

Résonance Magnétique Nucléaire

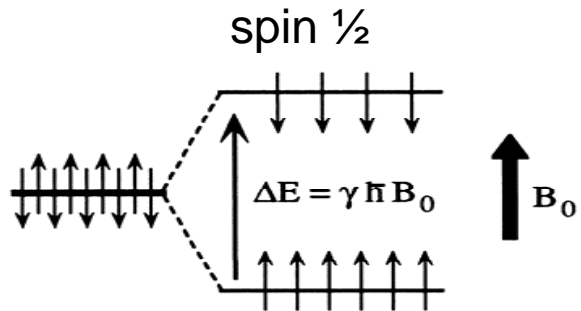
RMN Multidimensionnelle

- Christie Aroulanda et Pierre Mutzenhardt
Laboratoire de méthodologie RMN
Entrée 4A, niveau 2
2ème Cycle
Pierre.Mutzenhardt@rmn.uhp-nancy.fr
- <http://www.rmn.uhp-nancy.fr/Mutzenhardt>

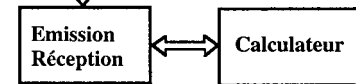
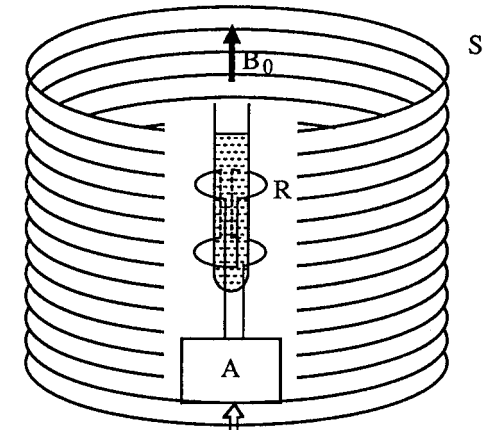
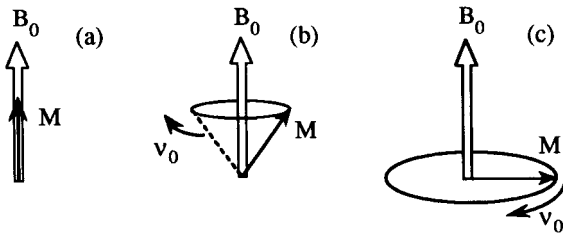
Résumé des épisodes précédents

Moment magnétique

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \hbar$$



Aimantation macroscopique



$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

Interactions subies par le spin nucléaire

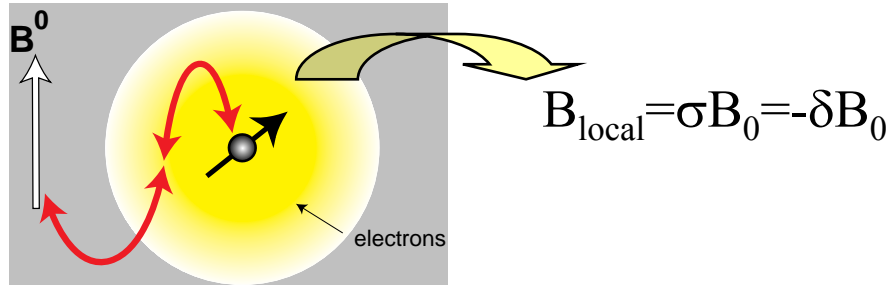
- **Interactions externes**

- Magnétiques pour tous les noyaux
 - Le champ magnétique statique (B_0)
 - Le champ magnétique radiofréquence (B_1) = excitation

- **Interactions internes**

- Magnétiques pour tous les noyaux
 - Spin isolé
 - **Déplacement chimique**
 - Spin-rotation
 - Ensemble de spins
 - **Couplages dipolaires**
 - **Couplages scalaires ou J**
- Electriques pour noyaux de spin $> 1/2$
 - Couplage quadripolaires

Le déplacement chimique



- Chaque noyau possède un environnement chimique propre (et donc électronique) et il existe ainsi de petites variations du champ magnétique ressenties par le noyau. Le noyau ne ressent plus le champ B_0 mais un champ effectif :

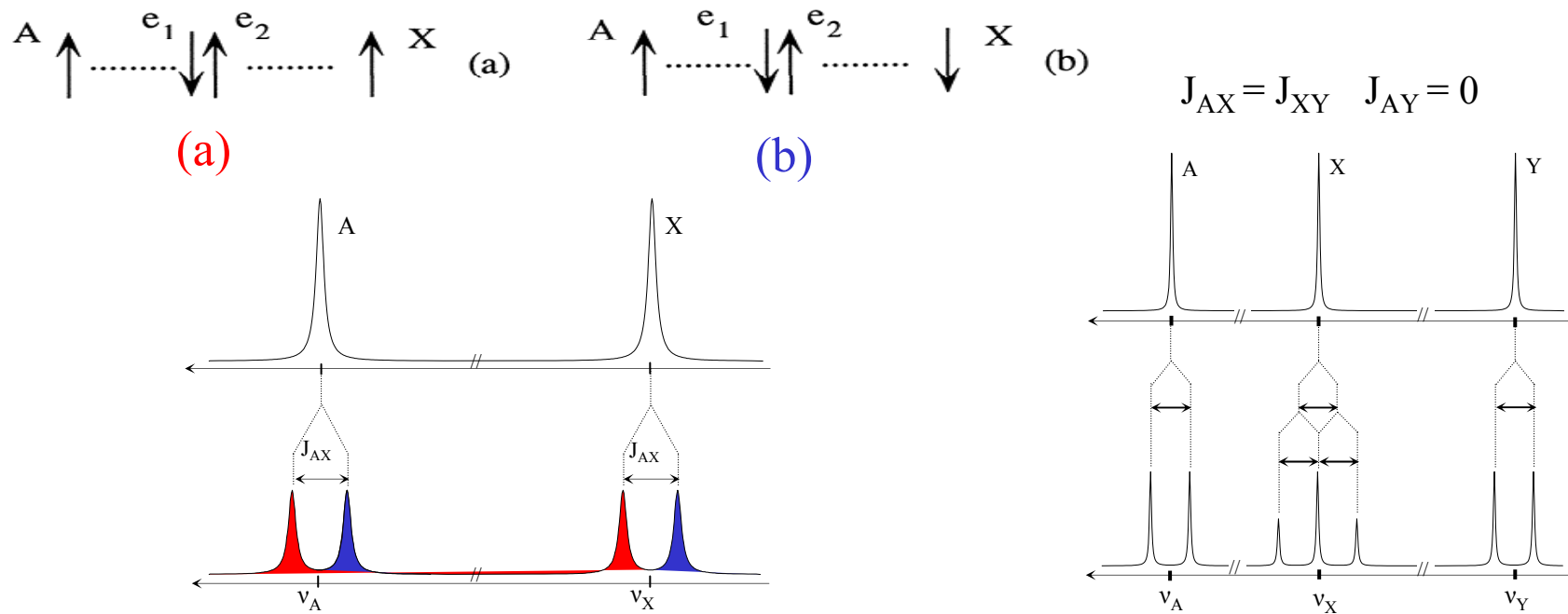
- $$B_{\text{eff}} = B_0 - B_{\text{local}} \quad \text{ou} \quad B_{\text{eff}} = B_0(1 - \sigma)$$

- σ est la constante d'écran du noyau. Elle dépend de l'environnement du noyau:
 - atomes et liaisons chimiques voisines
 - proximité de cycles aromatiques
 - etc..

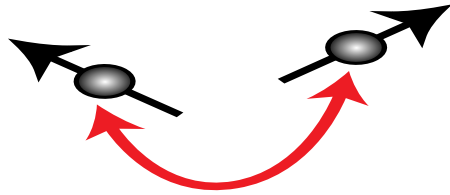
Le couplage scalaire

Interaction relayée par les électrons de liaison :

- structure fine des spectres
- spins distants de 1 à 3 liaisons (quelques fois 4 ou 5)



Le couplage dipolaire : interaction directe entre spin



- Couplage dipôle magnétique – dipôle magnétique
- Inter ou Intramoléculaire

$$E_d = \frac{\vec{\mu}_1 \vec{\mu}_2}{r^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{r})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{r})}{r^5} = \frac{\mu^2}{r^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

En solide : observation d'un doublet caractéristique (large) qui peut être éliminé par rotation à « l'angle magique ».

mais $\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle = 0$, donc, aucun éclatement dipolaire en phase liquide
Néanmoins, l'interaction dipolaire peut être mesurer en phase liquide par l'intermédiaire de la relaxation de spin : c'est l'Effet Overhauser Nucléaire (nOe en anglais) (mais $1/r^6$)

Interaction dipolaire en liquide : l'effet Overhauser nucléaire

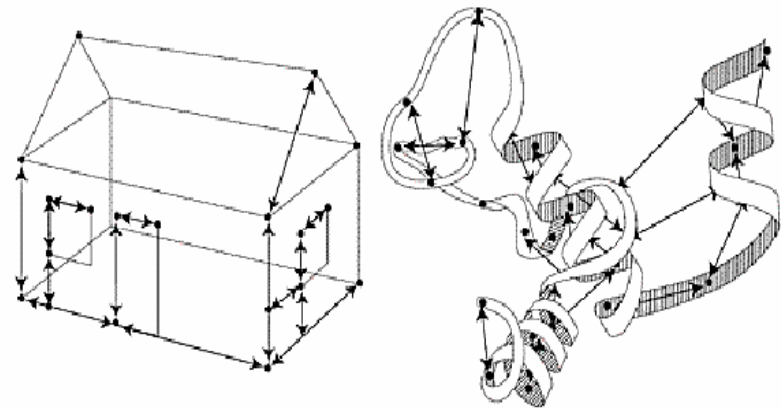
La réorientation rapide des molécules implique que :

$$\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle = 0$$

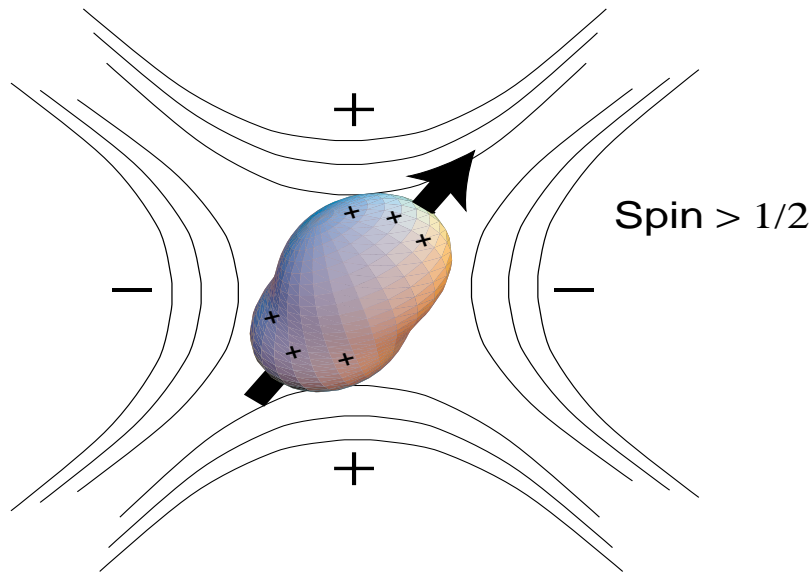
Néanmoins, l'interaction dipolaire peut être mesurée en phase liquide par l'intermédiaire de la relaxation de spin : c'est l'Effet Overhauser Nucléaire (nOe en anglais) (mais $1/r^6$)

The Nobel Prize in Chemistry 2002

The Nobel Prize in Chemistry for 2002 is being shared between scientists in two important fields: mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). The Laureates, **John B. Fenn** and **Koichi Tanaka** (for MS) and **Kurt Wüthrich** (for NMR), have contributed in different ways to the further development of these methods to embrace biological macromolecules. This has meant a revolutionary breakthrough, making chemical biology into the "big science" of our time. Chemists can now rapidly and reliably identify what proteins a sample contains. They can also produce three-dimensional images of protein molecules in solution. Hence scientists can both "see" the proteins and understand how they function in the cells.



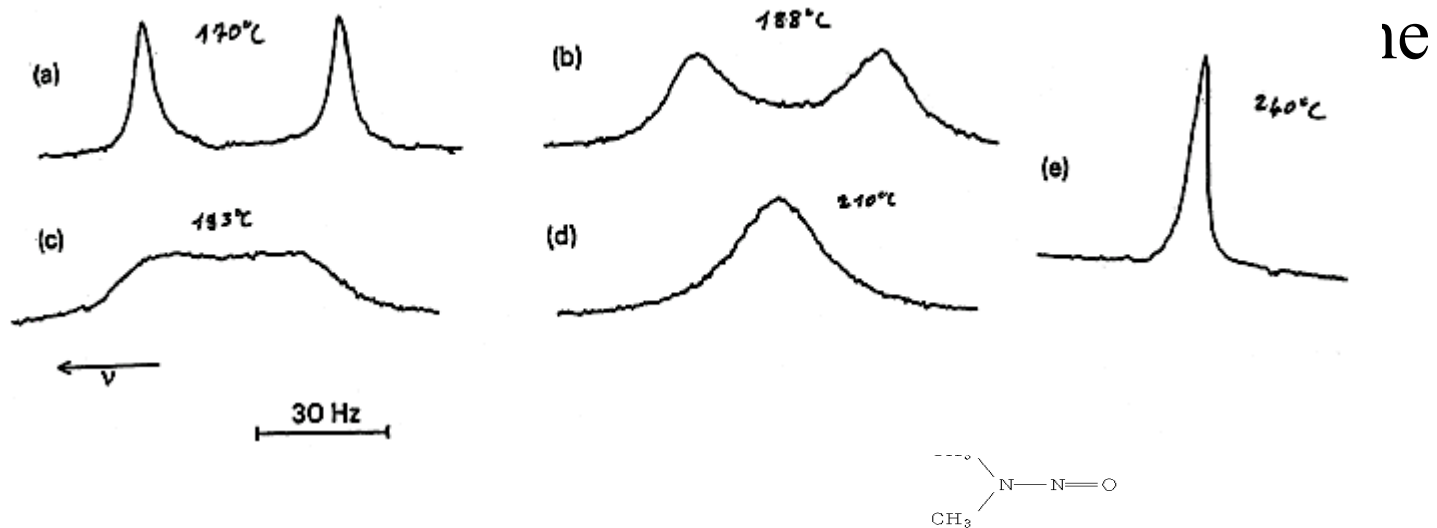
Le couplage quadripolaire (spin $> \frac{1}{2}$)



- Effet d'autant plus important que l'atome possède plus d'électrons
- Agit sur la relaxation du noyau et élargit fortement les raies
- Les isotopes quadripolaires ne donnent pas de raies fines (sauf dans un environnement symétrique)
- Pas ou peu d'effet visible sur les spectres des autres isotopes (sauf dans un environnement symétrique)
- pas de couplage indirecte (J) visible
- Spectres fins pour le ^2H et les isotopes du Bore.

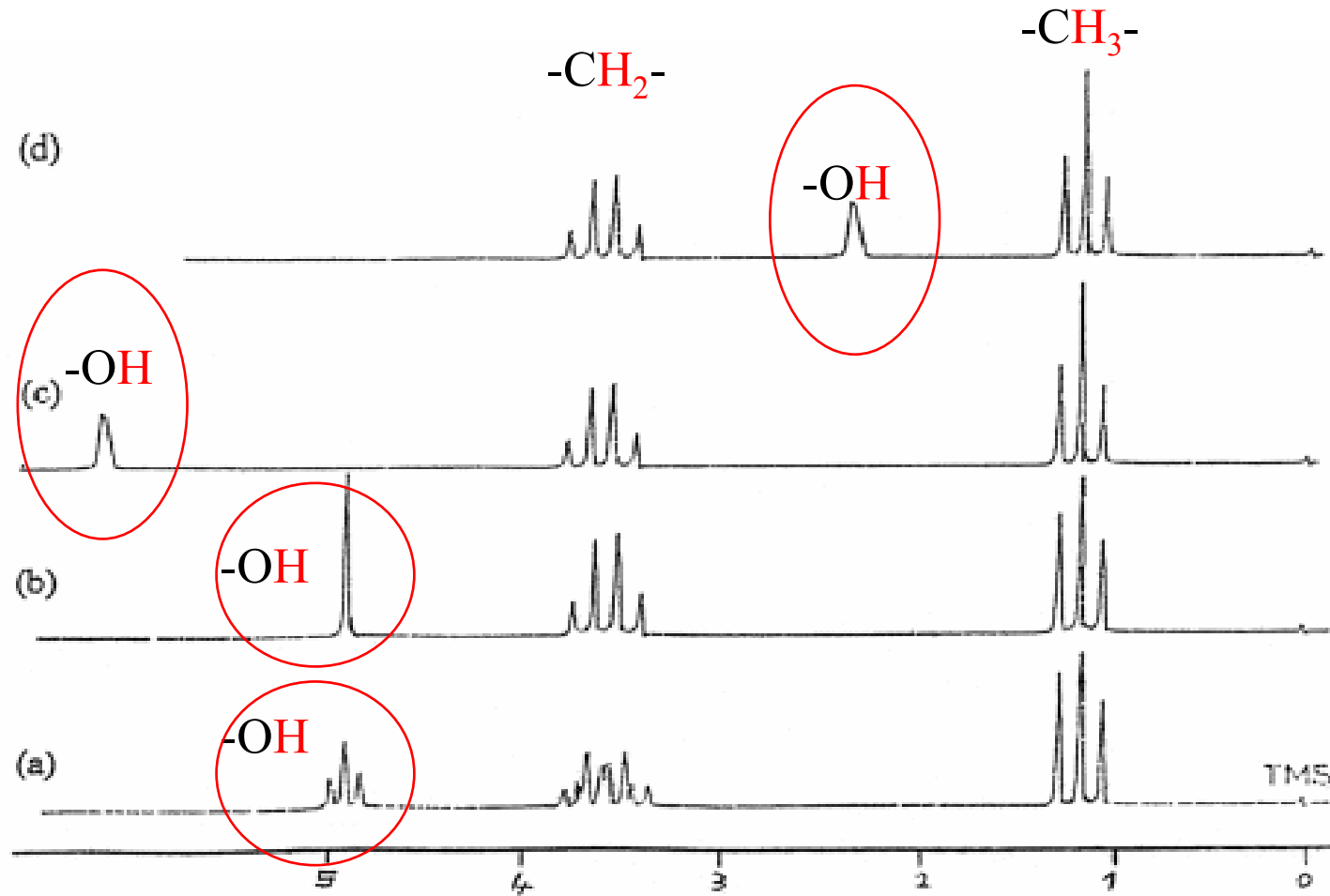
Échanges chimiques (1)

- Phénomènes d'échanges en RMN :
 - Protons échangeable (-OH, -NH) entre deux molécules
 - Rotation libre autour d'une liaison (-CH₃), échange conformationnel
 - ...

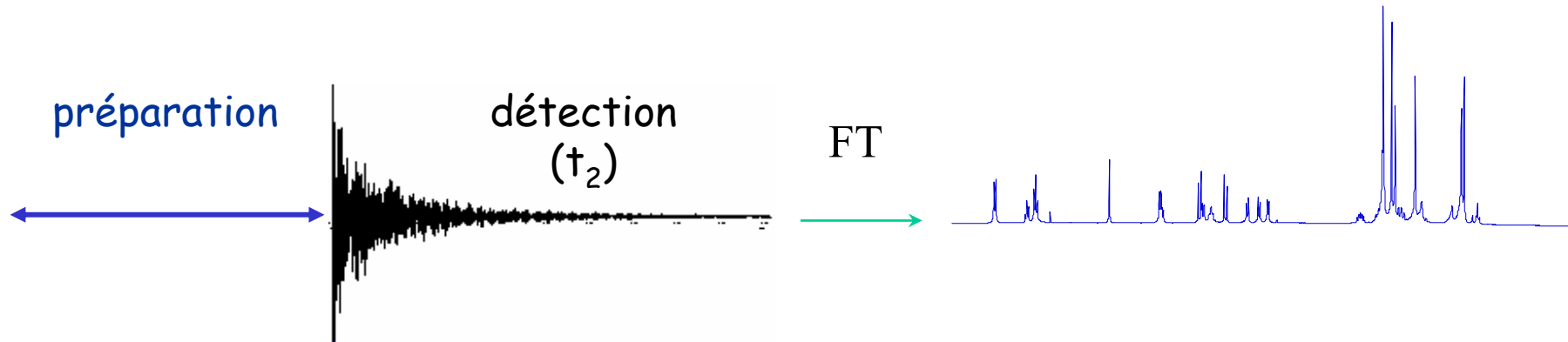


Échanges Chimiques (2)

Variabilité du déplacement chimique, visibilité ou non des couplages



Principe de la spectroscopie de RMN à 1 dimension



RMN impulsionnelle par Transformée de Fourier

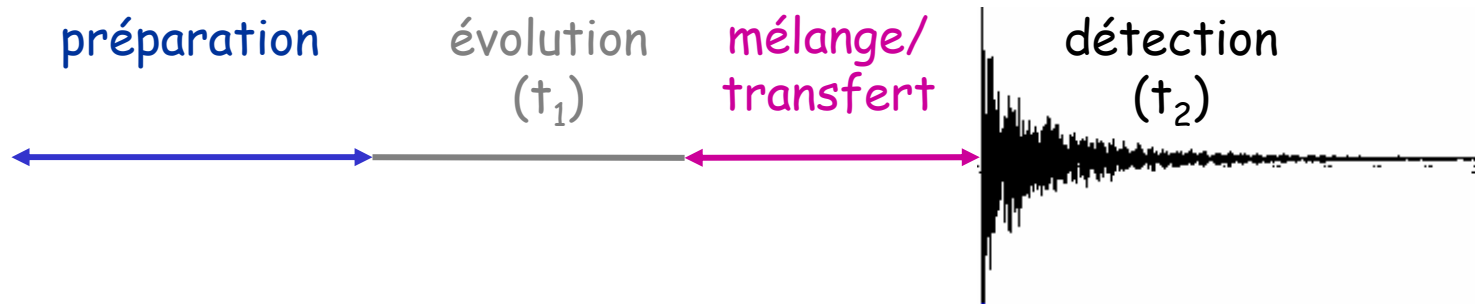
- Une impulsion radiofréquence va exciter tous les spins en une fois,
- On détecte alors un signal qui doit être mathématiquement transformé pour restituer le spectre d'absorption.

Cette méthode permet

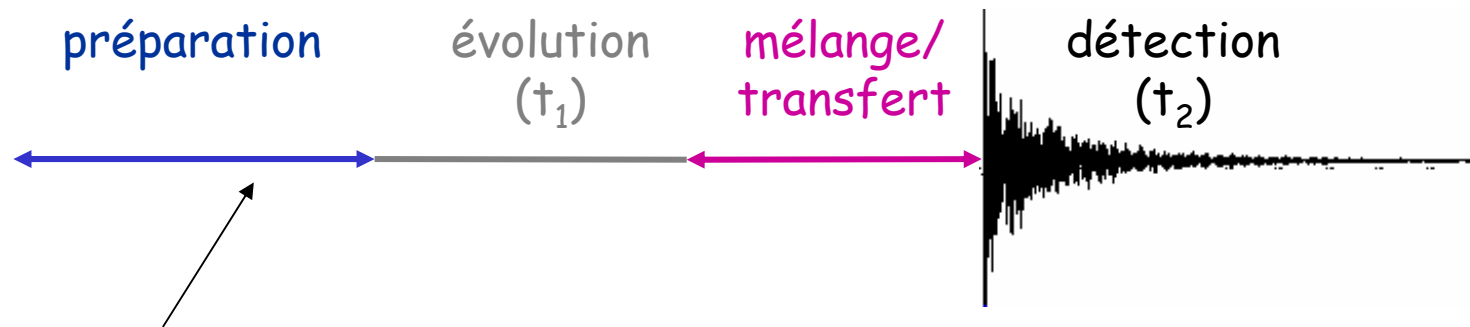
- d'accumuler plusieurs fois la même expérience (sensibilité)
- d'agir de manière particulière sur un ou plusieurs spins simultanément
- de réaliser des expériences multidimensionnelles (2D, 3D, imagerie)

Principe de la spectroscopie de RMN à 2 dimensions (1)

Succession de quatre intervalles de temps:
préparation, évolution, mélange, et détection



Principe de la spectroscopie de RMN à 2 dimensions (2)

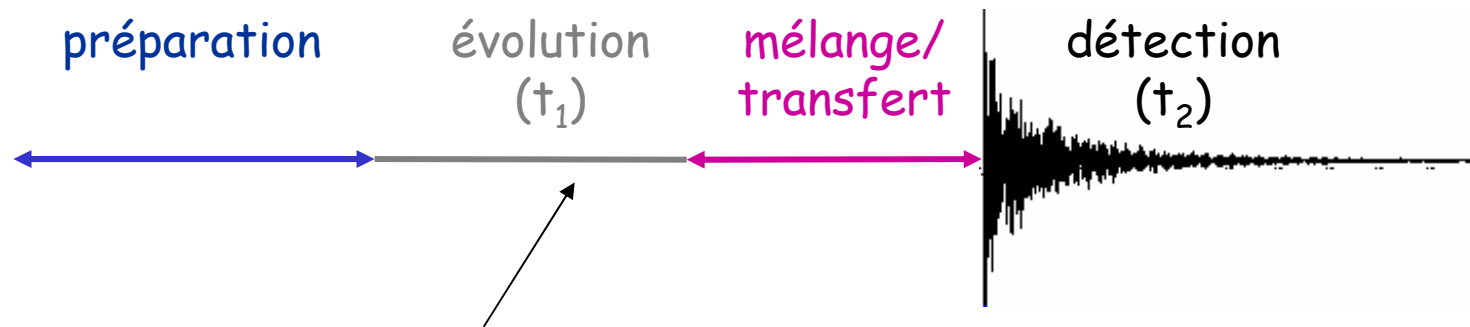


Le temps de préparation:

Préparation du système de spins à étudier pour l'expérience

(par exemple, création de l'état à mesurer à l'aide d'une impulsion radiofréquence, ou expérience de découplage)

Principe de la spectroscopie de RMN à 2 dimensions (2)

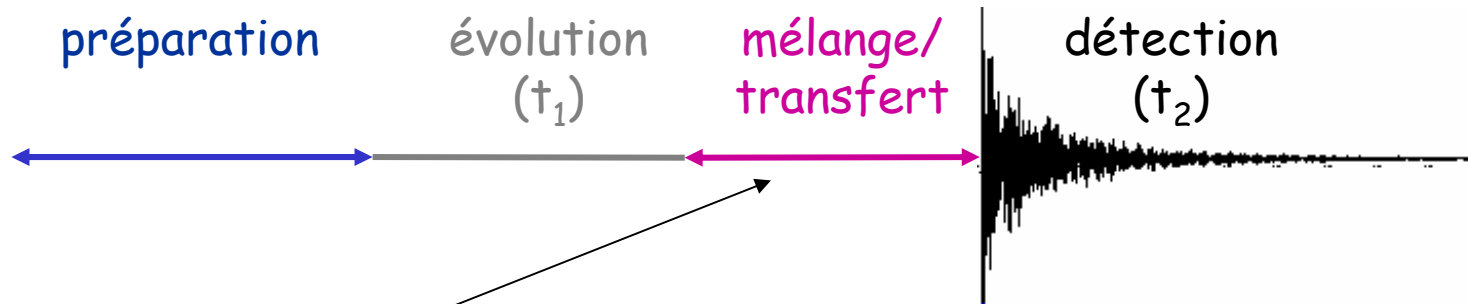


Le temps d'évolution:

Le système de spin évolue sous l'effet de divers facteurs, ceci étant fonction du déplacement et des couplages scalaires du noyau correspondant. Il y a modulation.



On parle de 'marquage'.

Principe de la spectroscopie de RMN à 2 dimensions (2)

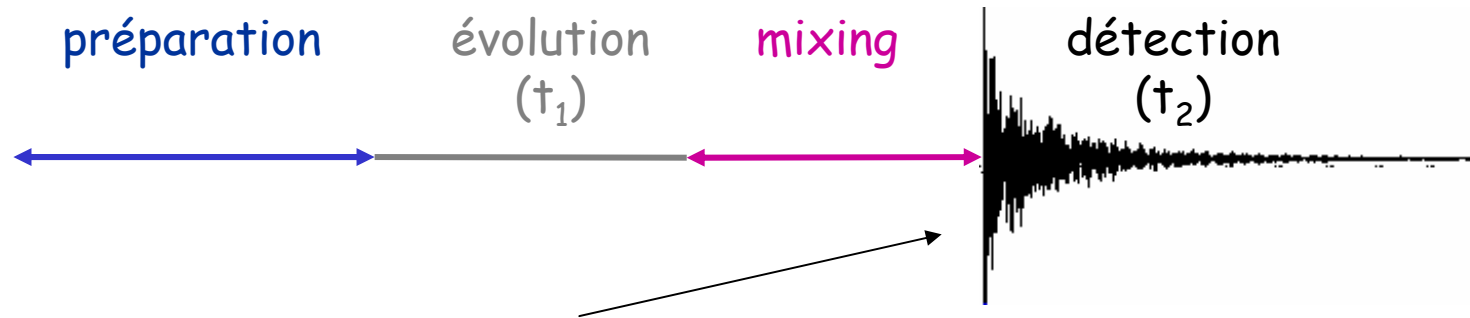


Le temps de mélange/transfert:

Réalisation de transferts d'aimantation ou de polarisation de manière à pouvoir corrélérer des spins entre eux.

	$A (\delta_A)$		$A (\delta_A)$	pic diagonal (homo)
transfert	$A (\delta_A)$		$X (\delta_X)$	pic de corrélation entre A et X pic hors diagonal (homo)

Principe de la spectroscopie de RMN à 2 dimensions (2)



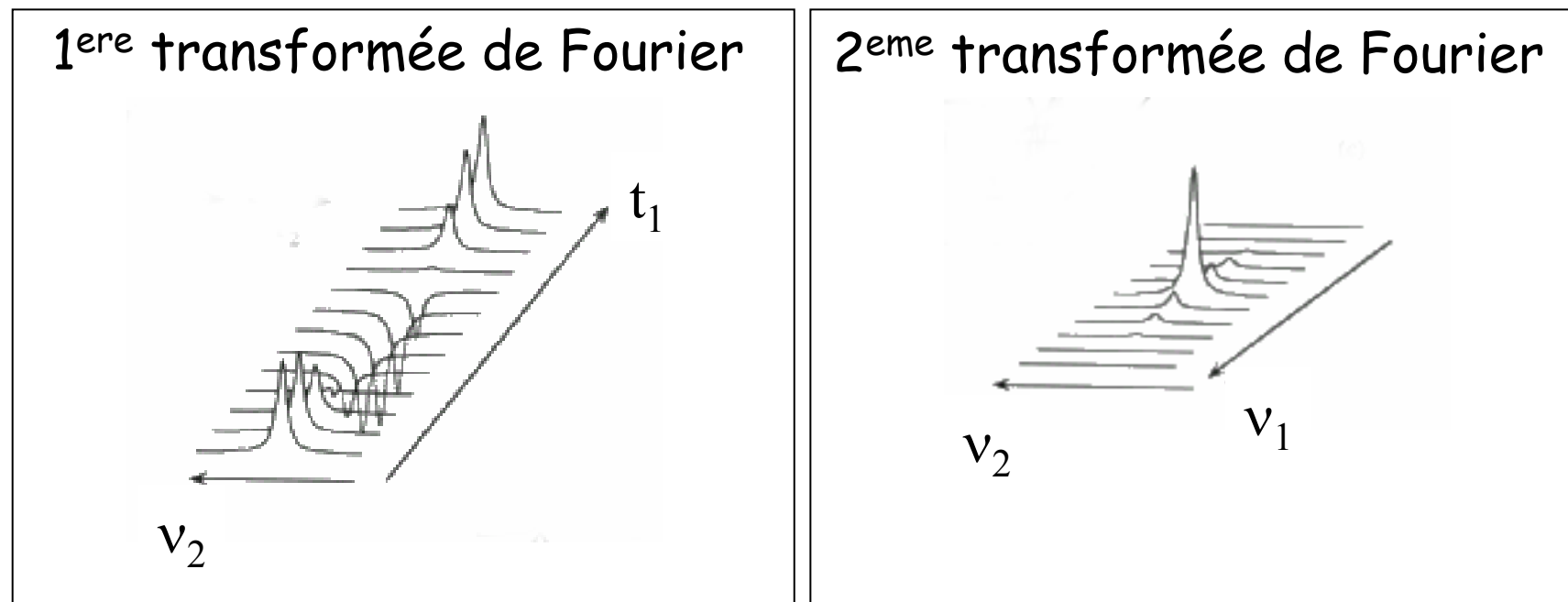
La détection:

Acquisition du signal modulé

Principe de la spectroscopie de RMN à 2 dimensions (3)

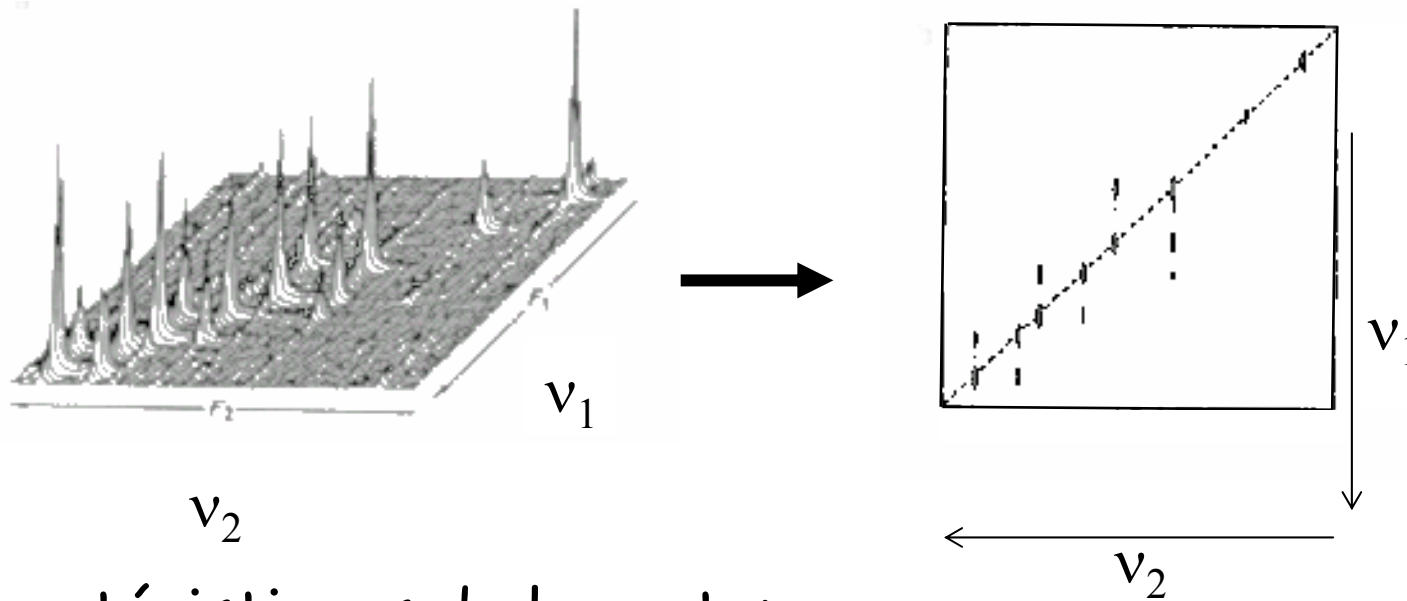
Expérience à 2 dimensions: 2 variables temporelles t_1 et t_2

➔ Double transformée de Fourier



Principe de la spectroscopie de RMN 2D (4)

La représentation en courbes de niveaux:



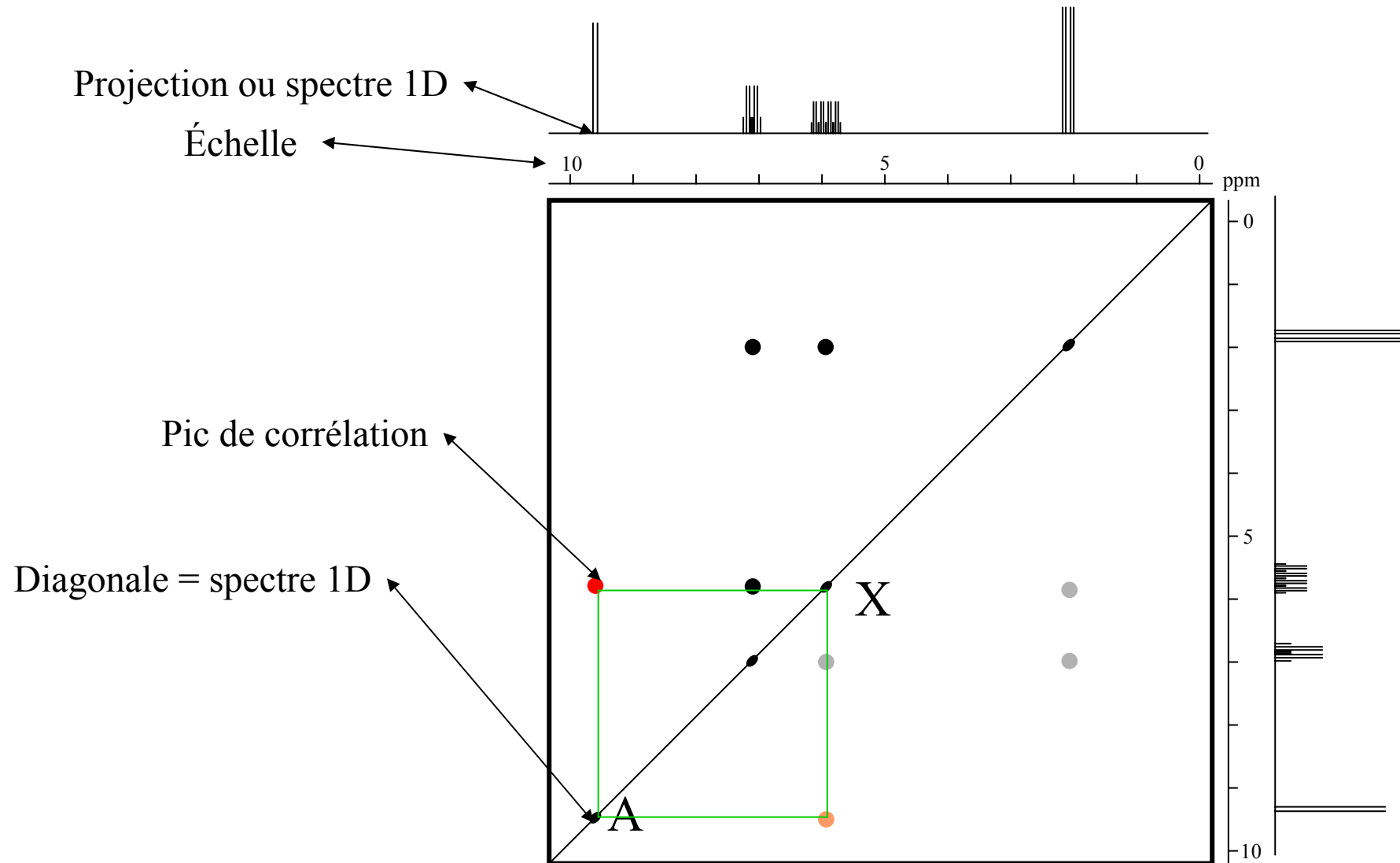
Caractéristiques de la carte:

La diagonale principale est occupée par le spectre conventionnel (2D homonucléaire).

Les informations de corrélation sont données par les pics hors diagonaux

La projection sur chacun des axes conduit à nouveau au spectre 1D conventionnel

Structure générale d'un diagramme 2D homonucléaire



Avantages/Inconvénients

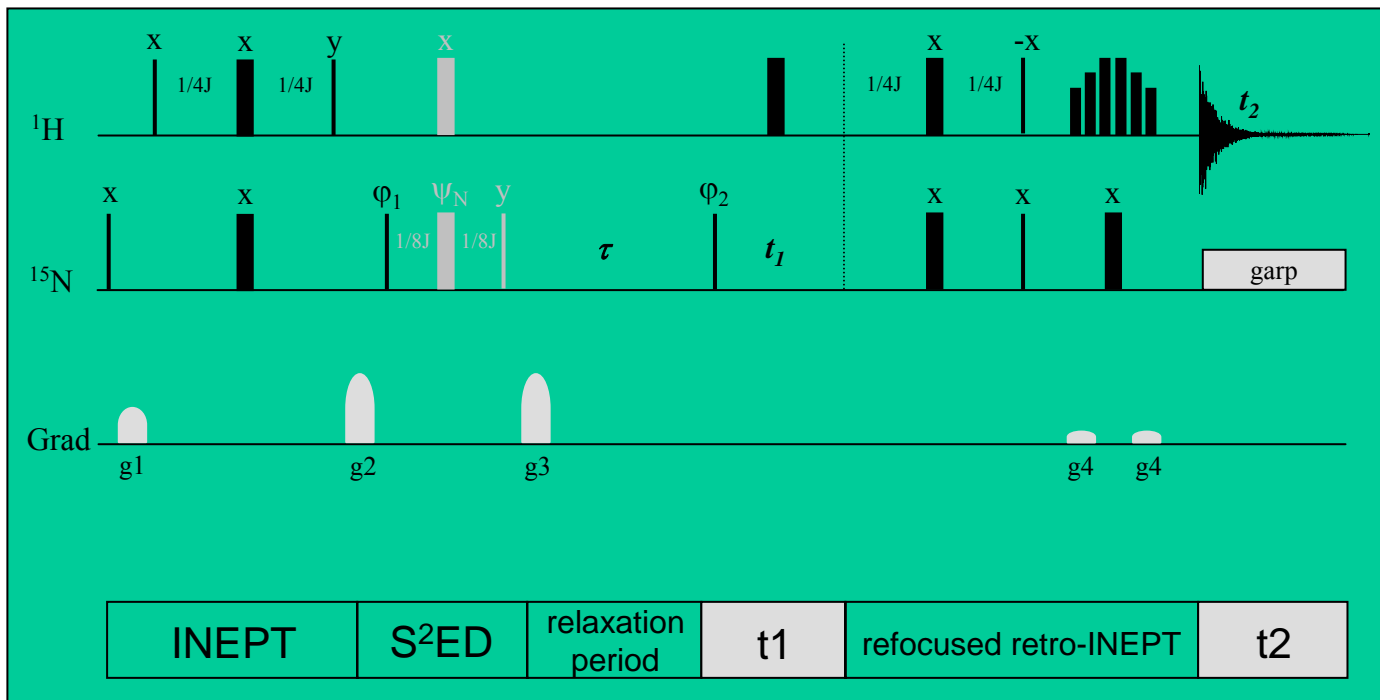
- visualisation directe des interactions
- Tri de l'information
- Dispersion de l'information sur n dimension
- temps d'expérimentation
- résolution spectrale

Directe/Inverse

- Une expérience directe consiste à partir du spin A (sensible) a transféré son aimantation vers le spin X et a observé le spin X (moins sensible)
- Une expérience inverse consiste à observé X par le biais de A

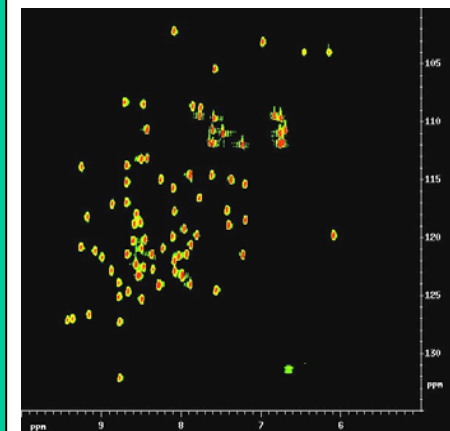
RMN nD pratique

- Séquence d'impulsions RMN
 - Impulsions radiofréquences (agir sur les spins)
 - Application simultanée sur plusieurs isotopes
 - Application sélective à une fréquence précise
 - ...
 - Délais (laisser se développer les interactions)
 - Impulsions de gradient de champ statique

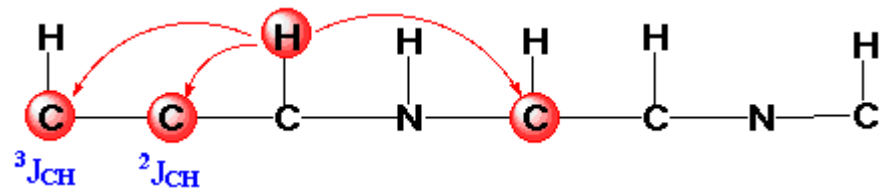
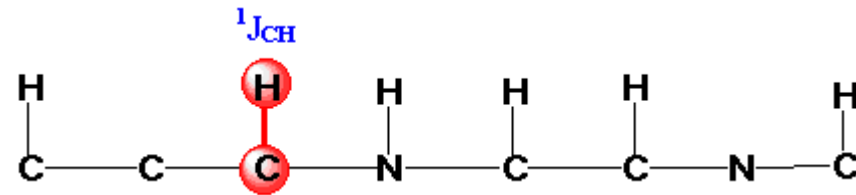
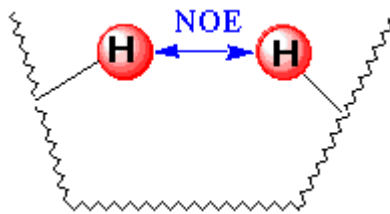
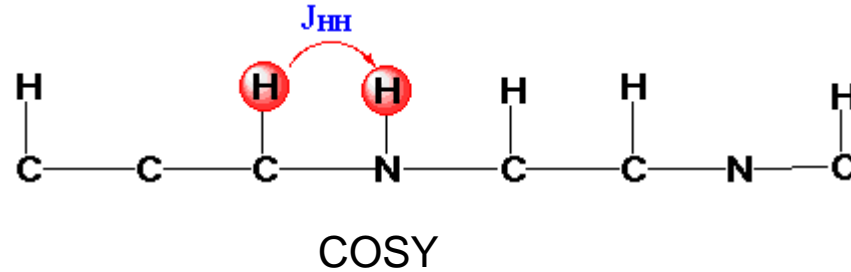


Protéine enrichie en ^{15}N

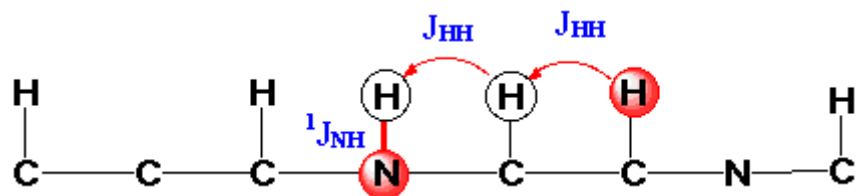
Correlation ^1H - ^{15}N



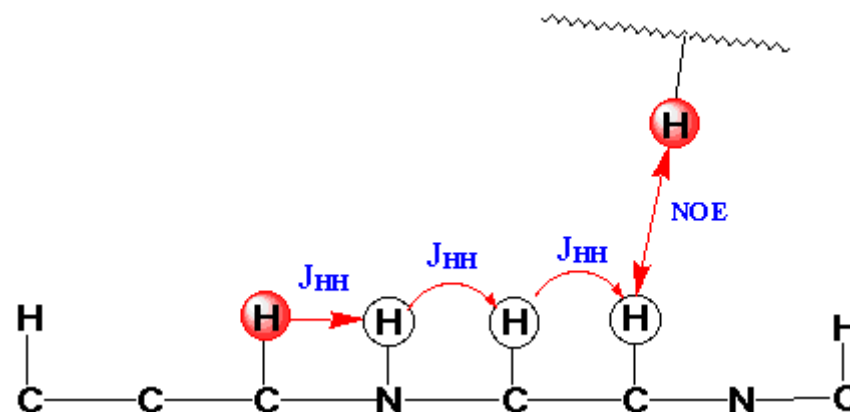
Exemples de Corrélations entre spins



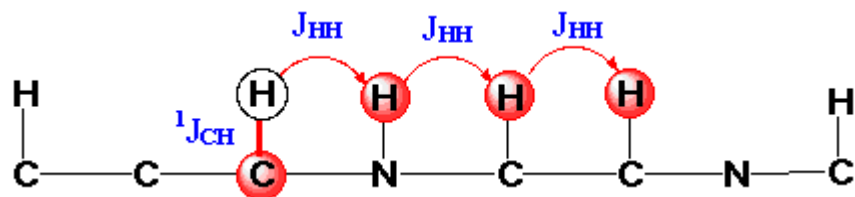
Exemples de Corrélations entre spins



TOCSY-HSQC



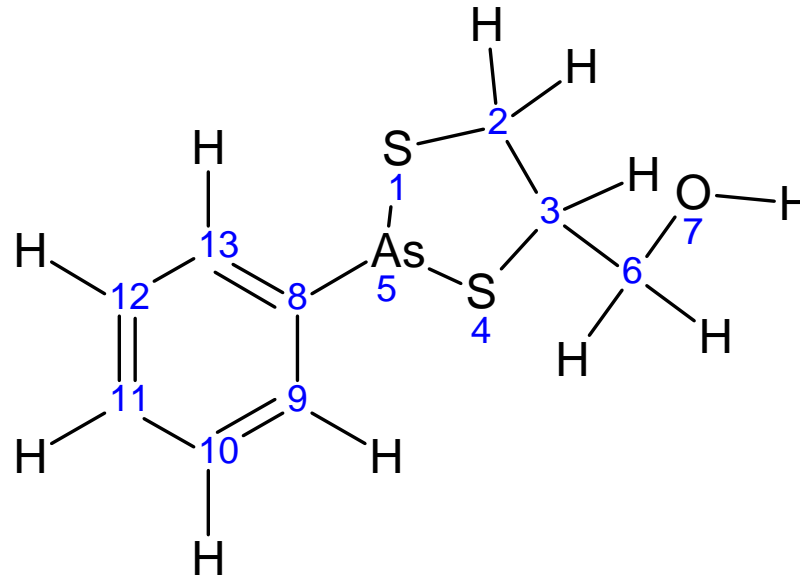
TOCSY-NOESY



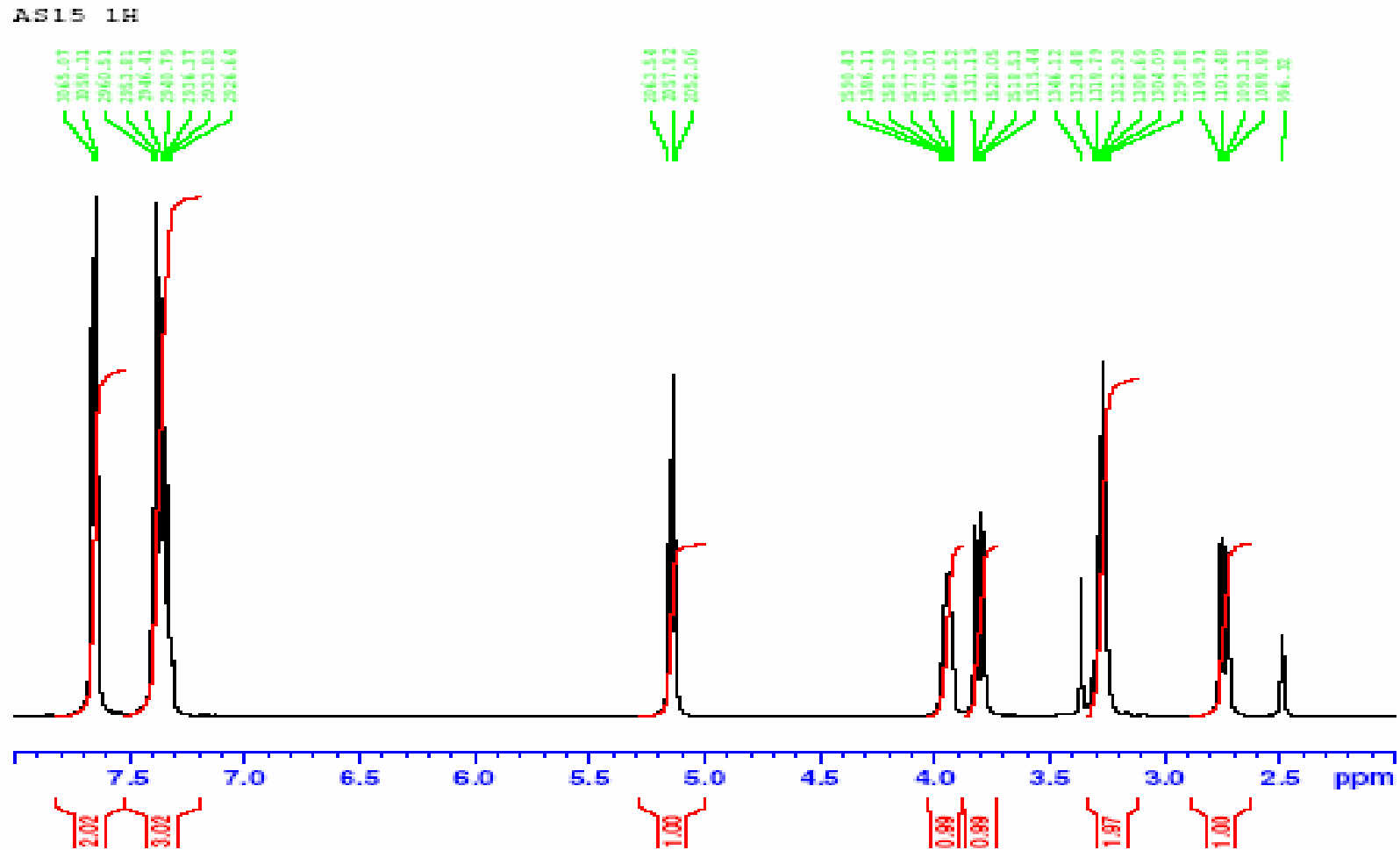
HSQC-TOCSY

Un premier exemple

- Anti-cancéreux
- COSY
- HSQC
- HMBC



Spectre 1D proton à 400 MHz



COSY – basée sur le couplage J homonucléaire (1)

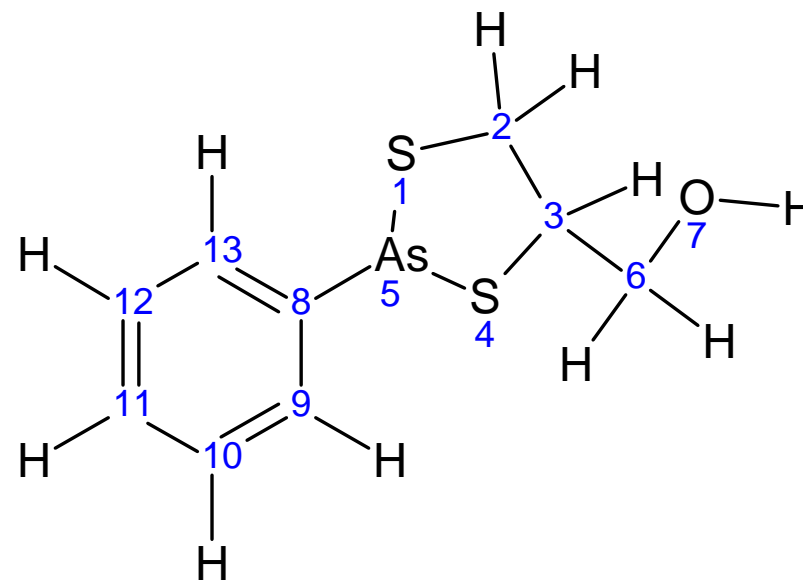
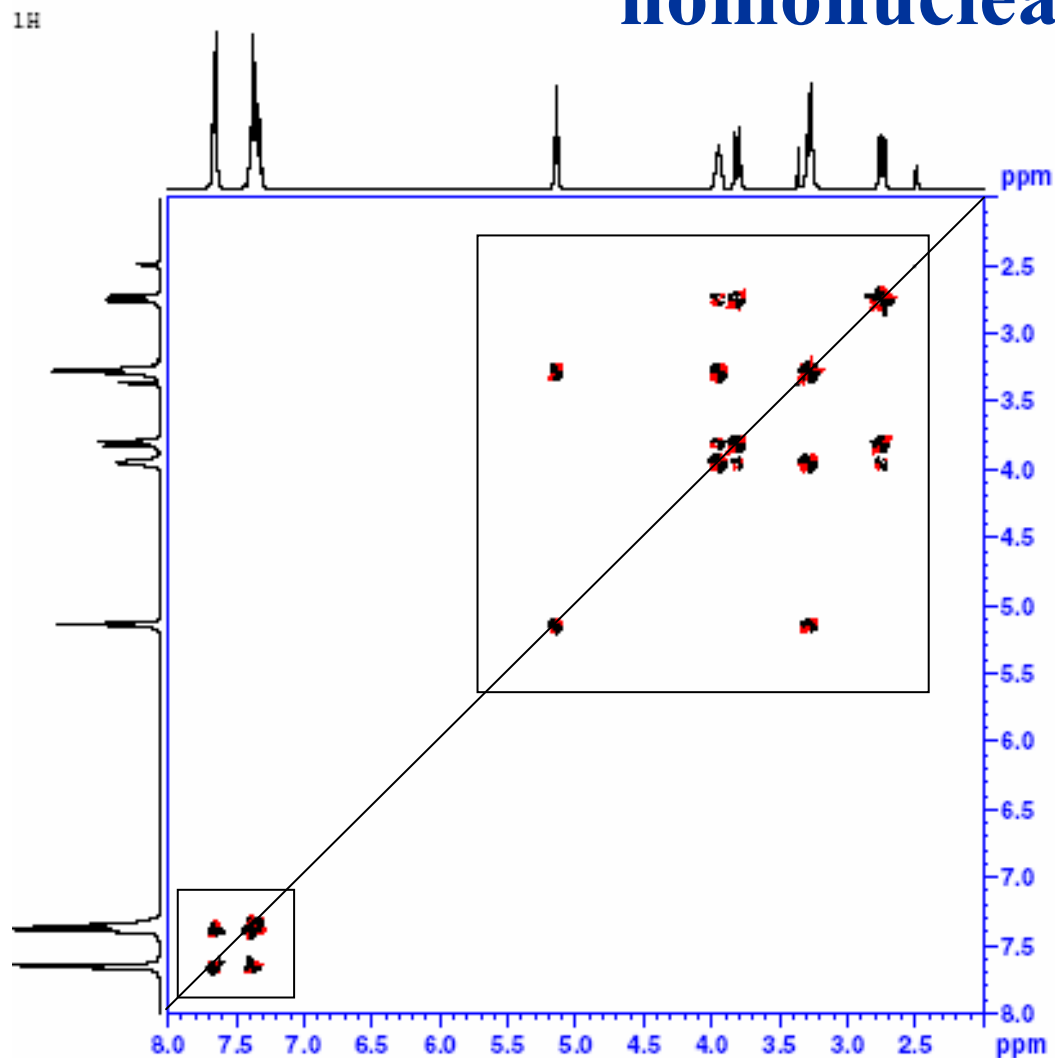
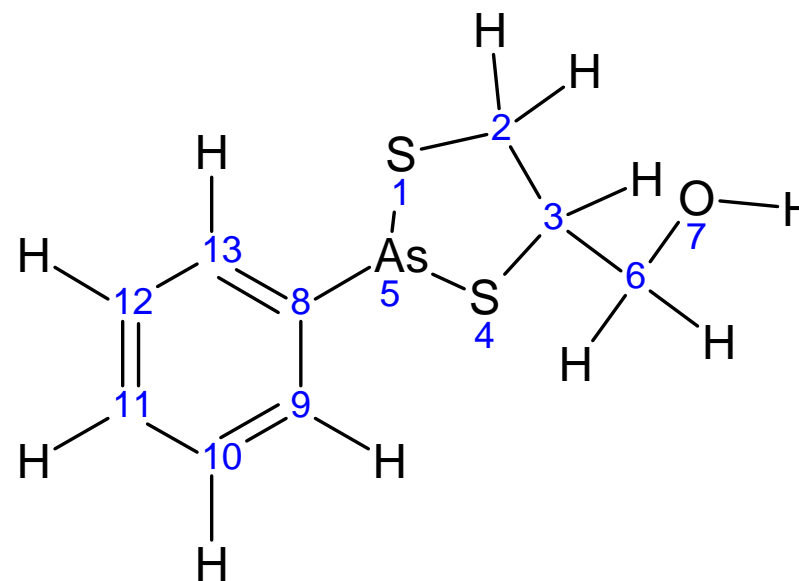
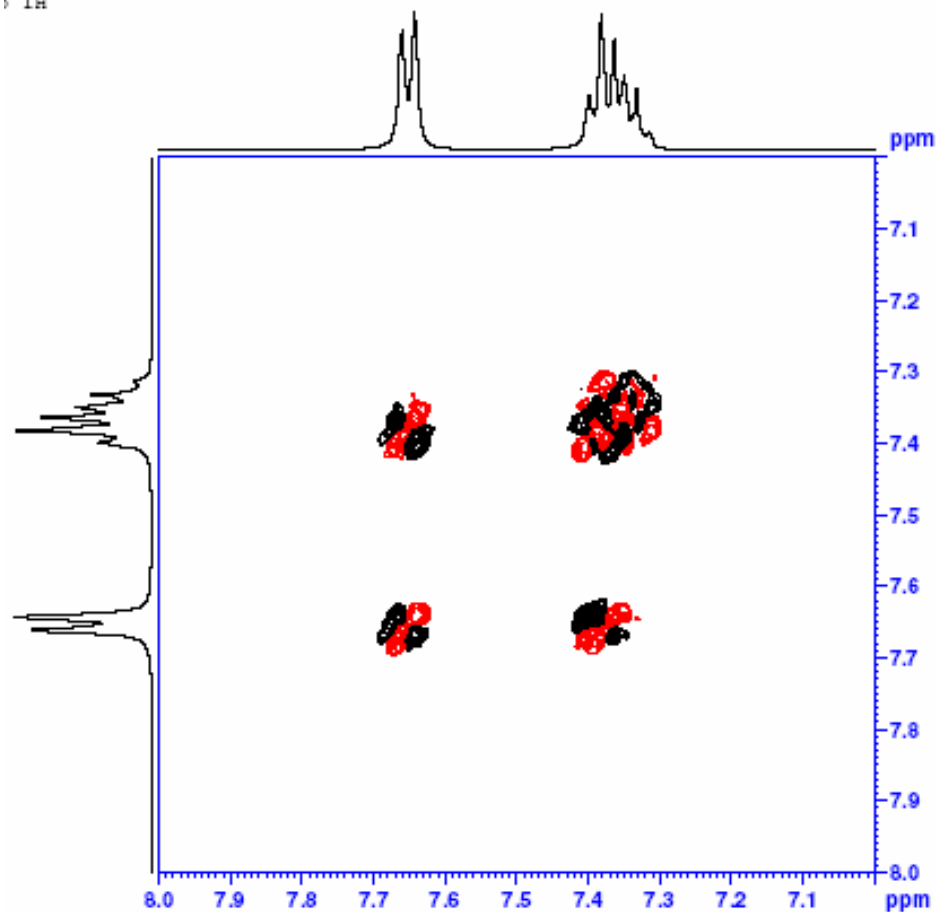


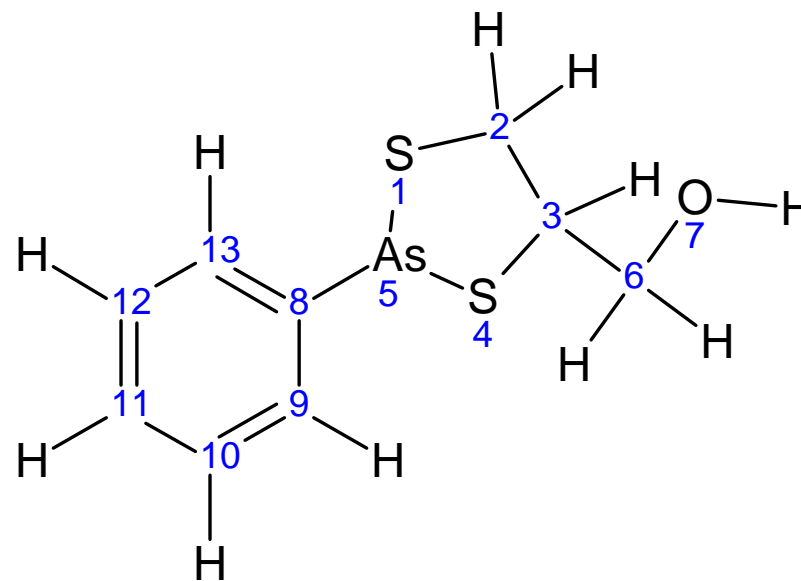
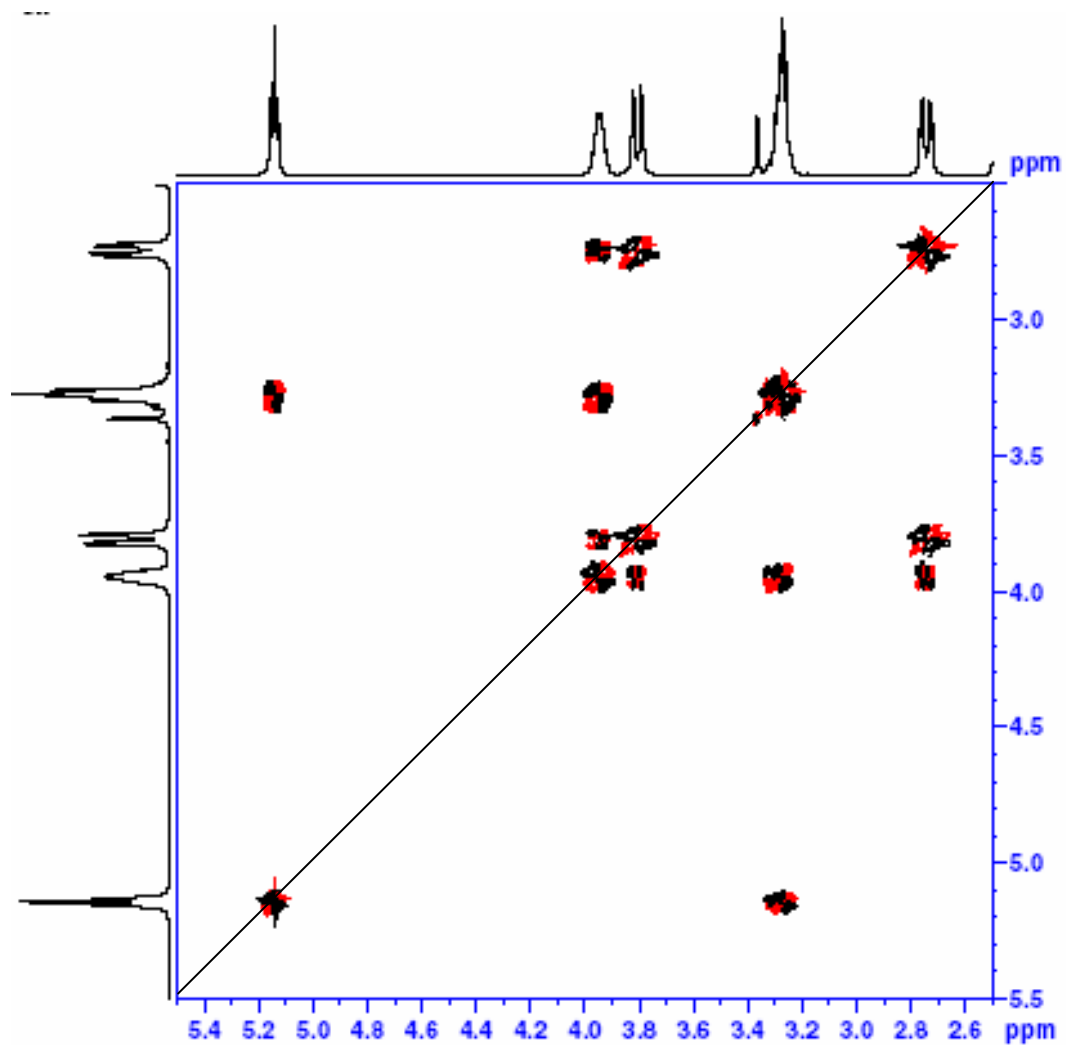
Diagramme carré
Présence d'une diagonale

COSY – basée sur le couplage J homonucléaire (2)

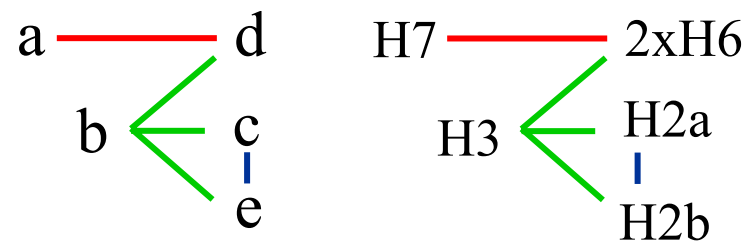
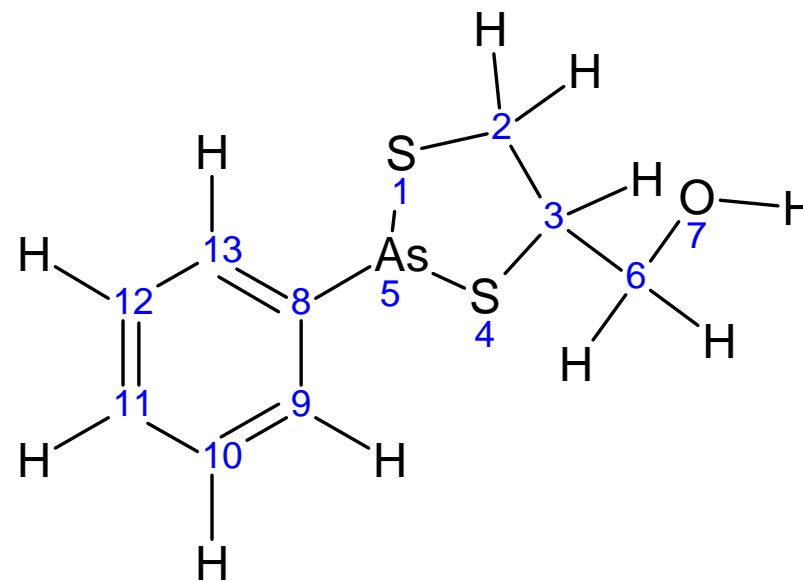
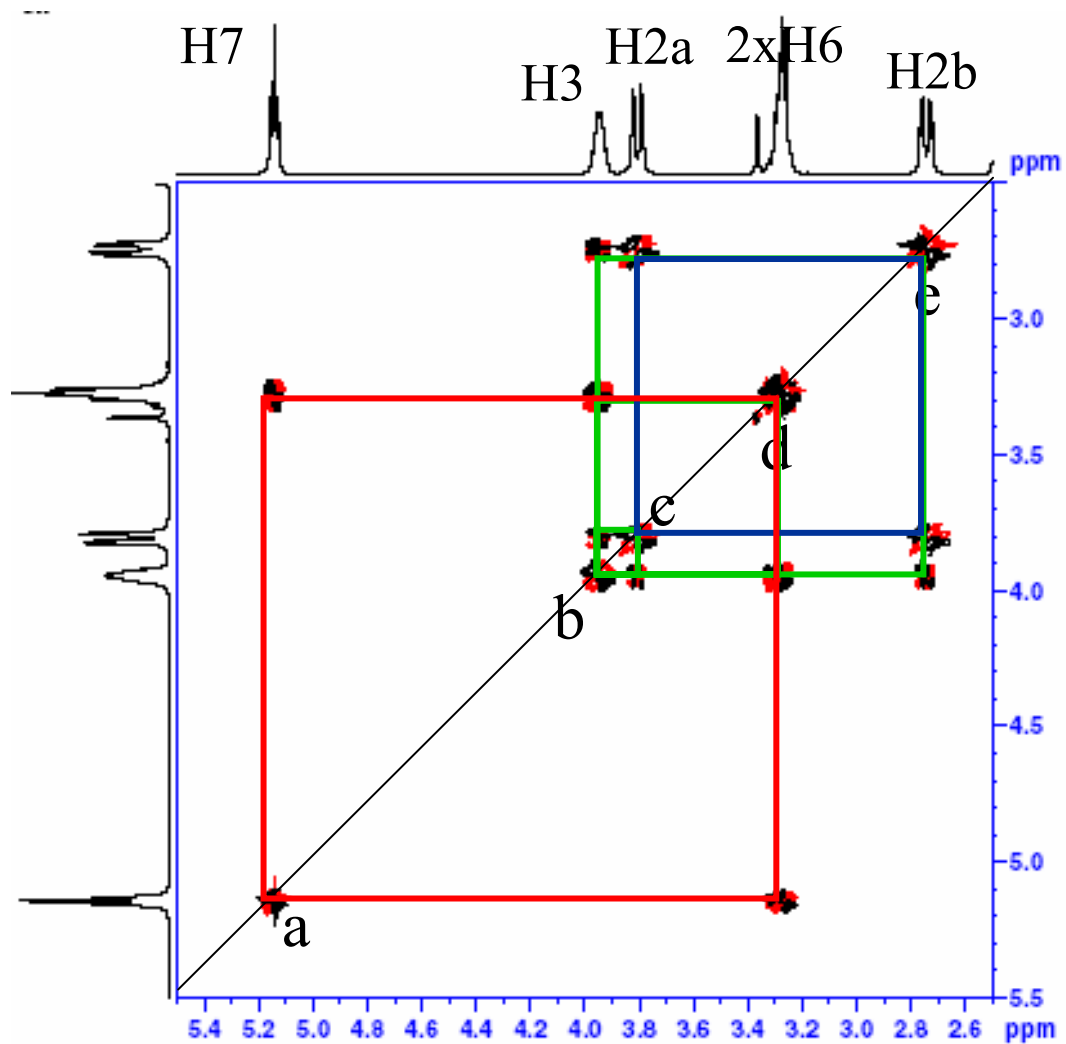
1H



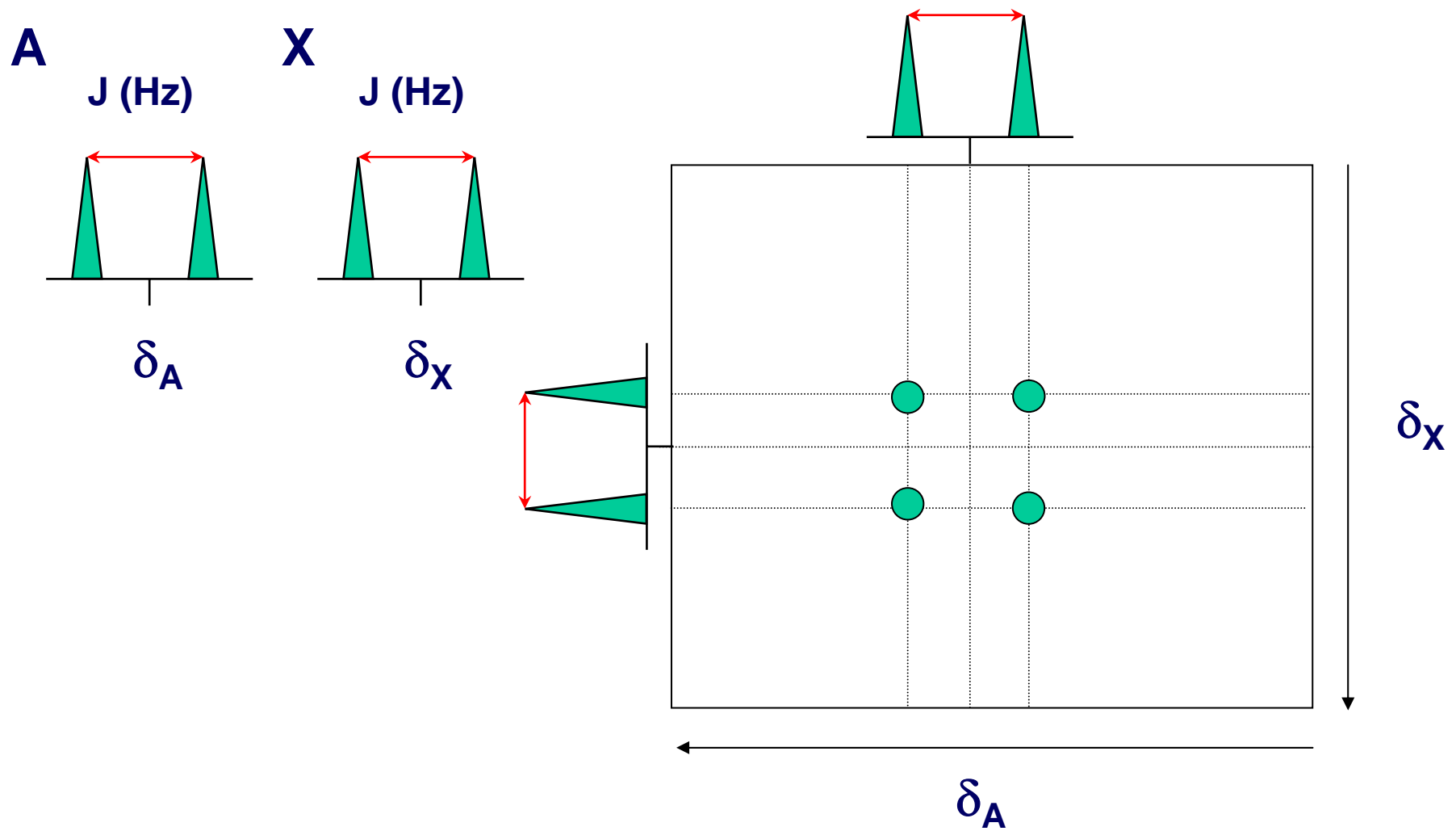
COSY – basée sur le couplage J homonucléaire (3)



COSY – basée sur le couplage J homonucléaire (3)

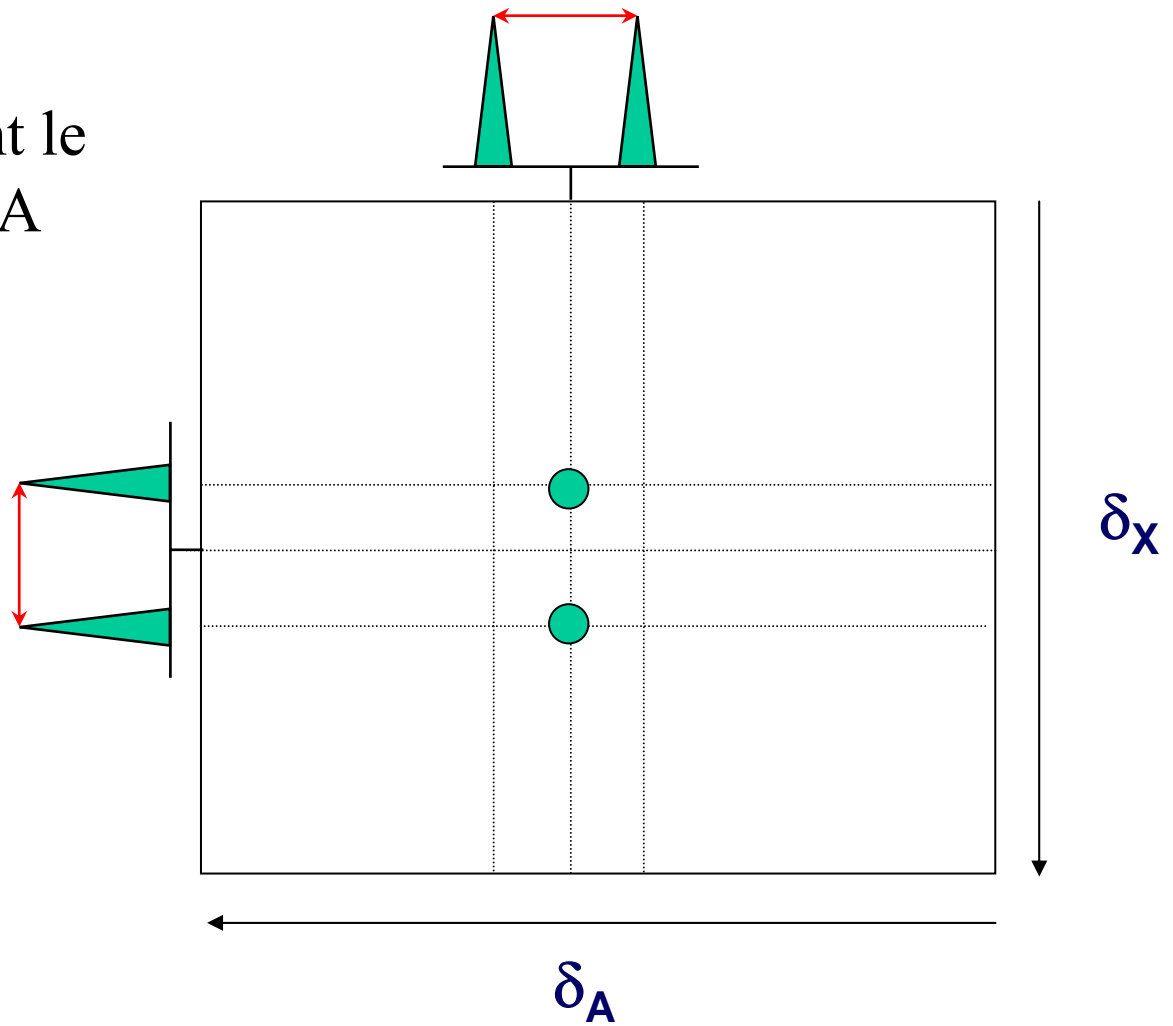


2D hétéronucléaire et découplage (1)



2D hétéronucléaire et découplage (2)

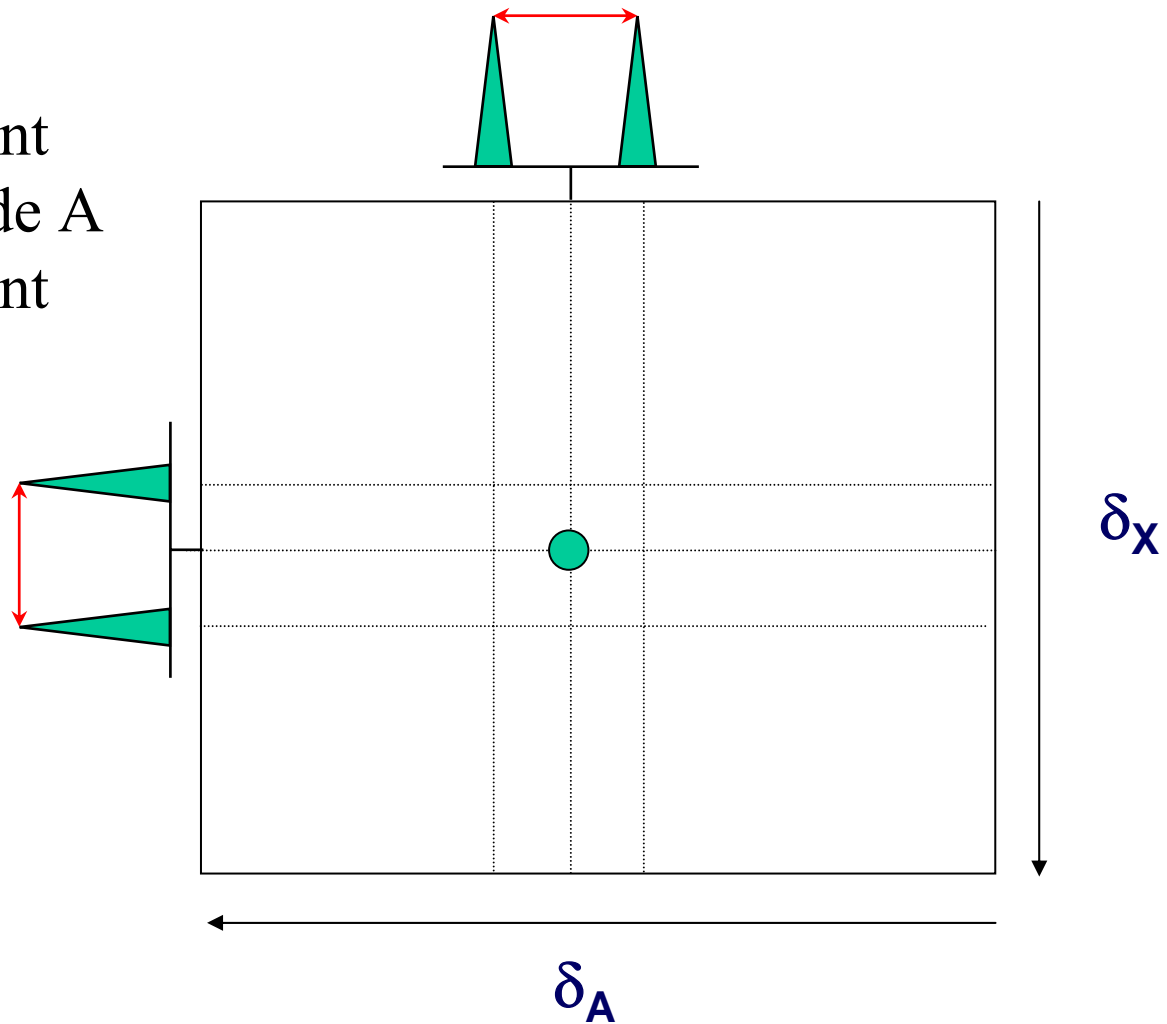
Découplage de X durant le temps d'acquisition de A



2D hétéronucléaire et découplage (3)

- découplage de X durant le temps d'acquisition de A
- découplage de A durant le temps d'évolution

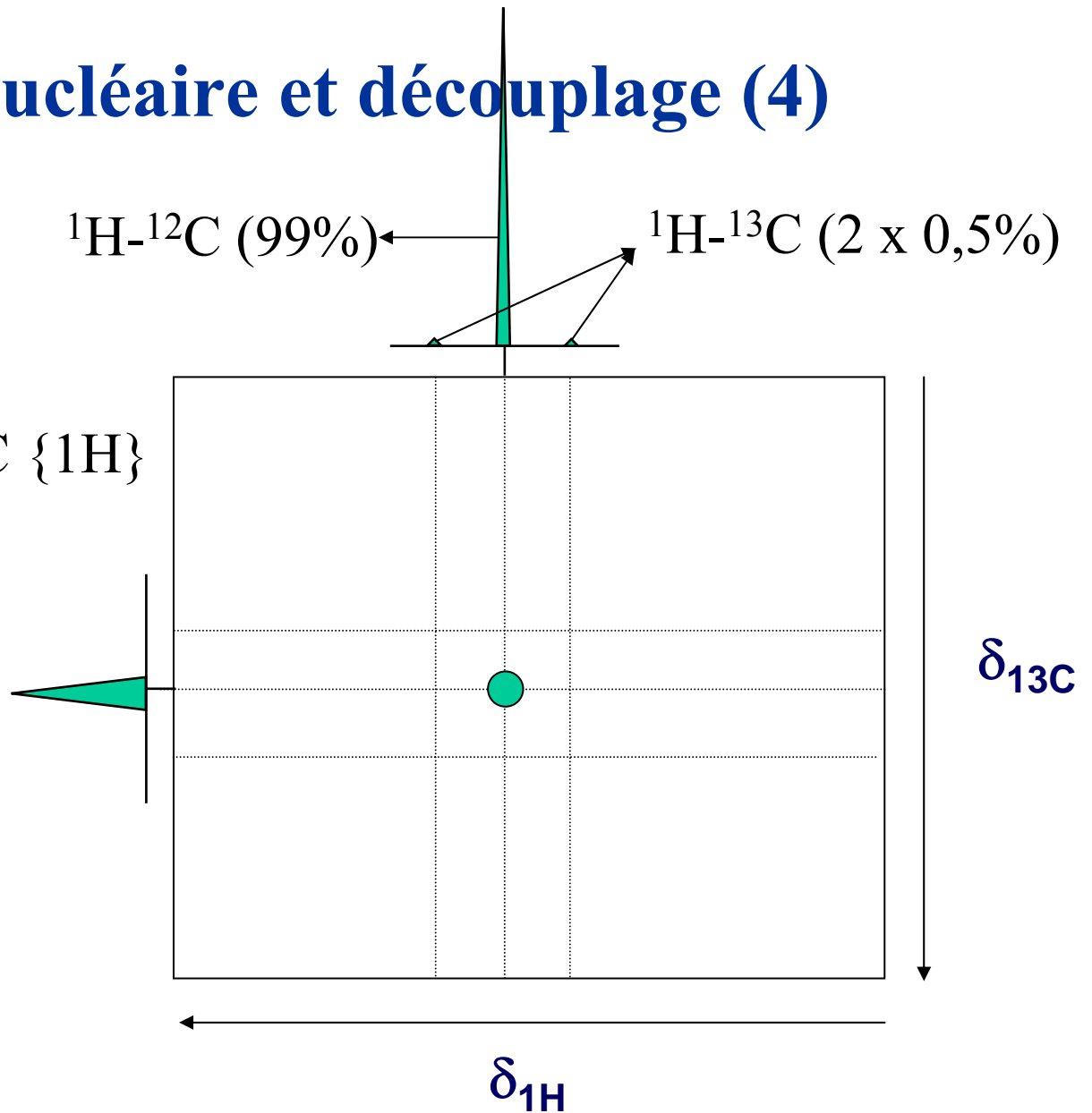
Pic de corrélation à
(δ_A , δ_X)



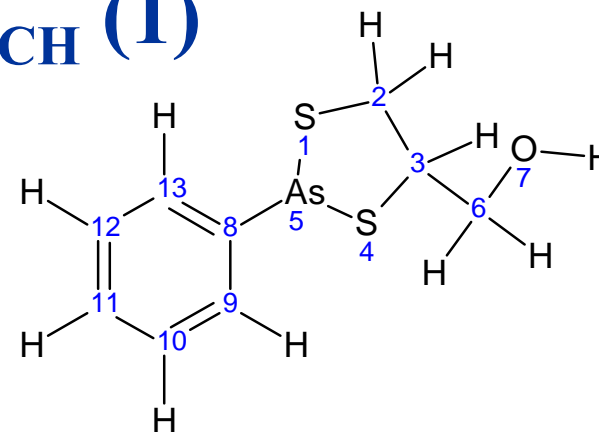
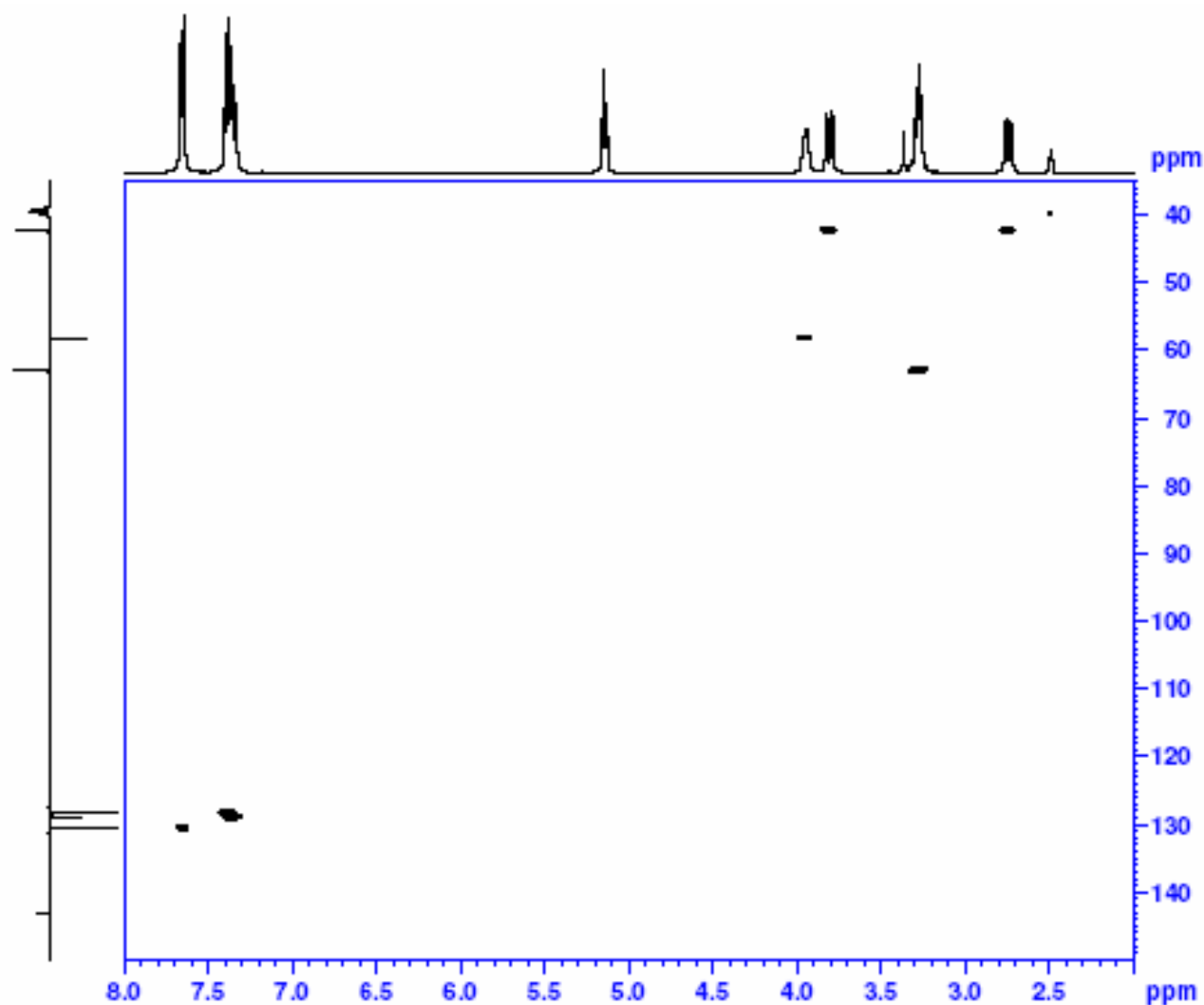
2D hétéronucléaire et découplage (4)

- Corrélation (^1H - ^{13}C)
- Référence spectre ^1H
- Référence spectre ^{13}C { ^1H }

Pic de corrélation à
(δ_{A} , δ_{X})



Corrélations hétéronucléaires basées sur le couplage $^1J_{CH}$ (1)



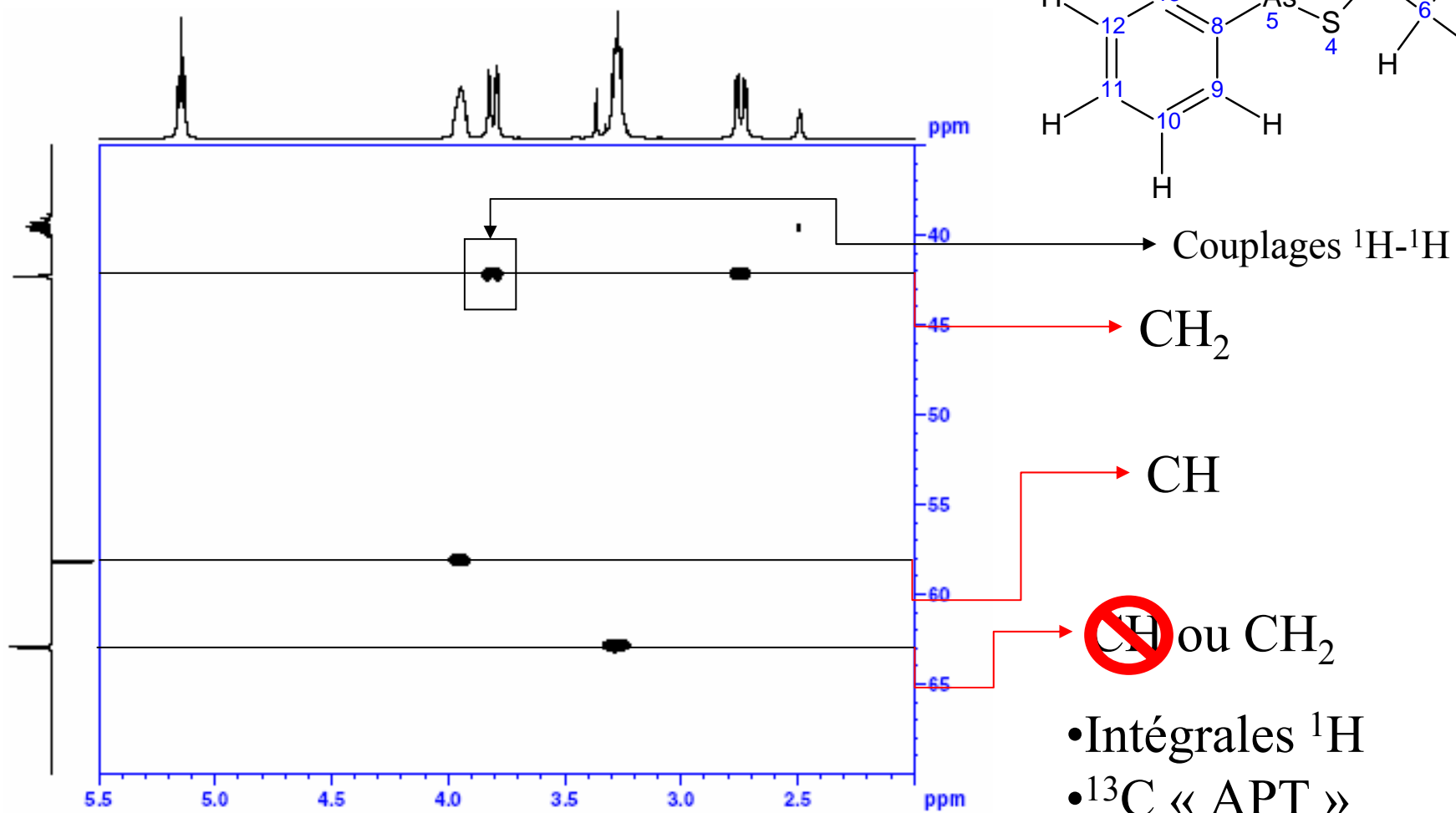
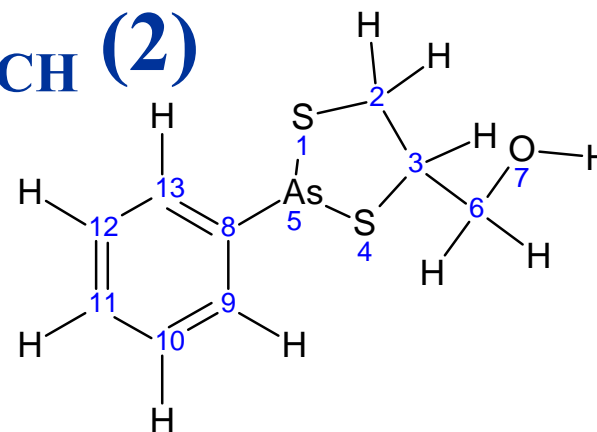
- HETCOR (Directe)
- HSQC (Inverse)
- HMQC (Inverse)

déc $\{^1H\}$ + déc $\{^{13}C\}$

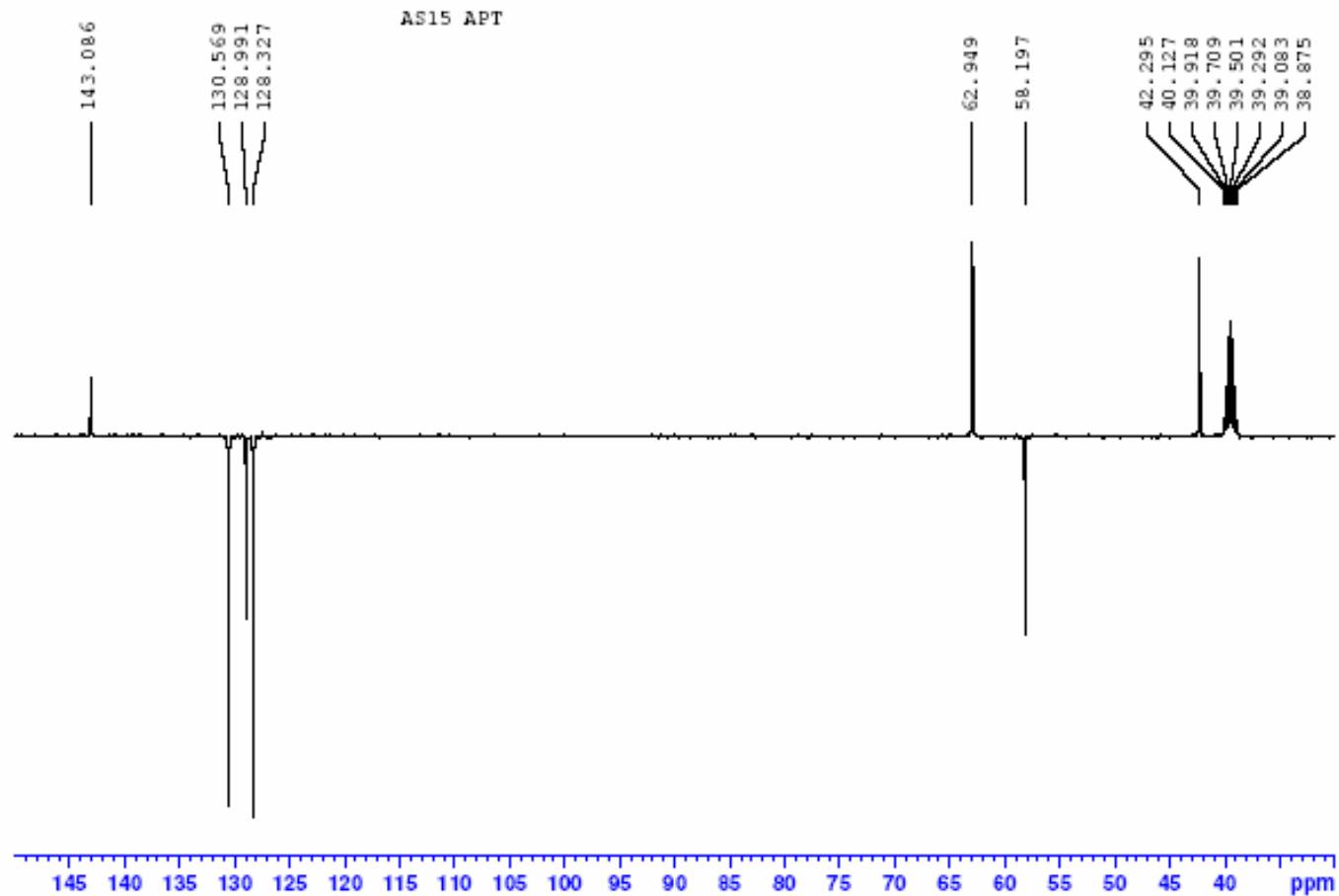
$$^1J_{CH} \gg ^{2,3}J_{CH}$$

$$140 \text{ Hz} \gg 10 \text{ Hz}$$

Corrélations hétéronucléaires basées sur le couplage $^1J_{CH}$ (2)

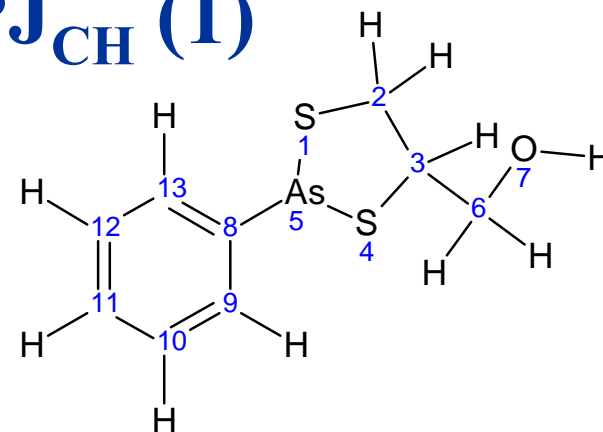
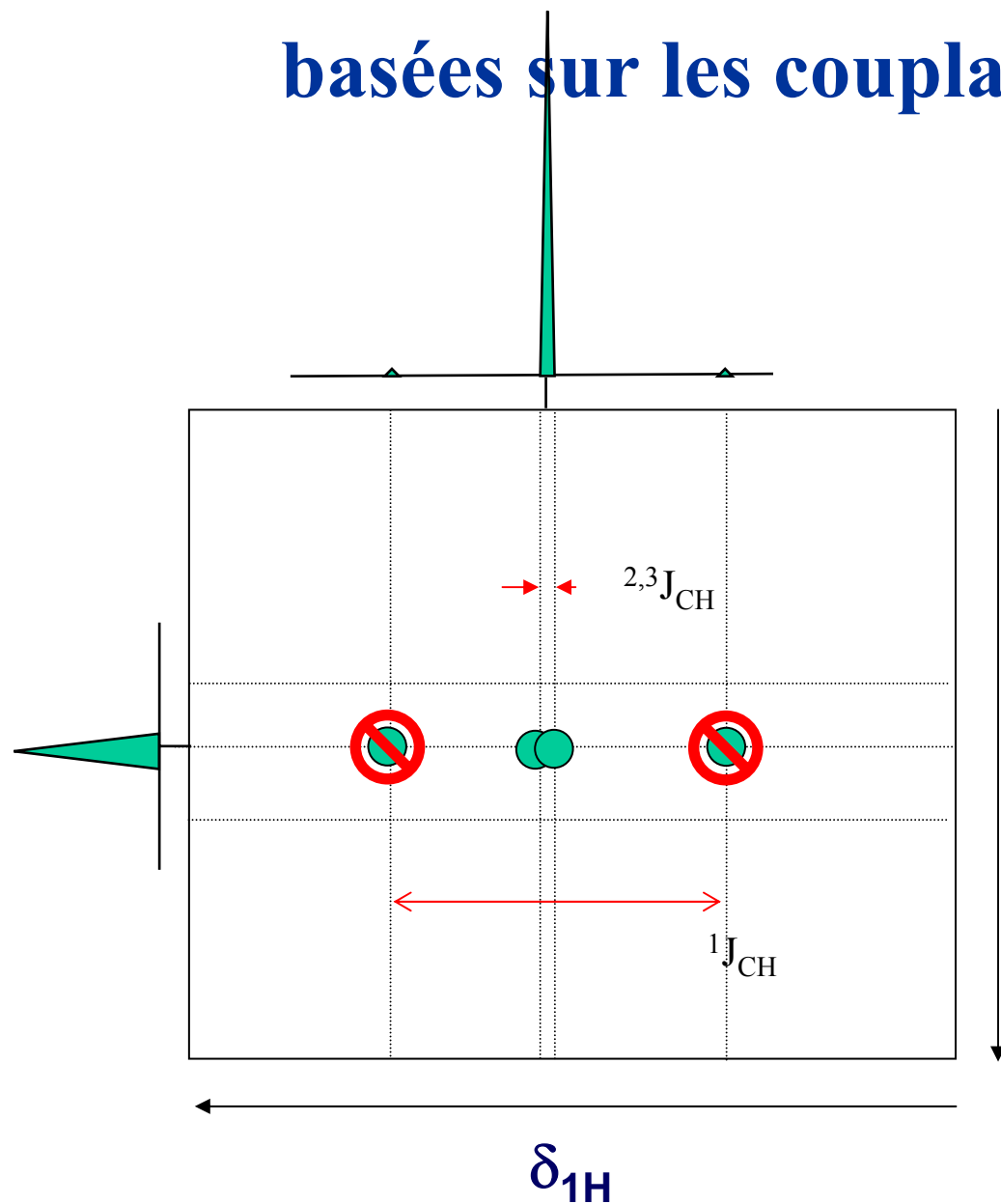


^{13}C $\{^1\text{H}\}$ Attached Proton Test



Tri : CH_3 et CH « négatif » // CH_2 et C « positif »

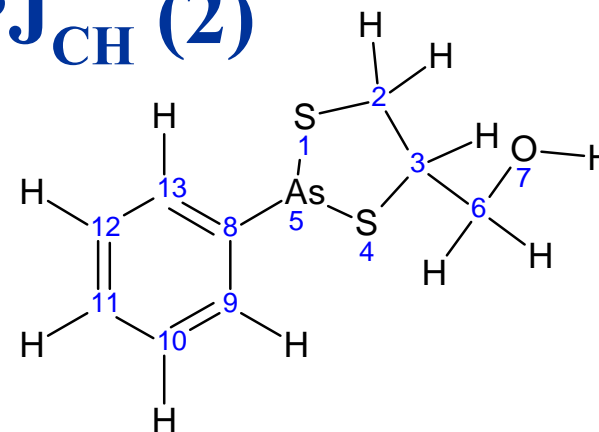
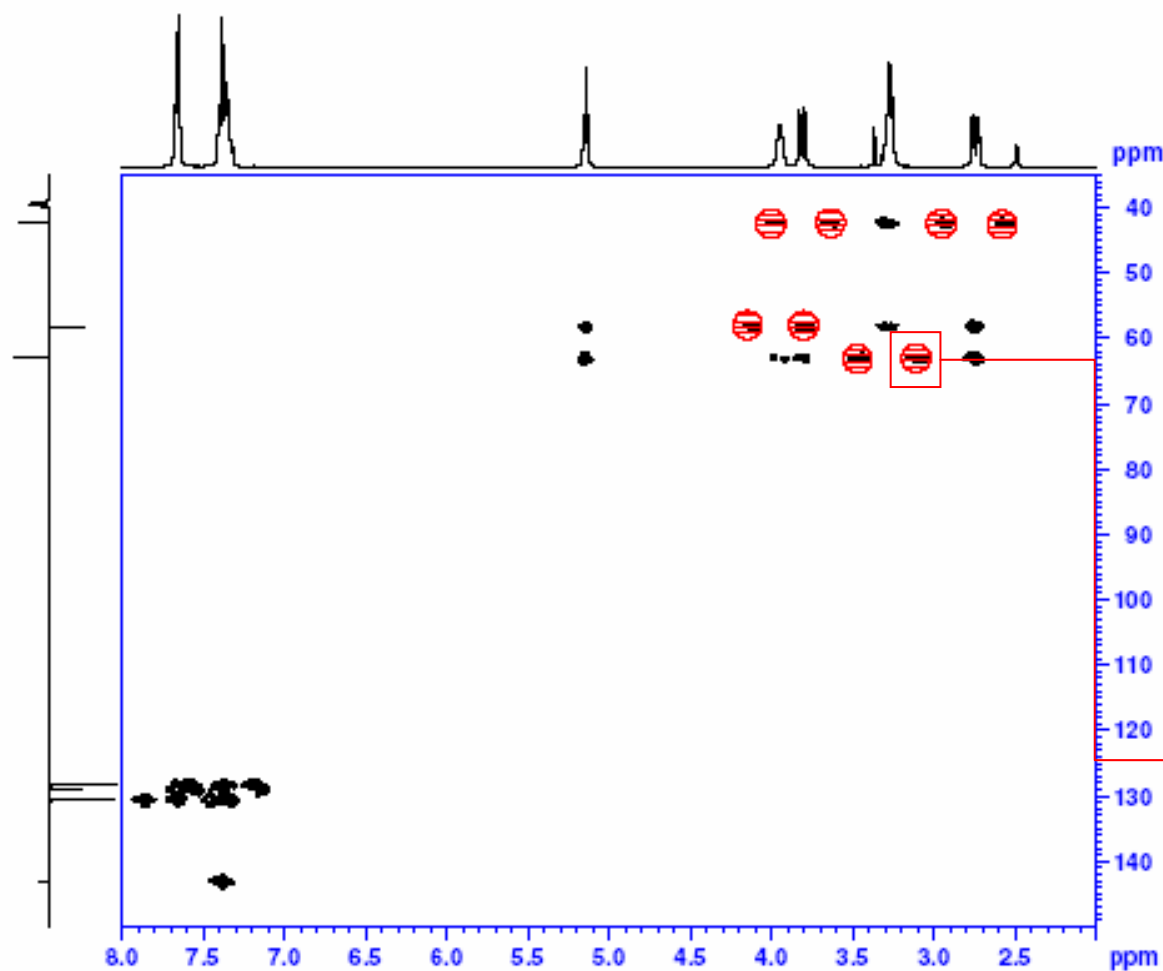
Corrélations hétéronucléaires basées sur les couplages $^{2,3}J_{CH}$ (1)



- COLOC (Directe)
- HMBC (Inverse)

δ_{13C} → déc $\{^1H\}$

Corrélations hétéronucléaires basées sur les couplages $^{2,3}J_{CH}$ (2)



- COLOC (Directe)
- HMBC (Inverse)

Imperfections
instrumentales

Corrélations hétéronucléaires basées sur les couplages $^{2,3}J_{CH}$ (3)

