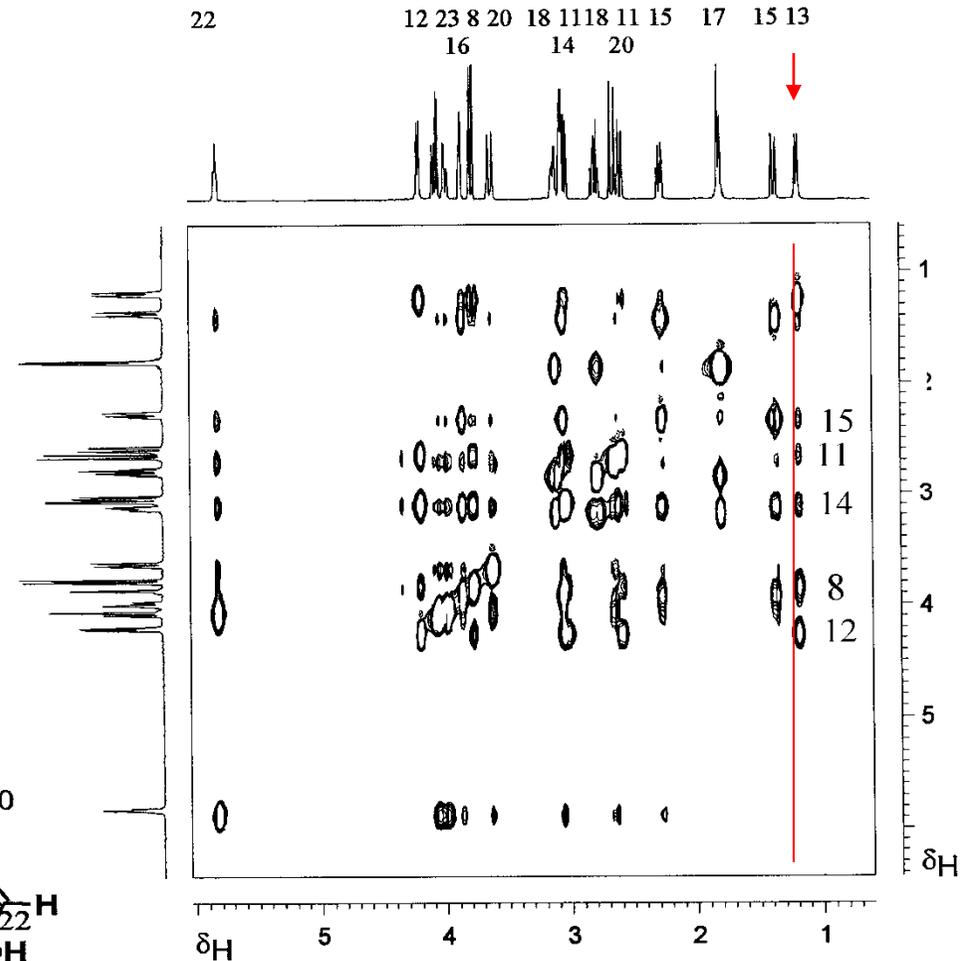
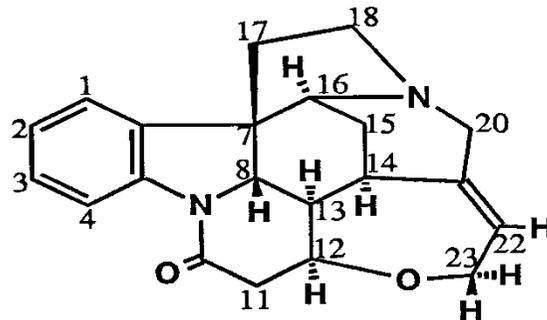


# TOCSY

La séquence TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) est une bonne alternative aux séquences COSY et DQF-COSY pour les grosses molécules. La TOCSY corrèle les spins couplés vicinaux et les spins couplés distants. Ainsi, un système de spins tel ABXYZ sera identifié sur une seule ligne de résonance ( $\nu_A$ , par exemple). Ceci résulte de la **propagation des transferts de polarisation le long du système de spins**.



Le spin-lock correspond à un délai ( $\tau$ ) pendant lequel une impulsion radio-fréquence est appliquée le long de l'axe  $x'$  de manière à maintenir l'aimantation en précession autour de  $x'$  dans le repère tournant. Si  $\tau$  est suffisamment long ( $\approx 100$  ms), le transfert de polarisation se fait d'un spin vers un autre spin du même système (ABXYZ).



## NOESY, ROESY - Couplages dipolaires

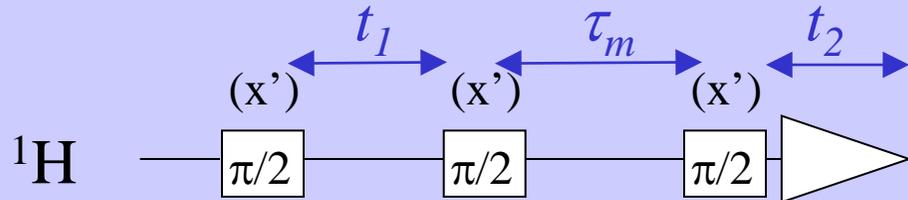
Ces séquences mettent en évidence les couplages dipolaires entre noyaux non équivalents. Ces interactions internucléaires résultent du phénomène de relaxation dipolaire lié aux mouvements moléculaires.

Avantages de la NOESY (ou ROESY) comparée à la séquence 1D NOE équivalente (cf. chapitre 2):

- inutilité de "saturer" sélectivement les résonances individuelles, ce qui est très difficile, voire impossible, lors du recouvrement de raies,
- la mesure simultanée de tous les nOes d'une molécule (surtout de taille importante) est plus rapide que d'effectuer une série de spectres "nOe" unidimensionnels.

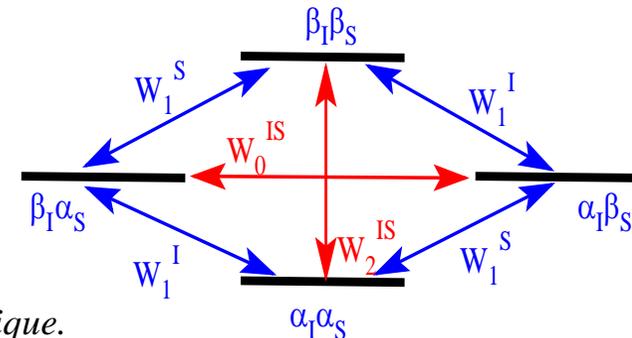
### Séquence NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Soit un couple de protons (I, S) non couplés scalairement et suffisamment proches l'un de l'autre spatialement ( $r_{IS} \leq 5\text{\AA}$ ) pour qu'une interaction dipolaire soit efficace. Le début de la séquence NOESY est identique à celui de la COSY. La 2<sup>e</sup> et la 3<sup>e</sup> impulsion  $\pi/2$  sont espacées d'un délai fixe  $\tau_m$  appelé **temps de mélange**, pendant lequel les transitions zéro-quanta et deux-quanta seront sélectionnées. Pendant  $\tau_m$  (quelques centaines de ms), l'aimantation  $\bullet_z^*(I)$  est transférée sur  $\bullet_z^*(S)$  selon un mécanisme de relaxation croisée (nOe).

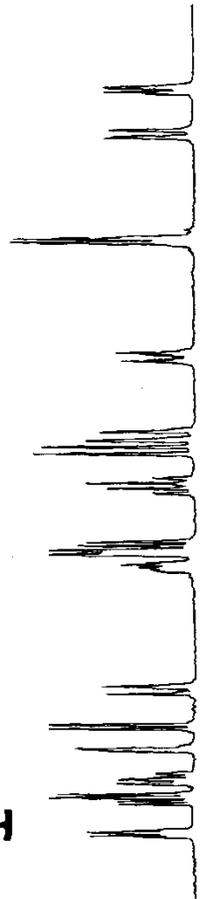
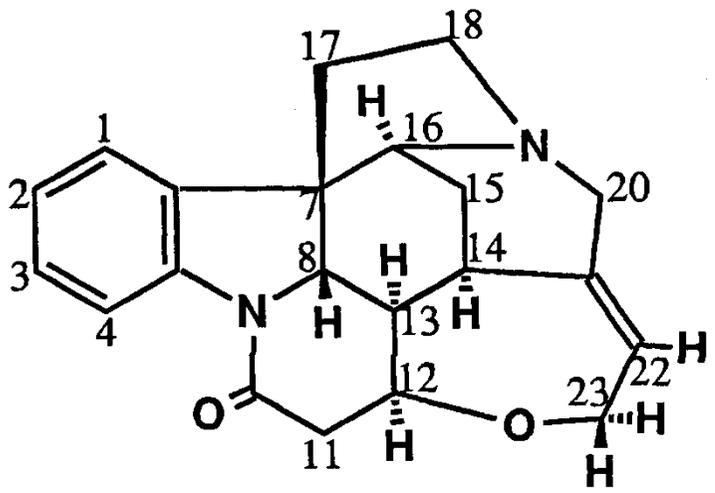
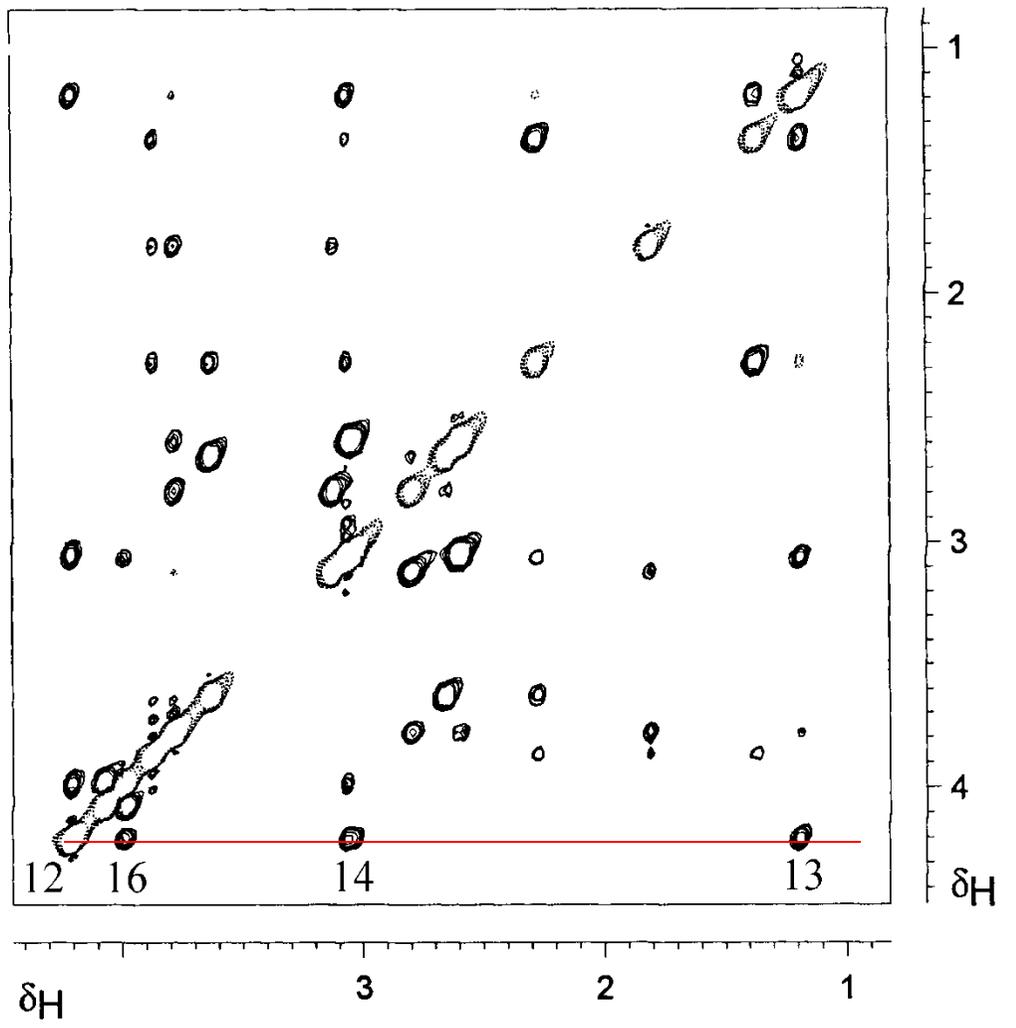
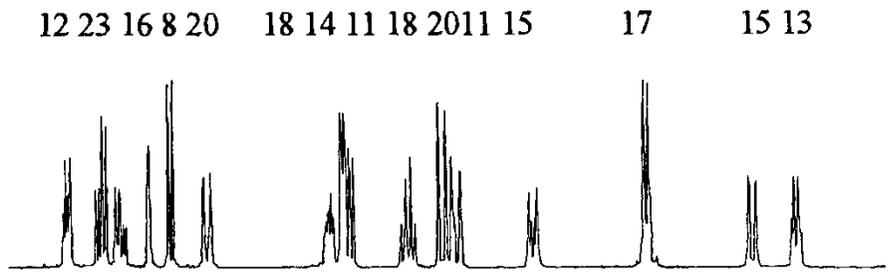
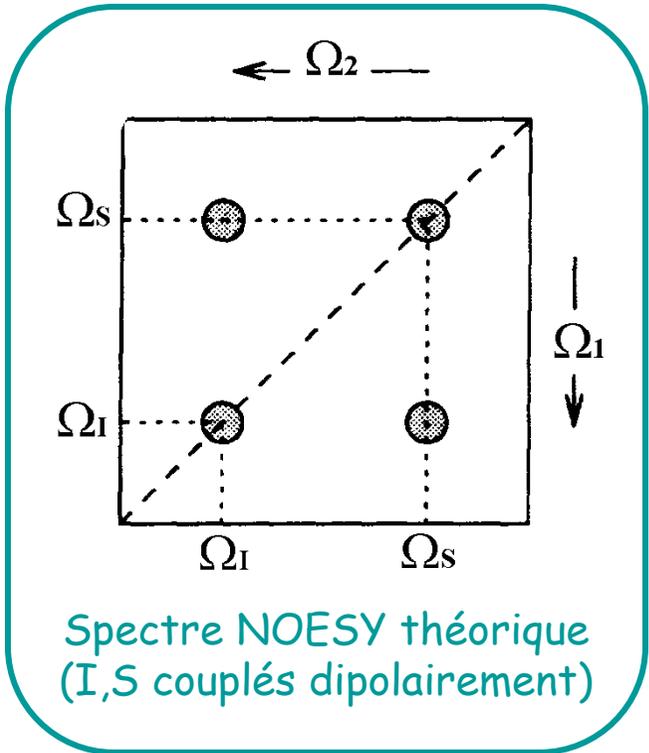


L'observation de pics croisés (nOe) dans le spectre 2D indique que les noyaux ( $^1\text{H}$ ) concernés sont distants de  $r \leq 5\text{\AA}$ .

**Rappel: origine du nOe.** Les chemins de relaxation spin-réseau possibles pour deux spins I et S, sont au nombre de 6, dont 4 s'accompagnent du changement  $\Delta m_I$  ou  $\Delta m_S = 1$ . Pour ces derniers, les constantes vitesses sont notées  $W_1^I$  ou  $W_1^S$ . Les deux autres processus sont appelés **relaxations croisées** où I et S relaxent simultanément ( $W_2^{IS}$  ou  $W_0^{IS}$ ). Les constantes  $W_2^{IS}$  et  $W_0^{IS}$  sont associées à des phénomènes dynamiques de retour de l'aimantation vers l'état d'équilibre. Ces constantes de vitesse sont  $\propto r_{IS}^{-6}$ .

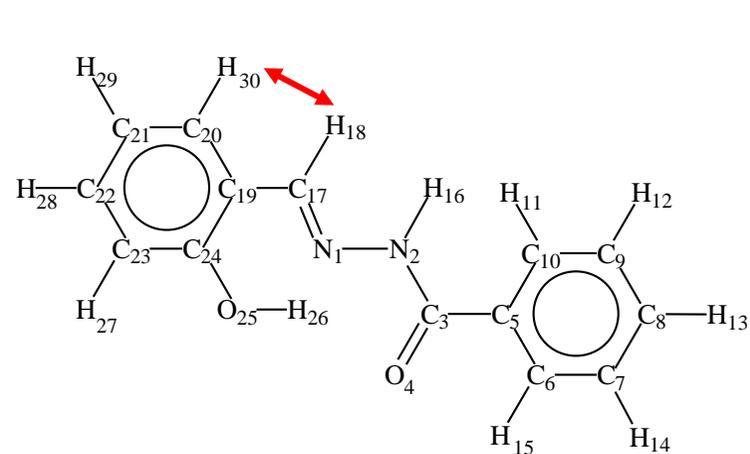
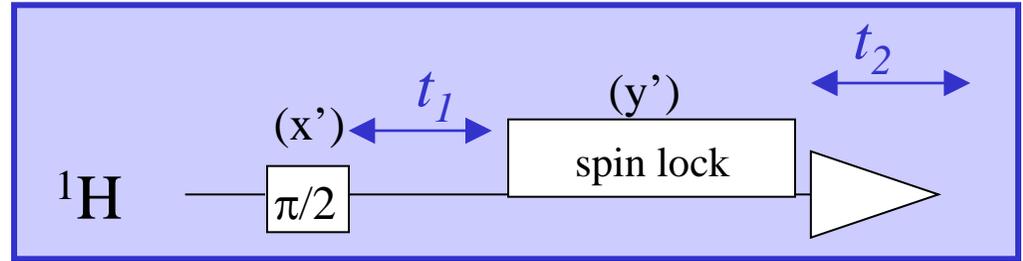
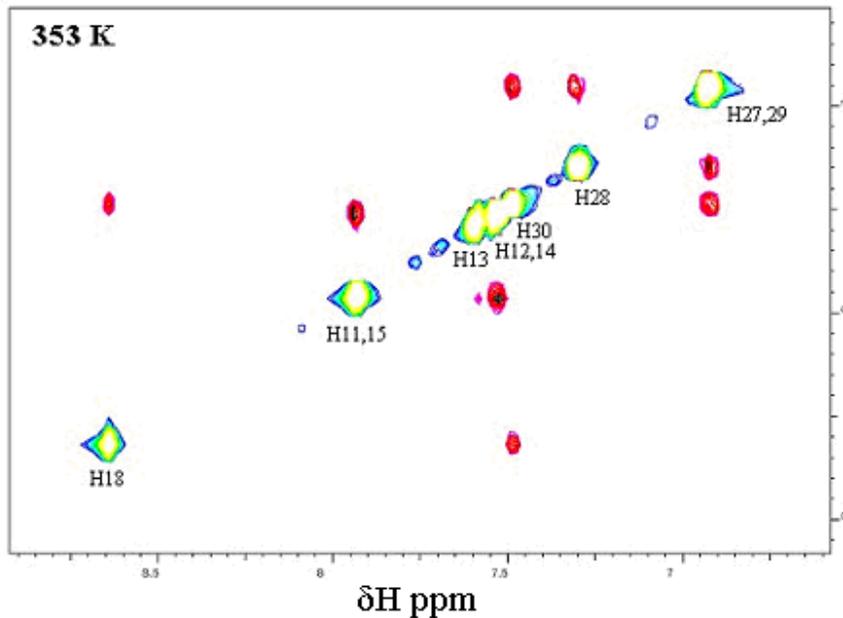


N.B. la même séquence permet aussi d'observer les corrélations de noyaux en échange chimique.



## Séquence ROESY

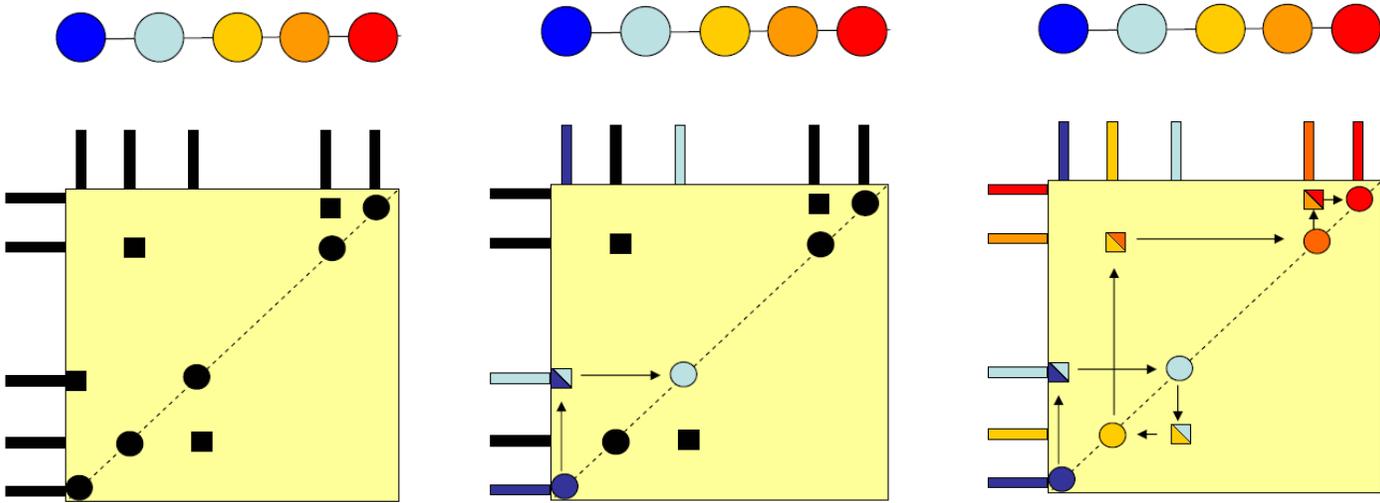
Contrairement aux termes de relaxation croisée longitudinale détectés par la NOESY, la ROESY s'intéresse aux termes de **relaxation croisée transversale**. Dans certaines conditions de mobilité moléculaire, les termes de relaxation croisée longitudinale deviennent très faibles voire nuls tandis que les termes de relaxation croisée transversale sont toujours positifs. Les informations dispensées par le ROESY sont identiques à celles du NOESY: les contacts dipolaires entre spins (nOe). Par contre, la phase des divers signaux diffère. Les pics de corrélation (hors diagonale) provenant de l'effet ROE sont de signe opposé aux pics de la diagonale. Les pics de corrélation provenant d'un phénomène d'échange chimique sont de même signe que les pics diagonaux. Cette expérience permet de distinguer les contributions dipolaires des contributions d'échange. La ROESY est donc complémentaire de la NOESY.



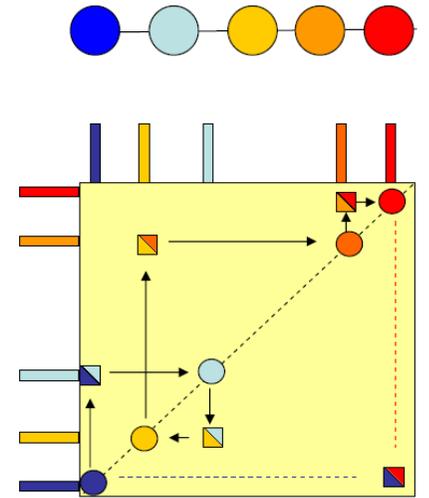
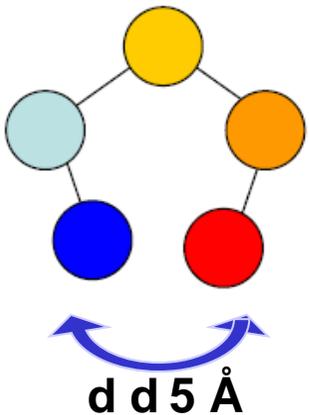
D- Un peu de méthodologie .....

COSY

Corrélations *via* couplages scalaires



Structure 3D probable



NOESY

Corrélations *via* couplages dipolaires