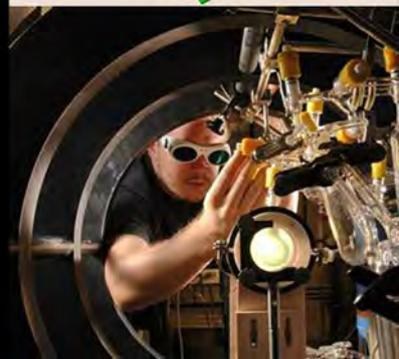
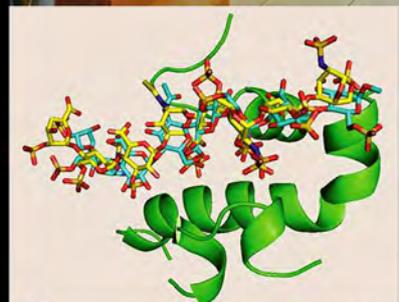
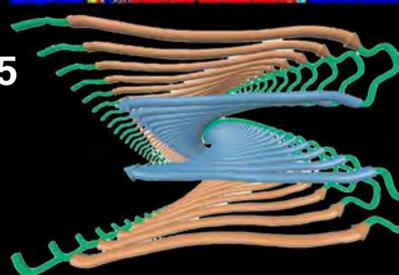
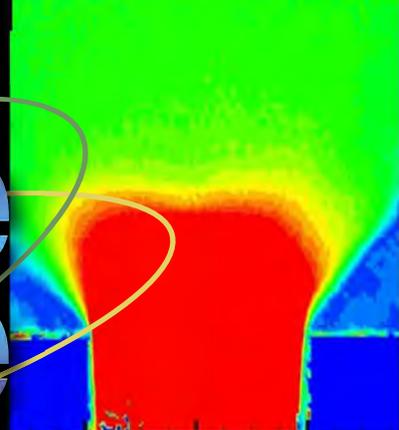
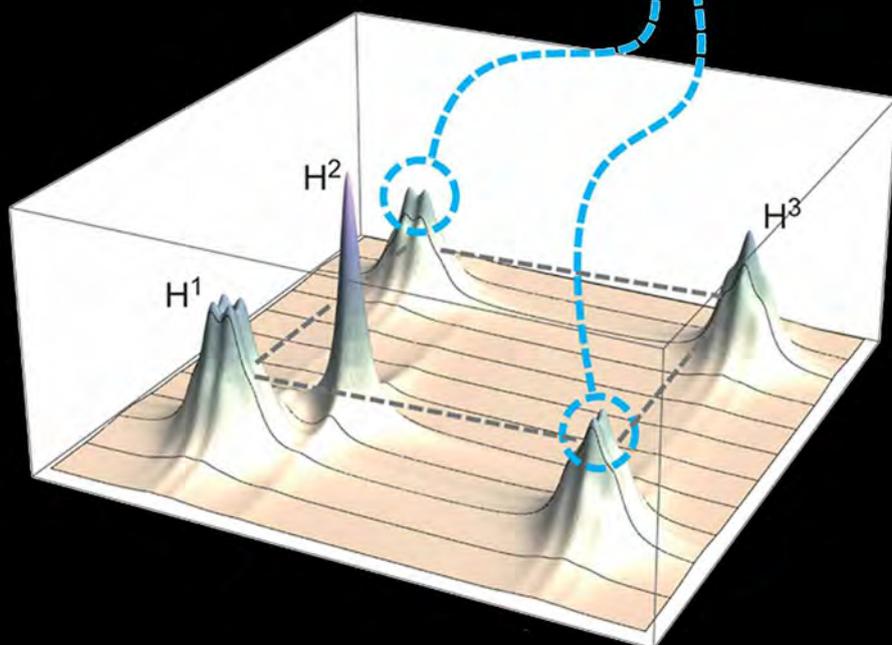
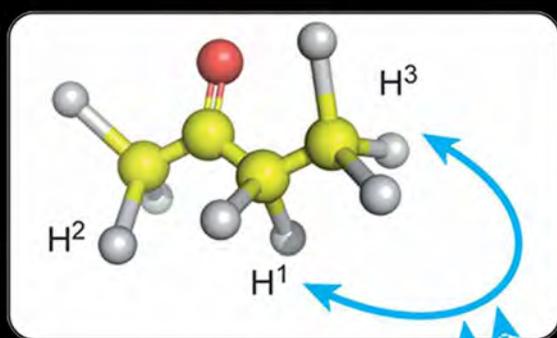


# L'actualité chimique

Mensuel - Juin-Juillet-Août 2012 - N° 364-365

## Danses avec les spins La RMN en chimie

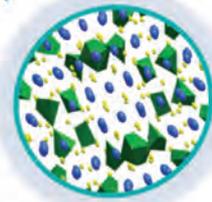


Société Chimique de France

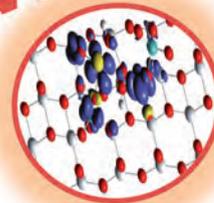


CATALYSE ET CHIMIE DU SOLIDE

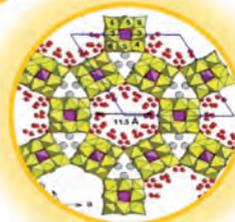
Pour l'énergie



Pour l'environnement



Pour le développement durable



De l'atome au procédé, des projets innovants:

Bioraffinerie (Eurobioref )

Des équipements phares:

Catalyse haut-débit (REALCAT Equipex )

Hall Pilotes catalyse  

Des plates-formes analytiques (Fédération Chevreul )

Surfaces (XPS-Tof-SIMS-LEIS), Diffraction RX, RMN solide (TGIR)

### RÉDACTION

**Rédacteur en chef** : Paul Rigny  
**Rédactrice en chef adjointe** :  
 Séverine Bléneau-Serdel  
**Secrétaire de rédaction** : Roselyne Messal  
**Chef de rubrique, Collection « L'Actualité Chimique - Livres »** : Minh-Thu Dinh-Audouin  
**Secrétariat** : Martine Maman  
**Webmestre** : Jérémie Meyer de Ville  
<http://www.etage-13.com>

### Comité des rubriques :

Recherche et développement : Paul Rigny, Industrie : Gilbert Schorsch, Enseignement et formation : Katia Fajerweg, TP : Xavier Bataille et Nicolas Cheymol, Histoire de la chimie : Marika Blondel-Mégrelis, Comment ça marche ? : Véronique Nardello-Rataj, Un point sur : Jean-Pierre Foulon, Chimie des aliments et du goût : Hervé This, À propos de : Bernard Sillion, En bref : Séverine Bléneau-Serdel, Roselyne Messal, Actualités de la SCF et Agenda : Roselyne Messal, Livres et médias : Yves Dubosc

### Comité de rédaction :

P. Arpino, H. Belhadj-Tahar, J. Belloni, E. Bordes-Richard, J. Buendia, N. Capron-Joubert, C. Cartier dit Moulin, C. Cordella, J.-C. Daniel, R.-E. Eastes, J. Fournier, F. Lafuma, V. Lucas, P. Massiani, M.-T. Ménager, N. Moreau, A. Ouali, J.-M. Paris, P. Pichat, A. Picot, M. Quarton, F. Rocquet, E. Soulié, H. Toulhoat, M. Verdaguer, P. Vermeulin, D. von Euv

**Partenariat** : CNRS, Fondation Internationale de la Maison de la Chimie

Publication analysée ou indexée par :  
 Chemical Abstracts, base de données PASCAL

**ÉDITION** : Société Chimique de France

250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris  
**Rédaction** : 28 rue Saint-Dominique, 75007 Paris  
 Tél. : 01 40 46 71 64 - Fax : 01 40 46 71 63  
[redaction@lactualitechimique.org](mailto:redaction@lactualitechimique.org)  
<http://www.lactualitechimique.org>

**Directeur de la publication** : Olivier Homolle, président de la Société Chimique de France

**Imprimerie** : SPEI, BP 26, 54425 Pulnoy

**Maquette articles** : e-Press, Casablanca Technopark, Route de Nouaceur, Casablanca (Maroc)

**Maquette hors articles** : Mag Design  
<http://www.magdesign.info>

**ISSN** version papier 0151 9093

**ISSN** version électronique 2105 2409

### PUBLICITÉ

EDIF, Le Clemenceau, 102 avenue Georges Clemenceau, 94700 Maisons-Alfort  
 Tél. : 01 43 53 64 00 - Fax : 01 43 53 48 00  
[edition@edif.fr](mailto:edition@edif.fr), <http://www.edif.fr>  
 Index des annonceurs : p. 4

© SCF 2012 - Tous droits réservés

Dépôt légal : juin 2012

Toute représentation ou reproduction, intégrale ou partielle, fait sans le consentement de l'auteur, ou des ayants droits, ou ayant cause, est illicite (loi du 11 mars 1957, alinéa 1<sup>er</sup> de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal. La loi du 11 mars 1957 n'autorise, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, que les copies et les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective d'une part, et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration.

### TARIFS 2012 - L'ACTUALITÉ CHIMIQUE

(11 numéros par an)

Abonnement papier + électronique

**Particuliers** : France 95 € - Étranger 100 €

**Institutions** : France 195 € - Étranger 205 €

**Lycées** : France 110 € - Étranger 130 €

Abonnement électronique seul (France/Étranger)

**Particuliers** : 55 € - **Institutions** : 155 € - **Lycées** : 70 €

**Membres de la SCF (hors membres associés)** :

abonnement inclus dans la cotisation

**Abonnement** : SCF, Nadine Colliot

250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris

Tél. : 01 40 46 71 66 - Fax : 01 40 46 71 61

[adhesion@societechimiquedefrance.fr](mailto:adhesion@societechimiquedefrance.fr)

Prix de vente au numéro : 32 € (port inclus)



## La RMN, une « success story » !

Tout chercheur est fier de son domaine de recherche et tend à considérer qu'il est le meilleur. Mon opinion personnelle est que les « RMNistes » ont plus de titre que les autres à cultiver ce préjugé. Déjà, « observer » cette bizarrerie qu'est le « spin » du noyau atomique et prétendre que l'on va étudier la chimie est une outrecuidance – mais elle réussit. Déjà en 1963 (il y a des souvenirs personnels), le spectromètre A60 pour observer les protons avec une onde de 60 MHz était devenu obligatoire à tout laboratoire de chimie organique : « voir » ce qu'il y avait dans leurs solutions était possible et devenait indispensable – un véritable saut qualitatif de la puissance du chimiste. Et voici la naissance de la « RMN à transformée de Fourier », grâce à l'électronique rapide mais aussi à un nouvel algorithme de transformation de Fourier rapide proposé par deux jeunes chercheurs (l'algorithme dit « papillon », James Cooley et John Tukey en 1965) : aussi bénéfique que celle des petits pains, c'est la multiplication des systèmes accessibles à la RMN, grâce au spectaculaire recul des limites de la sensibilité de la méthode. Souvenir encore : le séminaire (en 1975) d'un certain Peter Mansfield qui projette le cliché d'une tranche de citron resté entier. Encore une bizarrerie : la durée de l'expérience avait été de quatre heures et, vraiment, drôle d'idée de vouloir étudier un citron sans le couper. Mais l'imagerie RMN était née, et qui allait prévoir l'extraordinaire extension qu'elle prendrait dans le domaine médical ? Une foulure ? Tout de suite une IRM (il a mieux valu pudiquement supprimer le N de « nucléaire » qui déclenche de l'irrationnel) est devenue la réponse-réflexe. Mansfield et Lauterbur ont reçu le prix Nobel de médecine en 2003. Et beaucoup d'autres révolutions sont survenues, évoquées dans l'excellent rappel historique de Lyndon Emsley, qui ouvre ce numéro.

La publication de ce numéro spécial sur la RMN, coordonné par Lyndon Emsley, Stefano Caldarelli et Jean-Nicolas Dumez, inspire quelques remarques. Basée sur un phénomène simple, la RMN n'a cessé de se compliquer et cette évolution peut se suivre dans les articles présentés ici. La méthodologie et l'instrumentation se sont considérablement sophistiquées (irradiations multiples, séquences d'excitation sophistiquées, modélisation théorique des structures, de la dynamique externe ou interne des molécules, etc.) et corrélativement,

les domaines d'applications se sont étendus, presque sans limite dirait-on, à tout ce qui est matière condensée. Les barrières cèdent peu à peu : tailles des macromolécules biologiques – si bien que ce qui n'était que promesse aventureuse dans les premières structures de protéines est devenu méthode indispensable –, hétérogénéités des échantillons – si bien que les systèmes « réels » tels que rencontrés dans l'industrie chimique ou agroalimentaire sont maintenant bien caractérisés –, et bien d'autres barrières qu'on verra exposées dans ce numéro. Ces succès étaient bien loin naguère d'être escomptés, mais petit à petit la RMN s'est imposée dans le champ de l'étude des systèmes désordonnés, malheureusement abordés par la cristallographie X, mais qui sont la règle dans le monde du vivant et si répandus dans celui des matériaux qui nous entourent.

Ce numéro spécial est forcément difficile d'accès par bien des aspects (comment aborder la méthodologie sans quelques concepts spécialisés ?), mais il réussit, pensons-nous, à faire passer le message d'une mutation du champ de la science et de la technique qui se déroule sous nos yeux et qui touche profondément notre façon de connaître la matière – matière vivante ou technique. Malgré la difficulté de lecture qui heurtera certainement une partie de nos lecteurs, nous pensons que *L'Actualité Chimique* se doit – sans en faire un positionnement dominant – de donner à ses chimistes de lecteurs la possibilité de comprendre de telles évolutions.

Ceci est d'autant plus important que les développements ne sont pas achevés, comme on le comprend de l'article qui traite de l'instrumentation en RMN et qui fait miroiter d'autres exploitations de la résonance magnétique, ainsi que des conclusions de chacun des articles qui citent leurs perspectives. Formidable « success story » pour la science et la technique, la RMN peut continuer à attirer des chercheurs de toutes orientations – plus fondamentalistes, plus appliqués, plus expérimentateurs, plus théoriciens. C'est un beau message indirect de cette publication dont nous voulons encore féliciter et remercier non seulement les coordinateurs, mais aussi tous les auteurs qui se sont passionnés au bénéfice de *L'Actualité Chimique*.

**Paul Rigny**  
 Rédacteur en chef

Éditorial	1
La RMN, une « success story » !, par <b>P. Rigny</b>	1
Nos lecteurs réagissent	4
Chroniques	6
Un gaz anticrise ?, par <b>J.-C. Bernier</b>	6
À propos de	8
« Nanos » : définition, science, technologie, risques... L'exemple des nanotubes de carbone, par <b>R.A. Jacquesy</b>	8
Industrie	11
Eastman-Kodak : chronique d'une « faillite annoncée », par <b>G. Schorsch</b>	11
Histoire de la chimie	16
Louis Troost (1825-1911) : la chimie inorganique au tournant du XX <sup>e</sup> siècle, par <b>J. Fournier</b>	16
<b>Danses avec les spins</b>	
<b>La résonance magnétique nucléaire en chimie</b> 19-126	
En bref	127
Livres et médias	130
Agenda	133
Actualités de la SCF	134
Un point sur	135
Les fluides supercritiques à votre service, par <b>K. Benaïssi</b>	135

8 septembre 2012

## 2<sup>e</sup> Colloque « De la recherche à l'enseignement »

Paris



Ce colloque, qui se tiendra à l'ENSCP ParisTech, est ouvert à toute personne intéressée d'avoir en une journée une image de la recherche française en chimie – fluides supercritiques et matériaux nanostructurés, molécules chirales, polymérisation radicalaire, chimie bioinspirée et photosynthèse, interactions protéines/glucides, batteries lithium, catalyse –, présentée par des lauréats de Prix et Médailles de l'Académie des sciences, du CNRS et de la SCF : **Cyril Aymonier** (Médaille de bronze du CNRS 2011), **Thierry Buffeteau** (Médaille d'argent du CNRS 2011), **Bernadette Charleux** (prix Grammaticakis-Neumann de l'Académie des sciences 2011), **Marc Fontecave** (prix Le Bel SCF 2011), **Anne Imberty** (prix Charles Dhéré de l'Académie des sciences 2011), **Jean-Marie Tarascon** (prix Pierre Süe SCF 2011), et **Hélène Olivier-Bourbigou** (IFP Énergies Nouvelles).

• [www.societechimiquedefrance.fr/fr/breve/colloque-de-la-recherche-a-l-enseignement.html](http://www.societechimiquedefrance.fr/fr/breve/colloque-de-la-recherche-a-l-enseignement.html)



# Danses avec les spins La résonance magnétique nucléaire en chimie

19-126

Coordinateurs : Lyndon Emsley, Stefano Caldarelli et Jean-Nicolas Dumez

Couverture :

Conception graphique Mag Design © www.magdesign.info (avant-dernière photo en bas à droite : © P. Stroppa/CEA).

## Avant-propos

19

La RMN : un outil toujours en évolution au service de tous les aspects de la chimie, par **L. Emsley, S. Caldarelli** et **J.-N. Dumez**

19

## Introduction

20

La RMN à haut champ : soixante ans à révolutionner la science, par **A. Zagdoun** et **L. Emsley**

20

Glossaire

25

## RMN moléculaire

30

La RMN en chimie organique, par **J. Courtieu** (*coord.*), **N. Giraud**, **O. Lafon**, **P. Lesot**, **C. Lorthioir** et **J.-M. Nuzillard**

30

De la molécule aux patients : la RMN au cœur de la recherche pharmaceutique translationnelle, par **F. Herman**, **I. Salliot-Maire** et **S. Sablé**

42

Déterminer la structure d'une protéine par RMN : un problème d'optimisation complexe, par **Y. Nominé** et **B. Kieffer**

48

La RMN biomoléculaire ou la révolution en mouvement, par **L. Salmon** et **M. Blackledge**

56

## Analytique

59

La métabolomique par RMN et ses applications en biologie végétale, toxicologie et médecine, par **C. Canlet**, **L. Shintu** et **B. Elena-Herrmann**

59

La RMN pour la caractérisation moléculaire de produits de consommation agroalimentaire, par **S. Caldarelli**

69

## RMN des solides

73

Les spins nucléaires : des espions pour explorer la structure des matériaux, par **F. Babonneau**, **C. Bonhomme**, **C. Gervais**, **T. Azaïs**, **G. Laurent**, **O. Lafon**, **L. Montagne**, **J. Trébosc**, **L. Delevoye**, **G. Tricot**, **J.-P. Amoureux**, **T. Charpentier**, **F. Angeli**, **F. Fayon**, **M. Deschamps**, **S. Cadars**, **P. Florian** et **D. Massiot**

73

La RMN à l'état solide : un outil clé pour la compréhension moléculaire des catalyseurs hétérogènes bien définis, par **D. Gajan**, **G. Lapadula**, **M. Schwarzwälder** et **C. Copéret**

82

La cristallographie par RMN, par **J.-N. Dumez**

90

## Dynamique globale des molécules

97

Mobilité moléculaire et RMN, par **D. Canet** et **P. Palmas**

97

L'IRM s'aventure hors des sentiers du monde médical, par **F. Mariette**, **S. Rodts**, **P. Faure**, **P. Moucheront**, **M. Musse**, **A. Davenel**, **G. Collewet** et **T. Lucas**

104

## Avancées techniques et instrumentales

111

Polarisation dynamique nucléaire à haut champ magnétique et résonance paramagnétique électronique, par **G. De Paëpe** et **S. Gambarelli**

111

L'instrumentation en RMN : une affaire de haute sensibilité, par **D. Sakellariou**

117

## Prochainement

• **En octobre** : parution de « **La chimie et la nature** », le 7<sup>e</sup> ouvrage de la collection L'Actualité Chimique-Livres.

• **Le 14 novembre**, à la Maison de la Chimie (Paris 7<sup>e</sup>) : colloque « **Chimie et enjeux énergétiques** ».

• <http://actions.maisondelachimie.com/index-p-colloque-i-25.html>

## Pourquoi amusant ?

Bonjour !

Comme toujours, dès que *L'Actualité Chimique* arrive, je suis extrêmement impatiente de m'y plonger. Ce que j'ai fait dès la boîte aux lettres ouverte. Cela fait plusieurs numéros que je trouve extrêmement intéressants ; félicitations à la Rédaction, et également aux illustrateurs de page de couverture : celle du dernier numéro est très réussie !

Concernant la chronique de Jean-Claude Bernier du n° 363 de mai 2012, j'ai beaucoup apprécié son contenu et cela m'a donné très envie de lire le rapport de l'OPECST, ce que je ferai, le site étant indiqué par ailleurs.

Toutefois, je me permets, avec tout le respect que je dois à Mr Bernier, une remarque à propos de sa conclusion.

Si (pourquoi pas ? et je l'y encourage bien sûr), il envisage l'éventualité d'« *enseigner quelques idées de chimie* » à la Rédaction du *Canard*, je récuse totalement le terme d'« *amusante* » qu'il lui donne comme qualificatif. La chimie est une science, tout comme l'astronomie, la géologie, la biologie, etc... Parle-t-on d'« *astronomie amusante* » ? De « *biologie amusante* » ? De « *géologie amusante* », etc. ? Non ! La chimie ne doit pas être un simple spectacle ! Or, pour avoir assisté à plusieurs démos de chimie dite « *amusante* », j'ai trop souvent entendu la conclusion suivante de la part des spectateurs et auditeurs : « *c'était super* » (très bien !), voire « *c'était magique* » (très bien !), mais conclusion si souvent suivie (hélas !) du commentaire « *j'ai rien compris* ».

En ce qui me concerne en tout cas, j'ai compris, à l'écoute des commentaires entendus en sortie, que la perception qu'avaient des personnes profanes vis-à-vis de la chimie était que, en plus d'être des pollueurs – c'est bien connu –, nous pouvions être aussi (tiens !) des sortes de bateleurs un peu marrants, un peu magiciens, d'accord... mais pas très

sérieux, en fait plutôt des saltimbanques... et que... « *bon !... tout ça, cela ne change rien à l'image de la chimie.* »

Je demande instamment à la communauté des chimistes de peser ses mots : de parler de chimie « *spectaculaire* », « *étonnante* », « *surprenante* », « *originale* », voire même « *contre intuitive* » (quoique le mot me paraisse un peu trop savant) ; mais, par pitié, ne parlons pas de chimie « *amusante* » ou bien « *magique* » ! La chimie est une science, point barre ! Elle est, tout simplement, utile... et, de surcroît, intéressante ! Montrons, oui ! Des couleurs, des étincelles, des lueurs... mais surtout, démontrons ! Expliquons avec des mots simples le pourquoi du comment ! Expliquons ! Expliquons ; évoquons la démarche, et la peine, de nos grands prédécesseurs pour améliorer la compréhension du déroulement de faits observés ; faisons percevoir l'utilité de notre discipline et des multiples petites améliorations qu'elle apporte au quotidien, améliorations dont trop souvent les gens n'ont pas... ou ne veulent pas avoir conscience....

Voilà ! J'ai évacué mon irritation passagère, mais récurrente, tout comme l'est le qualificatif « *amusant* » ; veuillez, svp, me pardonner ! Mais « *ma* » science me passionne tellement que, à la vérité, je souffre du mépris avec lequel elle est considérée par la plupart.

**Françoise Plénat**

le 11 mai 2012

NB : il y a peu, j'ai apporté à une conférence... une allumette... et, à la grande surprise des auditeurs (« *comment peut-on faire toute une conférence à propos d'une simple allumette ?* »), j'en ai parlé pendant une bonne heure : ses débuts, les progrès, sa chimie (y compris les côtés négatifs). Seule expérience : l'enflammer et regarder, avec cette simple question pour finir : « *Y aurait-il ici quelqu'un qui n'aurait pas une boîte d'allumettes à la maison ?* » Tout le monde en avait une...



THE EUROPEAN SUSTAINABLE CHEMISTRY AWARD

### Marc Taillefer, lauréat de l'European Sustainable Chemistry Award (ESCA)



Au moment de mettre sous presse, nous venons d'apprendre que le second *European Sustainable Chemistry Award* (ESCA) a été décerné à **Marc Taillefer**, vice-président de la SCF.

Ce prix lui sera remis le 26 août à Prague, lors de l'ouverture du 4<sup>e</sup> congrès EuCheMS de chimie. Nous y reviendrons dans le prochain numéro.

### Index des annonceurs

BASF	p. 5
Bruker	p. 28-29, 4 <sup>e</sup> de couv.
CBM	p. 89
CNRS Formation Entreprises	p. 47
CultureSciences-Chimie	p. 24
EDIF	p. 96
ICMR	p. 15
ICSN	p. 10
RNChimie	p. 110
UCCS	2 <sup>e</sup> de couv.

Régie publicitaire : EDIF, Le Clemenceau, 102 avenue Georges Clemenceau, 94700 Maisons-Alfort  
Tél. : 01 43 53 64 00 - Fax : 01 43 53 48 00 -  
edition@edif.fr - http://www.edif.fr



La photo de Toshiko Yuasa qui illustre l'article « Deux savants japonais et la famille Curie, Nobuo Yamada et Toshiko Yuasa » de Keiko Kawashima (*L'Act. Chim.*, 2012, 363, p. 51-55) a été gracieusement fournie par le Centre d'étude de genre d'Ochanomizu (Japon).

### Précision



**La SCF sur Facebook, vous aimez ?**  
Parlez-en autour de vous,  
et invitez vos amis et collègues à nous rejoindre !

• [www.facebook.com/pages/Soci%C3%A9t%C3%A9-Chimique-de-France/114534205270205](http://www.facebook.com/pages/Soci%C3%A9t%C3%A9-Chimique-de-France/114534205270205)

## les enfants **aiment** la chimie

Donner envie aux nouvelles générations de faire de la chimie est important pour notre avenir. C'est pourquoi nous avons créé dans 15 pays le « Kid's Lab », un laboratoire où les enfants découvrent la chimie et la science en s'amusant à faire des expériences. Et si nous réconcilions les enfants avec les tubes à essai ? Chez BASF, nous créons de la chimie. [www.basf.fr/chimie](http://www.basf.fr/chimie)



 **BASF**  
The Chemical Company

## Un gaz anticrise ?



© Wikimedia Commons/George Shuklin.

Les chimistes connaissaient bien jusqu'ici l'oxyde d'azote  $N_2O$ , connu sous l'ancien nom de gaz hilarant, gaz euphorisant parfois utilisé pour rendre supportable des séances chez le dentiste ! Mais on assiste actuellement à l'arrivée aux États-Unis d'un nouveau gaz, le « shale gas » ou gaz de schiste, qui rend euphorique l'industrie américaine et les sociétés gazières internationales.

On sait que les sociétés modernes ont développé une soif inextinguible d'énergie ; cette soif a conduit à une consommation extrême des ressources naturelles, dont le pétrole qui a vu sa demande passer de 0,5 GTep<sup>(1)</sup> en 1900 à 4,5 GTep en 2010. Les prévisionnistes, impressionnés par le développement des BRIC<sup>(2)</sup>, extrapolent les consommations entre 8,5 et 12,5 GTep en 2050. Actuellement, l'extraction est de l'ordre de 85 Mbarils/j et les projections pour satisfaire la demande en 2050 exigeraient 200 à 250 Mbarils/j ! Les géologues, qui font la différence entre réserves et ressources (on ne peut récupérer qu'un pourcentage des gisements à un prix raisonnable) pensent que c'est impossible et que déjà le plateau de production pour le brut conventionnel est atteint. Les économistes, plus optimistes, pensent que ce plateau peut être prolongé avec les liquides non conventionnels : sables bitumineux, récupération assistée, biocarburants, charbon liquéfié... et de nouvelles découvertes en eau profonde ou arctiques. Physiquement, il semble cependant difficile de dépasser 100 Mbarils/j, avant la descente inéluctable qui succédera au pétrole cher.

Quand on fait le bilan énergétique mondial à partir des combustibles fossiles,

les contributions sont les suivantes : 33 % pour le pétrole, 25 % pour le charbon et 20 % pour le gaz naturel. Ce sont donc ces deux dernières ressources fossiles dont la consommation est destinée à croître. Parmi celles-ci, le gaz, dont la combustion émet moitié moins de  $CO_2$  que le charbon, est à préférer ; mais quelles sortes de gaz, et comment les distingue-t-on ?

- le gaz naturel « huileux », produit en même temps que le pétrole, souvent brûlé en torche mais récupérable ;
- le gaz de houille, bloqué dans les veines profondes du charbon ou « grisou », récupérable dans les mines désaffectées ;
- le gaz naturel « sec », confondu parfois avec le « tight gas », enfermé dans des cavités de roches mères imperméables de type grès ;
- le gaz naturel non conventionnel (GNC), ou « shale gas », absorbé dans les roches mères de type argile et qui n'a pas migré vers un gisement classique, récupérable par fracturation de la roche.

Tous ces gaz ont un point commun : leur composition majoritaire en méthane  $CH_4$  avec des quantités variables d'éthane, d'hydrogène, de  $CO_2$ . Depuis les années 2000, les compagnies américaines de forage et les compagnies gazières ont associé leurs technologies en forages horizontaux et fracturation hydraulique pour récupérer le « shale gas ». Cette exploitation n'a pas toujours été un long fleuve tranquille : abandonnée en 1960, elle a été relancée par le Département de l'énergie (US DOE<sup>(3)</sup>) de 1976 à 1982 qui a financé les études de fracturation. Dans les années 2000, elle a été reprise par de petites compagnies (Mitchell) dans le Texas sur le gisement de Barnett ; le succès a entraîné de grandes compagnies comme Devon et Chesapeake à prendre le relais sur des champs immenses comme Newart East, puis Marcellus, qui s'étendent sur 240 000 km<sup>2</sup> et plusieurs États (Pennsylvanie, Virginie et New York, ou Haynesville au Texas et en Louisiane). La contribution du « shale gas » à la production américaine est passée de 2 % en 2000 à 25 % en 2012, avec une production supérieure à 5 Tcf<sup>(4)</sup>. Les réserves américaines, estimées par le dernier rapport de l'US DOE à 862 Tcf, donnent au rythme actuel d'exploitation près de 150 ans de production. Cette

croissance rapide depuis 2005 a des conséquences heureuses et d'autres plus nuancées :

- le prix du gaz aux États-Unis a été divisé par trois de 2008 à 2012, de 12 \$ le Kcf<sup>(4)</sup> (28 m<sup>3</sup>) à 4 \$ ;
- les États-Unis, qui étaient gros importateurs de gaz, sont devenus exportateurs. La société Chemiere, spécialisée dans les usines de gazéification à partir du liquéfié, transforme au contraire ses usines en centres de liquéfaction du gaz américain pour l'exportation ;
- le méthane est une matière importante pour la chimie ; en dépend la production d'hydrogène, de méthanol et d'acide acétique, maillons importants pour de nombreuses matières plastiques. Les grandes sociétés pétrochimiques et chimiques attirées par le faible coût se préparent à investir dans des vapocraqueurs et des plates-formes chimiques.

Il est maintenant incontestable que le gaz de schiste contribue à la relance industrielle américaine. Mais cet engouement trop rapide depuis 2008 conduit à quelques excès :

- les sociétés ont été tentées de spéculer fortement sur leur portefeuille de droits d'exploitation en gonflant leurs estimations de réserves ;
- l'excès d'exploitation de la première année conduit à des prix de vente qui, dans certains cas, sont inférieurs au prix de revient (estimé à 7 \$ le Kcf moyen) ;
- les projets d'implantation de centrales nucléaires sont bloqués au profit de nouvelles centrales au gaz ;
- enfin, il est clair que la surexploitation par puits verticaux et fragmentation hydraulique commence à préoccuper les associations environnementales outre-Atlantique. Le gouvernement fédéral, après quelques États comme la Pennsylvanie et New York, veulent assortir les permis de règles environnementales plus sévères.

Et l'Europe et la France me direz-vous ? Nous avons été les premiers dans *L'Actualité Chimique* à attirer l'attention sur le gaz de schiste avant tous les médias en mars 2011 [1]. L'inventaire des réserves exploitables se situe à 624 Tcf, notamment en Scandinavie, Allemagne, Pologne, et en France qui possède la seconde réserve européenne dans le bassin parisien et dans le Sud-Est. Les réserves estimées sont de l'ordre de

425 Tcf dont un peu plus de 100 paraissent probablement exploitables, c'est-à-dire de l'ordre de 2 800 Gm<sup>3</sup>, ce qui représente près de 3 000 fois la production nationale de gaz (1 Gm<sup>3</sup>). Notre consommation actuelle est de 40 Gm<sup>3</sup>, avec des importations d'Algérie, de Russie et de Lybie qui se chiffrent à 11 Md€. Si elles étaient exploitées, ces réserves nationales assureraient 70 ans d'autonomie et une balance commerciale allégée de plus de 10 Md€. C'est ce calcul simple que font par exemple la Chine ou la Pologne.

Mais il y a une grande différence entre les États-Unis et la France. Tout d'abord, les particuliers américains sont propriétaires de leur sous-sol, donc les conventions d'exploitation laissent une part financière aux propriétaires des terrains sur lesquels sont installés des forages. En France, c'est l'État qui est propriétaire du sous-sol. Par ailleurs, dans les années 1980, c'est l'US DOE qui a financé l'exploration et les essais de fracturation (« Easterngas Shale Project »), et c'est l'Agence fédérale de protection de l'environnement (EPA) qui conduit une étude scientifique sur les effets de la fracturation hydraulique sur les ressources en eau potable. En France,

la loi du 13 juillet 2011 a non seulement interdit l'exploitation, mais aussi l'exploration des zones susceptibles, d'après les géologues, d'être sources de gaz, en particulier dans le bassin parisien et dans le Sud-Est dans les roches mères bien connues des terres noires, alors qu'un forage antérieur près de Valvignère avait déjà identifié le méthane.

La commission interministérielle chargée d'évaluer les techniques d'exploitation a rendu son rapport en mars 2012. Elle note en particulier qu'il est inconséquent de ne pas disposer d'une évaluation approfondie de la richesse potentielle de ces sous-sols, et accepter de rester dans l'ignorance de telles possibilités n'est cohérent ni avec les objectifs de la loi de programmation fixant les orientations de la politique énergétique (POPE), ni avec le principe de précaution. On pourrait alors recommander une phase préalable exploratoire de développement des connaissances que le BRGM et IFP Énergies nouvelles (IFPEN), en liaison avec des experts du forage (Total et GDF Suez), pourraient évidemment mener. Il faudrait aussi pouvoir intéresser les propriétaires de terrain des futurs forages par le versement d'une

redevance annuelle de l'exploitant comme on l'a prévu pour les fermes d'éoliennes, sinon les réticences resteront fortes.

Dès fin mars, les industriels de l'énergie et de la chimie ont manifesté leur souhait d'un rapide déblocage de la situation mettant fin à l'exception française. Mais il est vrai que nous étions en période électorale, et très prudemment, les candidats n'ont pas abordé ce sujet de polémiques, suivant le bon vieux principe du mikado : le premier qui bouge est éliminé !

Jean-Claude Bernier,  
le 10 mai 2012

- (1) Gtep : milliard de tonnes équivalent pétrole.  
(2) Brésil, Russie, Inde et Chine.  
(3) US Department of Energy.  
(4) Tcf : trillion de cubic feet = 28 Gm<sup>3</sup> = 28 milliards de m<sup>3</sup> ; Kcf : mille cubic feet = 28 m<sup>3</sup>.  
[1] Bernier J.-C., Encore un coup de grisou..., *L'Act. Chim.*, 2011, 350, p. 3.



Jean-Claude Bernier  
est vice-président  
de la SCF.

## Modernisons ensemble *L'Actualité Chimique*

Pour suivre l'évolution des préoccupations et des goûts des lecteurs, faisons évoluer notre revue. C'est d'abord aux auteurs que nous nous adressons par les deux messages suivants que nous proposons à leurs commentaires, mais surtout à leurs manuscrits en les remerciant vivement de leurs efforts :

### La rubrique « Recherche »

Nous acceptons :

- des **communications scientifiques plus courtes** (3 pages maximum),
- des articles plus étendus (environ 5 pages),
- des « dossiers détachables » (12 ou 16 pages) pour des articles de revue.

Nous demandons des **efforts de simplification des articles** : pour faire ressortir l'essentiel – le « pourquoi » de la recherche, les acquis du travail.

Nous souhaitons des **illustrations à caractère « journalistique »**, pour rendre la revue plus attrayante. Bien entendu, le critère de **qualité scientifique** indiscutable apprécié par tous reste incontournable.

### Recherche et « innovation »

Vous vous préoccupez de plus en plus, dans vos recherches, des prolongements de votre travail vers l'application ? Mettez cela en évidence dans vos articles ! *L'Actualité Chimique* le signalera par un « sourire » :



- Pour être mis ainsi en valeur**, votre article devra :
- bien faire ressortir sa **composante « innovation »** : par exemple au moyen d'encarts et d'illustrations appropriés ;
  - témoigner de **vrais efforts de développement** : existence de licences d'exploitation, création de « start-up », preuve d'un intérêt concret de la part d'un industriel ;
  - avoir eu l'agrément du Comité de Rédaction (groupe « Innovation »).

Nous souhaitons par cette mesure placer *L'Actualité Chimique* bien en phase avec l'évolution que connaissent les laboratoires depuis quelques années et intéresser tous les chimistes – de l'industrie, des universités ou des organismes de recherche – sensibles à cette évolution.

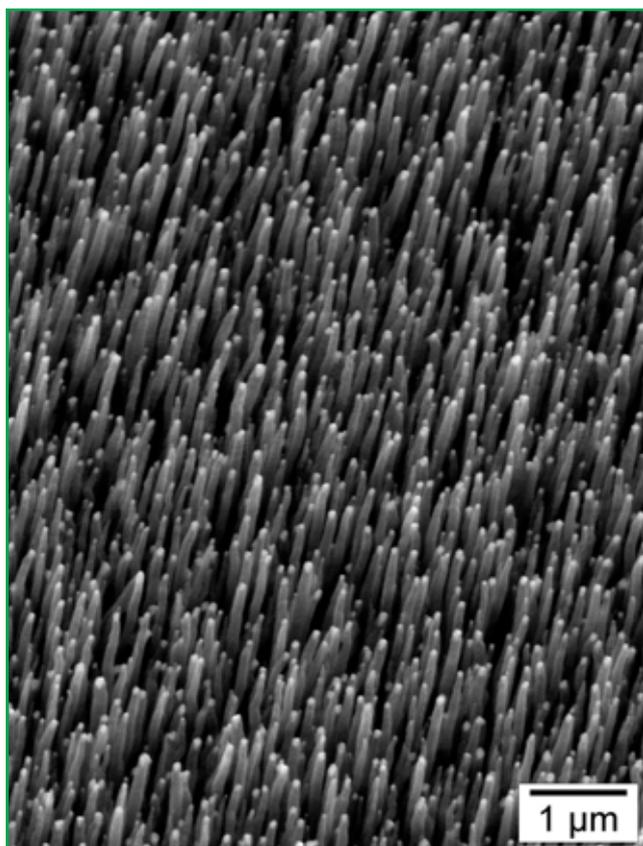
Paul Rigny  
Rédacteur en chef

# « Nanos » : définition, science, technologie, risques...

## L'exemple des nanotubes de carbone

Rose Agnès Jacquesy

© CNRS Photothèque/Catherine JOURNET-GAUTIER.



Forêt de nanotubes de carbone orientés perpendiculairement au substrat vue par microscopie électronique à balayage (UMR 5586 - Laboratoire de physique de la matière condensée et nanostructures (LPMCN), Villeurbanne).

Plus fort que Jules Verne, Richard Fleischer a imaginé en 1966 les pérégrinations d'une nanoparticule introduite dans un corps humain ! Dans *Le Voyage fantastique*, un sous-marin et son équipage miniaturisés vont sauver la vie d'un savant, victime d'un caillot de sang dans le cerveau. La présence de Raquel Welch, même à l'échelle du milliardième de mètre, n'a pas été neutre dans le succès du film, et l'absence de réaction à cette intrusion pose, pour le moins, des questions d'éthique.

D'ailleurs, le débat public avorté sur les « nanos » (en 2009 et 2010) a été l'occasion d'une débauche de démagogie et de paranoïa, dont certains scientifiques n'ont pas été totalement absents. Rien de très étonnant quand on ne définit pas exactement de quoi on débat, et donc que les uns et les autres parlent d'objets différents, dont l'étude toxicologique est balbutiante, voire inexistante !

Mais les « nanos », que l'on trouve partout (et depuis la haute antiquité !), sont-ils même des substances chimiques ? Au sein de l'AFSSET (maintenant ANSES), les nanomatériaux ont en effet été traités par le Comité d'experts spécialisés « Évaluation des risques liés aux agents physiques, aux nouvelles technologies et aux grands aménagements » (trois rapports produits en 2006, 2008 et 2010), comité qui intervient aussi sur les UV dans les cabines de bronzage, les radiofréquences, les éoliennes, etc., et non par celui qui traite des risques chimiques.

Un nombre conséquent de revues scientifiques (j'ai compté huit journaux spécialisés) traitent du domaine, sans en spécifier d'ailleurs le champ et les contours (les facilités relatives aux financements sur le sujet n'y sont probablement pas étrangères !). La définition de ce que l'on étudie est pourtant essentielle, notamment pour déterminer les éventuelles atteintes à la santé et à l'environnement.

Les chimistes, affirmons-le, sont les vrais artisans des nanosciences : en faisant et défaisant des liaisons chimiques entre atomes et groupes d'atomes, et même entre molécules (cf. la chimie supramoléculaire), ils créent des nano-objets, catégorie dans laquelle on peut même, à la limite, intégrer dendrimères, membranes, micelles..., dont une dimension au moins est comprise entre 1 et 100 nm. Le physicien, quant à lui, aura tendance à définir les nanosciences comme toute science dans laquelle on observe un changement des propriétés physiques quand on passe de l'échelle macroscopique à l'échelle nanoscopique. Cette notion, introduite dans les années 1950 par Richard Feynman (prix Nobel de physique 1965), inclut leurs technologies de fabrication et de caractérisation et a été popularisée par la phrase célèbre « *there is plenty of room at the bottom* », c'est-à-dire toute l'*Encyclopedia Britannica* peut être inscrite sur une tête d'épingle.

### Le cas des nanotubes de carbone

Limitons-nous humblement au cas des nanotubes de carbone (NTC), des entités déjà bien diverses, dont les applications sont multiples : conducteurs, on les envisage dans des matériaux composites pour le transport d'électricité ; semi-conducteurs, ils ont leur place en électronique moléculaire ; grâce à leur bonne conduction de la chaleur et à leurs propriétés mécaniques (dureté, rigidité, légèreté), ils peuvent être inclus dans des matrices polymères ou métalliques et servir dans les gilets pare-balles comme dans les raquettes de tennis, en construction automobile ou aérospatiale... Creux par définition, qu'ils soient multi-ou monofeuillets (on dit aussi « parois » en français et, respectivement, MWN et SWNT en anglais), ils sont utilisables en catalyse et on peut les fonctionnaliser en surface pour



Autoclave dans laquelle sont fabriquées des plaques composites résines époxy et fibres de carbone, et contenant des nanotubes de carbone (NTC). Les NTC servent alors de renfort mécanique et permettent de dissiper les charges électrostatiques. Ces matériaux composites sont très prisés dans le secteur de l'aéronautique.

en faciliter la dispersion, favoriser leur auto-assemblage, ou pour d'autres applications ciblées.

Naturellement produits par les volcans, mais aussi par l'Homme dans les céramiques lustrées et dans les aciers de Damas par exemple, ce n'est qu'en 1984 qu'a été délivré à la société Hyperion le premier brevet sur les NTC. Bien qu'industrialisés depuis 1990, et surtout depuis 2000 (environ 500 t/an, 42 secteurs industriels concernés et quelques 3 000 salariés actuellement), la question de leur brevetabilité (avec son impact sur la propriété industrielle et l'innovation) et celle de la base de cette brevetabilité (structure, propriétés, type d'application ?) sont toujours à l'ordre du jour. L'ANR finance ainsi depuis 2009 le programme multidisciplinaire « NanoNorma » sur la régulation des « nanos » et la Commission européenne a multiplié les programmes sur les « nanos » depuis le 6<sup>e</sup> PCRD, en promouvant également gouvernance et observatoires.

Que sait-on de la toxicité et de l'écotoxicité des NTC, les mieux connus peut-être, mais encore si peu ?

Ce n'est qu'en 2002 qu'une Action Group canadienne (ETC), c'est-à-dire une « class action », a évoqué des effets toxiques et exigé un moratoire sur la recherche en nanosciences, en invoquant notamment une analogie avec l'amiante. La première publication sur les effets respiratoires des NTC date de 2004. De nombreux travaux existent maintenant avec des études sur les souris ou les rats, utilisant divers types de NTC, par inhalation ou voie pharyngée, avec des doses variables et sur des durées tout aussi variables. Il en ressort que les NTC peuvent effectivement induire une réponse inflammatoire par libération de cytokines, très précoce en général (6 à 24 h), et très généralement transitoire (moins de 15 jours). Cette phase aiguë peut être suivie d'une phase plus persistante et à distance de l'inflammation initiale : la formation de granulomes incluant des macrophages, souvent entourés d'amas de NTC, encore parfois observables plus de six mois après l'exposition. Des fibroses pulmonaires peuvent apparaître plus ou moins rapidement, mais aucun développement de mésothéliome n'a été observé sur des animaux de laboratoire, à la différence des effets observés avec l'amiante. Le stress oxydant semble être

un des mécanismes impliqués dans les effets biologiques des NTC. Un des éléments récemment mis en évidence, et particulièrement intéressant, est la potentialisation de leurs effets biologiques en cas de terrain allergique ou infecté.

Les effets des NTC sont essentiellement d'origines physico-chimiques : la longueur, le nombre de parois, la nature et le contenu en résidus catalytiques (Fe, Ni, Co), ainsi que les propriétés de surface (hydrophobicité, enroulement, agrégation). Comme la fabrication et la purification des NTC sont des processus intrinsèquement complexes et très variés (action d'un arc électrique, dépôt en phase vapeur, ablation laser...), la population en NTC produits est hautement hétérogène, d'où la difficulté de mettre en œuvre des expérimentations reproductibles et comparables, d'autant que la caractérisation quantitative des NTC reste encore à réaliser. La connaissance de leur biotransformation dans le corps, dans ou hors du poumon, est tout aussi mal documentée.

Dans l'environnement, les choses ne sont pas plus simples : aucun article à ce jour ne

semble rapporter de mesures de concentration des NTC ! L'origine des NTC dans l'environnement est essentiellement double : émission des usines et des laboratoires de production d'une part, et dégradation en fin de vie des multiples structures et produits en contenant d'autre part. Les effluents des stations d'épuration en recèleraient quelques nanogrammes/litre, les eaux de surface jusqu'à quelques picogrammes/litre. Leur concentration atteindrait quelques microgrammes/kg de sédiment et quelques nanogrammes/kg de sol (la concentration en nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, largement utilisées dans l'industrie des cosmétiques et dans le génie civil et le bâtiment, serait mille fois supérieure). Les NTC sont peu mobiles et peu biodégradés dans l'environnement, mais leurs propriétés physico-chimiques et leur réactivité peuvent être modifiées par divers processus : agrégation, présence de tensioactifs ou assimilés (matière organique comme les acides humiques et fulviques du sol), pH, présence de sels ou d'argile..., tous phénomènes qui influent suffisamment sur leur capacité de dispersion dans les divers compartiments de l'environnement, et probablement sur leur dégradabilité biologique, photochimique, ou tout autre moyen de transformation.

Diverses souches bactériennes ont servi de modèles d'étude (en prenant soin, dans les expériences les plus récentes, de dissocier les éventuels effets toxiques dus aux agents dispersants souvent utilisés). Il semble bien que certaines souches soient très sensibles aux NTC alors que d'autres ne le sont pas du tout. Un effet mécanique spécifique aux nanotubes a été évoqué, le percement de la paroi cellulaire du micro-organisme entraînant sa mort. L'effet du stress oxydant, dans certains cas particuliers, pourrait être combattu par la sécrétion d'exopolysaccharides par la bactérie...

L'écotoxicité est souvent étudiée sur des organismes aquatiques – daphnie, poisson zébra, xénope et même truite – chez qui les NTC induiraient quelques troubles respiratoires. Par contre, sur les organismes plus simples, ils ne semblent pas provoquer de mortalité ni de génotoxicité larvaires, mais retarderaient leur développement. Quant à leur action sur les végétaux, elle peut se faire par dépôt de

particules en suspension dans l'air sur les feuilles ou par les racines dans un sol contaminé. Pour faire simple, tout dépend de la structure des NTC et de la plante, de son état végétatif, de son mode de germination...

### Risque incertain vs risque connu

Les risques liés aux NTC, et plus généralement aux nanotechnologies, qu'ils soient ou non professionnels (lieux de production, de mise en œuvre dans des produits finis comme certains cosmétiques, ou en tant que déchets en fin de vie), sont loin d'être clairement établis, et sont même loin d'être mesurables expérimentalement sur des systèmes modèles et par des études épidémiologiques étant donné le délai – de dix à cinquante ans – pour observer d'éventuels effets cancérogènes.

Alors que faire ? Appliquer aveuglément le « principe de précaution » et se priver des nombreux progrès que cette innovation peut nous apporter (des nanoparticules, non NTC, sont utilisées dans des tissus à propriétés antibactériennes, en thérapeutique, etc.) ?

Le cas de l'amiante pourrait-il faire jurisprudence, puisque « *le Conseil d'État a mis en cause pour la première fois la carence fautive des pouvoirs publics à l'égard des travailleurs, en raison du retard mis dans la réglementation d'un risque depuis longtemps identifié* » ? A priori non, car dans le cas des « nanos », il s'agit d'un risque qualifié d'incertain !

Le groupe Arkema a choisi d'appliquer les « principes de prévention » (article L.4121-2 du Code du travail) en mettant en œuvre des modes de production en milieu confiné et contrôlé, comme on le ferait en biologie, avec un suivi

médical spécifique et l'inscription des travailleurs concernés dans un registre spécial.

### Des produits chimiques comme les autres ?

Dans un document de travail de 2010, l'ECHA (Agence européenne des substances chimiques, Helsinki) considère que « les nanomatériaux peuvent être soit (a) des substances indépendantes (dites nouvelles-nouvelles), et donc déclarées comme telles, soit (b) des formes d'une substance (et sont alors des substances brutes parentales) ». Ces distinctions sont loin d'être formelles et conditionnent leur dépendance vis-à-vis des règlements REACH et de nombreuses contraintes d'ordres réglementaire et juridique. L'IUPAC ne s'y est pas trompée qui planche depuis 2008 sur la définition des « nanos » en chimie et a produit en 2009 un document « grand public » sur l'avenir et les problèmes soulevés par les nanotechnologies.

### Sources et références

- De l'innovation à l'utilisation des nanotechnologies. Le cadre normatif des nanotubes de carbone, S. Lacour, S. Desmoulin-Canselier, N. Hervé-Foumereau (coord.), Larcier, Bruxelles, 2012.
- [www.framingnano.eu/images/stories/FramingNanoMappingStudyFinal.pdf](http://www.framingnano.eu/images/stories/FramingNanoMappingStudyFinal.pdf)
- [www.observatorynano.eu/project/admin/createpdffromsector/id/9](http://www.observatorynano.eu/project/admin/createpdffromsector/id/9) (accès après enregistrement gratuit).
- [www.iupac.org/publications/ci/2009/3106/Nanotechnology\\_Smith0911.pdf](http://www.iupac.org/publications/ci/2009/3106/Nanotechnology_Smith0911.pdf)
- Académie des technologies, *Risques liés aux nanoparticules manufacturées*, 2012, Éd. Le Manuscrit ([www.manuscrit.com/Book.aspx?id=14516](http://www.manuscrit.com/Book.aspx?id=14516)).



## Institut de Chimie des Substances Naturelles

Créé en 1959, l'ICSN est un laboratoire propre du Centre National de la Recherche Scientifique, où 51 chercheurs, 67 ingénieurs et techniciens, 80 étudiants et post-doctorants assurent le développement des recherches portant sur la chimie des composés originaires des substances naturelles.

Situé au sein du Campus du CNRS à Gif-sur-Yvette, l'Institut dispose d'un des meilleurs parcs RMN et Spectrométrie de Masse d'Europe, d'un équipement de pointe pour le développement de méthodologies de synthèses et d'une unité pilote de purification et de fermentation.

Deux médicaments antitumoraux actuellement sur le marché international : la Navelbine® et le Taxotère® sont issus des recherches de l'Institut et développés respectivement par les Laboratoires Pierre Fabre et les Laboratoires Sanofi-Aventis.

Pour tout renseignement, dons, legs... contacter : Max MALACRIA, Directeur  
Institut des Substances Naturelles

CNRS

91198 Gif-sur-Yvette Cedex

Tél. : (33)1 69 82 30 89 - Fax : (33)1 69 07 77 52

E-mail : [max.malacria@icsn.cnrs-gif.fr](mailto:max.malacria@icsn.cnrs-gif.fr)



# Eastman-Kodak : chronique d'une « faillite annoncée »

Gilbert Schorsch



Les célèbres logos de Kodak.

L'annonce de la faillite possible d'Eastman-Kodak mérite mieux que les communiqués laconiques de la presse, car l'histoire de la société est riche de coïncidences et d'enseignements révélateurs.

Les portraits de George Eastman, fondateur de l'entreprise, et de Steve Sasson, inventeur de l'appareil à photos numériques, témoignent du passé prestigieux de la société. Cependant, à partir de 1950, les prémices des difficultés à venir s'esquissent. Victime de la formidable révolution des technologies de l'information et de la communication (TIC), l'entreprise se trouve pénalisée aussi par le manque de vision stratégique des successeurs de George Eastman. Au moment où Eastman-Kodak risque de disparaître, Eastman Chemical, son ancienne filiale chimique rachète Solutia, la branche chimique de Monsanto. Par cette opération, les deux sociétés, orphelines de sociétés prestigieuses, marquent leur ambition de se concentrer sur les films techniques utilisables en particulier pour le photovoltaïque. Un réconfort pour l'ancien leader mondial de l'industrie photographique, un espoir pour sa filiale chimique, répudiée en 1994 ? À suivre...

## Le passé d'Eastman-Kodak en deux portraits

*George Eastman, capitaine d'industrie intuitif : d'« Eastman Dry Plate » à « Tennessee-Eastman » en passant par « Eastman-Kodak »*

L'histoire d'Eastman-Kodak débute en 1881, lorsque George Eastman fonde avec W.A. Strong « The Eastman Dry Plate and Film Co. » pour fabriquer à Rochester, sur le lac Ontario, des **plaques photosensibles sèches**, à base de gélatine et de bromure d'argent déposés sur nitrocellulose.

George Eastman n'est pas l'inventeur de ce modèle de plaques, mais il espère en tirer avantage [1]. Contrairement aux **plaques humides** disponibles à l'époque, les plaques sèches ne nécessitent pas de développement immédiat. Elles permettent aux pionniers de la photographie de sortir de leurs studios les encombrantes « chambres noires » et de tourner ainsi leurs objectifs vers de nouveaux horizons. La demande en surfaces photosensibles augmentera obligatoirement, pense-t-il. Mais celle-ci ne se développera qu'à la suite de deux innovations technologiques décisives.

La première, en association avec W.H. Walker, est l'introduction en 1891 du **premier appareil à photos portable** – sous la marque Kodak, créée dès 1888 –, qui met la photographie à la portée de tous. Elle donne naissance à Eastman-Kodak en 1892. C'est le précurseur de l'appareil à soufflet en vogue entre les deux guerres mondiales.

La seconde est la **mise au point des pellicules souples**, qui permettent le déroulement puis l'enroulement des pellicules à l'abri de la lumière. Elles adaptent aussi la plaque à la



George Eastman (1854-1932).

miniaturisation de l'appareil. Au départ, elles sont à base de nitrocelluloses, mais compte tenu de leur risque d'inflammabilité, elles seront remplacées par du triacétate de cellulose [2].

Portables et rouleaux de pellicules marquent le démarrage de l'industrie photographique. Avec la fabrication de bobines de films naîtra le cinéma muet, c'est-à-dire le **passage du fixe au continu**.

Pour sécuriser l'**approvisionnement des matières premières** de son entreprise, George Eastman crée dès 1918 Tennessee-Eastman. L'État du Tennessee dispose en effet des ressources en eau et en cellulose pour fabriquer les supports de films et le papier pour leur tirage ultérieur. Tennessee-Eastman deviendra ultérieurement Eastman Chemical.



Publicité pour le premier appareil photo portable de Kodak, onomatopée imitant le clic-clac du déclencheur (1889).

Atteint d'une maladie incurable de la colonne vertébrale, George Eastman se suicide en 1932.

### Steve Sasson, inventeur génial de l'appareil photographique numérique

Jusqu'en 1975, à côté de la fabrication d'appareils, Eastman-Kodak concentrera son activité sur le développement – dans le double sens du terme – des films et sur le tirage sur papier des prises de vue.

Le champion du développement « différencié » connaît une première alerte : Polaroid le prend de vitesse avec le **développement instantané des pellicules** – les révélateurs sont introduits directement dans les couches photosensibles. La solution Polaroid ne sera que passagère. Seule une rupture technologique permettra le véritable développement instantané.

Par un heureux hasard, le directeur R & D d'Eastman-Kodak prend connaissance d'un **dispositif électronique** breveté par Boyle et Smith en 1968, sous la dénomination « CCD » (« charge coupled device »). En l'absence d'une description précise de son principe de fonctionnement, retenons qu'il **transforme directement l'énergie lumineuse en signal électrique**. Il téléphone aussitôt à Steve Sasson, jeune chercheur à peine arrivé au laboratoire de Rochester, et lui demande de voir si et comment ce nouveau dispositif peut intéresser leur société. Après quelques mois d'essais, Steve Sasson présente, fin 1975, le prototype du premier appareil photo numérique. L'inventeur a 25 ans. L'appareil pèse près de huit livres, avec une résolution de 0,01 mégapixel. Les brevets sont accordés en 1978.

Paradoxalement, c'est **Canon**, spécialiste japonais de l'optique de précision depuis 1933, qui lance en 1989 le premier appareil grand public. Quant à l'appareil tel que nous le connaissons actuellement, il est commercialisé en 1995 par **Casio**, fabricant japonais de calculatrices et d'ordinateurs. Pourquoi Eastman-Kodak n'a-t-il pas su négocier le virage du numérique ? Nous tentons de l'expliquer ci-après.

### La double cause de la situation actuelle d'Eastman-Kodak

De 1993, année du démarrage effectif des ventes des appareils photos numériques, à 2009, année de l'arrêt définitif de la fabrication par Eastman-Kodak des emblématiques rouleaux *Kodachrome*, la vente des pellicules argentiques chute à pic. Les effectifs de la société fondent de 132 600 à 24 000 personnes. La vente des appareils numériques d'Eastman-Kodak n'a pas réussi à prendre le relais de la baisse du chiffre d'affaires des pellicules. Le 19 janvier 2012, le fleuron de Wall Street des Trente Glorieuses se place sous la protection de la loi sur les faillites [3]. Dans la presse, l'annonce est brève, mais le verdict unanime : **le « raz de marée numérique » a englouti la pellicule argentique**.

### Eastman-Kodak, victime de la révolution des technologies de l'information et de la communication

Le son, phénomène vibratoire transformé en signal – mécanique puis optique par inscription du son sur la piste



© Kodak.

Steve Sasson avec le prototype du premier appareil photo numérique.

des films cinématographiques au fil des ans, et enfin magnétique à partir de 1948 – est facile à enregistrer et à diffuser. Avantage décisif du signal magnétique : il est réversible, c'est-à-dire effaçable. Le développement des « cassettes » pour magnétophones et magnétoscopes témoigne de l'intérêt pratique du signal magnétique.

Par comparaison, le développement puis la diffusion de la trace d'une réaction de réduction d'ions  $\text{Ag}^+$  en nanoparticules d'Ag sous l'action de la lumière s'avère nettement plus laborieuse. Il faut attendre l'arrivée des ordinateurs et les progrès de l'informatique pour que les facilités d'enregistrement et de diffusion de l'image rejoignent celles du son.

Cette mise à niveau se fait en deux étapes, très rapprochées d'ailleurs : – à partir de 1969, une diapositive peut être transformée en une suite de points, les pixels, à l'aide de capteurs électroniques implantés au cœur des scanners ;

### Eastman-Kodak à l'origine du succès planétaire de la photo couleur

Trois ans après la disparition de Georges Eastman et fort de ses technologies de fabrication et de développement des surfaces argentiques, Eastman-Kodak lance les fameuses pellicules couleur *Kodachrome*, en superposant trois émulsions sensibles aux trois couleurs primaires. L'image apparaît en positif sur le film, d'où le nom de diapositives donné aux images extraites de ces pellicules, visualisables directement sur table lumineuse ou projetables sur écran.



La pellicule *Kodachrome* est obtenue en superposant une émulsion sensible au bleu, un filtre jaune (laissant passer le rouge et le vert), une émulsion sensible au vert, et une émulsion sensible au rouge [a].

Les films *Kodachrome* ont détrôné les plaques *Autochrome* des frères Lumière. Leur développement ne pouvait être effectué que par un laboratoire Kodak car les coupleurs étaient incorporés primitivement aux bains de traitement.

C'est pourquoi Kodak a commercialisé, au début des années 1940, les pellicules *Ektachrome* que professionnels et amateurs pouvaient développer eux-mêmes car les coupleurs étaient incorporés dans les couches sensibles. Un nouvel effort de démocratisation de la photographie !

Bien sûr, Eastman-Kodak n'était pas le seul producteur de pellicules couleur. Dès 1936, un an après le *Kodachrome*, Agfa a commencé à produire ses pellicules *Agfa-Color* dont le principe avec coupleurs incorporés était très voisin de celui de l'*Ektachrome*.

Contrairement au *Kodachrome*, les pellicules *Kodacolor*, sorties en 1942, étaient des films négatifs.

*Kodachrome* aura été la pellicule la plus vendue au monde, et sa fabrication n'a cessé qu'en 2009, après 74 ans de succès !

D'après Valeur B., La photographie, *La couleur dans tous ses éclats*, Belin, Pour la Science, 2011, Chap. 8, p. 22-23.

[a] Delamoir J., Romer G., Les premières photographies en couleurs, *La couleur*, Pour la Science, Dossier avril 2000, p. 68-75.

– par introduction directe en 1975 de capteurs – ceux de Boyle et Smith comme nous l'avons plus haut – dans l'appareil photo, ce qui supprime la nécessité de développer la diapositive, et donc la pellicule argentique.

Une carte mémoire enregistre les photos ainsi numérisées. Celles-ci sont visibles sur écran ou imprimables instantanément, ou diffusées rapidement telles quelles. Elles peuvent aussi être retraitées avec un ordinateur et un logiciel de traitement approprié. Le traitement d'image rejoint le traitement de texte. Amateurs et professionnels disposent ainsi d'une grande liberté de création, allant de la simple correction de lumière ou de couleur à la composition d'images et au montage de films d'animation. Cette numérisation autorise simultanément un traitement numérique des données, plus précis et gage d'une meilleure définition des images.

La photo numérique, fille de la puissance de calcul des ordinateurs et de la haute définition expérimentée préalablement sur les écrans de télévision !

La photo numérique donne ainsi l'impression à l'utilisateur – mais non au payeur des infrastructures – d'une « dématérialisation » des supports traditionnels de la photo. L'image possède désormais la même « maniabilité » que le son. Ensemble, ils participent aux défis futurs des TIC, résumés par le PDG de HP France : « *Faire converger les technologies, les rendre flexibles pour gérer, sécuriser et distribuer l'information.* »

Déjà, l'image numérisée a permis l'intégration de la photo dans le téléphone portable. Elle semble même prendre le pas sur le son, à en juger par la publicité toute récente : « Un appareil photo nommé iPhone ».

Remarquons au passage que, paradoxalement, les TIC sont particulièrement muettes et ne délivrent pas d'informations techniques suffisamment synthétiques sur les principes de fonctionnement des composants essentiels du matériel audiovisuel.

### **Eastman-Kodak pénalisé aussi par le manque de vision stratégique des successeurs de George Eastman**

Rétroactivement, face aux batailles successives qui jalonnent la révolution des TIC (magnétique/optique pour l'enregistrement puis la lecture, disque/bande pour le support, câble/ondes pour la transmission...), le manque de réactivité des successeurs de George Eastman paraît suicidaire. Ils n'ont pas vu l'impasse dans laquelle les menait la divergence entre la miniaturisation des appareils et la croissance exponentielle des informations à stocker et à traiter. Ils n'ont pas flairé non plus l'anachronisme du temps de développement de la photographie argentique. Le multimédia et le photojournalisme requièrent l'image en temps réel.

Les successeurs de George Eastman ont voulu rester fidèles à la photo argentique. Deux situations les ont surpris en flagrant délit d'immobilisme. Commençons par la plus récente : **l'échec de la commercialisation de l'appareil numérique**. Sa cause profonde a été révélée dernièrement à Londres par Steve Sasson lui-même [4]. Le jeune retraité précisait qu'en 1975, les dirigeants de la société estimaient que l'appareil photo numérique ne toucherait jamais le grand public, car l'ordinateur portable, son complément indispensable, ne serait jamais accessible à ce public. Ils n'ont donc pas mis les moyens suffisants pour réussir la transition. Une erreur impardonnable pour l'inventeur de l'appareil photo portable : appareil photo numérique, ordinateur et imprimante à jet d'encre font à présent partie de la panoplie de chaque amateur de photo.

La deuxième date du début des années 1950, lorsque Chester Carlson invente la **xérographie**. Cette technologie permet la **reproduction** de documents et **d'images directement sur papier ordinaire**, à contre-pied de la photo.

Haloid, une petite société, se décide rapidement à exploiter cette invention. Elle conduira aux **photocopieurs actuels**, outils indispensables pour la reproduction d'images à un coût acceptable. Depuis 1996, Haloid s'appelle **Xerox**. La famille s'est effacée devant la technologie. Le dernier x de Xerox a été ajouté pour donner au nom un aspect similaire à Kodak. Haloid n'était autre qu'une petite société de produits photographiques vivant à Rochester, à l'ombre de Kodak ! Elle avait pris le risque d'explorer un créneau complémentaire de la photographie.

À présent, Xerox (CA 2011 : 23 Md\$) emploie 140 000 personnes partagées entre les technologies d'impression couleur et les services aux entreprises, qui constituent ses deux compétences de base, selon Ursula Burns, PDG depuis 2010.

Comme Xerox, **Hewlett Packard** (CA 2011 : 127 Md\$) mise à présent, selon son PDG Meg Whitman, sur la **fabrication d'imprimantes**, à côté de celle d'ordinateurs, pour faire face aux attaques des iPad d'Apple qui ont déjà fait baisser ses ventes d'ordinateurs.

Bref, Eastman-Kodak n'a pas su faire preuve de la même réactivité et de la même flexibilité que celles de ses grands confrères Xerox, HP ou Apple. Dans ce contexte, il s'est révélé un modèle exemplaire pour les milieux financiers, en quête de sociétés à bonne visibilité ; ces derniers n'ont eu aucune peine à **convaincre le groupe de se séparer dès 1994 d'Eastman Chemical**, depuis lors société indépendante.

Le photocopieur, pour les entreprises et les administrations, l'ordinateur et l'imprimante à jet d'encre, pour tous, ont pris le relais de la photo « traditionnelle » pour la communication d'images en couleurs. Après le papier carbone et les stencils, la pellicule argentique se trouve reléguée au Musée de l'histoire de l'évolution des technologies.

### **Perspectives d'avenir pour l'industrie chimique : réorientation et diversification**

La disparition de la photo argentique n'est pas sans incidence sur l'industrie chimique. À l'origine, l'industrie chimique était un partenaire indispensable pour l'industrie photographique. Sans produits chimiques utilisés pour la fabrication, le traitement des pellicules et le tirage des photos, pas de photos.

L'image de synthèse actuelle – mieux acceptée que le produit chimique de synthèse – a besoin toutefois d'être imprimée. La rénovation du monde des photocopieurs et des imprimantes appelle de nouvelles encres – meilleur marché, sans solvants, solides... La réorientation des encres est en cours : on imprimera moins mais mieux, gage d'une contribution salutaire des TIC au développement durable...

Avec le marché de la photo argentique qui se dérobe, l'industrie chimique doit aussi aller chercher de nouveaux marchés. Dans ce contexte, deux exemples actuels de diversification entrepris directement par des industriels de la photo argentique méritent d'être signalés.

#### **Fujifilm : de l'argentique à la cosmétique !**

Les panneaux publicitaires qui restent accrochés chez les professionnels de la photo, de moins en moins nombreux, sont révélateurs des différences de stratégie des industriels de la profession. Au suffisant « Kodak : ses produits », à présent



La crème *Astalift* commercialisée par la société Fujifilm ([beautystat.com](http://beautystat.com)).

hors course, s'oppose le conquérant « Fujifilm : ses films, ses appareils photo, ses caméscopes ».

Après s'être converti aux technologies médicales (scanners, mammographies...), Fujifilm transfère depuis 2007 son expérience de l'enduction de gélatine utilisée dans l'argentique vers celle de collagène formulé avec de l'astaxantine, un antioxydant naturel utilisable pour les soins anti-âge. La micronisation de ces films conduit à une poudre d'un bel ocre. Formulée en crème, cette poudre est distribuée en France depuis mars 2012 sous la marque *Astalift*. Un lissage de rides qui colore et illumine simultanément le visage. Un bel exemple de valorisation de la photo couleur pour la coloration des joues.

### La faillite d'Eastman-Kodak le photographe : un espoir pour Eastman Chemical le chimiste ?

Coïncidence et pied de nez aux analystes financiers, deux semaines après l'annonce de la faillite d'Eastman-Kodak, revoilà Eastman Chemical. La filiale bannière en 1995 se porte bien après son parcours indépendant.

Pour un montant de 4,7 Md\$, elle rachète Solutia, la branche chimique séparée de Monsanto en 1997 [5]. Les deux orphelines mettent en commun des activités complémentaires (voir *tableau*). En particulier, Solutia apportera ses films de poly-(butyrate de vinyle) – utilisés par exemple comme film de sécurité pour la confection des pare-brises – aux activités traditionnelles de films souples d'Eastman-Kodak (cellulosiques, polyesters, etc.). Un leader mondial des films techniques se constitue. Juste retour aux sources, Eastman Chemical compte précisément sur le développement du photovoltaïque pour développer une activité de films techniques. Il exposera désormais ses films techniques, avec leurs matières photoactives, à la pleine lumière pour recueillir de l'électricité, et pas seulement un signal électrique. De l'argentique au photovoltaïque, une évolution à suivre !

Au moment où Eastman-Kodak risque de disparaître, le nom du fondateur de la société perdure. Ce n'est que justice. Décidément, il n'est pas bon de mettre tous ses œufs dans le même panier !

### Une dernière coïncidence révélatrice

La **coïncidence**, fortuite, de l'annonce de la **faillite d'Eastman-Kodak** le 19 janvier dernier et de la **consécration**

à la cérémonie des Oscars du 26 février du film ***The Artist*** est **intéressante à analyser**. À titre d'information, notons que la cérémonie s'est déroulée au *Kodak Theater* à Los Angeles, que les organisateurs des Oscars, opportunistes et ingrats, proposent déjà de débaptiser en *Hollywood & Highland Center* !

Ce film décrit le passage du cinéma muet au cinéma parlant, entre 1927 et 1932. *The Artist* nous montre la différence de comportement à cette transition d'un couple d'acteurs. Les sociétés que nous venons de mentionner n'ont-elles pas manifesté aussi une différence de réaction aux nouvelles technologies ? George Valentin, la vedette du muet, ruinée, démoralisée et incapable de réagir, ne préfigure-t-elle pas la faillite d'Eastman-Kodak ? À l'inverse, l'enthousiasme de Peppy Miller, débutante décomplexée, à s'immerger dans le cinéma parlant n'annonce-t-il pas Apple et Hewlett-Packard dont l'iPad et l'Ultrabook™ révolutionnent à présent le secteur du multimédia ?

En tout cas, avec leurs dernières innovations, les entreprises de la Silicon Valley, prises de vitesse par l'industrie japonaise pour le développement de la photo numérique, ont repris les commandes et se replacent à nouveau au centre du dispositif d'innovation dans le domaine des TIC. C'est une visite au Xerox PARC de Palo Alto qui aurait inspiré à

#### Les cartes d'identité de Eastman Chemical et Solutia

	Eastman Chemical	Solutia
<b>Origine</b>	Séparation d'Eastman-Kodak en 1994	Séparation de Monsanto en 1997
<b>CA 2011 (Md\$)</b>	7,2	1,7
<b>Effectifs</b>	10 000	3 400
<b>Siège social (États-Unis)</b>	Kingsport (Tennessee)	Saint-Louis (Missouri)
<b>Unités opérationnelles mondiales</b>	Coatings, adhesives, chemical specialties and inks Fibers (PET...) Performance chemicals (explosives...) and intermediates Special plastics	Advanced interlayers (PV butyrates, EVA, TPU for solar modules encapsulants...) Performance films (safety, energy efficiency, electronics...) Technical specialties (heat transfer and hydraulic fluids)
<b>Sites de production mondiaux</b>	16	15



La société Eastman Chemical à Kingsport, Tennessee (E.-U.), prête à prendre à nouveau le relais d'Eastman-Kodak.

Steve Jobs la conception de sa tablette tactile ! La forme de cette dernière n'est d'ailleurs pas sans rappeler celle de la plaque de verre utilisée par Niepce au début de l'histoire de la photographie. La boucle est bouclée. Mais sur le fond, que de fonctions intégrées dans ce « bijou technologique ». Quel chemin parcouru depuis !

### Notes et références

- [1] La date officielle retenue pour l'invention de la photographie remonte à 1839, date de la présentation par Arago à l'Académie des sciences de l'« invention » de Daguerre, le daguerréotype, elle-même amélioration de l'invention initiale de Niepce en 1826 basée sur le durcissement, sous l'effet de la lumière, d'une résine naturelle déposée sur plaque de verre.
- [2] Michel J.-M., Pellicules-Photographie-Cinématographie, *Contribution à l'histoire industrielle des polymères en France*, Société Chimique de France, 2011 ([www.societechimiquedefrance.fr/IMG/pdf/a\\_1\\_351\\_000.vfx2\\_sav.pdf](http://www.societechimiquedefrance.fr/IMG/pdf/a_1_351_000.vfx2_sav.pdf)).
- [3] Ce régime, le fameux « chapter 11 », permet à la société de se restructurer à l'abri de ses créanciers – des conditions similaires à celles de la procédure de sauvegarde en France. Une sortie de ce régime est possible : General Motors l'a fait récemment après sa crise en 2009.

- [4] Cérémonie de remise du Prix de l'Innovation 2009 pour un produit de la grande consommation, attribué à Steve Sasson, à Londres en novembre 2009, année de l'arrêt de la production des *Kodachromes*... Juste récompense pour l'inventeur, amère consolation pour l'entreprise qui l'employait !
- [5] *C & EN*, 6 fév. 2012, p. 5.



#### Gilbert Schorsch

est chargé de la rubrique « Industrie » de *L'Actualité Chimique*\*.

\* 28 rue Saint-Dominique, F-75007 Paris.  
Courriel : [cgschorsch@aol.com](mailto:cgschorsch@aol.com)



### Institut de Chimie Moléculaire de Reims UMR CNRS 7312



Campus Moulin de la Housse – Faculté des Sciences



Campus Santé – Faculté de Pharmacie

Avec un effectif de plus de 110 titulaires et contractuels, l'ICMR développe son activité autour de 5 axes de recherche :

- Méthodologie en synthèse organique
- Biomolécules: synthèse et mécanismes d'action
- Chimie de coordination
- Isolement et structure
- Polymères fonctionnels et réseaux

La plate-forme d'analyse et de transformation (PIANET) mise en œuvre par l'ICMR apporte un appui aux projets des laboratoires du site rémois ainsi qu'aux partenaires scientifiques externes et aux entreprises, pour la caractérisation structurale des composés moléculaires (produits de synthèse, substances naturelles) et l'analyse chimique quantitative.

Les travaux réalisés dans ses domaines d'expertise débouchent sur de nombreux partenariats de l'ICMR avec le secteur industriel (ARD, Astrium-ST, BASF Beauty Care, Guerbet, Lonza, LVMH, Michelin, Pierre Fabre, Soliance...).

Les domaines de recherche de l'ICMR s'inscrivent dans la stratégie des pôles de compétitivité IAR et Matériaux, dans les thématiques des structures fédératives CAP-santé et Condorcet (agro-sciences et environnement) et dans des réseaux et groupes thématiques du CNRS (GDR BioMatPro, Chimiothèque Nationale).

L'ICMR est laboratoire support pour les formations Master de l'Université de Reims Champagne Ardenne dans les domaines de la chimie, la pharmacie, les nanosciences, la qualité et l'environnement et les agro-sciences.

L'ICMR recrute chaque année une quinzaine de doctorants et chercheurs contractuels.

Les offres correspondantes peuvent être consultées sur le site Internet : [www.univ-reims.fr/icmr](http://www.univ-reims.fr/icmr)



# Louis Troost (1825-1911)

## La chimie inorganique au tournant du XX<sup>e</sup> siècle

Josette Fournier

La grande salle de réunion au siège de la Société Chimique de France est ornée d'un grand tableau figurant Henri Sainte-Claire Deville entouré de ses collaborateurs. Parmi eux se trouve Louis Troost, chimiste français réputé dont 2011 marquait le centenaire de la disparition.



Louis Joseph Troost est né à Paris le 17 octobre 1825. Son père, Félix Joseph Troost, était fileur de cachemire à la Porte Saint-Martin. Sa mère était née Lucie Dewaly. Le 12 janvier 1859, il épouse Thérèse Verdot, de quinze ans sa cadette mais qui décèdera avant lui. Elle est la fille d'un ancien professeur du lycée Charlemagne, normalien, directeur d'une institution privée que Troost a fréquentée et qui sert d'internat pour les élèves des classes préparatoires du lycée. Le

couple a eu deux filles : Madeleine et Blanche. Madeleine, née le 15 novembre 1859, épousera Frédéric Parmentier (1852-1904), également normalien, devenu professeur de chimie à la Faculté de Clermont-Ferrand ; elle décède en 1895. Blanche épouse Édouard Péchard, professeur de chimie à la Faculté des sciences de Paris ; elle aussi disparaît avant son père en 1905. Cette famille de chimistes universitaires, très homogène, porte un grand intérêt aux programmes et méthodes d'enseignement. Troost, décédé le 30 septembre 1911, est inhumé au cimetière Montparnasse.

### L'itinéraire professionnel

Après des études secondaires au lycée Charlemagne, Troost, bachelier ès lettres (1846) et ès sciences (1847) entre à l'École normale supérieure (ENS) en 1848. En 1850, il est licencié en mathématiques (avril) et en sciences physiques (août). Il se classe second à l'agrégation de sciences physiques en 1851. Il est affecté au lycée d'Angoulême, chargé de l'enseignement de physique et chimie en mathématiques supérieures, où il se heurte immédiatement au proviseur qui veut lui imposer de compléter son service par deux heures de physique en enseignement spécial. Il est aussi chargé des collections d'histoire naturelle. Il s'intègre mal dans la vie locale ; on le trouve « froid » et peu sociable. Finalement, il obtient un congé en septembre 1855 pour achever des recherches de chimie dans le laboratoire de l'ENS.

À la rentrée suivante, il est nommé professeur adjoint suppléant de physique au lycée Bonaparte, par moitié avec un autre enseignant. L'administration lui reproche de donner trop

de temps à ses travaux de thèse. Il est néanmoins renouvelé dans cette affectation jusqu'en 1859, où il devient professeur divisionnaire, et décembre 1860, où il est nommé professeur titulaire. Le 17 juin 1857, devant un jury présidé par Dumas, il soutient sa thèse intitulée « Recherches sur le lithium et ses composés », préparée sous la direction d'Henri Sainte-Claire Deville. En 1865-1866, il doit affronter une contestation des élèves de « spéciales » suscitée, semble-t-il, par des enseignants de cours particuliers extérieurs au lycée.

En 1868, il est nommé maître de conférences de chimie à l'ENS ; il remplace Sainte-Claire Deville pour une conférence hebdomadaire devant les élèves de 1<sup>ère</sup> année. Au laboratoire de l'ENS, il fréquente Debray, Isambert, Hautefeuille et Ditte. De 1868 à 1870 et en 1872-1873, il remplace Pasteur chaque second semestre à la Faculté des sciences de Paris. En 1874, il est chargé des manipulations de chimie à l'ENS. Le 31 décembre 1874, il est nommé professeur à la chaire de chimie 2 (chimie minérale) de la Faculté des sciences. L'intitulé de sa chaire est modifié en chimie générale en 1881. Nommé professeur honoraire le 10 avril 1900, il cesse ses activités le 1<sup>er</sup> novembre, cédant sa chaire à Henri Moissan.

Louis Troost a exercé de nombreuses fonctions annexes : il a été vice-président du Comité consultatif des arts et manufactures (1900) ; il a succédé à Sainte-Claire Deville comme administrateur, puis président de la Compagnie parisienne du Gaz et des Eaux ; avec Eugène Péligot, Lamy, l'ingénieur Piarron de Montdésir et Félix LeBlanc, il a fait partie de la commission préfectorale de la Seine sur la production d'oxygène et son emploi pour l'éclairage ; il a été membre du jury des expositions universelles de 1878 et 1889 ; lors de l'exposition de 1900, il est président des comités d'admission, d'installation et du jury des récompenses de la classe 87, vice-président du groupe XIV et membre du jury supérieur ; il a été membre du Comité des travaux historiques et scientifiques ; enfin, jusqu'à sa mort, il est membre du Conseil d'hygiène et de salubrité publique du département de la Seine, où il a remplacé le pharmacien Louis René Le Canu (1800-1871) le 21 février 1871.

Troost était décoré de la Légion d'honneur (chevalier en 1865, officier en 1886, commandeur en 1897) et officier de l'Instruction publique (1864).

Le 7 juillet 1884, il était élu à l'Académie des sciences au fauteuil de Wurtz ; il en fut vice-président (1904) et président (1905).

Avec le chimiste métallurgiste Caron et Louis Grandeau, Troost avait été présenté le 28 décembre 1858 pour devenir membre de la Société chimique de Paris, séance au cours de laquelle furent évincés les premiers fondateurs étrangers de la Société au bénéfice des « jeunes maîtres » de la chimie française.

## L'homme et l'enseignant

On le décrit comme un homme de devoir, sympathique et bienveillant, ferme avec ses élèves qui, au lycée Bonaparte, sont très nombreux (130 en 1856-57). Il avait acquis avec le temps une facilité d'expression et même un « *charme remarquable* ». Sa culture scientifique était étendue et solide. Les proviseurs des lycées dans lesquels il a exercé lui ont reproché d'avoir une vie sociale limitée : « *Sa vie se partage entre les soins de sa classe et ses recherches scientifiques.* » On lui reconnaît méthode, clarté et habileté d'exposition, exactitude, distinction, et on loue les succès de ses élèves aux concours. « *Le ton qu'il prend est plutôt celui de la conversation que de la leçon publique.* » La ténacité qu'il apporte dans la gestion de sa carrière, son arrivée rapide à Paris et un début de notoriété scientifique lui suscitent quelque jalousie. « *Quoique spécialement chimiste* », il réussit dans l'enseignement de la physique.

Il est l'auteur d'un *Traité élémentaire de chimie* (1861) et d'un *Précis de chimie*. Il n'introduit la notation atomique que dans la 11<sup>e</sup> édition du *Traité* (1895) ; la 15<sup>e</sup> édition (1910) paraît sous son nom et celui de son gendre Péchard. Des éditions de ce *Traité* se sont succédées jusqu'après la Seconde Guerre mondiale (1948, 24<sup>e</sup> édition refondue par G. Champetier).

Troost parlait et écrivait l'allemand ; avec Louis Grandeau, il a traduit le *Traité pratique d'analyse chimique, par Vöhler* (1865).

## Les travaux scientifiques

Ils se rapportent essentiellement à la production et à l'utilisation de hautes températures pour l'étude d'équilibres gazeux en chimie inorganique, et à l'étude d'éléments métalliques rares.

Troost les classe lui-même en cinq champs de recherche : chimie générale, chimie minérale, métallurgie, chimie organique et physique. Pour une meilleure lisibilité, nous donnons les formules actuelles des corps composés.

Dans le premier, on trouve : 1) ses mesures de densités de vapeur pour déterminer l'équivalent du soufre, du phosphore et de l'arsenic, du sélénium et du tellure ; 2) ses recherches sur la méthode de diffusion ; 3) ses travaux sur les densités « anormales » – hydrate de chloral [CCl<sub>3</sub>CH(OH)<sub>2</sub>], acide hypoazotique (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), acide acétique (CH<sub>3</sub>COOH), soufre ; 4) ses recherches sur les équilibres de dissociation des sous-chlorures de silicium (composés ou mélanges contenant moins de chlore que le chlorure normal SiCl<sub>4</sub>), du protochlorure de platine (PtCl<sub>2</sub>), de l'ozone (O<sub>3</sub>) et de l'oxyde d'argent ; pour ces substances, Troost met en évidence l'existence d'une température à laquelle la dissociation est maximale et au-delà de laquelle il y a recombinaison ; 5) ses recherches sur les transformations allotropiques du cyanogène [(CN)<sub>2</sub>], de l'acide cyanique (HOCN) et du phosphore.

Dans le champ de la chimie inorganique, on trouve ses recherches sur : 1) les alliages métalliques d'hydrogène (composés définis d'hydrogène avec les alcalins et le palladium) ;



Le chimiste Henri Sainte-Claire Deville : leçon sur l'aluminium (1890) de Léon Augustin Lhermitte (1844-1925). Louis Troost se tient juste à la gauche de Sainte-Claire Deville, la main posée sur la joue.

2) le phosphore rouge cristallisé et la transformation isomérique de l'acide arsénieux (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ; 3) le silicium ; 4) les spectres du carbone, du bore, du silicium, du titane et du zirconium ; 5) le lithium ; 6) le zirconium ; 7) le niobium et le tantale ; 8) le fer ; 9) le manganèse ; 10) la perméabilité du platine à haute température ; 11) la blende hexagonale qu'il a découverte.

Dans le champ de la métallurgie, Troost a produit des travaux sur : 1) l'enrichissement des fontes et aciers en silicium ; 2) de nouvelles propriétés des fontes siliceuses ; 3) des fontes phosphorées ; 4) des fontes manganésifères ; 5) le rôle du silicium et du manganèse dans la métallurgie du fer grâce à des études calorimétriques de carbures, siliciures, sulfures et phosphures, et borures de fer et manganèse.

En chimie organique, il s'est intéressé aux propriétés du paracyanogène [(CN)<sub>x</sub>] et de l'acide cyanique (HOCN), à leurs chaleurs de transformation et de combustion, à l'action de l'ammoniac sur les éthers dérivés des oxychlorures de silicium et aux effets calorifiques qui accompagnent la transformation de l'acide hypoazotique (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) en acide azotique (NO) et l'introduction de ces deux corps dans les composés organiques.

En physique, les recherches de Troost portent sur le coefficient de dilatation de la porcelaine entre 1 000 et 1 500 degrés.

La loi de Gay-Lussac établissait que la densité des corps gazeux pris sous le même volume est proportionnelle à leur poids équivalent. Dumas, suivi par tous les chimistes, l'avait utilisée pour déterminer ou vérifier les équivalents estimés par d'autres méthodes, définis pour 4 ou 8 volumes de vapeur (en prenant comme unité le volume occupé par 8 g d'oxygène). Cependant, des anomalies qui ont dû attendre Auguste Cahours pour recevoir une interprétation, l'avaient détourné de la théorie atomique. La mesure de la densité de vapeur de chlorures métalliques (Al, Si, Zr) exige des températures supérieures à celles du soufre ou du mercure en ébullition. Troost franchit cet obstacle en utilisant des ballons de porcelaine munis d'un dispositif ingénieux de fermeture ; il obtint des températures élevées et constantes en opérant dans la vapeur de métaux (Cd à 860 °C, Zn à 1 040 °C) bouillant à

### Principales références

Parmi ses nombreuses publications, on peut citer :

- Recherches sur le lithium : *CRAS*, **1856**, XLIII, p. 921.
- Mémoire sur les densités de vapeur à des températures très élevées, avec Sainte-Claire Deville : *CRAS*, **1859**, XLIX, p. 239 et *Ann. Chim. Phys.*, 3<sup>e</sup> série, **1860**, LVIII, p. 257.
- Détermination de l'équivalent du lithium : *CRAS*, **1862**, LIV, p. 766.
- Détermination du point d'ébullition des liquides bouillant à haute température, avec Sainte-Claire Deville : *CRAS*, **1864**, LVII, p. 879.
- Reproduction de la blende hexagonale et de la greenockite, avec Sainte-Claire Deville : *Ann. Chim. Phys.*, 4<sup>e</sup> série, **1865**, V, p. 118.
- Recherches critiques sur la constitution des composés du niobium, avec Sainte-Claire Deville : *CRAS*, **1865**, LX, p. 1221.
- Recherches sur le zirconium : *CRAS*, **1865**, LXI, p. 109.
- Sur le coefficient de dilatation et la densité de vapeur de l'acide hypoazotique, avec Sainte-Claire Deville : *CRAS*, **1867**, LXIV, p. 238.
- Expériences sur la perméabilité de la fonte pour les gaz de la combustion, avec Sainte-Claire Deville : *CRAS*, **1868**, LXVI, p. 83.
- Recherches sur la paracyanogène, 1<sup>er</sup> Mémoire, et Loi de la transformation du paracyanogène en cyanogène et de la transformation inverse, 2<sup>e</sup> Mémoire, avec Hautefeuille : *CRAS*, **1868**, LXVI, p. 735 et p. 795.
- Chaleur de combinaison du bore avec le chlore et avec l'oxygène, et Chaleur de combinaison du silicium avec le chlore et avec l'oxygène, avec Hautefeuille : *CRAS*, **1870**, LXX, p. 185 et p. 252.
- Recherches sur les transformations allotropiques du phosphore, 1<sup>er</sup> Mémoire et 2<sup>e</sup> Mémoire, avec Hautefeuille : *CRAS*, **1873**, LXXVI, p. 76 et p. 219.
- Sur le palladium hydrogéné, avec Hautefeuille : *Ann. Chim. Phys.*, 5<sup>e</sup> série, **1874**, II, p. 279.
- Recherches sur les fontes manganésifères, avec Hautefeuille : *CRAS*, **1875**, LXXX, p. 909.
- Sur la vapeur de l'hydrate de chloral : *CRAS*, **1877**, LXXXV, p. 32 et p. 400.
- Plusieurs mémoires de Troost sont réédités dans les *Classiques de la science*, par H. Le Chatelier : *III Eau oxygénée et ozone*, A. Colin, Paris, **1913** et *VI Fusion du platine et dissociation*, A. Colin, Paris, **1914**.

température fixe dans des vases distillatoires en fer. Il mesure la température en étalonnant ses vases avec de la vapeur d'iode. Reprenant une interprétation de Cahours au sujet des anomalies de densité de vapeur de l'acide acétique, il montre que le soufre est polyatomique jusque vers 860°. Une astuce

expérimentale lui permet de déterminer la densité de vapeur du sélénium et du tellure à 1 400° et de prouver que les halogénures d'ammonium obéissent à la loi de Gay-Lussac, laquelle « s'applique d'une manière tout à fait générale. »

L'existence d'équilibres de dissociation s'opposant à la dissociation complète de certaines substances était un autre obstacle que Troost sut dépasser en critiquant la méthode de diffusion de Playfair et Wanklyn dont il démontre l'insuffisance par des expériences variées effectuées avec Paul Hautefeuille (1836-1902) qui fut son principal collaborateur. Le « *point capital* » pour faire cesser les anomalies, dit-il, est de se placer « *dans des conditions où les vapeurs obéissent à la loi de Mariotte.* »

Pour ses études sur le lithium, Troost réussit à préparer d'assez grandes quantités de lithine pour étudier le métal et ses composés ; il montre l'analogie du lithium avec le manganèse, et détermine son équivalent, confirmé par Stas. Avec Sainte-Claire Deville, il obtient les bromure et iodure d'aluminium, jusqu'à lui inconnus. Il réussit à préparer le zirconium cristallisé et établit la formule de la zircone (ZrO<sub>2</sub>), dont la bijouterie fait aujourd'hui grand usage comme substitut du diamant. Il révisé les formules des chlorures et oxychlorures du niobium et du tantale (NbCl<sub>5</sub>, NbOCl<sub>3</sub> et TaCl<sub>5</sub>).

À cause de ses études métallurgiques, communes avec Hautefeuille, Troost est considéré par Le Chatelier comme l'un des « *véritables initiateurs de la métallurgie scientifique.* »

Avec Paul Hautefeuille, dont les travaux sont inséparables des siens, Louis Troost illustre l'école d'Henri Sainte-Claire Deville, dont il a été le fidèle continuateur.

### Sources

AN LH 2633/28 ; AN AJ16/1552 ; AN F17/21812 ; AN F17/3229 ; AJ16/235/2 ; Archives départementales de la Seine ; annuaire ENS, 1912 ; Archives de l'Académie des sciences.



**Josette Fournier\***  
est professeur hors cadre des universités.

\* 21 parc Germalain, F-49080 Bouchemaine.  
Courriel : Josette.Fournier3@wanadoo.fr

# La RMN : un outil toujours en évolution au service de tous les aspects de la chimie

Depuis son introduction en 1945, la résonance magnétique nucléaire s'est de toute évidence rendue largement utile à de nombreux domaines de la science et de la technologie, mais elle a en particulier toujours été au cœur de la chimie. Elle se réinvente sans arrêt ; l'introduction de méthodologies nouvelles permet d'obtenir des informations qui étaient simplement inaccessibles auparavant, comme la structure des sites actifs de surfaces. En parallèle, la RMN renforce son rôle dans ses domaines de prédilection classiques, tels que la chimie organique et biostructurale, tout cela sans oublier un regain d'intérêt pour les applications analytiques.

Ce numéro de *L'Actualité Chimique* est consacré à un aperçu, certes incomplet, de l'état des recherches en RMN en France, qui démontre la vitalité d'une communauté scientifique naturellement ouverte aux collaborations et aux interactions avec les autres domaines de la chimie.

Un point structurant de cette communauté a été la mise en place d'un réseau fédératif de laboratoires à hauts champs, ouvert pour un accès libre, qui héberge les champs magnétiques commercialement disponibles les plus élevés. Les percées scientifiques récentes au sein de ce réseau et au-delà illustrent le renouvellement perpétuel de la RMN et sont abordées dans l'article ouvrant ce numéro (A. Zagdoun et L. Emsley).

Un premier ensemble d'articles décrit les aspects de la **RMN moléculaire** qui sont à la base de la caractérisation chimique : élucidation de structure, caractérisation de la dynamique et corrélations entre structure et activité. Ce chapitre s'ouvre par un aperçu de la façon dont la chimie organique a pu profiter des avancées spécifiquement conçues pour aborder les problématiques les plus complexes (J. Courtieu *et coll.*). Le rôle fondamental de la RMN dans le processus de découverte de médicaments est ensuite mis en évidence (S. Sablé *et coll.*). Ce chapitre est complété par deux contributions montrant l'apport de la RMN à la description des biomacromolécules, permis par sa capacité à décrire structure et dynamique en solution, deux paramètres difficilement accessibles par d'autres moyens (Y. Nominé et B. Kieffer ; L. Salmon et M. Blackledge).

Le **potentiel analytique** de la RMN est connu depuis longtemps, mais au cours de ces dix dernières années, on a pu assister à un essor incomparable des applications aux mélanges de molécules de faible taille, notamment grâce aux développements simultanés de méthodes statistiques adaptées. Deux exemples de cette démarche sont abordés dans ce chapitre ; ils traitent notamment des applications

dans les domaines de la métabolomique (B. Elena-Herrmann *et coll.*) et agroalimentaire (S. Caldarelli).

La **RMN des solides** est sans doute le domaine qui a vécu les développements méthodologiques les plus spectaculaires ces vingt dernières années. Cela l'a fait passer d'une technique pour initiés à une méthode répandue et capable de fournir des éléments de structure pour les matériaux divisés comme cristallins, qu'il s'agisse de caractériser leurs composantes massives, leurs surfaces ou tout simplement leurs sites actifs. Les trois articles de ce chapitre abordent la description structurale de matériaux inorganiques et hybrides (F. Babonneau *et coll.*), la caractérisation de sites actifs de catalyseurs hétérogènes (C. Copéret *et coll.*) et la possibilité de déterminer directement par RMN la structure de molécules de faible taille sous forme de poudre (J.-N. Dumez).

Les méthodes RMN dédiées à l'étude de la **dynamique globale des molécules** ont un fort potentiel descriptif. Le premier article de ce chapitre illustre la façon dont la RMN peut être utilisée pour décrire les différents constituants chimiques d'un objet complexe, grâce aux variations de mobilité soit des molécules, soit de portions de l'échantillon (D. Canet et P. Palmas). Le second article montre comment, dans un matériau hétérogène, les variations spatiales de la dynamique moléculaire peuvent être analysées, une application qui illustre la portée de l'IRM au-delà des hôpitaux (F. Mariette *et coll.*).

Les percées scientifiques sont souvent associées à des **avancées techniques et instrumentales**. C'est certainement le cas du croisement de la RMN avec sa technique cousine, la RPE. Leur mariage a permis l'un des développements récents qui offre le plus de perspectives, la polarisation dynamique nucléaire, méthode parmi les plus prometteuses pour pallier à la faible sensibilité intrinsèque de la RMN (G. De Paëpe et S. Gambarelli). L'article concluant ce chapitre décrit des efforts de miniaturisation et de portabilité, défi moderne qui constitue un enjeu important et qui permettra à la RMN de franchir les portes du laboratoire (D. Sakellariou).

En conclusion, bien qu'inévitablement restreint par des limites de temps et d'espace, nous espérons que le panorama proposé dans ce numéro illustrera les horizons en expansion et l'enthousiasme qui caractérise le monde de la RMN française.

**Lyndon Emsley, Stefano Caldarelli  
et Jean-Nicolas Dumez,  
coordinateurs du numéro**

# La RMN à haut champ

## Soixante ans à révolutionner la science

Alexandre Zagdoun et Lyndon Emsley

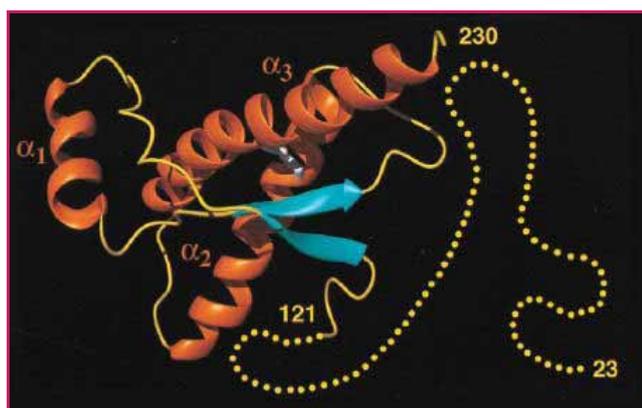


### Une brève histoire de la RMN

Depuis sa découverte en 1945, la RMN a connu d'incroyables développements technologiques, motivés par la diversité de ses applications (qui vont de la physique à la médecine). Elle est par exemple l'unique méthode capable de déterminer la structure de protéines en solution. Cet exemple illustre bien son incroyable potentiel. Ses applications ne sont cependant pas limitées à la biologie, puisque cette technique est aussi bien appliquée à la chimie des matériaux (zéolites, polymères, cristaux liquides) qu'à la recherche en cosmétique. Elle est aussi utilisée de manière standard comme outil de diagnostic médical, et trouve même des applications dans la recherche de nouvelles sources de pétrole.

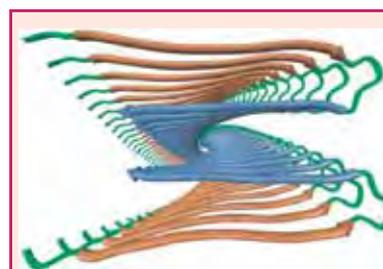
De fait, les applications potentielles de la RMN ne sont limitées que par le coût du développement de la technologie capable de produire de très hauts champs magnétiques, et par l'imagination des chercheurs.

En effet, la RMN permet de sonder la structure et la dynamique des molécules en utilisant des transitions de spins nucléaires. En l'absence de champ magnétique, ces transitions sont dégénérées (de même énergie). Elles acquièrent une énergie différente en présence d'un champ magnétique (effet Zeeman). Le signal RMN est proportionnel à la différence d'énergie entre ces niveaux, qui est habituellement très faible (dans la gamme des radiofréquences). L'intensité – et la résolution – du signal augmentent donc avec le champ magnétique, motivant ainsi la recherche de champs toujours plus élevés.



Détermination de la structure tridimensionnelle de protéines [a].

Se basant sur la découverte que l'aimantation de certains noyaux pouvait être transférée à d'autres noyaux à travers l'espace (effet Overhauser nucléaire) et d'une relation entre les angles diédraux et les constantes de couplage, Kurt Wüthrich, prix Nobel de chimie 2002, et son groupe ont déterminé la structure 3D d'une protéine en solution pour la première fois en 1986. En 2000, il fut le premier à déterminer la structure de la protéine du prion humain.

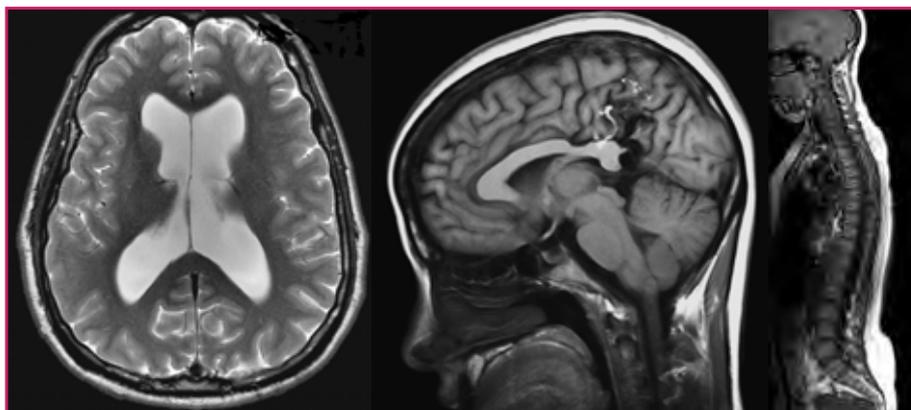


Structure des protéines insolubles impliquées dans la maladie d'Alzheimer déterminée par RMN MAS [b].

Dans les années 1960, les travaux d'Andrew, Waugh, Pines, Stejskal et Shaeffer ont permis d'augmenter la résolution des échantillons solides en introduisant la technique de rotation à l'angle magique (MAS). Griffin (MIT) utilise cette technique depuis 1994 pour étudier le mécanisme d'action de diverses protéines membranaires, comme la rhodopsine et bactériorhodopsine, impliquées dans le mécanisme de la vision. En 2002, Tycko (NIH) utilise la RMN MAS pour fournir la première structure des plaques de protéines amyloïdes, responsables de la maladie d'Alzheimer. Enfin en 2006, Bladus (Göttingen) fournit les premières structures de protéines membranaires dans leurs environnements natifs obtenus par RMN à haut champ.

Au fil des ans, elle est passée du stade de simple curiosité illustrant la théorie – alors nouvelle – de la mécanique quantique à celui d'une technique incontournable pour la caractérisation d'un grand nombre de matériaux.

La RMN est aujourd'hui un outil essentiel pour la caractérisation à l'échelle atomique ou moléculaire d'un vaste



L'imagerie par résonance magnétique (IRM) : un outil de diagnostic clinique [c].

En 1973, Paul Lauterbur utilise un spectromètre RMN haute résolution pour fournir la première IRM : deux tubes à essais remplis d'eau. En l'espace de dix ans, cette démonstration a évolué pour devenir l'outil de choix pour le diagnostic de nombreuses maladies, en particulier de cancers. En 2003, Lauterbur et Mansfield reçoivent le prix Nobel de médecine.

nombre de systèmes : surfaces métalliques, catalyseurs, polymères, supraconducteurs, verres, cristaux liquides, intermédiaires de synthèse, assemblages supramoléculaires, produits naturels, médicaments, membranes et protéines, pour ne citer qu'eux. Elle est au centre des techniques d'analyse standards et a révolutionné notre approche de la chimie, que ce soit au niveau de la synthèse ou de l'étude de la dynamique moléculaire.

Ces progrès phénoménaux peuvent être attribués à deux principaux facteurs. Tout d'abord, l'augmentation du champ magnétique des aimants RMN – qui est passé des électroaimants générant un champ de 0,9 T (correspondant à une fréquence de résonance de 40 MHz pour les protons) à des aimants supraconducteurs créant un champ de 1 GHz aujourd'hui – a permis l'analyse de systèmes de plus en plus complexes et a contribué à l'élargissement du domaine d'application de la RMN. Un autre facteur de ce développement fulgurant concerne les progrès faits au niveau des expériences de RMN par des groupes de recherche. À ce titre, on peut citer deux innovations majeures qui sont intrinsèquement liées. Dans les années 1970, Richard Ernst (Zürich) – prix Nobel de chimie en 1991 – introduisit la RMN par transformée de Fourier. En réalisant l'acquisition du signal dans le domaine temporel, puis en faisant la transformée de Fourier de ce signal au lieu du conventionnel balayage en fréquence, la sensibilité de l'expérience fut augmentée d'un facteur 100. Ce pas de géant pour la RMN en amena un autre : en 1971, lors d'une école d'été en Pologne, Jean Jeneer proposa une méthode qui pourrait conduire à l'acquisition de spectres de corrélation bidimensionnels en tirant parti de la transformée de Fourier. Ernst fit la démonstration expérimentale de cette proposition en 1975 et montra qu'il était possible d'établir des connectivités entre les atomes des molécules. En quelques années, des dizaines de séquences RMN sont nées, capables de sonder les connectivités à travers les liaisons (COSY), à travers l'espace (NOESY), par échange chimique (EXSY), ou encore entre hétéroatomes (HSQC). Ceci fut la démonstration que la RMN ne se limitait pas à une méthode pour obtenir les déplacements chimiques des protons d'une molécule, mais qu'elle pouvait s'adapter à une grande diversité de problèmes, allant de la structure tridimensionnelle d'une protéine à la mesure de coefficients de diffusion. La RMN multidimensionnelle, en combinaison avec la capacité que l'on a à manipuler l'hamiltonien apparent de RMN par des impulsions

radiofréquence (notion introduite entre autres par Andrew, Waugh et Freeman) permet de créer des expériences RMN qui s'adaptent aux propriétés que l'on veut extraire, de l'affinité d'une enzyme pour un substrat à la dynamique moléculaire d'un catalyseur sur une surface.

L'un des aspects les plus excitants de la RMN est que, bien que l'on soit absolument certain que de plus hauts champs vont ouvrir de nouvelles applications (comme cela a toujours été le cas dans le passé), il est impossible de savoir à l'avance dans quel domaine cette révolution aura le plus d'impact.



Repousser les frontières de la physique : des supraconducteurs aux ordinateurs quantiques [d].

En 1945, Bloch et Purcell, prix Nobel de physique 1952, ont démontré expérimentalement le phénomène de RMN, validant ainsi la théorie émergente de la mécanique quantique. L'application majeure envisagée à l'époque était la calibration de champs magnétiques. Ceci leur valut le prix Nobel de physique en 1952. Slichter utilisa plus tard la RMN pour apporter la première preuve expérimentale de la théorie BCS de la supraconductivité. En 1997, Gershenfeld et Chuang ont montré comment la RMN haute résolution peut apporter un support aux calculs quantiques multibits. En 2001, la RMN apporte la première preuve expérimentale de l'algorithme de Shor.

## Développements récents en France

La France a toujours été un berceau du développement de la RMN, avec des grands noms comme Goldman ou Abragam. C'est encore le cas comme le montrent ces quelques exemples de recherche récents. Nous ne donnons ici que quelques exemples sélectionnés parmi l'impressionnante production française en RMN, dans des groupes impliqués dans le projet TGIR-CNRS de RMN à très haut champs, mais de nombreux autres groupes de recherche en RMN sont actifs en France, et au moins aussi productifs, comme illustré au long de ce numéro.



Métabolisme, diagnostic et suivi personnalisé [e].

L'urine fut le premier fluide complexe à être étudié par RMN, ce qui a conduit au développement de la « métabolomique par RMN ». Dans les années 1990, la RMN a été utilisée pour la première fois pour diagnostiquer des cancers. En 2006, Nicholson et ses collègues présentent les résultats d'une étude épidémiologique internationale, sur des milliers de patients, pour déterminer l'impact de facteurs environnementaux sur l'apparition du diabète et de l'hypertension.

Les chercheurs du CRMN (Lyon), où l'on trouve le seul spectromètre 1 GHz au monde, en collaboration avec des scientifiques du MIT et de CPE Lyon, ont récemment réussi à observer des intermédiaires réactionnels dans des

réactions de métathèse à la surface de catalyseurs supportés [1], fournissant ainsi un mécanisme à cette réaction de grande importance pour l'industrie. Ils ont aussi apporté la preuve que des atomes de tungstène isolés sur une surface pouvaient cliver le diazote [2]. Dans un autre domaine, en collaboration avec l'IBCP-Lyon, ils ont montré pour la première fois que la RMN pouvait être utilisée pour sonder en détail les interactions eau-protéines en utilisant des échantillons microcristallins (ces interactions sont vitales pour la stabilisation et le repliement des protéines) [3]. Encore dans un autre domaine, le groupe de Lyon a montré comment le vers *C. elegans* pouvait être utilisé comme modèle pour des études de génétique fonctionnelle par RMN [4].

Des chercheurs de l'IBS Grenoble ont montré l'existence d'une corrélation entre les mouvements lents le long du squelette d'une protéine, qui forment un réseau de mouvements, ce qui a permis d'observer l'existence d'ondes stationnaires sur les feuillettes bêta d'une protéine modèle [5]. Ces mouvements lents sont liés aux procédés de transduction du signal et de régulation allostérique. Ce groupe contribue au développement de la RMN moderne par la découverte de nouvelles méthodes combinant spectroscopie, biologie computationnelle et marquage isotopique pour étudier entre autres des systèmes moléculaires de grande taille, des molécules à courte durée de vie, ainsi que des protéines déstructurées. Un effort particulier est dévoué au développement de méthodes de RMN multidimensionnelle rapide afin d'étudier des intermédiaires dans le repliement des protéines ou d'autres procédés moléculaires hors équilibre [6]. Leurs recherches ont des impacts sur la compréhension que l'on a de la réplication virale, en particulier pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou de l'hépatite C (HCV).

La RMN permet aussi de sonder des protéines naturellement non repliées, comme le font les chercheurs de Gif-sur-Yvette, qui développent de nouvelles méthodes pour sonder la dynamique en solution de ces protéines et leurs interactions avec leurs partenaires biologiques [7]. Ceci permet de tester l'efficacité et le mécanisme d'action de nouveaux traitements, contre des virus par exemple.

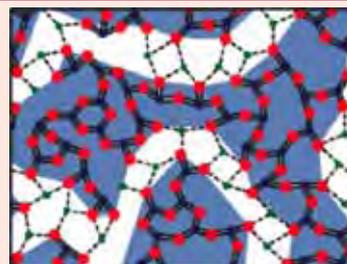


#### Reconnaissance de l'ADN : un vrai puzzle [f].

Les premiers spectres d'oligomères d'ADN et d'ARN ont été obtenus dans les années 1970. En 2004, Kaptein utilise la RMN à haut champ (900 MHz) pour déterminer la cinétique et les changements structuraux qui permettent aux protéines de trouver leur site de fixation sur l'ADN.

À Bordeaux, en collaboration avec des équipes de l'UCSD et du Burnham Institute de San Diego, des scientifiques ont réussi à réincorporer la protéine membranaire Pf1 dans des biomembranes orientées par des champs magnétiques (biphényl bicelles). Ils ont déterminé la topologie de l'hélice de la protéine traversant la membrane en utilisant la RMN du proton et de l'azote à l'état solide. Dans d'autres travaux, en collaboration avec le Cancer Research UK à Londres, ils ont utilisé la RMN du deutérium à l'état solide sur des cellules vivantes pour mesurer la fluidité de l'enveloppe nucléaire qui est impliquée dans la fusion des gamètes mâles et femelles lors de la reproduction [8].

Comme mentionné plus haut, les applications de la RMN ne sont pas limitées à la biologie. À Orléans, des chercheurs ont développé un système unique de chauffage par laser qui permet d'étudier par RMN la structure et la dynamique de matériaux à l'état fondu, à des températures pouvant atteindre 2 000 °C. Les plus récents développements ont même conduit à la mesure de constante d'autodiffusion dans ces conditions extrêmes. Ils ont aussi mis au point de nouvelles méthodes pour caractériser l'ordre à moyenne échelle de matériaux vitreux, ce qui a conduit à la découverte surprenante de structures locales. Ils ont participé à la caractérisation de nouveaux matériaux hybrides avec des propriétés spécifiques et des applications aux nanomatériaux, aux matériaux biocompatibles ou au transport de médicaments [9].



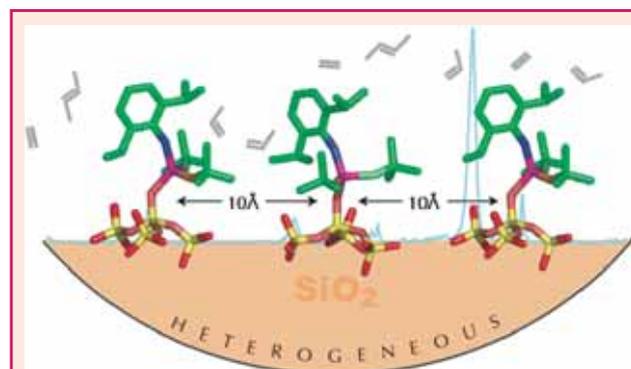
#### Verres, nouveaux matériaux et nanosciences [g].

Les noyaux quadripolaires ont toujours été au cœur des préoccupations des spectroscopistes RMN. Dans les années 1990, les études RMN sur l'oxygène et l'aluminium ont changé notre perception de la structure et de la dynamique des matériaux vitreux. En 2006, Grey et ses collègues utilisent la RMN pour améliorer les capacités de

charge de batteries à base d'oxyde de nickel, de manganèse et de lithium.

Des chercheurs à Lille ont contribué à de nombreuses avancées dans le domaine des noyaux quadripolaires, à la fois pour leur caractérisation directe, ainsi que pour l'analyse de connectivités spatiales et à travers les liaisons à d'autres noyaux. Ces méthodes sont maintenant fréquemment appliquées pour le développement de caractérisation de verres inorganiques par RMN à haut champ de l'oxygène-17 (sceaux pour pile à combustible à oxyde solide, couches phosphates antioxydantes) [10]. Le groupe de RMN biologique à Lille a étudié en détail la protéine neuronale Tau, dont les agglomérats sont caractéristiques de la maladie d'Alzheimer [11].

L'un des développements les plus récents et prometteurs en RMN est l'utilisation de la polarisation nucléaire dynamique (PND) en RMN à haut champ.



#### Chimie et catalyse [h].

Le premier spectre de catalyseur est enregistré dans les années 1970, à l'époque où la RMN révolutionne le quotidien des chimistes organiciens. En 2006, Schrock obtient le prix Nobel de chimie pour la métathèse des oléfines, aujourd'hui réaction au cœur de l'industrie chimique. La même année, il utilise la RMN pour valider le mécanisme de la réaction de métathèse par un catalyseur supporté sur une surface.

Cette méthode, dont l'équipe d'Abragam à Saclay compte parmi les pionniers, permet d'augmenter la sensibilité du signal RMN en tirant parti du fait que les électrons, comme les noyaux, possèdent un spin. Seulement, les propriétés physiques de l'électron font que la séparation de ses niveaux Zeeman (à laquelle le signal est proportionnel) est beaucoup plus grande que pour les noyaux (dans le domaine des micro-ondes). C'est pour cela que la « RMN de l'électron » (RPE) ne souffre pas du manque de sensibilité intrinsèque à la RMN. La PND consiste en un transfert d'aimantation d'électrons contenus dans l'échantillon (on introduit souvent des radicaux stables) vers les noyaux induits par irradiation micro-onde à basse température. Cette technique, qui a le potentiel d'augmenter le signal RMN d'un facteur 700, est le fruit de nombreuses années de développement (source de micro-ondes, sondes RMN basse température, radicaux (source d'électrons) stables). Elle est appliquée depuis les années 1990 pour sonder des échantillons biologiques. En 2010, le groupe de Lyon a introduit ce concept pour étudier la surface des matériaux – ce qui est très utile dans le cas de catalyseurs supportés sur des surfaces d'oxydes par exemple. Les premiers résultats sont extrêmement prometteurs et ont permis de caractériser en l'espace d'une dizaine d'heures des matériaux qui auraient nécessité plus d'une année d'acquisition continue pour arriver aux mêmes résultats.

## Que nous réserve le futur ?

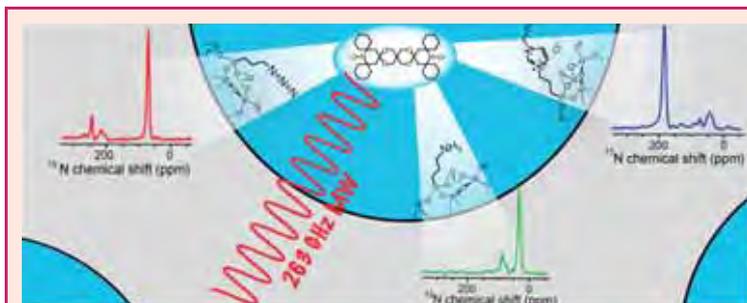
La RMN a été récompensée par cinq prix Nobel en soixante ans : deux en physique – Rabi (1944), Purcell et Bloch (1952) –, deux en chimie – Ernst (1973), Wüthrich (2002) –, et un en médecine – Lauterbur et Mansfield (2003). C'est maintenant une technique standard d'analyse bien établie. Peut-on espérer que la progression continuera à ce rythme ? De nouveaux domaines d'applications vont-ils être découverts avec l'augmentation des champs magnétiques ? Bien qu'il soit impossible de prédire avec certitude ce que le futur de la RMN nous réserve, quelques directions semblent privilégiées.

Évidemment, les principaux développements se font encore dans le domaine de la biologie, comme cela a été le cas ces quinze dernières années. L'effet TROSY, pilier de la détermination structurale de larges complexes moléculaires, doit atteindre son maximum vers 1 GHz, permettant la caractérisation de molécules toujours plus imposantes, notamment les protéines membranaires. De plus hauts champs seront aussi bénéficiaires à l'étude de protéines insolubles à l'état solide.

Le domaine des nanotechnologies et la chimie des matériaux vont aussi bénéficier de cette montée en champ. L'étude de noyaux quadripolaires (présentant plus de deux transitions Zeeman) qui composent souvent ces matériaux (comme l'aluminium ou l'oxygène) sera simplifiée à plus haut champ. En effet, les interactions secondaires gênantes dues à la nature quadripolaire de ces noyaux diminuent quand le champ augmente. Ceci devrait nous aider à comprendre la dynamique et les structures locales de ces matériaux qui sont de plus en plus présents dans notre vie quotidienne.

Le développement de la PND à haut champ (où le design de sources micro-ondes devient compliqué) promet aussi de grandes avancées, tant dans le domaine de la biologie que dans celui des matériaux.

Enfin, l'un des développements que l'on peut attendre avec les hauts champs magnétiques est l'application de la



### De nouveaux horizons pour l'étude des matériaux.

L'introduction de la RMN de surface exaltée par polarisation nucléaire dynamique (PND) a récemment permis l'étude de matériaux comprenant une très faible densité de sites actifs (comme c'est le cas pour de nombreux catalyseurs hétérogènes), rendant leurs études par « RMN classique » impossibles. L'étude de ces matériaux par RMN-PND a aussi permis d'améliorer la technique en elle-même, en permettant la découverte de nouveaux solvants compatibles avec cette méthode, ainsi que de sources de polarisation plus efficaces. La PND permet, dans les meilleurs cas, d'accélérer les expériences RMN d'un facteur 12 000. Ainsi, les chercheurs lyonnais ont montré qu'il était possible d'obtenir en quelques heures des spectres de corrélation bidimensionnels, ou des spectres de noyaux peu abondants (comme l'azote-15), impensables sans PND.

RMN pour le diagnostic médical. Jusqu'à présent, le manque de sensibilité de la RMN réduit son application pour la détection de microtraces, comme c'est le cas en médecine ou dans le cadre des analyses environnementales. Les récents développements de microsondes et de « lab on a chip » combinés avec de plus hauts champs magnétiques vont repousser les limites des seuils de détection. L'un des objectifs majeurs étant d'appliquer la RMN au diagnostic, où les marqueurs d'une maladie dans les fluides biologiques (urine, plasma) sont souvent à l'état de traces.

Il est clair que la RMN va continuer à avoir l'impact et le développement qui la caractérisent, propulsée toujours plus en avant par l'inexorable montée en champ.

*Les auteurs et la Rédaction de la revue remercient vivement Jean-Pierre Foulon pour sa relecture et ses conseils avisés sur cet article, et plus généralement sur l'ensemble des articles de ce numéro spécial RMN.*

## Références

### Pour les travaux cités dans les encadrés

- [a] Karplus M., Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments, *J. Chem. Phys.*, 1959, 30, p. 11 ; Karplus M., Vicinal proton coupling in nuclear magnetic resonance, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, p. 2870 ; Williamson M.P., Havel T.F., Wüthrich K., Solution conformation of proteinase inhibitor-IIA from bull seminal plasma by  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance and distance geometry, *J. Mol. Biol.*, 1985, 182, p. 295 ; Meddour A., Canet I., Loewenstein A., Pechine J.M., Courtieu J., Observation of enantiomers, chiral by virtue of isotopic substitution, through deuterium NMR in a polypeptide liquid-crystal, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, p. 9652 ; Zahn R., Liu A.Z., Luhrs T., Riek R., von Schroetter C., Garcia F.L., Billeter M., Calzolari L., Wider G., Wüthrich K., NMR solution structure of the human prion protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97, p. 145.
- [b] Hu J.G., Griffin R.G., Herzfeld J., Synergy in the spectral tuning of retinal pigments - Complete accounting of the opsin shift in bacteriorhodopsin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91, p. 8880 ; Hu J.G.G., Griffin R.G., Herzfeld J., Interactions between the protonated schiff base and its counterion in the photointermediates of bacteriorhodopsin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, p. 9495 ; Petkova A.T., Ishii Y., Balbach J.J., Antzutkin O.N., Leapman R.D., Delaglio F., Tycko R., A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99, p. 16742 ; Petkova A.T., Leapman R.D., Guo Z.H., Yau W.M., Mattson M.P., Tycko R., Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils, *Science*, 2005, 307, p. 262.

- [c] Lauterbur P.C., Image formation by induced local interactions - Examples employing nuclear magnetic-resonance, *Nature*, 1973, 242, p. 190 ; Mansfield P., Multi-planar image-formation using NMR spin echoes, *J. Phys. J. C-Solid State Physics*, 1977, 10, p. L55.
- [d] Hebel L.C., Slichter C.P., Nuclear spin relaxation in normal and superconducting aluminum, *Phys. Rev.*, 1959, 113, p. 1504 ; Barrett S.E., Durand D.J., Pennington C.H., Slichter C.P., Friedmann T.A., Rice J.P., Ginsberg D.M.,  $^{63}\text{Cu}$  Knight shifts in the superconducting state of  $\text{YBa}_2\text{Cu}_3\text{O}_{7-\delta}$  ( $T_c=90\text{ K}$ ), *Phys. Rev. B*, 1990, 41, p. 6283 ; Gershenfeld N.A., Chuang I.L., Bulk spin-resonance quantum computation, *Science*, 1997, 275, p. 350 ; Vandersypen L.M.K., Steffen M., Breyta G., Yannoni C.S., Sherwood M.H., Chuang I.L., Experimental realization of Shor's quantum factoring algorithm using nuclear magnetic resonance, *Nature*, 2001, 414, p. 883.
- [e] Brindle J.T., Antti H., Holmes E., Tranter G., Nicholson J.K., Bethell H.W.L., Clarke S., Schofield P.M., McKilligin E., Mosedale D.E., Grainger D.J., Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using  $^1\text{H}$ -NMR-based metabolomics, *Nature Medicine*, 2002, 8, p. 1439 ; Nicholson J.K., Connolly J., Lindon J.C., Holmes E., Metabolomics: a platform for studying drug toxicity and gene function, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1, p. 153 ; Clayton T.A., Lindon J.C., Cloarec O., Antti H., Charuel C., Hanton G., Provost J.P., Le Net J.L., Baker D., Walley R.J., Everett J.R., Nicholson J.K., Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment, *Nature*, 2006, 440, p. 1073.
- [f] Kalodimos C.G., Biris N., Bonvin A., Levandoski M.M., Guennegues M., Boelens R., Kaptein R., Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes, *Science*, 2004, 305, p. 386 ; Henzler-Wildman K.A., Lei M., Thai V., Kerns S.J., Karplus M., Kern D., A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis, *Nature*, 2007, 450, p. 913.
- [g] Farnan I., Grandinetti P.J., Baltisberger J.H., Stebbins J.F., Werner U., Eastman M.A., Pines A., Quantification of the disorder in network-modified silicate-glasses, *Nature*, 1992, 358, p. 31 ; Poe B.T., McMillan P.F., Coté B., Massiot D., Coutures J.P., Magnesium and calcium liquids: *In situ* high-temperature  $^{27}\text{Al}$  NMR spectroscopy, *Science*, 1993, 259, p. 768 ; Stebbins J.F., Xu Z., NMR evidence for excess non-bridging oxygen in an aluminosilicate glass, *Nature*, 1997, 390, p. 60 ; Kang K.S., Meng Y.S., Breger J., Grey C.P., Ceder G., Electrodes with high power and high capacity for rechargeable lithium batteries, *Science*, 2006, 311, p. 977 ; Sideris P.J., Nielsen U.G., Gan Z.H., Grey C.P., Mg/Al ordering in layered double hydroxides revealed by multinuclear NMR spectroscopy, *Science*, 2008, 321, p. 113.
- [h] Blanc F., Copéret C., Thivolle-Cazat J., Basset J.M., Lesage A., Emsley L., Sinha A., Schrock R.R., Surface versus molecular siloxy ligands in well-defined olefin metathesis catalysts:  $\{(\text{RO})_3\text{SiO}\}\text{Mo}(=\text{NAr})(=\text{CHtBu})(\text{CH}_2\text{fBu})$ , *Angew. Chem.*, 2006, 45, p. 1216 ; Lesage A., Lelli M., Gajan D., Caporini M.A., Vitzthum V., Miéville P., Alauzun J., Roussey A., Thieuleux C., Medhi A., Bodenhausen G., Copéret C., Emsley L., Surface enhanced NMR spectroscopy by dynamic nuclear polarisation, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, p. 15459.
- [2] Felgines Avenier P., Taoufik M., Lesage A., Baudouin A., De Mallmann A., Veyre L., Basset J.-M., Emsley L., Quadrelli E.A., Dinitrogen dissociation on an isolated surface by a single tantalum atom, *Science*, 2007, 317, p. 1056.
- [3] Lesage A., Emsley L., Penin F., Böckmann A., Investigation of dipolar-mediated water-protein interactions in microcrystalline Crh by solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, p. 8246.
- [4] Blaise B.J., Giacomotto J., Elena B., Dumas M.-E., Toulhoat P., Ségalat L., Emsley L., Metabotyping of *Caenorhabditis elegans* reveals latent phenotypes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007, 104, p. 19808.
- [5] Bouvignies G., Bernado P., Meier S., Cho K., Grzesiek S., Bruschweiler R., Blackledge M., Identification of slow correlated motions in proteins using residual dipolar and hydrogen-bond scalar couplings, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2005, 102, p. 13885.
- [6] Arnero C., Schanda P., Dura M.A., Ayala I., Marion D., Franzetti B., Brutscher B., Boisbouvier J., Fast two-dimensional NMR spectroscopy of high molecular weight protein assemblies, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, p. 3448.
- [7] Hertzog M., Van-Heijenoort C., Didry D., Gaudier M., Coutant J., Gigant B., Didelot G., Preat T., Knossow M., Guittet E., Carlier M.F., The b-thymosin/WH2 domain: structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly, *Cell*, 2004, 117, p. 611.
- [8] Garnier-Lhomme M., Byrne R.D., Hobday T.M.C., Gschmeissner S., Woscholski R., Pocia D.L., Dufourc E.J., Larjani B., Nuclear envelope remnants: fluid membranes enriched in sterols and polyphosphoinositides, *PLoS One*, 2009, 4, e4255.
- [9] Laurencin D., Gervais C., Wong A., Coelho C., Mauri F., Massiot D., Smith M.E., Bonhomme C., Implementation of high resolution  $^{43}\text{Ca}$  solid state NMR spectroscopy: towards the elucidation of calcium sites in biological materials, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, 131, p. 13430.
- [10] Tricot G., Delevoeye L., Palavit G., Montagne L., Phase identification and quantification in a devitrified glass using homo- and heteronuclear solid state NMR, *Chem. Comm.*, 2005, p. 5289.
- [11] Landrieu I., Lacosse L., Leroy A., Wieruszkeski J.M., Trivelli X., Sillen A., Sibille N., Schwalbe H., Saxena K., Langer T., Lippens G., NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, p. 3575.



A. Zagdoun

Alexandre Zagdoun est doctorant et Lyndon Emsley, professeur, à l'Université de Lyon, Centre européen de RMN à Très Hauts Champs\*.



L. Emsley

\* CNRS/ENS Lyon/UCB-Lyon 1, Centre de RMN à très hauts champs, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne.  
Courriels : alexandre.zagdoun@ens-lyon.fr, lyndon.emsley@ens-lyon.fr

#### Pour les travaux cités dans le texte

- [1] Blanc F., Berthoud R., Copéret C., Lesage A., Emsley L., Singh R., Kreickmann T., Schrock R.R., Direct observation of reaction intermediates for a well-defined heterogeneous alkene metathesis catalyst, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008, 105, p. 12123.

<http://culturesciences.chimie.ens.fr>

Le site CultureSciences-Chimie est conçu pour assurer une formation scientifique de haut niveau, accessible à tout utilisateur, en particulier aux enseignants.

Ce site constitue un centre de ressources pour enseigner la chimie, en lien direct avec l'avancement des connaissances au sein des laboratoires de recherche.

Alors vite à vos souris !



# Glossaire

## RMN : résonance magnétique nucléaire

### Résonances magnétiques

**DNP (« dynamic nuclear polarisation » ou polarisation dynamique nucléaire)** : méthode consistant à transférer l'aimantation des électrons aux noyaux afin d'accroître considérablement l'aimantation nucléaire. À basse température, une augmentation de quatre ordres de grandeur par rapport à l'aimantation d'équilibre est possible.

**HRMAS (« high-resolution magic-angle spinning » ou haute résolution sous rotation à l'angle magique)** : utilisation de la rotation à l'angle magique pour l'étude d'échantillons semi-solides tels que des tissus biologiques.

**IRM (imagerie par résonance magnétique)** : méthode d'imagerie non invasive qui repose sur l'acquisition d'un spectre RMN pour un système plongé dans un gradient de champ magnétique. Son application la plus connue est l'IRM médicale qui utilise les protons des molécules d'eau du corps humain ; le contraste est alors dû aux temps de relaxation, qui varient d'un tissu à l'autre.

**IRMf (IRM fonctionnelle)** : méthode permettant de mesurer de manière localisée les variations de flux sanguin dans le cerveau, qui sont liées à l'activité neuronale.

**MAS (« magic-angle spinning » ou rotation à l'angle magique)** : méthode consistant à faire tourner l'échantillon autour d'un axe incliné à l'« angle magique », soit  $54,74^\circ$ , par rapport au champ magnétique statique. Utilisée principalement pour les solides, cette technique permet d'éliminer l'effet de certaines interactions. Des fréquences de rotation de plus de 100 kHz peuvent aujourd'hui être atteintes.

**Relaxométrie** : méthode consistant à mesurer la variation des temps de relaxation en fonction de l'intensité du champ magnétique.

**RMN à onde continue** : méthode d'acquisition de spectres RMN qui consiste à effectuer un lent balayage en fréquence avec une source radiofréquence et à mesurer l'absorption pour chaque fréquence. Cette méthode, quasiment plus utilisée depuis les années 1980, a été remplacée par la RMN par transformée de Fourier.

**RMN bidimensionnelle (2D)** : méthode permettant l'acquisition de spectres RMN à deux dimensions en fréquence, par exemple les fréquences de résonance du carbone-13 et du proton. Elle nécessite deux dimensions temporelles : le temps d'acquisition usuel en RMN 1D et un temps indirect incrémenté lors d'une succession d'expériences 1D.

La RMN 2D peut être utilisée pour la séparation (par ex., couplage scalaire en fonction du déplacement chimique), la corrélation (par ex., existence ou non d'un couplage scalaire entre deux spins) et l'échange (par ex., échange chimique entre deux fonctions dans une molécule).

**RMN chromatographique** : méthode consistant à placer l'échantillon dans un support chromatographique afin de faciliter une identification des composés reposant à la fois sur les interactions RMN et la mobilité moléculaire.

**RMN multidimensionnelle** : extension de la RMN bidimensionnelle à des dimensions plus élevées par l'utilisation de dimensions indirectes supplémentaires.

**RMN par transformée de Fourier** : méthode d'acquisition de spectres RMN qui consiste à exciter simultanément l'ensemble des spins nucléaires avec une impulsion radiofréquence, puis à enregistrer le signal induit par leur évolution temporelle. Le spectre RMN est alors obtenu par transformée de Fourier du signal de précession libre. Cette approche conduit à une grande variété d'expériences par l'ajout d'impulsions et de dimensions supplémentaires.

**RPE (résonance paramagnétique électronique)** : domaine voisin de la RMN, qui étudie les spins électroniques et non nucléaires. En RPE, les fréquences de résonances vont de quelques GHz à quelques centaines de GHz pour les champs magnétiques utilisés expérimentalement. En conséquence, bien qu'elle partage les principes physiques de la RMN, la RPE fait appel à une instrumentation et à des expériences distinctes.

### Dynamique de spin

**Abondance naturelle** : pour un isotope, pourcentage d'un élément naturellement présent sous cette forme. On distingue notamment les isotopes « abondants », d'abondance naturelle proche de 100 %, comme  $^1\text{H}$  et  $^{19}\text{F}$ , et les isotopes « dilués », comme  $^{13}\text{C}$  et  $^{17}\text{O}$ . Pour ces derniers, on choisit parfois de procéder à un enrichissement isotopique, c'est-à-dire de préparer un système chimique dans lequel le pourcentage d'un isotope est supérieur à son abondance naturelle. Cela permet notamment d'augmenter l'intensité du signal enregistré en RMN.

**Aimantation** : vecteur décrivant l'état d'un ensemble de spins. À l'équilibre, l'aimantation est alignée avec le champ magnétique statique. Les impulsions entraînent une rotation de l'aimantation, et on enregistre en RMN le signal causé par la précession de l'aimantation autour du champ magnétique statique.

**Champ magnétique statique** : champ magnétique intense indépendant du temps dans lequel est placé l'échantillon pour une expérience de RMN. Ce champ est dans la grande majorité des cas généré par un aimant supraconducteur ; il doit avoir une grande homogénéité (faible variation dans l'espace) et une grande stabilité (faible variation dans le temps). On le caractérise par la fréquence de résonance des protons, par exemple 400 MHz pour un champ de 9,4 T ou 1 GHz pour un champ de 23,5 T. Pour certaines applications, le champ peut être généré par un aimant permanent ou un électroaimant.

**Fréquence de Larmor** : fréquence de précession d'un spin soumis à un champ magnétique.

**Gradient de champ magnétique** : variation du champ magnétique à travers l'espace. Un gradient de champ

magnétique est introduit délibérément dans certaines expériences, comme en imagerie où il permet d'établir un lien entre position et fréquence de résonance.

**Impulsion** : champ magnétique oscillant à la fréquence de résonance qui permet d'agir sur les spins. En RMN, la durée des impulsions va de quelques microsecondes à plusieurs centaines de millisecondes et leur intensité est très inférieure à celle du champ magnétique statique.

**Isotopes** : noyaux d'un même élément qui diffèrent par leur nombre de neutrons. Deux isotopes peuvent avoir un nombre de spin différent et donc des propriétés différentes en RMN, comme par exemple le carbone-12, pour lequel  $I = 0$  et qui est donc « muet » en RMN, et le carbone-13 pour lequel  $I = 1/2$ .

**Nombre quantique de spin** : nombre entier ou demi-entier (0, 1/2, 1, 3/2...) qui caractérise la norme du moment cinétique de spin. La RMN étudie les noyaux de nombre de spin  $I$  non nul.

On distingue les noyaux de nombre de spin  $I = 1/2$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ...) et les spins  $I > 1/2$  pour lesquels existe une interaction supplémentaire, l'interaction quadripolaire, et donc une méthodologie RMN distincte. Les électrons, étudiés en RPE et DNP, ont un spin  $I = 1/2$ .

**Radiofréquence** : domaine de fréquence dans lequel se situent les fréquences de résonance en RMN.

**Rapport gyromagnétique** : rapport entre le moment magnétique et le moment cinétique d'une particule. Plus il est élevé, plus le signal acquis en RMN pour un même nombre d'atomes est intense. Le rapport gyromagnétique du proton  $^1\text{H}$  est par exemple quatre fois plus élevé que celui du carbone-13.

**Spin** : moment cinétique intrinsèque des particules quantiques, comme les noyaux atomiques et les électrons.

## Instrumentation

Les instruments d'aujourd'hui et de demain sont décrits dans l'article de D. Sakellariou.

## Interactions

**Anisotropie de déplacement chimique** : contribution au déplacement chimique qui dépend de l'orientation du système par rapport au champ magnétique statique (voir articles Babonneau, Caldarelli, Canet, Copéret, Courtieu, Dumez, Elena-Herrmann, Kieffer *et coll.*).

**Couplage dipolaire** : interaction entre deux spins nucléaires, analogue de l'interaction dipolaire classique entre deux moments magnétiques. Le couplage dipolaire est également appelé couplage direct ou couplage à travers l'espace (voir articles Babonneau, Blackledge, Caldarelli, Canet, Copéret, Courtieu, Dumez, Gambarelli, Kieffer *et coll.*).

**Couplage scalaire** : interaction entre deux spins nucléaires transmise par les électrons de liaison. Le couplage scalaire est également appelé couplage direct ou couplage à travers les liaisons (voir articles Babonneau, Blackledge, Caldarelli, Copéret, Courtieu, Elena-Herrmann, Kieffer *et coll.*).

**Déplacement chimique** : modification de la fréquence de résonance d'un spin nucléaire causée par son environnement électronique. Le déplacement chimique est dû au champ magnétique induit localement par les courants électroniques produits en réponse à la présence d'un champ magnétique externe (voir articles Babonneau, Caldarelli, Canet, Copéret, Courtieu, Dumez, Elena-Herrmann, Kieffer *et coll.*).

**Interactions anisotropes** : interactions dont l'intensité dépend de l'orientation du système par rapport au champ magnétique statique. C'est le cas de l'interaction dipolaire, de l'anisotropie de déplacement chimique et de l'interaction quadripolaire. En solution, ces interactions sont moyennées à zéro par le mouvement moléculaire et n'influencent pas la position des pics dans le spectre RMN ; elles interviennent cependant pour la relaxation nucléaire. Ces interactions jouent un rôle prépondérant en RMN du solide.

**Interactions paramagnétiques** : en RMN, ce terme désigne l'ensemble des interactions impliquant le spin d'un électron non apparié (voir articles Babonneau, Canet, Gambarelli, Kieffer *et coll.*).

**Interaction quadripolaire** : interaction entre la distribution de charge d'un noyau et la distribution de charge de son environnement électronique. Cette interaction n'intervient que pour les noyaux de spin  $I > 1/2$ , qu'on appelle également noyaux quadripolaires (voir articles Babonneau, Canet, Copéret, Courtieu, Dumez *et coll.*).

## Dynamique et relaxation

**Diffusion** : déplacement aléatoire des particules dans leur milieu sous l'effet de l'agitation thermique ou de gradient de concentration (voir articles Caldarelli, Canet, Kieffer, Mariette, Sakellariou *et coll.*).

**Effet Overhauser** : transfert d'aimantation due aux fluctuations des interactions spin-spin, causées, par exemple, par le mouvement atomique. L'effet Overhauser nucléaire (NOE, pour « nuclear Overhauser effect ») désigne plus spécifiquement le transfert d'aimantation entre noyaux (voir articles Canet, Gambarelli, Kieffer, Sakellariou *et coll.*).

**PRE (« paramagnetic relaxation enhancement » ou exaltation de la relaxation par l'interaction paramagnétique)** : réduction du temps de relaxation observée en présence d'un site paramagnétique (voir article Kieffer *et coll.*).

**RDC (« residual dipolar coupling » ou couplage dipolaire résiduel)** : couplage résultant de réduction partielle du couplage dipolaire par la réorientation des molécules dans un milieu orienté tel un cristal liquide. Dans un liquide isotrope, la moyenne du couplage dipolaire est nulle, c'est pourquoi on parle de couplage « résiduel » (voir articles Blackledge, Courtieu, Kieffer *et coll.*).

**Relaxation** : retour à l'équilibre du système de spin après une perturbation telle qu'une impulsion radiofréquence (voir articles Caldarelli, Canet, Kieffer, Mariette, Sakellariou *et coll.*).

**Relaxation longitudinale** : retour à l'équilibre de la composante longitudinale de l'aimantation, c'est-à-dire la composante parallèle au champ magnétique statique. On parle également de relaxation spin-spin.

**Relaxation transversale** : retour à l'équilibre de la composante transversale de l'aimantation, c'est-à-dire la composante perpendiculaire au champ magnétique statique. On parle également de relaxation spin-réseau.

**Temps de corrélation** : temps caractéristique des mouvements moléculaires, comme la rotation d'ensemble ou la réorientation des liaisons chimiques.

## Concepts expérimentaux

**Corrélation** : signal RMN permettant de mettre en évidence l'existence d'une interaction entre spins.

**Découplage** : stratégie consistant à éliminer l'effet d'une interaction sur le spectre RMN, par exemple le couplage

scalaire hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  lors de l'acquisition de spectre  $^{13}\text{C}$ . Le découplage a le plus souvent pour objectif d'améliorer la résolution et la sensibilité.

**Hétéronucléaire/homonucléaire** : une méthode de corrélation, de découplage ou de recouplage est dite homonucléaire si elle concerne une interaction entre deux noyaux d'un même isotope, par ex.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , et hétéronucléaire pour deux noyaux d'isotopes distincts, par ex.  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .

**Recouplage** : stratégie consistant à réintroduire l'effet d'une interaction sur le spectre RMN. Le recouplage dipolaire est par exemple utilisé pour mesurer les couplages dipolaires pour des solides en rotation à l'angle magique.

**Résolution** : capacité à distinguer deux pics dans un spectre RMN. La résolution augmente avec l'intensité du champ magnétique statique et peut être améliorée par l'utilisation de séquences de découplage. Une résolution élevée est nécessaire pour étudier des systèmes de grande taille à l'échelle atomique.

**Sensibilité** : capacité à distinguer le signal RMN du bruit dans un spectre RMN. La RMN souffre en comparaison d'autres spectroscopies d'une faible sensibilité et de nombreuses méthodes sont mises en œuvre pour remédier à cela.

## Échantillon d'une vaste panoplie de séquences

**COSY (« correlation spectroscopy »)** : séquence 2D homonucléaire où les pics de corrélation indiquent l'existence d'un couplage scalaire entre deux noyaux (voir articles Courtieu, Sablé *et coll.*).

**CP (« cross polarisation »)** : élément de séquence permettant d'effectuer un transfert de polarisation hétéronucléaire dans les solides (voir articles Babonneau, Copéret *et coll.*).

**CPMG (« Carr Purcell Meiboom Gill »)** : séquence constituée d'un train d'impulsions, extension de l'écho de spin, qui permet d'éliminer l'effet de certaines interactions (voir articles Caldarelli, Copéret, Elena-Herrmann *et coll.*).

**DEER (« double electron electron resonance »)** : séquence RPE permettant de mesurer des distances entre spins électroniques allant jusqu'à 80 Å (voir article Gambarelli *et coll.*).

**DOSY (« diffusion ordered spectroscopy »)** : séquence 2D permettant d'effectuer une séparation en fonction simultanément du déplacement chimique et du coefficient de diffusion (voir articles Caldarelli, Canet *et coll.*).

**DQ/SQ (« double quanta »/« single quantum »)** : séquence 2D de corrélation homonucléaire où la présence de pics de corrélation renseigne sur l'existence d'un couplage dipolaire intense entre deux spins et donc sur leur proximité dans l'espace (voir articles Babonneau, Copéret, Dumez *et coll.*).

**Écho de spin, SE (« spin echo »)** : utilisation d'une impulsion pour éliminer l'effet net de certaines interactions au terme d'une période d'évolution (voir articles Caldarelli, Canet, Copéret *et coll.*).

**EXSY (« exchange spectroscopy »)** : séquence 2D homonucléaire permettant de mesurer des transferts de polarisation sur des temps allant de la milliseconde à plusieurs secondes (voir article Courtieu *et coll.*).

**HETCOR (« heteronuclear correlation »)** : séquence 2D hétéronucléaire où la présence de pics de corrélation renseigne sur l'existence d'un couplage dipolaire intense entre deux spins et donc sur leur proximité dans l'espace (voir articles Copéret, Courtieu *et coll.*).

**HMBC (« heteronuclear multiple bond correlation »)** : séquence 2D hétéronucléaire où les pics de corrélation permettent d'identifier des paires d'atomes séparés par deux liaisons chimiques ou plus (voir articles Courtieu, Sablé *et coll.*).

**HSQC (« heteronuclear single quantum correlation »)** : séquence 2D hétéronucléaire où les pics de corrélation permettent d'identifier des paires d'atomes séparés par une liaison chimique (voir articles Caldarelli, Courtieu, Elena-Herrmann, Sablé *et coll.*).

**IR (« inversion recovery »)** : séquence permettant la mesure de temps de relaxation longitudinale (voir article Canet *et coll.*).

**JRES (« J-resolved spectroscopy »)** : séquence 2D permettant de séparer les noyaux en fonction simultanément de leur déplacement chimique et de leurs couplages scalaires (voir articles Courtieu, Elena-Herrmann *et coll.*).

**MQMAS (« multiple quantum magic-angle spinning »)** : séquence 2D permettant d'obtenir un spectre dépourvu de l'influence de l'interaction quadripolaire et ainsi d'accéder aux valeurs de déplacements chimiques (voir articles Babonneau, Dumez *et coll.*).

**NOESY (« nuclear Overhauser effect spectroscopy »)** : séquence 2D homonucléaire utilisée pour mesurer le transfert de polarisation dû à l'effet Overhauser nucléaire, identique en pratique à la séquence EXSY (voir articles Canet, Kieffer, Sablé *et coll.*).

**TOCSY (« total correlation spectroscopy »)** : séquence 2D homonucléaire où les pics de corrélation indiquent que deux noyaux appartiennent au même système de spin (voir articles Caldarelli, Elena-Herrmann, Sablé *et coll.*).

**TROSY (« transverse relaxation optimised spectroscopy »)** : séquence 2D de corrélation hétéronucléaire qui exploite un mécanisme de relaxation dit de corrélation croisée pour améliorer la résolution (voir article Kieffer *et coll.*).

## RMN sur ordinateur

**Protocole de recuit simulé** : méthode de simulation numérique qui permet de rechercher des conformations stables d'édifices moléculaires en les portant artificiellement à haute température avant de les laisser « refroidir » (voir articles Courtieu, Kieffer *et coll.*).

**Simulation de dynamique moléculaire** : méthode qui consiste à effectuer l'intégration numérique des équations du mouvement pour un ensemble d'atomes. La description des interactions peut être quantique ou empirique (voir articles Babonneau, Blackledge, Kieffer *et coll.*).

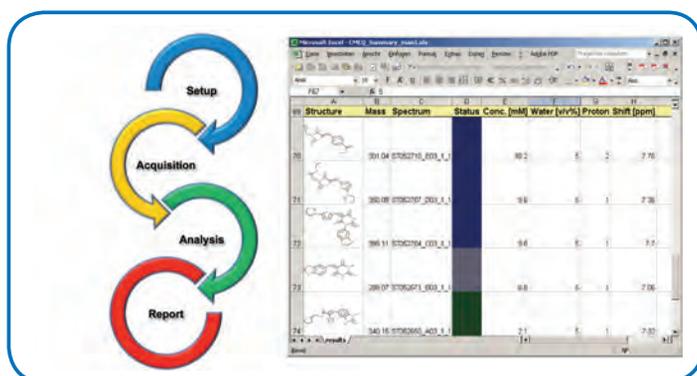
**Théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT, « density functional theory »)** : méthode de chimie numérique qui permet de calculer la structure électronique d'une molécule ou d'un matériau ainsi que certaines propriétés RMN, comme le déplacement chimique, le couplage scalaire et le couplage quadripolaire (voir articles Babonneau, Copéret, Dumez *et coll.*).

# CMC: Complete Molecular Confidence

## A Suite of Products for Small Molecules

### CMC-q – quantification

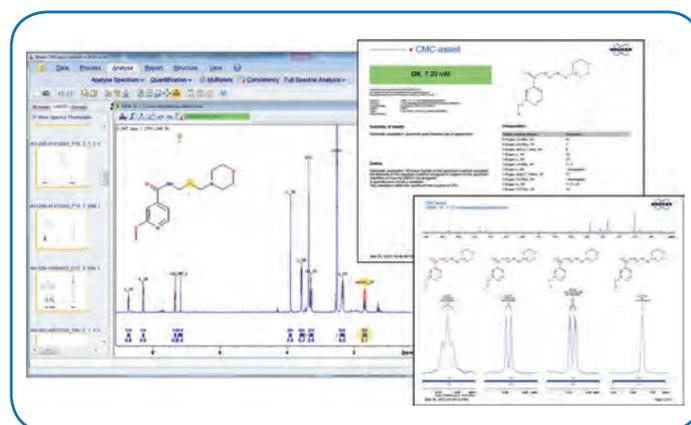
CMC-q covers the whole workflow for high throughput quantification of compound libraries. The fully automated CMC-q work-package controls the setup of NMR experiments, manages the data acquisition and processing, determines the concentration and finally exports the results. The parameter sets provided with this work-package are tailored for a wide variety of experimental conditions and optimized for high throughput quantification of only a few  $\mu\text{g}$  of compound. Besides the quantification, the automatic interpretation of the acquired data also includes the identification of obvious structural inconsistencies.



CMC-q: workflow for compound library QA in industry.

### CMC-assist – assisted spectra interpretation

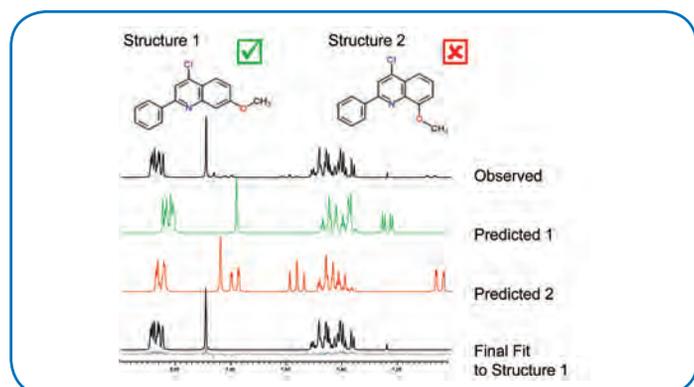
CMC-assist assists the chemist with the interpretation of routine NMR spectra, providing an automated processing and an automated analysis of their NMR data. CMC-assist's underlying algorithm mimics the human interpretation logic and analyses routine NMR spectra with respect to structural consistency, spectral assignment, multiplet analysis, concentration determination and purity assessment. Any of these automatically generated results can be conveniently refined and finally reported in various formats.



CMC-assist: routine NMR processing and interpretation.

### CMC-i – integrity

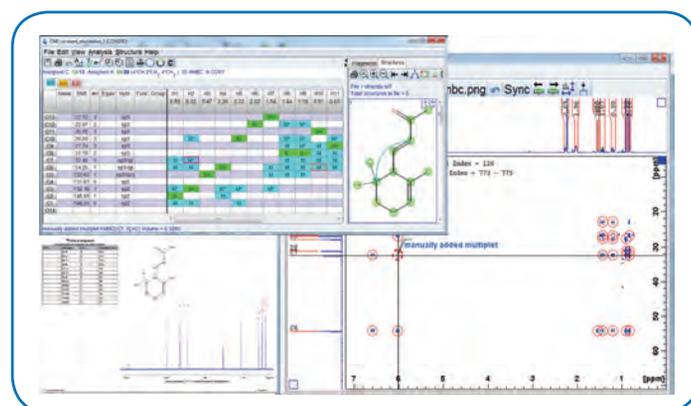
CMC-i completely analyses NMR data providing accurate chemical shifts and coupling constants even for spectra with overlapping and higher order multiplets including the solvent signals. CMC-i evaluates the difference between predicted and the actual NMR-parameters and gives a match index for the consistency between spectrum and structure. The algorithm is highly specific and selective (very few false positives) because all the coupling information is taken into account as well.



CMC-i: full spectral analysis by spectra simulation and fitting.

### CMC-se – structure elucidation

CMC-se is an interactive tool which moves the workflow of structure elucidation from paper to the screen, streamlines and organizes it. CMC-se performs an automatic analysis of different NMR spectra types and proposes structural solutions, which are ranked by probability. The user controls all steps and may refine the analysis using a comfortable graphical interface.



CMC-se: computer aided structure elucidation.

# CryoProbe Prodigy™

## More Sensitivity for Your Money

The CryoProbe Prodigy is the newest member of the Bruker CryoProbe family. The compact device controlling the CryoProbe Prodigy consists of a control unit including pumps and a storage vessel for the liquid nitrogen. RF coil and preamplifiers are cooled using liquid N<sub>2</sub>. The Prodigy offers, at an affordable price, a sensitivity boost comparable to “additional 300 MHz”.

CryoProbe Prodigy systems are offered for new spectrometers as well as upgrades for AVANCE II & III spectrometers. CryoProbe Prodigys are available as 5 mm Z-Gradient broad-band observe (BBO) probes for 400, 500 & 600 MHz. Latest, the 600 MHz triple resonance inverse (TCI) probe is introduced.

The broad-band Prodigy provides a Signal-to-Noise gain of 2–3 on BB channel (<sup>31</sup>P-<sup>15</sup>N) compared to the best RT probes, e.g. the 400 MHz CryoProbe (BBO) surpasses the conventional 700 MHz BBO in sensitivity. At the same time the <sup>1</sup>H sensitivity is more than duplicated. The 600 MHz Triple Resonance Inverse CryoProbe Prodigy outperforms a conventional 950 MHz TXI probe in sensitivity.

The CryoProbe Prodigy systems are highly suitable to be used in Open-Shop environments under full automation.



600 MHz NMR spectrometer with CryoProbe Prodigy and SampleMail™ sample transfer system.

## CryoProbe Prodigy Applications

- Small molecules, trace analysis
- API (active pharmaceutical ingredients)
- Bio-NMR: triple resonance with <sup>2</sup>H decoupling
- Quality assurance, compound depository screening
- Inorganic chemistry, complex chemistry, catalysts, ...



600 MHz Inverse Triple Resonance (TCI) CryoProbe Prodigy.

## CryoProbe Prodigy features

- 5 mm, Z-gradient and ATM compatible
- 0°–80° C sample temperature range, other ranges on request.
- Liquid nitrogen consumption comparable to that of a standard Bruker 400/500 MHz magnet.
- Low maintenance costs with long (2 years) maintenance interval

## CryoProbe Prodigy TCI features

- Triple resonance with <sup>2</sup>H decoupling
- S/N gain <sup>1</sup>H: factor ~2.5\*
- Cold preamplifiers for <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H & <sup>13</sup>C
- Available at 600 MHz

## CryoProbe Prodigy BBO features

- X Observe & Inverse detection in full automation
- <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P, <sup>1</sup>H & <sup>19</sup>F
- S/N gain <sup>15</sup>N-<sup>31</sup>P: factor ~2 to 3\*
- S/N gain <sup>1</sup>H: factor ~2\*
- Cold preamplifiers for all nuclei (BB/<sup>1</sup>H/<sup>2</sup>H)
- Available at 400, 500 and 600 MHz

## Summary

The CryoProbe Prodigy is an economic equipment to greatly increase your signal-to-noise and expands the range of applications of the AVANCE spectrometer, allowing 5–10 times faster NMR measurements compared to RT probes. The sensitivity increase corresponds to “additional 300 MHz (BBO) or even more (TCI)” in field. The CryoProbe Prodigy has a moderate surcharge as well as minimal running and maintenance costs.

\*vs. RT probe

# La RMN en chimie organique

Jacques Courtieu (*coord.*), Nicolas Giraud, Olivier Lafon, Philippe Lesot, Cédric Lorthioir et Jean-Marc Nuzillard

<b>Résumé</b>	Depuis le début des années 1960, la RMN est la compagne journalière du chimiste organicien. Cet article présente quatre facettes originales montrant que la recherche dans ce domaine est toujours extrêmement dynamique. Le but essentiel est de fournir des outils simplifiant l'analyse des spectres afin d'aborder des molécules toujours plus complexes.
<b>Mots-clés</b>	<b>RMN du liquide, RMN anisotrope, RMN localisée, polymères, chiralité, analyse automatique, édition des couplages, dynamique moléculaire.</b>
<b>Abstract</b>	<b>NMR in organic chemistry</b> Since the beginning of 1960s, the RMN is the daily partner of the organic chemist. This article presents four original facets showing that the research in this domain is always extremely dynamic. The essential purpose is to supply tools simplifying the analysis of spectra to approach molecules always more complex.
<b>Keywords</b>	<b>Liquid NMR, anisotropic NMR, localised NMR, NMR of polymers, chirality, automated analysis, coupling edition, molecular dynamics.</b>

Le premier succès historique suivant la découverte du phénomène de résonance magnétique nucléaire fut de déterminer expérimentalement les propriétés magnétiques des noyaux de tous les isotopes du tableau de Mendeleïev, rapports gyromagnétiques et nombres de spin. Ensuite, dès les années 1950, la découverte des notions de déplacement chimique et de couplage scalaire ouvrit la voie aux applications en chimie organique, grâce à la résonance du proton, le noyau le plus sensible, et en travaillant à l'état liquide où, grâce aux mouvements browniens des molécules, la haute résolution est naturelle. Plus ancienne application chimique de la RMN donc, on peut parfois entendre dire que ce domaine de recherche est en perte de vitesse. En fait, il n'en est rien car les problèmes structuraux posés par les chimistes sont d'une complexité toujours croissante. Sans être exhaustifs, les quatre paragraphes développés ci-dessous montreront au lecteur autant de thèmes très vivants et dynamiques de la recherche RMN en chimie organique.

## Vers une attribution automatique des structures

par Jean-Marc Nuzillard

L'analyse structurale est indissociable de la synthèse organique ou de l'isolement des substances naturelles. Il est bien rare que la structure, *a priori* inconnue, d'une substance isolée soit déterminée avec le seul appui d'arguments chimiques : le plus souvent le recours à des techniques physico-chimiques d'analyse est nécessaire. La structure moléculaire d'une substance organique pure est considérée comme complètement déterminée lorsque la nature et l'enchaînement de tous atomes qui la composent sont connus (structure 2D), ainsi que la configuration absolue des éventuels centres asymétriques (structure 3D). En dehors du cas relativement rare où des cristaux de taille suffisante sont disponibles pour permettre une analyse par diffraction des rayons X, l'analyse structurale relève de l'interprétation de données telles que celles obtenues par l'étude de l'absorption des rayonnements infrarouges (IR) et ultraviolets (UV), par spectrométrie de masse (SM) et par spectroscopie de RMN. Aucune de ces techniques ne donne directement une structure, mais chacune propose des indices qu'il faut prendre en compte pour en proposer une, voire plusieurs,

qui seraient compatibles avec le résultat des mesures disponibles. La SM à haute résolution fournit une formule brute pour la substance étudiée, ce qui limite considérablement le champ des possibilités. Les chromophores révélés par les spectroscopies IR et UV et les fragmentations observées en SM ne sont généralement pas suffisantes pour identifier une substance de complexité structurale élevée. La RMN joue un rôle particulier dans ce domaine car les atomes « actifs » (dont les noyaux n'ont pas un spin nul) deviennent le centre de chromophores individualisés par leur déplacement chimique. Ainsi, le spectre de RMN du  $^{13}\text{C}$  du camphre, de formule brute  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$ , montre dix résonances. Son pic à 220 ppm est une signature pour une cétone et l'absence de toute autre résonance au-delà de 70 ppm montre qu'il n'y a pas de double liaison carbone-carbone. La puissance et le succès de la RMN comme outil analytique sont cependant liés à l'existence d'interactions de couplage entre spins nucléaires. L'intensité du couplage indirect (ou scalaire) s'atténue en effet avec le nombre de liaisons qui sépare deux spins nucléaires. L'intensité d'un couplage entre deux spins séparés par  $n$  liaisons chimiques est désignée par le symbole  $^nJ$  et se mesure en Hz. Deux spins scalairement couplés, chacun étiqueté par son déplacement chimique, sont nécessairement « proches » dans la molécule. La RMN permet donc de

compléter l'inventaire des sous-structures anonymes (les chromophores des spectroscopies IR et UV) par des informations centrées sur chaque atome (les déplacements chimiques) et par des informations « à deux centres » (les couplages). L'ensemble des méthodes qui ont permis depuis 35 ans de collecter des données de proximité entre atomes ont fait de la RMN une technique remarquablement fiable d'analyse structurale.

La mise en évidence expérimentale des relations de couplage entre spins s'effectue de manière pratique grâce aux spectres de RMN 2D de corrélation des déplacements chimiques. Les plus utilisés sont les spectres COSY (CORrelations Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Un spectre COSY révèle les couplages entre spins de même nature ( $^1\text{H}$  et  $^1\text{H}$ ). Les spectres HSQC et HMBC révèlent des couplages entre spins de natures différentes ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ou  $^1\text{H}$  et  $^{15}\text{N}$ ), respectivement à travers une liaison ( $^1J$ ) et plusieurs liaisons ( $^nJ$ ,  $n > 1$ ). Ces spectres 2D, ainsi que les spectres 1D  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  usuels, sont, avec l'appui de la SM, suffisants pour proposer des structures 2D de « petites » molécules organiques (masse moléculaire inférieure à  $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), tout en ne faisant appel qu'à de très rudimentaires règles de correspondance entre valeurs de déplacement chimique et nature de l'environnement chimique. La pratique de cette méthode d'analyse conduit à penser que la tâche peut être effectuée par un ordinateur.

L'intervention des ordinateurs pour l'analyse structurale des petites molécules organiques est pratiquement contemporaine de l'intelligence artificielle [1]. Les premiers efforts ont porté sur l'assemblage de fragments moléculaires proposés à partir des valeurs des déplacements chimiques en RMN du  $^{13}\text{C}$ . Les limitations de ces méthodes sont celles liées à l'état de l'art en RMN à l'époque où elles ont été proposées. L'utilisation des couplages révélés par la RMN 2D est à l'origine d'une augmentation importante de la capacité des logiciels d'analyse structurale à traiter des problèmes réels. Dans un premier temps, les programmes basés sur l'analyse des déplacements chimiques ont été modifiés pour tenir compte des couplages, puis ces derniers sont devenus moteurs pour la proposition de structures, avec une prise en compte des valeurs de déplacement chimique pour le classement *a posteriori* des solutions d'un problème par ordre de vraisemblance. Le logiciel LSD est le premier à avoir été conçu pour fonctionner à partir des données contenues dans les spectres 2D COSY, HSQC et HMBC, et sans recourir à une base de données de déplacements chimiques [2].

À l'origine, le logiciel LSD a été écrit pour traiter des problèmes « idéaux » pour lesquels les spectres COSY ne montrent que des couplages à travers trois liaisons ou deux liaisons dans le cas de protons géminés de déplacements chimiques différents. De même, seuls les couplages  $^2J$  et  $^3J$  devaient être visualisés par les spectres HMBC. Dans ce cadre, une corrélation COSY  $^3J$  révèle l'existence d'une liaison entre deux atomes « lourds » (tous, sauf les hydrogènes) et une corrélation HMBC ouvre le choix entre l'identification de deux atomes lourds liés ensemble ou de chacun lié à un atome intermédiaire commun *a priori* inconnu (figure 1). La combinaison des informations contenues dans les spectres HSQC, COSY et HMBC fournit donc un ensemble de relations de proximité entre atomes lourds. Dans la pratique, chacun d'entre eux est identifié par un numéro d'ordre arbitraire, leur nombre et leur nature chimique étant imposés par la connaissance, réelle ou supposée, de la formule brute de la molécule étudiée. Trouver sa formule

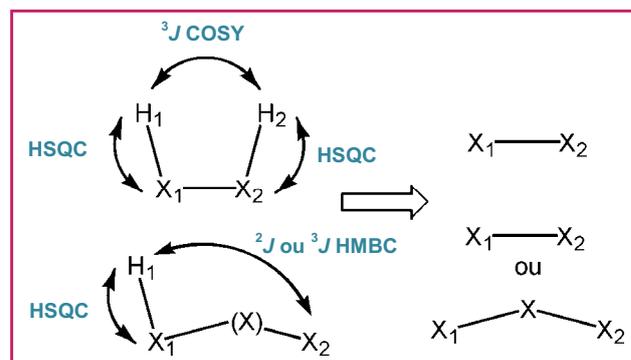


Figure 1 - Principe de la création de relations de proximité entre atomes lourds à partir des spectres COSY et HMBC.

développée plane revient donc à associer à chaque numéro d'atome la liste des numéros de ses voisins, ou, en d'autres termes, à construire sa matrice de connectivité. Le nombre de voisins de chaque atome est défini indirectement par l'utilisateur en indiquant sa nature chimique, son hybridation et le nombre d'hydrogènes qu'il porte. Le statut des atomes est facilement établi pour les atomes de carbone, mais parfois plus compliqué à proposer pour les autres atomes lourds. L'utilisateur peut être conduit à formuler des hypothèses sur les statuts et à les tester séparément.

Les corrélations COSY et d'éventuelles liaisons directement proposées par l'utilisateur fournissent un ensemble initial de liaisons. Les corrélations HMBC sont exploitées en considérant successivement les hypothèses d'un couplage  $^2J$  puis d'un couplage  $^3J$  avec, dans ce dernier cas, la nécessité de faire une hypothèse supplémentaire sur la nature de l'atome intermédiaire inconnu. La prise en compte de chaque corrélation HMBC entraîne ainsi la formation d'une ou deux liaisons. Les corrélations qui ne sont pas encore traitées mais dont l'interprétation est déjà contenue dans l'ensemble des liaisons construites sont automatiquement marquées comme inutiles, ce qui les élimine de la liste des corrélations restant à traiter. L'ordre dans lequel les corrélations HMBC sont exploitées a un fort impact sur le temps total de résolution d'un problème. Il est impératif de traiter le plus tôt possible les données qui ne donnent pas lieu à hypothèse. Celles et ceux qui ont au moins une fois pratiqué le jeu de sudoku comprendront aisément ce que cela signifie. Si toutes les corrélations HMBC à traiter donnent lieu à la formulation d'hypothèses, il faut considérer en priorité les moins ambiguës. Pour ce faire, le logiciel LSD traite d'abord les corrélations des atomes qui possèdent le moins de voisins inconnus.

En considérant par exemple qu'au cours de l'analyse des données du camphre, la situation est celle décrite par la figure 2 et que toutes les corrélations des atomes C-2, C-8, C-9 et C-10 ont déjà été exploitées, les corrélations de C-6 et de H-6 deviennent prioritaires car tous les voisins de C-6 sont connus. La corrélation de C-6 avec H-5 serait alors interprétée comme suit. La corrélation ne peut être considérée comme de type  $^2J$  car alors C-5 serait lié à C-6. Le carbone C-6 étant hybridé  $sp^3$  et portant deux hydrogènes, il ne possède que deux voisins « lourds ». C-2 et C-7 sont connus comme les voisins de C-6 et donc C-5 ne peut pas être aussi lié à C-6. Cela signifie que la corrélation étudiée est de type  $^3J$  et donc que C-5 et C-6 sont tous les deux liés au même atome intermédiaire encore inconnu. Comme cet atome est un voisin de C-6, ce ne peut être que C-2 ou C-7. Il n'est pas possible de lier C-2 et C-5 car les quatre voisins de C-2 sont connus et C-5 n'en fait pas partie. La seule possibilité pour interpréter

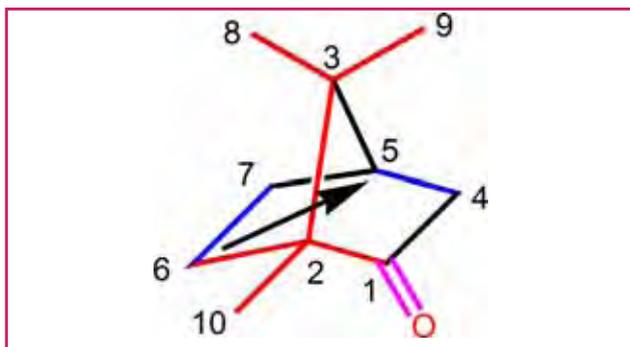


Figure 2 - Structure de la molécule de camphre en cours de construction.

La liaison dessinée en rose est déduite du déplacement chimique de C-1 (220 ppm), celles en bleu proviennent de l'analyse du spectre COSY, celles en rouge ont été proposées suite à l'analyse de corrélations HMBC et celles en noir n'existent pas encore. L'analyse de la corrélation entre C-6 et H-5 conduit sans ambiguïté à la formation de la liaison entre C-7 et C-5.

la corrélation HMBC entre C-6 et H-5 est donc de lier C-7 et C-5. Les corrélations encore non interprétées de C-1, C-3, C-4, C-5 et C-7, H-4, H-5 et H-7 auraient potentiellement donné lieu à la formulation d'hypothèses. En imaginant que C-2 n'ait pas été précédemment lié à C-1, il aurait été possible de lier C-5 avec C-2. La corrélation étudiée aurait eu alors deux interprétations possibles, chacune devant être explorée indépendamment de l'autre.

Il est simple de réduire la complexité de l'analyse en restreignant, quand c'est légitime, la liste des voisins possibles d'un atome. Dans le spectre de RMN  $^1\text{H}$  du camphre, les hydrogènes portés par C-8, C-9 et C-10 sont « blindés » (entre 0,8 et 1 ppm) et apparaissent sous forme de singulets. Cela signifie que ces carbones sont liés à des carbones quaternaires. L'utilisateur peut demander d'imposer cette contrainte aux solutions proposées.

Il est rare que la seule analyse des spectres COSY, HSQC et HMBC soit suffisante pour assurer à tous les atomes la fourniture d'une liste complète de voisins. Il est alors nécessaire d'apparier systématiquement tous les atomes à qui il manque des liaisons pour obtenir une structure moléculaire chimiquement valide. Cette étape est généralement suivie d'une phase de validation qui élimine les structures pour lesquelles l'appariement final est impossible, où il est impossible de placer les liaisons multiples, qui n'incluent pas un ou plusieurs éléments de sous-structure fournis par l'utilisateur, ou qui présentent au moins une double liaison en jonction de deux cycles de petite taille. Les données disponibles pour le camphre fournissent deux structures identiques qui se distinguent toutefois par permutation de C-2 (57 ppm) et de C-3 (47 ppm). Le classement par ordre de vraisemblance décroissante des structures et des attributions produites, en fonction de la compatibilité entre les déplacements chimiques mesurés et ceux obtenus par prédiction, n'est pas effectué par LSD. La prédiction des déplacements chimiques est, à de rares exceptions près, du ressort de logiciels commerciaux. Le format de production des solutions par LSD permet à l'utilisateur d'effectuer lui-même le classement au moyen du logiciel de son choix.

Des récentes modifications du logiciel LSD concernent le traitement de cas qui s'éloignent de l'idéalité et autorisent le traitement de données qui contiennent des corrélations  $n^{\text{J}}$  COSY et HMBC avec  $n > 3$ . Il est maintenant possible d'attribuer à chaque corrélation un intervalle de longueurs de chemins de couplage et d'imposer un nombre maximum de corrélations à très longue distance.

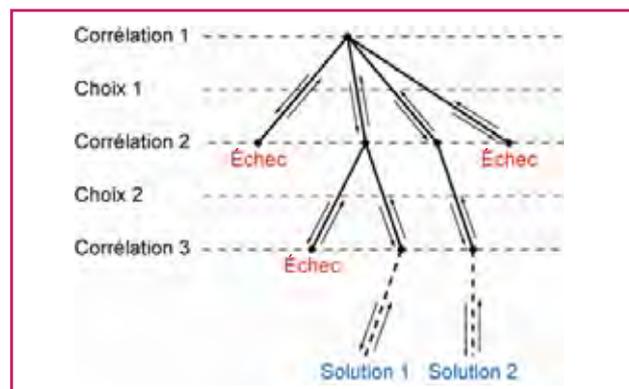


Figure 3 - Représentation schématique de l'analyse successive des corrélations : chacune d'elle ouvre un ou plusieurs choix pour son interprétation.

Certains choix conduisent à des contradictions logiques qui rendent inutile l'analyse ultérieure d'une corrélation. À la suite d'un tel échec, les possibilités les plus récentes encore inexploitées sont envisagées, jusqu'à la prise en compte de toutes données du problème et la production d'une solution. Toutes les solutions sont recherchées en remettant en cause tous les choix possibles.

Le logiciel LSD étudie systématiquement toutes les structures possibles issues des données qui lui sont fournies et ne délivre de solution que lorsque toutes les informations disponibles sont exploitées. Bien entendu, lorsqu'une hypothèse est faite en cours de résolution d'un problème, elle peut se révéler ultérieurement fautive, c'est-à-dire infructueuse pour la production d'une solution. Toutes les hypothèses réalisées entre une hypothèse donnée et le moment où une contradiction est révélée sont reconsidérées en commençant par celles qui sont les plus proches du point d'échec (figure 3). LSD constitue un prototype de générateur de structure déterministe, où le même problème fournit toujours le même ensemble complet de solutions au problème posé. Une autre approche, dite « stochastique » existe et utilise une stratégie empruntée à la technique d'optimisation du recuit simulé. Une molécule initiale est construite « au hasard » et les atomes sont permutés selon des règles qui font intervenir un générateur de nombres aléatoires pour augmenter le nombre de contraintes spectroscopiques respectées. Les générateurs stochastiques sont susceptibles de fournir des solutions à des problèmes complexes qu'un générateur de structures déterministe ne pourrait pas traiter en un temps raisonnable.

Les logiciels d'analyse structurale automatique ne font pas encore partie des outils de bureau usuels des chimistes organiciens, pour un ensemble de raisons dont il est difficile d'évaluer l'importance relative et qui pourrait constituer un sujet de recherche dans le domaine des sciences humaines. Les efforts vers des systèmes informatiques plus conviviaux et plus efficaces que ceux proposés actuellement feront peut-être que, dans un proche avenir, la tâche principale d'un spectromètre de RMN sera de fournir ce que les chimistes désirent, à savoir des structures moléculaires plutôt que des spectres.

## Nouveaux développements méthodologiques en RMN inspirés de l'imagerie

par Nicolas Giraud

La spectroscopie de RMN par transformée de Fourier s'est imposée comme un outil de choix pour observer, décrire

et comprendre les structures des molécules, mais également les phénomènes dynamiques et les réactivités toujours plus complexes qui régissent les processus chimiques étudiés de nos jours. La plupart des développements méthodologiques qui ont été effectués en RMN depuis plus de 50 ans ont eu pour principal objectif de repousser continuellement ses limites expérimentales, en cherchant à améliorer la vitesse d'acquisition et la résolution des spectres.

Dans ce contexte, la mise en œuvre de techniques issues de l'imagerie médicale a donné lieu, au cours de la décennie passée, à une série d'innovations tout à fait originales. En revisitant le concept même d'imagerie par résonance magnétique (IRM), elle a permis d'effectuer des progrès spectaculaires dans le domaine de la spectroscopie.

## RMN ultra-rapide

### Flashback : RMN par transformée de Fourier et spectre multidimensionnel

Au tournant des années 1970, les travaux menés par Richard Ernst et ses collaborateurs sur la transformée de Fourier dans des liquides ont permis d'installer définitivement la RMN comme une technique d'investigation de choix pour la communauté des chimistes [3]. Son principe repose sur l'excitation cohérente des spins nucléaires (par exemple les protons  $^1\text{H}$ ) au moyen d'un champ radiofréquence puissant et de courte durée (appelé *impulsion*), suivie par l'enregistrement de l'évolution de l'aimantation nucléaire de ces noyaux au cours de leur relaxation (*figure 4*).

La transformée de Fourier du signal ainsi acquis permet de mesurer, sur le spectre qui en résulte, les fréquences de résonance des signaux (ou pics) attribuables aux protons des différentes parties de la molécule analysée. Dans la butan-2-one dont le spectre est représenté en *figure 4*, on observe trois signaux distincts qui peuvent être attribués respectivement aux protons ( $\text{H}^1$ ) du groupement  $\text{CH}_2$  et aux protons ( $\text{H}^2$  et  $\text{H}^3$ ) des deux méthyles. Il est possible d'obtenir une information encore plus précise sur la structure de cette molécule, telle que la proximité entre les différents protons : le groupement  $\text{CH}_2$  est ici lié à un premier groupement  $\text{CH}_3$ , alors que le deuxième méthyle est séparé de ceux-ci par le groupement carbonyle de la fonction cétone. Pour atteindre ce niveau de détail de l'architecture moléculaire, il faut néanmoins recourir à une analyse de la structure fine (ici, les couplages scalaires) de chaque signal du spectre. Malheureusement, la résolution de ce type d'expérience à *une* dimension (ou 1D), pourtant

fondatrice de la spectroscopie RMN moderne, s'est très vite avérée dépassée par la complexité des spectres de molécules dont la taille est telle que de trop nombreux signaux viennent se superposer.

Dès le début des années 1970, un nouveau développement introduisit le principe des expériences multidimensionnelles, qui sont la clef de voûte de nombreuses analyses structurales ou dynamiques [4]. Une expérience multidimensionnelle comprend plusieurs délais d'évolution de l'aimantation nucléaire séparés par des périodes dites de *mélange*. Au cours d'une de ces périodes de mélange, l'aimantation peut être manipulée par des combinaisons de champs radiofréquences (ou impulsions) de manière à être transférée (ou échangée) entre les différents spins, si ceux-ci sont couplés par l'interaction que l'on souhaite sonder (couplage scalaire, interaction dipolaire...). Le spectre qui peut être obtenu à partir du signal enregistré lors d'une expérience 2D a ainsi *deux* dimensions (autant qu'il y a de délais d'évolution de l'aimantation). Sur ce spectre, il est non seulement possible de mesurer les fréquences de résonance (ou déplacements chimiques) de chaque proton (de manière analogue à une expérience 1D), mais également d'observer des *corrélations*, générées pendant les périodes de mélange, qui sont les marqueurs d'un transfert d'aimantation d'un noyau à l'autre. Ces corrélations permettent par exemple de déterminer la proximité des protons  $\text{H}^1$  et  $\text{H}^3$  dans la butan-2-one (*figure 5*).

Une caractéristique fondamentale de ce type de spectroscopie réside dans le fait que l'observation de corrélations sur un spectre 2D (ou 3D, 4D...), nécessite que l'évolution de l'aimantation nucléaire soit enregistrée au cours de *deux* (respectivement *trois*, *quatre*...) périodes d'évolution d'une même séquence, de manière *indépendante*. Historiquement, ceci a été rendu possible par l'acquisition d'une série d'expériences 1D comportant le même délai direct d'acquisition  $t_2$ , mais correspondant chacune à une valeur différente d'un deuxième délai indirect d'évolution  $t_1$ , comme illustré par la *figure 5*. Dans cette approche historique, le temps d'acquisition d'un spectre multidimensionnel est alors directement proportionnel au nombre de sous-expériences 1D qui le composent (et donc à la résolution qui doit être atteinte), ce qui peut conduire à une durée totale d'expérience très longue (jusqu'à plusieurs jours).

### Encodage spatial d'une dimension temporelle

La RMN ultra-rapide [5] (« ultrafast » ou « single scan NMR ») a révolutionné la façon d'enregistrer ces expériences multidimensionnelles. Cette nouvelle approche consiste en

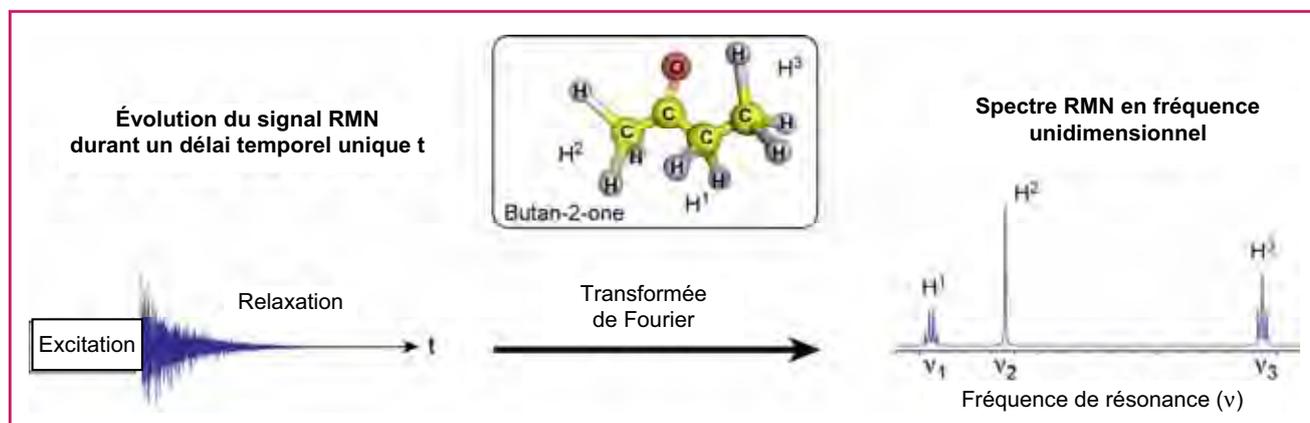


Figure 4 - Principe d'acquisition et de traitement du signal RMN, illustré ici à travers l'enregistrement du spectre RMN  $^1\text{H}$  de la butan-2-one (spectre simulé).

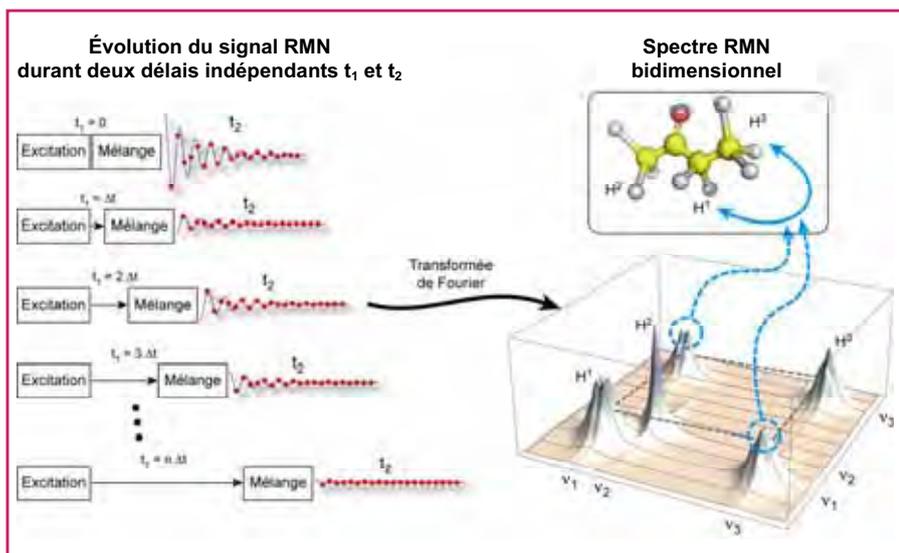


Figure 5 - Représentation schématique du principe d'acquisition d'un spectre de corrélation 2D, sur la butan-2-one (spectre simulé).

une acquisition simultanée de plusieurs sous-expériences dans des « tranches » distinctes de l'échantillon. Au lieu d'enregistrer les unes après les autres la série d'expériences 1D correspondant chacune à une valeur du délai d'évolution  $t_1$  (ce qui permet de reconstituer l'évolution pendant le délai  $t_1$  indépendamment de celle qui est acquise durant le délai  $t_2$ ), ces sous-expériences sont enregistrées en parallèle le long de l'échantillon. À cette fin, les différentes « tranches » sont excitées les unes après les autres, ce qui permet de laisser l'aimantation au sein de chaque tranche évoluer pendant un délai  $t_1$  différent (figure 6). On parle alors d'une *localisation spatiale* du signal, par analogie avec l'imagerie par résonance magnétique : alors qu'en IRM cette localisation permet de caractériser les différents tissus à travers le volume de l'organe analysé, en RMN ultra-rapide, elle permet de faire évoluer les différentes parties de l'échantillon pendant des durées  $t_1$  différentes. Autrement dit, la RMN ultra-rapide consiste en un encodage *spatial* d'un délai d'évolution à travers l'échantillon.

À l'image de ce qui se pratique en IRM, l'encodage spatial de l'échantillon est obtenu au moyen de gradients de champ magnétique. Lors de l'étape d'excitation, un champ magnétique dont l'intensité varie d'un bout à l'autre de

l'échantillon est appliqué : les spins nucléaires situés en des endroits différents de l'échantillon acquièrent alors une fréquence de résonance différente. Il est ainsi possible d'exciter successivement chaque tranche au moyen d'un champ radiofréquence résonant précisément à la fréquence de résonance qui lui a été attribuée. Dans la suite de l'expérience, une période de mélange permet de corréler les noyaux observés à travers le spectre 2D, puis le signal RMN est acquis au cours du délai d'évolution  $t_2$ . Durant l'acquisition du signal, l'utilisation de gradients de champ magnétique de décodage permet de séparer les évolutions durant  $t_1$  et  $t_2$  dans le signal acquis sur l'ensemble de l'échantillon. La possibilité d'encoder spatialement un délai d'évolution, puis de le décoder, permet ainsi à un détecteur unique d'effectuer en une seule fois l'acquisition parallèle de toutes ces sous-expériences, rendant possible l'enregistrement d'un spectre 2D en une fraction de seconde.

Cette technique d'acquisition a fait l'objet d'un développement continu au cours de ces dernières années. De nouvelles stratégies d'encodage spatial du délai indirect d'évolution ( $t_1$ ), mais également de détection du signal, ont permis d'améliorer la sensibilité et la résolution des séquences ultra-rapides au point de rendre possible l'acquisition, en un seul scan, non seulement de la plupart des spectres classiques de corrélation homonucléaire (fournissant des informations sur un seul type de noyaux, par exemple les protons), mais également d'expériences hétéronucléaires qui sont devenues indispensables, en particulier pour l'étude de macromolécules biologiques telles que les protéines.

Le gain substantiel en vitesse d'acquisition que représente cette méthodologie a incité un nombre croissant de groupes à mettre au point une version ultra-rapide de leurs expériences, afin d'accéder à un suivi, à une échelle de temps parfois inférieure à la seconde, des phénomènes dynamiques mis en jeu dans leurs systèmes physico-chimiques ou biologiques. De nouvelles applications ont ainsi pu être développées avec succès : le suivi par RMN multi-dimensionnelle *en temps réel* de réactions chimiques, ou plus généralement de processus dynamiques, y compris dans des échantillons solides dont l'analyse par RMN est pourtant *a priori* plus difficile, sont ainsi devenus accessibles dans un certain nombre de cas.

Dans ce contexte, Patrick Giraudeau et ses collaborateurs se sont également intéressés à la question de la quantitativité (qui constitue un enjeu majeur en chimie analytique) des expériences de RMN de type ultra-rapide : les développements qu'ils ont effectués pour améliorer la qualité, et notamment la résolution des spectres enregistrés par cette méthode, leur ont permis de déterminer les conditions d'une quantification précise de mélanges de métabolites par des méthodes ultra-rapides (figure 7).

L'application de ces méthodes rapides à la mesure d'enrichissements isotopiques dans des échantillons biologiques (fluide, cellule, tissu...) pourrait fournir des indications précises, résolues en temps, sur les

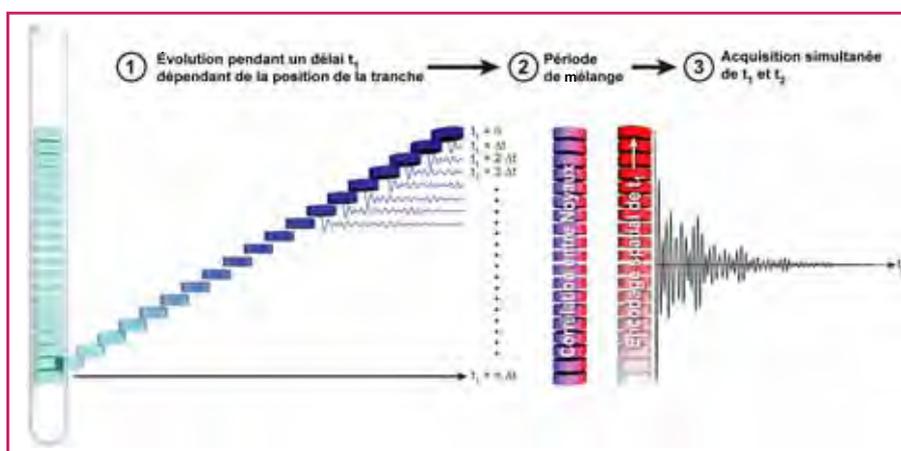


Figure 6 - Représentation schématique du principe d'acquisition d'une expérience 2D ultra-rapide.

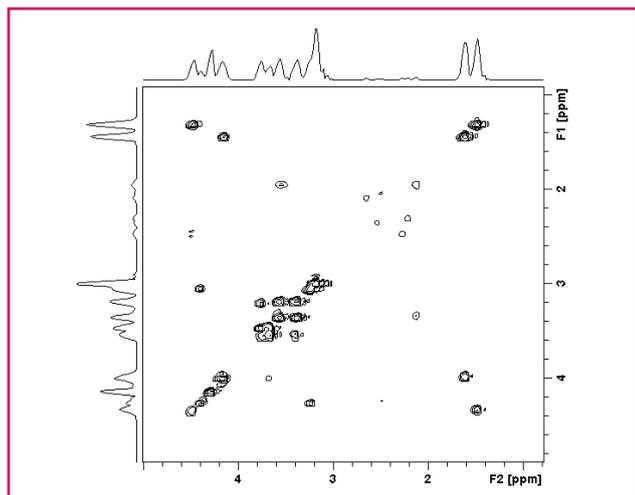


Figure 7 - Spectre 2D ultra-rapide corrélant les protons dans un mélange de métabolites (100 mM), obtenu en 0,2 s sur un spectromètre 500 MHz équipé d'une cryosonde (P. Giraudeau et coll., non publié).

voies métaboliques permettant la synthèse, la modification et la dégradation des différentes molécules impliquées dans les différents cycles catalytiques qui décident de la vie et de la mort des cellules et autres micro-organismes [6].

Finalement, tel un retour aux sources, certains développements récents en RMN ultra-rapide pourraient demain être à leur tour à l'origine d'une évolution notable dans le domaine de l'imagerie. En effet, Lucio Frydman et ses collaborateurs ont mis au point une approche permettant d'extraire de chaque *voxel* observé lors d'une expérience d'IRM, l'information spectroscopique (les *déplacements chimiques*) associée aux tissus analysés, ouvrant la voie à une analyse à l'échelle moléculaire de leur composition chimique respective [7].

### RMN avec encodage spatial en fréquence : vers une spectroscopie ultra-résolue

#### Principe de l'encodage fréquentiel

Si la RMN ultra-rapide peut être définie comme correspondant à un encodage *temporel* de l'échantillon, une deuxième approche reposant cette fois-ci sur un encodage *fréquentiel* a ouvert la voie depuis quelques années à une nouvelle génération d'expériences au fort potentiel analytique. La *figure 8* illustre le principe de cette technique, qui consiste à exciter, dans des parties distinctes de l'échantillon, les noyaux ayant des fréquences de résonance différentes, et de contrôler ensuite leur évolution au sein de chacune de ces « tranches ».

Chaque proton de l'oxyde de propylène est excité dans une « tranche » distincte, conduisant à une localisation spatiale de son signal RMN : en d'autres mots, le spectre RMN de cette molécule a été encodé le long de l'échantillon. Expérimentalement, ceci est rendu possible par l'utilisation simultanée d'un gradient de champ magnétique et d'impulsions sélectives (capables d'exciter, au sein d'une molécule donnée, seulement les spins qui résonnent à une fréquence de résonance unique).

### Résolution et vitesse d'analyse en RMN : la quadrature du cercle

L'intérêt de cette approche par encodage spatial des fréquences de résonance du spectre peut être illustré à travers le cas de l'analyse structurale de la strychnine (*figure 9*). Dans cette molécule de taille modeste, il est possible d'obtenir des informations sur sa structure (conformation des différents cycles...) si l'on est capable de mesurer les couplages scalaires ( $J$ ) entre les différents protons.

Imaginons par exemple que l'on souhaite connaître le détail des couplages autour du proton  $H^{12}$  : la stratégie d'analyse assez communément répandue consiste à acquérir dans un premier temps un spectre de type COSY qui permet de déterminer quels sont les protons couplés entre eux, et ainsi de décrire de proche en proche l'enchaînement des sites de la molécule (carbones...) portant des hydrogènes. Sur le spectre COSY de la strychnine, il est par exemple possible de corrélérer les protons  $H^{11}$ ,  $H^{12}$  et  $H^{13}$  qui sont situés sur des carbones voisins. Cette étape permet d'attribuer à chaque proton de la strychnine sa fréquence de résonance (ou déplacement chimique).

Ensuite, l'identification et la mesure des couplages scalaires entre les différents protons de la molécule nécessitent en général de procéder à l'analyse d'un grand nombre de spectres 2D. L'expérience  $J$ -résolue fournit pour chaque proton l'ensemble des couplages expérimentés par celui-ci. Quand les spectres  $J$ -résolus s'avèrent trop complexes à analyser (ce qui est le cas pour la strychnine), des expériences de type SERF (SElective ReFocusing) permettent alors d'extraire les couplages un par un, ce qui les rend alors facilement mesurables. L'inconvénient majeur de cette stratégie est qu'elle est très coûteuse en temps, non seulement expérimental (il faut consacrer beaucoup de temps à acquérir un grand nombre de spectres RMN), mais également d'analyse car l'étude de l'ensemble des spectres constitue un processus relativement long.

### De l'imagerie médicale à l'imagerie spectroscopique : vers une analyse RMN accélérée

Une autre approche, plus économe en temps, consiste donc à encoder le spectre de la strychnine le long du tube RMN (*figure 10*).

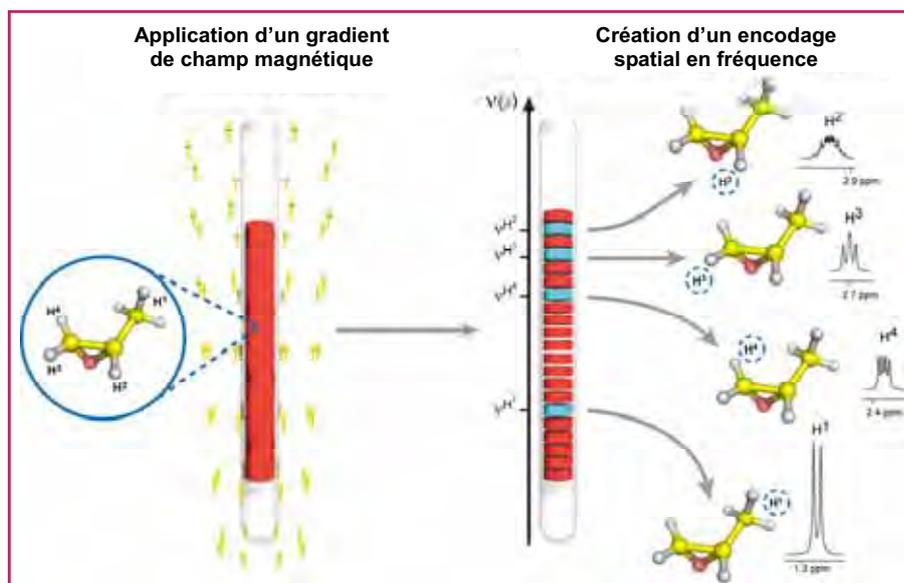


Figure 8 - Représentation schématique de l'encodage spatial en fréquence d'un échantillon RMN.

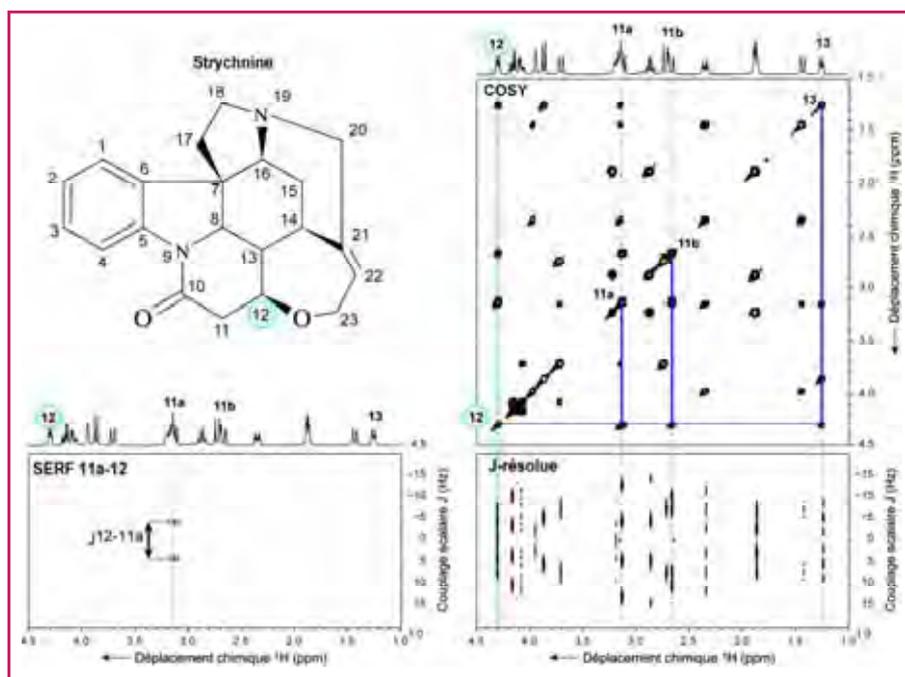


Figure 9 - Les spectres 2D de corrélation entre protons sont acquis classiquement pour analyser des molécules organiques telles que la strychnine, c'est-à-dire pour déterminer les déplacements chimiques et les couplages pour l'ensemble des protons de la structure étudiée.

L'idée extrêmement simple derrière cet encodage consiste à manipuler, dans chaque tranche de l'échantillon, l'aimantation de chaque spin pris individuellement de façon à ce que seul le couplage scalaire que l'on souhaite mesurer

exactement nécessaire à l'obtention de l'information souhaitée.

La haute résolution observée sur les spectres enregistrés avec un encodage fréquentiel de l'échantillon et l'extrême

donne un signal. Autrement dit, alors qu'en IRM l'encodage spatial généré par le gradient de champ magnétique du spectromètre permet de visualiser les différents tissus à travers la partie du corps observée, il sera possible dans notre cas d'imager les différents couplages à travers l'échantillon.

Dans cet esprit, une nouvelle expérience dite de *refocalisation sélective* avec encodage par gradient (G-SERF [8]) a été développée, qui permet d'acquérir des spectres 2D donnant un accès direct à l'attribution et à la mesure de tout le réseau de couplages existant autour du site de la molécule que nous souhaitons analyser (figure 11).

Dans le spectre G-SERF acquis sur l'échantillon de strychnine pour l'analyse des couplages impliquant  $H^{12}$ , chaque couplage peut être facilement mesuré, et surtout identifié, puisqu'il donne un signal à la fréquence de résonance du proton qui est couplé à  $H^{12}$ . Alors qu'une batterie d'expériences et un long processus d'analyse sont nécessaires en utilisant les méthodes classiques, cette nouvelle approche inspirée de l'imagerie permet de rassembler sur un seul spectre l'information qui est

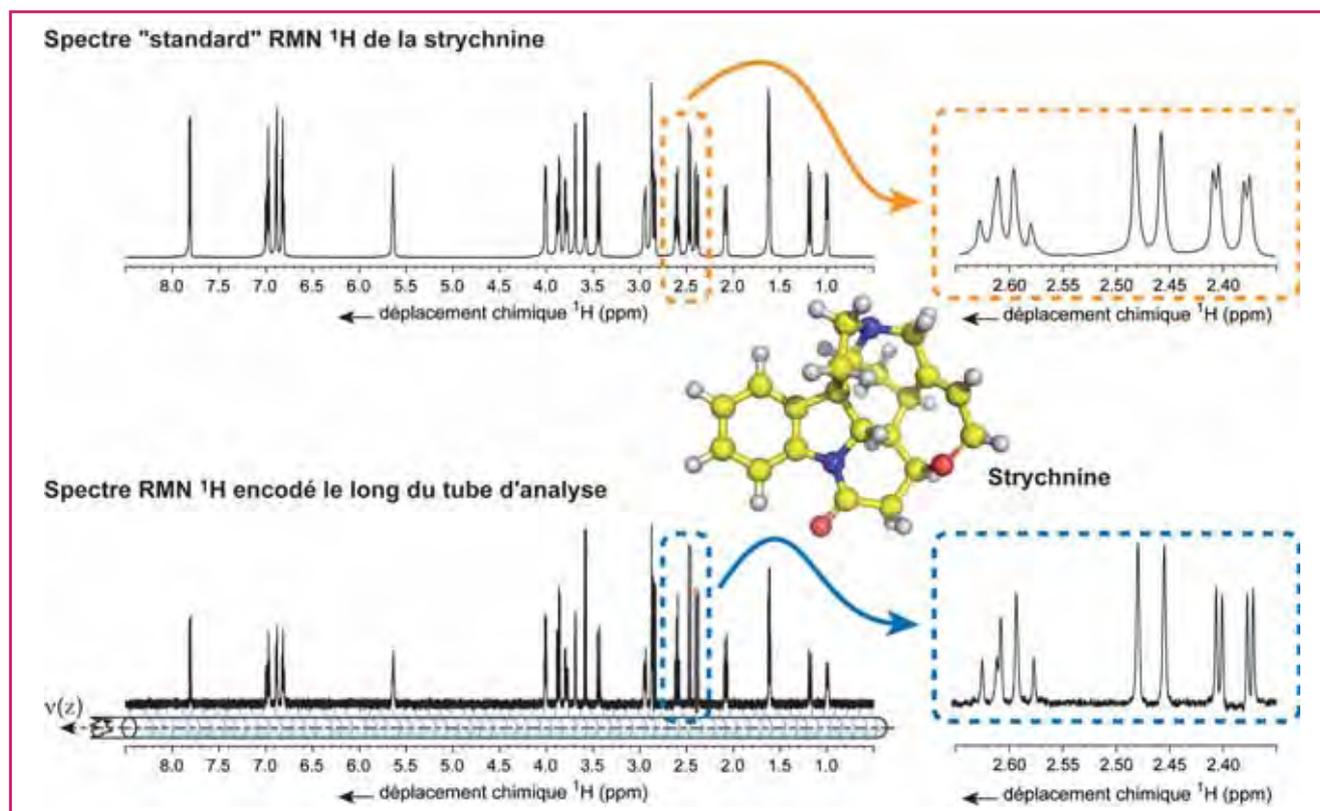


Figure 10 - Spectres 1D  $^1H$  enregistrés à partir d'un échantillon de strychnine (solvant :  $CDCl_3$ ), sans (en haut) et avec (en bas) encodage spatial en fréquence.

Un tube d'analyse RMN est dessiné le long du spectre encodé pour symboliser la localisation spatiale de chaque signal.

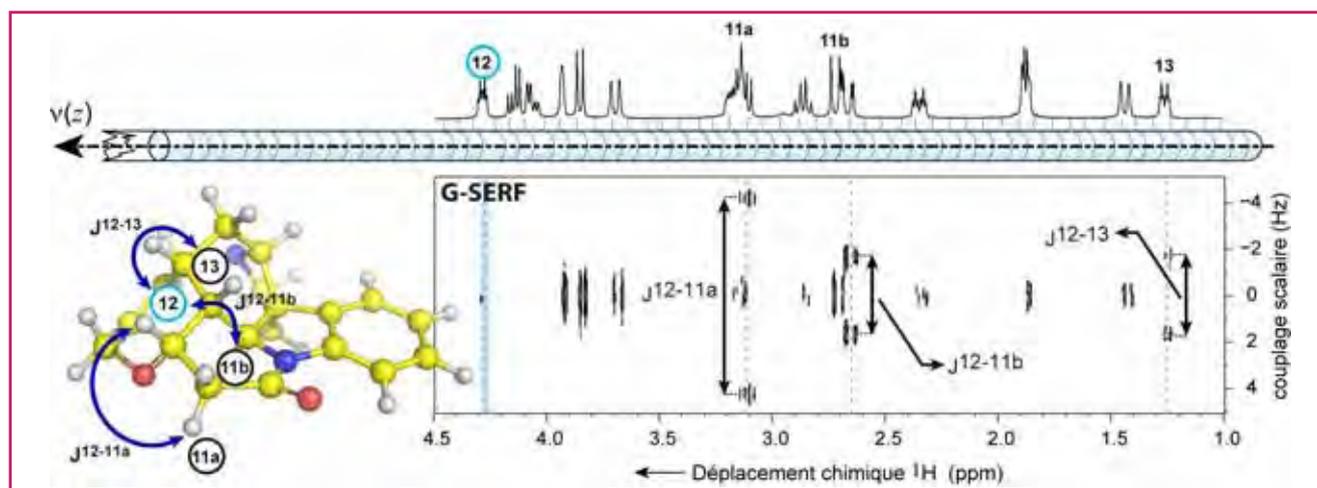


Figure 11 - Spectre 2D  $^1\text{H}$  G-SERF enregistré pour l'édition du réseau de couplages scalaires autour du proton  $\text{H}^{12}$  dans un échantillon de strychnine (solvant :  $\text{CDCl}_3$ ).

simplicité de leur contenu analytique ont fait de cette technique un outil particulièrement prometteur pour l'étude de molécules complexes ou de grande taille. Cette approche a été utilisée avec succès aussi bien pour la mesure résolue de l'ensemble des déplacements chimiques des protons d'une molécule, que pour l'étude de réseaux de couplages à l'image de l'analyse détaillée des différents sites de la strychnine présentée ici. Une application particulièrement prometteuse de cette technique est la visualisation d'énantiomères dissous dans un solvant cristal liquide chiral (voir la contribution de P. Lesot et O. Lafon ci-dessous) : l'ensemble des couplages dipolaires résiduels (RDC) proton-proton, qui constituent autant de sondes de la structure et de l'orientation de chaque énantiomère dans la phase cristal liquide, a pu être mesuré et attribué pour un mélange d'énantiomères modèles en un temps inférieur à celui requis par les techniques classiques de haute résolution.

## Spectroscopie RMN dans les solvants anisotropes chiraux... ou comment détecter le « chant » magnétique de molécules (pro)chirales dans un univers dissymétrique !

par Philippe Lesot et Olivier Lafon

La préparation, puis l'analyse de molécules énantiopures est un enjeu clef dans de nombreuses applications chimiques, depuis la pharmacologie (substances bioactives) jusqu'à la chimie des matériaux (contrôle des propriétés des polymères), en passant par l'agrochimie (herbicides et insecticides), ou la chimie des arômes et des parfums. D'un point de vue fondamental, l'analyse stéréochimique est indispensable pour comprendre les mécanismes réactionnels en (bio)chimie. Cependant, les outils classiques (méthodes optiques, chromatographie chirale en phase liquide ou vapeur, RMN isotrope en présence d'agents chiraux énantiopurs) ne sont pas toujours efficaces et sont loin d'être universels [9]. L'un des verrous lié à la mise au point de nouvelles synthèses asymétriques est très souvent l'analyse stéréochimique : proposer aux chimistes des alternatives analytiques efficaces est donc un défi permanent.

La RMN présente deux atouts : i) sa quantitativité autorise *a priori* la mesure des proportions relatives des composants

d'un mélange ; et ii) puisque les fréquences de résonance dépendent de l'agencement et de la dynamique des atomes, il s'agit d'une méthode d'analyse locale permettant de sonder directement la stéréochimie à l'échelle moléculaire. Néanmoins, la RMN possède une limitation importante, puisqu'elle ne permet pas, seule, de distinguer le signal de deux énantiomères (molécules images l'une de l'autre dans un miroir mais non superposables) ou d'éléments énantiotopes (éléments moléculaires interchangeable par une des opérations de symétrie suivantes : symétrie par rapport à un plan, inversion ou rotation-réflexion). En effet, la symétrie axiale du champ magnétique ( $B_0$ ) du spectromètre RMN rend leurs propriétés magnétiques identiques, contrairement aux diastéréoisomères (molécules non superposables) ou éléments diastéréotopes (éléments moléculaires qui ne peuvent être échangés par une opération de symétrie). Ils sont donc indétectables si aucune interaction supplémentaire n'intervient pour lever cette dégénérescence [9].

Discerner des énantiomères (*R/S*, +/-) par RMN (sans les transformer chimiquement en diastéréoisomères) impose de les plonger dans un environnement dépourvu de plan de symétrie, comme, par exemple, un milieu comportant une concentration significative de molécules chirales énantiomériquement pures. En solvant isotrope, ces molécules homochirales jouent le rôle d'agents chiraux de complexation (ACC), de solvation (ACS) ou d'inclusion (ACI), en interagissant avec les analytes pour former des associations diastéréoisomériques. Du fait de leur homochiralité, ces agents agissent comme des sélecteurs énantiosélectifs et interagissent différemment avec des énantiomères [10]. On aboutit ainsi au concept de reconnaissance chirale, phénomène souvent au cœur de la « chimie du vivant ».

Les approches classiques, basées sur l'existence d'interactions intermoléculaires spécifiques (liaison hydrogène entre l'analyte et l'agent énantiopur, par exemple) sont généralement inefficaces pour des composés dépourvus de groupements polaires. En outre, dans un solvant isotrope, les différences de fréquences de résonance RMN entre diastéréoisomères sont parfois trop faibles (même à très haut champ magnétique) par rapport aux largeurs de raie pour être spectralement détectées.

Pour résoudre ces difficultés, un changement de paradigme est nécessaire ! Paradoxalement, cette « révolution » a été initiée à une époque où la RMN connaissait ces premiers

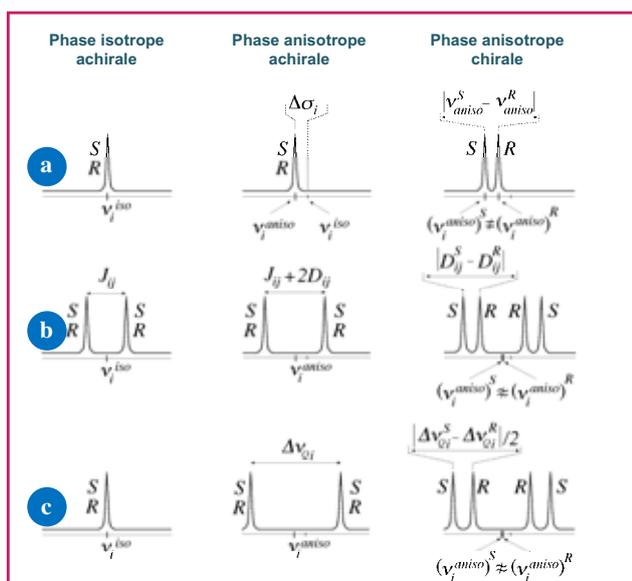


Figure 12 - Comparaison entre les différentes signatures spectrales de deux isomères « R/S » (ou directions énantiotopes « pro-R/pro-S ») sur la base d'une différence : (a) d'anisotropie de déplacement chimique, (b) de couplage dipolaire (D), et (c) d'éclatement quadrupolaire ( $\Delta\nu_Q$ ) dissous dans un liquide (achiral), une phase anisotrope achirale et une phase anisotrope chirale.

balbutiements. Ainsi, dès 1968, l'utilisation d'agents chiraux d'orientation (ACO) pour analyser des molécules (pro)chirales était proposée [10] !

Le concept des ACO repose sur une idée simple mais géniale : dans un milieu organisé et orienté chiral énantiopur, des énantiomères (ou des éléments énantiotopes) en interaction diastéréomérique avec les ACO peuvent s'aligner différemment en moyenne par rapport à l'axe du champ  $B_0$  [11]. Ces différences d'orientation sont révélées spectralement *via* différentes interactions dites « anisotropes » : i) l'anisotropie de déplacement chimique (CSA) ; ii) le couplage dipolaire (D) ; et iii) l'éclatement quadrupolaire ( $\Delta\nu_Q$ ) pour des noyaux de spin  $I > 1/2$  (figure 12) [11]. Dans cette approche, le phénomène de reconnaissance de forme est le mécanisme moteur à l'origine de l'orientation différentielle de deux énantiomères ou d'éléments énantiotopes dans les molécules prochirales. Elle ne nécessite donc pas la présence d'interactions spécifiques entre l'ACO et le soluté, et ne dépend pas uniquement de la polarité de ce dernier. De ce fait, cette méthode s'est révélée être très générale [11-12] !

La description des divers ACO publiés dans la littérature à ce jour et adaptés à l'analyse de molécules hydro- ou organosolubles dépasse le cadre de cet article. Cependant, il est possible de distinguer deux grandes catégories d'ACO : les cristaux liquides chiraux (CLC) et les gels orientés chiraux (GOC) naturellement alignés ou orientés mécaniquement par étirement. L'intérêt de ces systèmes est que leurs propriétés d'orientation et de discrimination sont plus ou moins modulables en fonction de paramètres physiques comme la concentration, la nature des composants du mélange, la température ou le degré d'étirement (contrainte mécanique).

Si la mise au point et l'utilisation de GOC préparés par exemple à partir de gélatine ou de polysaccharides (carraghénane) sont encore restreintes, une large variété de CLC a été développée depuis quatre décennies. Parmi les plus intéressants potentiellement, on peut citer les CLC préparés à

partir de surfactants anioniques, de gomme de xanthanes ou de diglucosides, mais aussi les biopolymères hélicoïdaux à base de polynucléotides (double brin d'ADN) dont le potentiel analytique semble être très prometteur [13]. Nombre de systèmes orientants chiraux originaux ont donc été explorés et décrits dans la littérature !

Dans l'arsenal des ACO, rares sont ceux réellement capables de combiner à la fois d'excellentes propriétés énantiosélectives et de solvation pour rendre leur utilisation attractive et compétitive. Parmi eux, les solutions organiques de poly- $\alpha$ -peptides (homopolymères hélicoïdaux) comme le poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate (figure 13) se sont révélées être des solvants orientants simples à préparer et très efficaces analytiquement [11-12]. Ces poly- $\alpha$ -peptides sont, en effet, capables de former des milieux orientés homogènes sur une large plage de température avec de nombreux solvants organiques usuels comme le dichlorométhane, le chloroforme, le DMF, la pyridine..., offrant ainsi une « flexibilité » impressionnante à la technique. Par ailleurs, ce type de CLC supporte une grande quantité de soluté avant de perdre ses propriétés mésogènes, ce qui est un atout essentiel pour analyser des composés de haute masse moléculaire ou détecter des noyaux magnétiquement actifs de faible abondance naturelle comme le carbone-13 ou le deutérium [11].

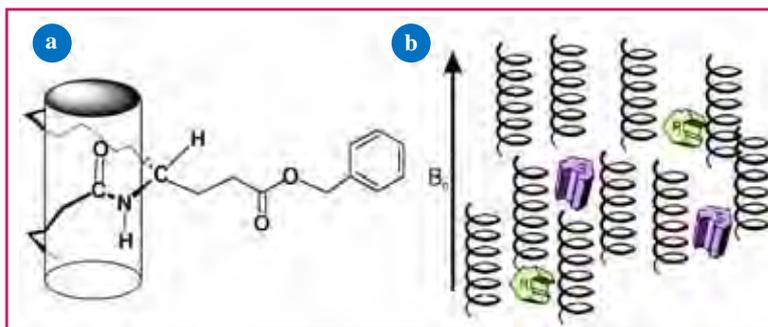


Figure 13 - (a) Structure chimique du poly- $\gamma$ -benzyl-L-glutamate ; (b) exemple schématique d'orientation différentielle d'une paire d'énantiomères vis-à-vis des hélices poly- $\alpha$ -peptides alignées sous l'action d'un champ magnétique  $B_0$ .

Expérimentalement, les CLC préparés à base de poly- $\alpha$ -peptides (de chiralité L ou D) sont efficaces pour discriminer les énantiomères de la majorité des molécules chirales organosolubles (rigides ou flexibles) comme les hydrocarbures, alcools, éthers, acides, esters, complexes métalliques, halogénoalcanes... Lorsque les séparations spectrales sont suffisantes (cf. figure 12), la détermination de la pureté énantiomérique devient possible par simple intégration ou déconvolution des signaux RMN.

La RMN dans les CLC à base de poly- $\alpha$ -peptides s'est aussi révélée être une méthode spectrale particulièrement efficace pour la discrimination d'énantiomères chiraux par la substitution  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , c'est-à-dire des molécules dont la structure (dans le cas le plus simple) est du type R-C\*HD-R' [12]. Ces discriminations s'expliquent par la possibilité de discriminer par RMN des directions énantiotopes au sein d'un milieu chiral. D'un point de vue pratique, la mesure de la pureté énantiomérique de ces énantiomères isotopiques est une méthode prometteuse pour l'étude des voies biosynthétiques ou l'authentification de biosubstances organiques naturelles telles que les acides gras (in)saturés [12].

À titre d'exemple illustratif, la figure 14 présente la série de spectres RMN 1D deutérium en abondance naturelle

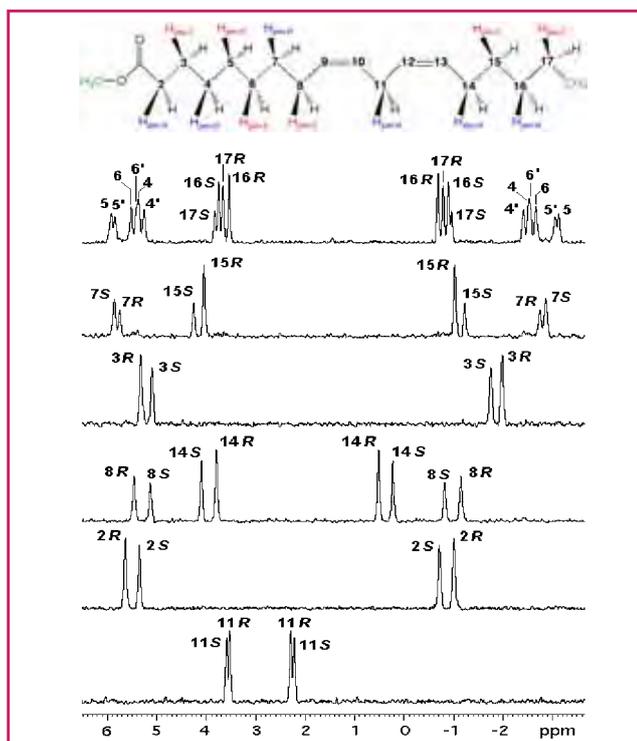


Figure 14 - Sous-spectres RMN 1D en abondance naturelle (DAN) (extraits d'une expérience 2D) associés aux différents groupes méthylènes du linoléate de méthyle (extrait de *Vernonia galamensis*) dissous dans un CLC polypeptidique.

(DAN) du linoléate de méthyle (un ester d'acide gras essentiel apporté par notre alimentation, les fameux oméga-3 et oméga-6 si médiatiques), sur laquelle nous pouvons distinguer tous les sites énantiotopes des groupements méthylène de la molécule dans un solvant CLC.

La présence de deux doublets quadrupolaires pour chaque groupe méthylène traduit la discrimination des signaux des paires d'énantio-isotopomères associés. La mesure de la surface des doublets (« R/S ») permet d'accéder à la mesure des excès énantio-isotopomériques associés à chaque groupe CH<sub>2</sub>. Couplés à des mesures de rapports isotopiques (<sup>2</sup>H/<sup>1</sup>H) par RMN 1D DAN en milieu isotrope, il devient alors possible de déterminer le fractionnement isotopique naturel site-spécifique (FINS) de la molécule et d'accéder ainsi à des informations cruciales, notamment pour les biochimistes [14].

Finalement, la RMN anisotrope chirale est aussi une méthode de choix (et unique) pour l'étude de la dynamique conformationnelle. En effet, elle permet d'observer spectralement l'interconversion entre des énantiomères ou des directions énantiotopes de molécules prochirales, ce qui est impossible en milieu achiral.

## La spectroscopie RMN au service de l'étude des polymères : quelques aspects

par Cédric Lorthioir

La spectroscopie RMN constitue un outil extrêmement utile pour l'étude des matériaux polymères. Rappelons que ces derniers sont constitués de chaînes qui, dans le cas le plus simple, sont linéaires et correspondent à l'enchaînement d'un seul type d'unité de répétition. La RMN en solution permet

de décrire de façon très détaillée la structure chimique de ces unités et surtout, la façon dont elles s'enchaînent les unes avec les autres, leur éventuelle tacticité, leurs défauts de structure ou encore la nature des extrémités de chaîne [15]. La structure des matériaux polymères insolubles, tels que le caoutchouc réticulé par exemple, ainsi que l'organisation des chaînes à l'état solide, pour les polymères semi-cristallins en particulier, peuvent être analysées, de façon alternative, par RMN du solide [15]. La détermination de la structure de polymères synthétiques ou naturels est essentielle en science des matériaux et la RMN joue un rôle très important à ce niveau.

Cependant, outre ces informations d'ordre structural, la RMN peut apporter de nombreuses informations sur le comportement dynamique des polymères puisqu'elle permet de décrire précisément les mouvements moléculaires développés par ces chaînes, avec une résolution atomique. Il est très important de pouvoir caractériser ces propriétés dynamiques car elles déterminent, en partie, le comportement mécanique/rhéologique de polymères en masse. À ce titre, RMN en solution et RMN du solide sont très complémentaires. La RMN en solution permet d'analyser la mobilité de chaînes polymères « isolées », c'est-à-dire essentiellement entourées de molécules de solvant, et de déterminer ainsi l'effet de la structure chimique des unités de répétition sur les mouvements décrits par ces chaînes. La RMN du solide permet d'étudier la mobilité de polymères en masse : dans ce cas, chaque chaîne est entourée d'autres chaînes, avec lesquelles elle peut développer d'éventuelles interactions. Par comparaison avec la dynamique de la chaîne « isolée », les informations déduites de la RMN du solide permettent de préciser les effets interchaînes et leur influence sur la mobilité des polymères en masse.

L'une des spécificités des polymères tient aux types très différents de mouvements, simultanément présents au niveau d'une chaîne : des mouvements localisés, tels que la rotation d'un groupement méthyle autour de son axe, jusqu'aux mouvements de diffusion de l'intégralité de la chaîne, en passant par des mouvements de réorientation de portions de chaînes. L'un des atouts majeurs de la spectroscopie RMN est de permettre d'étudier, de façon sélective, ces différents types de mouvements grâce aux nombreuses expériences développées à ce jour. Deux exemples récents d'études de mobilité moléculaire dans des polymères en masse, qui illustrent l'apport très significatif de la spectroscopie RMN à la compréhension du comportement mécanique/rhéologique de ces matériaux, sont présentés ci-après.

### Mouvements localisés dans les polymères vitreux

À l'état vitreux, les chaînes de polymères sont essentiellement « gelées » et les seuls mouvements présents sont localisés, c'est-à-dire qu'ils correspondent à la réorientation de groupements chimiques d'étendue limitée. Cette mobilité a pourtant des conséquences significatives sur les propriétés mécaniques de ces matériaux : lorsque la température est suffisamment élevée pour permettre à ces mouvements de se produire, une chute du module d'Young est observée, macroscopiquement.

Afin d'établir les entités de l'unité de répétition d'un polymère vitreux présentant ces mouvements localisés, les expériences de RMN dites d'échange [16] apparaissent comme des méthodes particulièrement intéressantes. Ces approches s'appliquent à des noyaux tels que le carbone (<sup>13</sup>C) ou l'azote (<sup>15</sup>N) par exemple et permettent de détecter si ces noyaux constitutifs de l'unité de répétition sont mobiles ou non durant une période d'attente  $t_m$ , généralement comprise entre 1 ms et 1 s. Réalisées en l'absence de rotation de l'échantillon

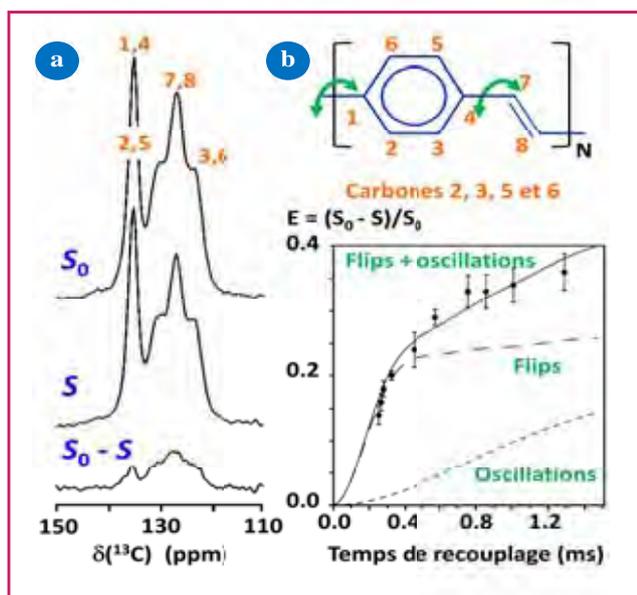


Figure 15 - Mouvements moléculaires au sein d'un polymère conducteur, le poly(para-phénylène vinylène), à -15 °C.

a) Spectres RMN  $^{13}\text{C}$ , CODEX (S) et de référence ( $S_0$ ), obtenus pour  $t_m = 50$  ms ; b) Géométrie des mouvements des groupements phényle, déterminée sur la base de l'évolution du taux d'échange  $E = (S_0 - S)/S_0$  en fonction d'un temps intervenant dans l'expérience, appelé temps de recouplage. Ces données concernent les carbones 2, 3, 5 et 6 de l'unité de répétition (d'après [17]).

analysé autour de l'angle magique ou à vitesse de rotation modérée, les premières expériences d'échange qui ont été proposées ne permettaient pas de résoudre les contributions des différents carbones d'un polymère, et donc, de discuter leur mobilité respective. Par ailleurs, ces premières approches rendaient difficile l'analyse des mouvements de faible amplitude. Au cours de ces dernières années ont été développées des expériences d'échange pouvant être conduites avec rotation rapide de l'échantillon autour de l'angle magique, ce qui permet de distinguer des carbones de nature différente et de décrire leur comportement dynamique. Une analyse fine de leurs mouvements en termes de vitesse et de géométrie est par ailleurs possible. Parmi ces approches figure l'expérience CODEX (« centerband-only detection of exchange ») [17] dans laquelle deux spectres sont enregistrés alternativement : le spectre CODEX (S) et un spectre de référence ( $S_0$ ), obtenu par la même séquence d'impulsions, mais avec un temps  $t_m$  très court, ce qui permet d'accéder à l'intensité des signaux associés aux différents carbones en l'absence de mouvement. Un exemple d'étude du poly(para-phénylène vinylène) [17] est présenté en figure 15.

La différence d'intensité entre S et  $S_0$ , observée pour les pics des carbones du groupement phényle de l'unité de répétition de ce polymère, indique la présence de mouvements de ce cycle à -15 °C. L'évolution du taux d'échange  $E = (S_0 - S)/S_0$  en fonction de  $t_m$  permet de déterminer la vitesse de ces mouvements ainsi que la fraction de chaque carbone y participant. Par ailleurs, la variation de E avec un autre temps de l'expérience CODEX, appelé temps de recouplage, permet de préciser la géométrie des mouvements détectés. Ainsi, une analyse détaillée montre que pour le poly(para-phénylène vinylène), à -15 °C, la réponse mesurée expérimentalement, reportée en figure 15b, peut être décrite par la somme de deux contributions. La première est associée à 30 % des noyaux aromatiques, décrivant des oscillations de 9° environ d'amplitude autour de l'axe défini par les carbones 1 et 4. La seconde contribution est liée aux autres cycles en mouvement,

qui exécutent des retournements (« flips ») de 150 à 210° autour du même axe reliant les carbones 1 et 4.

### Mouvements de portions de chaînes polymères : le cas de polymères aux interfaces

Mélangés à des charges inorganiques de taille nanométrique, telles que des plaquettes d'argile ou des particules de silice, les polymères peuvent présenter un renfort important de leur module d'Young [18]. De tels matériaux, dits nanocomposites, sont d'un grand intérêt applicatif mais soulèvent plusieurs questions fondamentales. En particulier, l'origine moléculaire du renfort mécanique observé à l'échelle macroscopique demeure une question ouverte à ce jour. Du fait de la dimension nanométrique de ces charges, leur surface de contact avec le polymère est très élevée, de sorte que la contribution des chaînes aux interfaces doit être prise en compte afin de décrire les propriétés mécaniques de ces matériaux. Dans ce contexte, il apparaît important d'analyser précisément l'effet de ces parois rigides, associées aux nanocharges, sur les mouvements des portions de chaînes situées au voisinage [18]. Les mouvements étudiés sont moins localisés que dans l'exemple précédent puisqu'ils portent cette fois sur plusieurs unités de répétition consécutives.

La RMN du solide permet précisément d'étudier ces mouvements de réorientation de portions de chaînes polymères. Un atout majeur est sa sélectivité : dans une matrice polymère comportant 5 à 10 % de charges, elle permet une détection exclusive des chaînes proches des interfaces. Pour cela, des expériences de RMN à deux dimensions [16] sont utilisées afin de corrélérer l'un des noyaux présents à la surface des charges avec l'un des noyaux des chaînes polymères situées à proximité, comme le montre le schéma de la figure 16. De telles approches ont été récemment mises à profit afin de caractériser la dynamique de chaînes de poly(oxyde d'éthylène) (POE,  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_N-$ ) mélangées à des argiles [19]. Des expériences de corrélation  $^{29}\text{Si}-^1\text{H}$  (HetCor) conduisent au spectre RMN des protons situés à proximité des noyaux de silicium de l'argile. Sur ce spectre, le pic à 3,5 ppm, observé en figure 16a, révèle la présence de chaînes de POE aux interfaces. Une expérience complémentaire, Wise (« wideline separation »)  $^{29}\text{Si}-^1\text{H}$ , permet d'extraire le spectre RMN des protons des espèces aux interfaces, à condition qu'elles présentent suffisamment de mobilité moléculaire. Ainsi, l'absence du pic des protons du

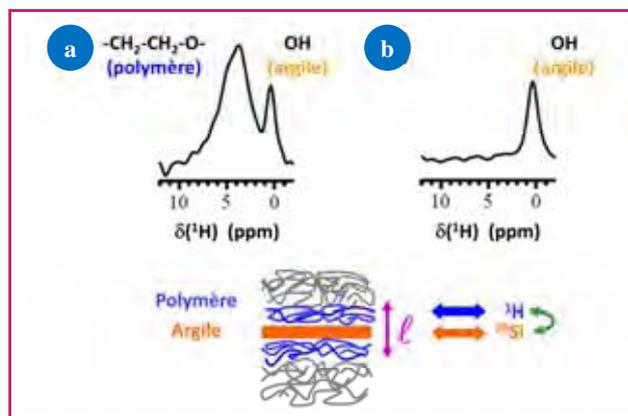


Figure 16 - Mouvements de portions de chaînes de poly(oxyde d'éthylène) proches de plaquettes d'argile.

Spectres RMN  $^1\text{H}$  révélant (a) la nature et (b) la mobilité des portions de chaînes aux interfaces, déduits d'expériences de corrélation  $^1\text{H}-^{29}\text{Si}$  (d'après [19]).

POE sur la *figure 16b* indique que ces chaînes à proximité des plaquettes d'argile sont immobilisées ou fortement ralenties sur des échelles de temps de quelques dizaines de microsecondes, à température ambiante.

En utilisant ces mêmes approches, il est aussi possible de suivre l'évolution de la mobilité des portions de chaînes sur des distances  $\ell$  variables, comptées depuis les interfaces. Dans le cas des systèmes POE/argile précédemment cités, la mobilité des chaînes de POE s'avère de plus en plus importante à mesure que  $\ell$  augmente et finit par présenter un niveau de mobilité constant, suffisamment loin des surfaces. Le gradient de mobilité au voisinage des charges et la longueur caractéristique associée à ce gradient peuvent ainsi être déterminés par RMN.

Les nombreuses avancées technologiques (hauts champs magnétiques, sondes à très hautes vitesses de rotation) et méthodologiques (efficacité et robustesse de méthodes de découplage  $^1\text{H}$ ) devraient permettre d'aborder l'étude du comportement interfacial de polymères d'architectures plus complexes dans les années à venir.

### RMN des polymères : d'autres champs d'application

Les deux exemples présentés dans cette dernière contribution illustrent quelques-unes des nombreuses possibilités offertes par la RMN du solide pour décrire les vitesses et géométries des mouvements moléculaires développés au sein de matériaux macromoléculaires. Ces études de dynamiques locales permettent une meilleure compréhension des liens entre la structure chimique des polymères et leurs propriétés macroscopiques, mécaniques notamment. La liste des approches citées est, bien sûr, loin d'être exhaustive et d'autres domaines d'étude des polymères ont également bénéficié des développements de la RMN opérés au cours des dernières années. On peut, entre autres, citer l'utilisation des double quanta  $^1\text{H}$  pour la caractérisation de la densité de réticulation d'élastomères ou encore l'étude de l'organisation et de la dynamique des liaisons hydrogène au sein d'architectures supramoléculaires.

Cédric Lorthioir remercie Françoise Lauprêtre pour les nombreux échanges autour de la RMN du carbone-13 dans les solides.

### Références

- [1] Lindsay R.K., Buchanan B.G., Feigenbaum E.A., Lederberg J., *Applications of Artificial Intelligence for Organic Chemistry: The Dendral Project*, McGraw-Hill Book Company, 1980.
- [2] www.univ-reims.fr/LSD, consulté le 26/01/2012.
- [3] Goldman M., Histoire de la RMN : autour de ses premiers acteurs... et après, *L'Act. Chim.*, 2004, 273, p. 57.
- [4] Jeener J., International Ampere Summer School Basko Polje, Yougoslavie, 1971.
- [5] Frydman L., Single-scan multidimensionnel NMR, *C.R. Chimie*, 2006, 9, p. 336.
- [6] Giraudeau P., Massou S., Robin Y., Cahoreau E., Portais J.-C., Akoka S., Ultrafast quantitative 2D NMR: a new tool for the measurement of specific isotopic enrichments in complex biological mixtures, *Anal. Chem.*, 2011, 83, p. 3112.
- [7] Tal A., Frydman L., Single-scan multidimensional magnetic resonance, *Prog. NMR Spec.*, 2010, 57, p. 241.
- [8] Giraud N., Beguin L., Courtieu J., Merlet D., Nuclear magnetic resonance using a spatial frequency encoding: Application to J-edited spectroscopy along the sample, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, p. 3481.
- [9] Wenzel T.J., *Discrimination of Chiral Compounds using NMR Spectroscopy*, Wiley Interscience, 2007.
- [10] Sackmann E., Meiboom S., Snyder L.C., Nuclear magnetic resonance spectra of enantiomers in optically active liquid crystals, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90, p. 2183.
- [11] Sarfati M., Lesot P., Merlet D., Courtieu J., Theoretical and experimental aspects of enantiomeric differentiation using natural abundance multinuclear NMR spectroscopy in polypeptide liquid crystals, *Chem. Commun.*, 2000, p. 2069.
- [12] Lesot P., Courtieu J., Natural abundance deuterium NMR spectroscopy: Developments and analytical applications in liquids, liquid crystals and solid phases, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2009, 55, p. 128.
- [13] Lesot P., Venkateswara Reddy U., Suryaprakash N.S., Exploring the enantiodiscrimination potentialities of DNA-based orienting media using deuterium NMR spectroscopy, *Chem. Commun.*, 2011, p. 11736.
- [14] Lesot P., Serhan Z., Billault I., Recent advances in the analysis of the site-specific isotopic fractionation of metabolites such as fatty acids using anisotropic natural abundance  $^2\text{H}$  NMR spectroscopy: Application on conjugated linolenic methyl esters, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, p. 1187.
- [15] Mirau P.A., *A Practical Guide to Understanding the NMR of Polymers*, Wiley Interscience, 2004.
- [16] Schmidt-Rohr K., Spiess H.W., *Multidimensional Solid-State NMR and Polymers*, Academic Press, 1994.
- [17] deAzevedo E.R., Franco R.W.A., Marletta A., Faria R.M., Bonagamba T.J., Conformational dynamics of phenylene rings in poly(p-phenylene vinylene) as revealed by  $^{13}\text{C}$  magic-angle-spinning exchange nuclear magnetic resonance experiments, *J. Chem. Phys.*, 2003, 119(5), p. 2923.
- [18] Halary J.L., Lauprêtre F., Monnerie L., *Mécanique des matériaux polymères*, Belin, 2008.
- [19] Hou S.-S., Beyer F.L., Schmidt-Rohr K., High-sensitivity multinuclear NMR spectroscopy of a smectite clay and of clay-intercalated polymer, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 2002, 22(2-3), p. 110.



J. Courtieu



N. Giraud



O. Lafon



P. Lesot



C. Lorthioir



J.-M. Nuzillard

Jacques Courtieu a été professeur à l'Université Paris-Sud<sup>1</sup>, Nicolas Giraud est maître de conférences à l'Université Paris-Sud<sup>1</sup>, Olivier Lafon est professeur à l'Université de Lille<sup>2</sup>, Philippe Lesot est directeur de recherche au CNRS au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay<sup>1</sup>, Cédric Lorthioir est chargé de recherche au CNRS à l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est<sup>3</sup>, et Jean-Marc Nuzillard est directeur de recherche au CNRS à l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Université Paris-Sud, Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO), Équipe RMN en Milieu Orienté (UMR 8182 CNRS), Bât. 410, F-91405 Orsay Cedex.

Courriels : jacques.courtieu@u-psud.fr, nicolas.giraud@u-psud.fr, philippe.lesot@u-psud.fr

<sup>2</sup> Université de Lille Nord de France, F-59000 Lille. Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UCCS), UMR 8181 CNRS, Université de Lille 1, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.

Courriel : olivier.lafon@univ-lille1.fr

<sup>3</sup> Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est, UMR 7182 CNRS/Université Paris-Est Créteil, 2 à 8 rue Henri Dunant, F-94320 Thiais.

Courriel : lorthioir@icmpe.cnrs.fr

<sup>4</sup> Institut de Chimie Moléculaire de Reims, UMR 7312 CNRS, Moulin de la Housse, CPCBAI, Bât. 18, BP 1039, F-51687 Reims Cedex 2.

Courriel : jm.nuzillard@univ-reims.fr

# De la molécule aux patients

## La RMN au cœur de la recherche pharmaceutique translationnelle

Frédéric Herman, Isabelle Salliot-Maire et Serge Sablé

**Résumé** La résonance magnétique nucléaire joue un rôle essentiel depuis plusieurs dizaines d'années dans la recherche et le développement de nouveaux médicaments et pour la revendication de la propriété intellectuelle des nouvelles molécules analysées. Au sein de Sanofi, l'expertise RMN est regroupée dans des unités spécialisées en analyse structurale. L'objectif de ces entités est de résoudre les problèmes spécifiques de la R & D tels le criblage de molécules présentant une activité biologique, l'analyse structurale de produits d'origine naturelle, ou encore l'analyse et la caractérisation des impuretés formées à chacune des étapes de la synthèse des principes actifs. Avec la réorganisation stratégique de Sanofi pour la découverte de nouveaux médicaments, les laboratoires RMN des différents centres de recherche soutiennent également l'activité des unités de production à travers le monde, notamment en participant au contrôle du processus de bonne pratique de fabrication des produits finis. La RMN accompagne ainsi le médicament tout au long de sa vie.

**Mots-clés** RMN, R & D, médicaments, recherche pharmaceutique, industrie.

**Abstract** **From molecule to patients: the NMR at the heart of pharmaceutical research**  
For over ten years, nuclear magnetic resonance has played an essential role in the research and development of new medicines and for the intellectual property of the new analyzed molecules. Within Sanofi, the NMR expertise is gathered in specialized structural analysis units. The objective of these entities is to resolve specific problems of the R&D such the profiling of molecules with a biological activity, the structural analysis of natural products or the analysis and the characterization of impurities formed in each stage of the synthesis of active principles. With the strategic reorganization of Sanofi Research and Development, the NMR laboratories also support the activity of the production units all over the world with the control of good practice manufacturing of finished products. Besides medicine, NMR can be found throughout life.

**Keywords** NMR, R&D, drugs, pharmaceutic research, industry.

Jusqu'aux années 2000, l'organisation interne de l'industrie pharmaceutique est restée assez cloisonnée avec la recherche, le développement et les affaires industrielles, considérés comme des entités autonomes. Du point de vue analytique, chaque entité possédait ses laboratoires avec leurs propres activités. Les outils analytiques et informatiques n'étaient pas les mêmes, les intérêts professionnels différaient et peu de passerelles existaient entre les entités. La vie d'une molécule et du futur médicament au sein d'une entreprise pharmaceutique était alors segmentée. Plusieurs études analytiques identiques pouvaient être réalisées et répétées lors des différents stades de développement, de sa découverte à sa commercialisation.

Les années 2000 sont aussi des années d'interrogations pour l'industrie pharmaceutique. Les politiques de santé des pays développés évoluent : la part des génériques s'accroît fortement, avec la perte de nombreux brevets pour des médicaments majeurs, et les conditions réglementaires se durcissent. Dans le même temps, le nombre de molécules innovantes mises sur le marché diminue drastiquement malgré des budgets de recherche et développement toujours plus élevés.

Les grandes compagnies pharmaceutiques doivent réagir et se restructurent. Sanofi adhère au concept de la

« médecine translationnelle » qui place le patient au cœur du processus de recherche de nouveaux médicaments dès les phases de découverte de molécules d'intérêt thérapeutique pour accélérer leurs développements. L'un des objectifs est de capitaliser les connaissances scientifiques acquises tout au long de la vie de la molécule et du futur médicament et de partager cette information. Le but est également de rationaliser les coûts de R & D pour faire face aux enjeux économiques et réglementaires des prochaines années.

C'est dans ce contexte que les laboratoires de RMN du groupe Sanofi s'organisent en réseau d'expertise mondial de façon transversale aux organisations et filiales. Localement, les centres de recherche de Vitry-sur-Seine et de Chilly-Mazarin sont regroupés fonctionnellement et s'organisent pour répondre efficacement à tous les défis analytiques que peut nécessiter le processus de développement d'un médicament, de sa découverte à sa vie après sa mise sur le marché : vie industrielle, commerciale et médicale.

### Deux laboratoires, une équipe et un parc instrumental optimisé

Les activités de recherche au sein des laboratoires industriels relèvent principalement de la recherche appliquée, et les

laboratoires de RMN de Chilly et Vitry sont des partenaires qui délivrent des services pour l'ensemble des collaborateurs du groupe, de la recherche la plus en amont jusqu'aux produits commercialisés. Les chercheurs de ces laboratoires doivent posséder des compétences pharmacologiques élargies et les qualités exigées sont la rigueur et l'efficacité industrielle, c'est-à-dire se soumettre à des notions de délai et de qualité très contraignantes pour des activités multiples, tout en respectant des obligations réglementaires strictes avec un devoir de traçabilité.

Pour répondre aux exigences industrielles, les chercheurs disposent d'un équipement optimisé. Le parc d'appareillage est composé de douze spectromètres de 200 à 600 MHz dont quatre en libre service (figure 1).



Figure 1 - Le laboratoire de RMN de Vitry-sur-Seine. Tous les spectromètres y fonctionnent soit manuellement, soit en automatique.

## De l'usage de la RMN à la recherche de nouveaux médicaments

La première étape du processus de découverte d'un médicament est la recherche de molécules présentant une activité biologique (« hits ») sur des cibles préalablement validées, généralement enzymatiques, avant leur transformation en molécules d'intérêt thérapeutique (« leads »), possédant les propriétés chimiques, physico-chimiques et métaboliques nécessaires.

Cette phase d'optimisation, bien que dirigée, a longtemps gardé une composante assez aléatoire, réalisée grâce au hasard et à la perspicacité des chimistes médicinaux. Mais la recherche se complexifie et le taux d'attrition devient de plus en plus élevé. Pour 10 000 molécules testées biologiquement, une seule reçoit son autorisation de mise sur le marché (AMM). Les coûts de R & D ont progressé fortement, contraignant l'industrie pharmaceutique à rationaliser cette approche aléatoire.

### La conception moléculaire rationnelle (biologie structurale)

Cette stratégie repose principalement sur l'analyse de fragments de molécules (« fragment-based drug

design »). Des petites bibliothèques (environ 1 500 fragments de masse moléculaire 150) sont utilisées pour identifier les interactions potentiellement responsables de l'activité chimique. Le choix et la diversité des fragments constituant la bibliothèque sont essentiels pour réussir cette identification. Les informations obtenues sont ensuite utilisées pour construire le hit chimique à partir des fragments qui présentent les interactions les plus intéressantes.

Des outils informatiques ont été développés pour tester virtuellement ces fragments de molécules et ainsi simuler les interactions potentielles avec la cible thérapeutique. Mais quelles que soient les hypothèses construites sur la base des résultats théoriques obtenus, la validation ou l'infirmité de ces résultats ne peut se faire qu'avec l'apport des résultats expérimentaux. La RMN est utilisée dans ce cas pour détecter l'existence d'interactions et donc valider les hypothèses.

Ce type d'étude a par exemple été réalisé au laboratoire pour comprendre la nature de l'interaction entre l'antithrombine et les oligosaccharides constituant de l'énoxaparine [1-2], une héparine de bas poids moléculaire. La connaissance des interactions ioniques et non ioniques responsables de la formation des complexes oligosaccharides-antithrombine permet de comprendre les différences d'affinité observées selon la nature de la séquence oligosaccharidique (figure 2).

### La découverte de nouveaux produits inspirés des structures des produits naturels

La découverte de nouveaux produits inspirés des produits naturels est une autre stratégie utilisée aujourd'hui au sein de Sanofi pour découvrir de nouveaux hits. Elle repose sur le fait qu'environ 80 % de la population mondiale utilisent uniquement des plantes médicinales pour se soigner et que la moitié des prescriptions médicales aux États-Unis contient au moins un médicament d'origine naturelle. Ces deux chiffres sont

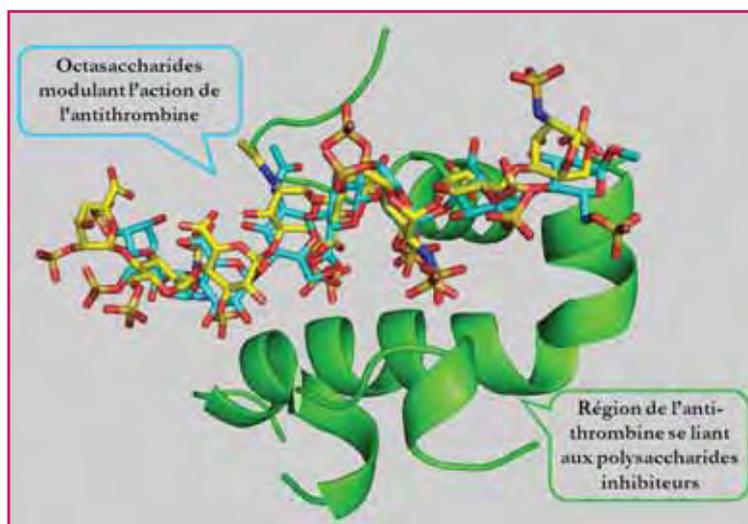


Figure 2 - Modélisation à partir des données RMN du complexe binaire antithrombine-polysaccharide.

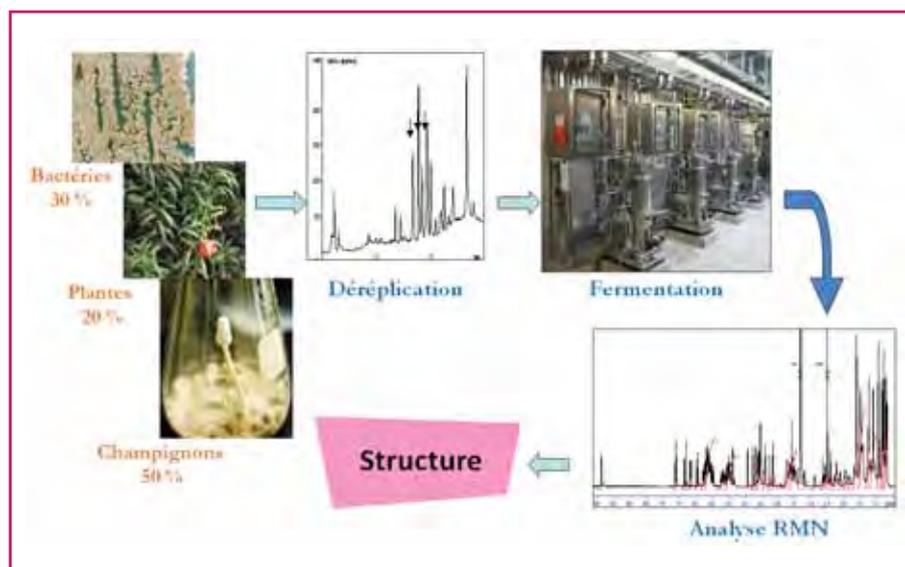


Figure 3 - Processus de découverte de nouveaux produits d'origine naturelle.

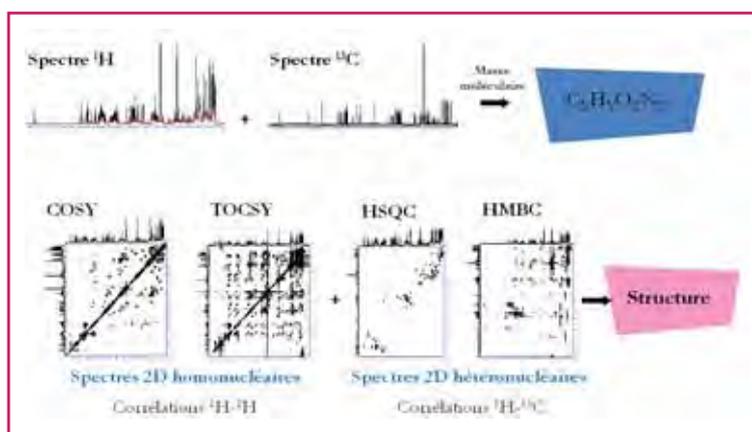


Figure 4 - Processus de détermination de structure par RMN.

significatifs de la place des produits naturels dans l'approche thérapeutique mondiale. Si on rajoute le fait qu'environ un tiers des médicaments commercialisés sont d'origine naturelle et que ce chiffre est d'environ 50 % dans le domaine de l'oncologie et des anti-infectieux, on comprend l'intérêt d'une société pharmaceutique comme Sanofi de continuer à investir dans la recherche de nouveaux produits d'origine naturelle.

La collection de Sanofi est parmi les plus importantes avec environ 100 000 espèces de bactéries et champignons et 7 000 plantes. Chaque année, plusieurs centaines de nouvelles molécules sont extraites de cette collection et les laboratoires de RMN jouent un rôle majeur dans la détermination de leur structure (figure 3). Le jeu consiste à utiliser avec rigueur et méthode les différentes expériences à deux dimensions homonucléaires (COSY, TOCSY et NOESY) et hétéronucléaires (HSQC et HMBC) pour conduire le plus rapidement possible à la structure recherchée (figure 4). La difficulté majeure a longtemps été d'obtenir le spectre  $^{13}\text{C}$ , nécessaire pour identifier la molécule étudiée. L'investissement réalisé dans l'achat d'une crysonde spécifique  $^{13}\text{C}$  nous permet d'acquérir désormais très rapidement les spectres 1D  $^{13}\text{C}$  avec un excellent rapport signal sur bruit, contribuant à augmenter significativement notre productivité.

Parmi les produits commercialisés d'origine naturelle du groupe Sanofi, on peut mentionner le premier produit du groupe, le docétaxel (Taxotère®), un anticancéreux de type taxoïde, mais également un autre taxoïde indiqué pour le cancer de la prostate, le Jevtana®, commercialisé en 2010 (figure 5).

## Thérapie ciblée et RMN

L'un des axes thérapeutiques majeurs de la recherche de Sanofi est l'oncologie. Principalement basé sur le site de Vitry, l'essentiel des efforts de recherche était jusqu'à présent focalisé sur la chimiothérapie. Son développement thérapeutique montre ses limites, liées à l'activité non spécifique qui peut produire une toxicité élevée. Au début du XXI<sup>e</sup> siècle apparaît une approche moléculaire originale qui cible très précisément l'oncogenèse en

bloquant la transmission de signaux de la division cellulaire. Pour cela, des anticorps modifiés sont utilisés pour interagir avec les récepteurs membranaires des cellules visées.

Puis récemment, on conjugue la thérapie ciblée et la chimiothérapie classique : c'est la naissance des immunoconjugués. Partenaire absent de la thérapie ciblée à ses débuts, le laboratoire de RMN joue aujourd'hui un rôle important dans le développement des immunoconjugués. La conjugaison des deux approches doit permettre d'utiliser des médicaments possédant une cytotoxicité beaucoup plus élevée. Les molécules présentant de telles propriétés sont généralement d'origine naturelle, avec une structure complexe (figure 6). Un lien direct est ainsi créé entre la recherche de hits à partir de nouveaux produits naturels et la recherche d'immunoconjugués à visée thérapeutique.

L'optimisation des hits choisis se fait par hémisynthèse et leur confirmation structurale est facilitée par une bonne connaissance préalable de la molécule utilisée, souvent découverte en interne. Actuellement, une vingtaine de chimistes travaillent sur les modifications par hémisynthèse de différentes molécules d'origine naturelle. Cette nouvelle

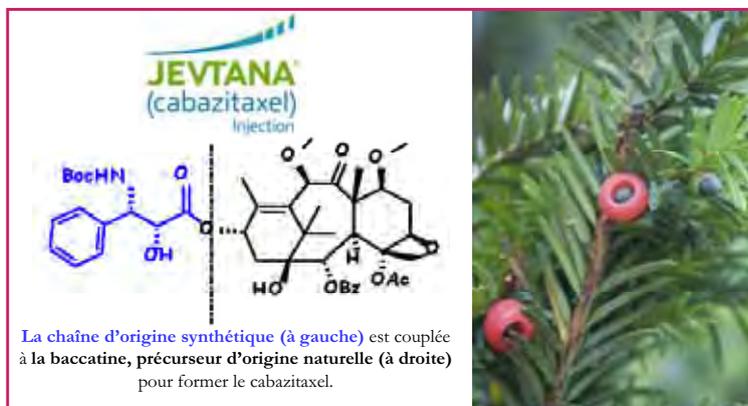


Figure 5 - Structure du Jevtana®, produit issu du département des produits naturels, fabriqué par hémisynthèse à partir d'un précurseur provenant des aiguilles d'if.

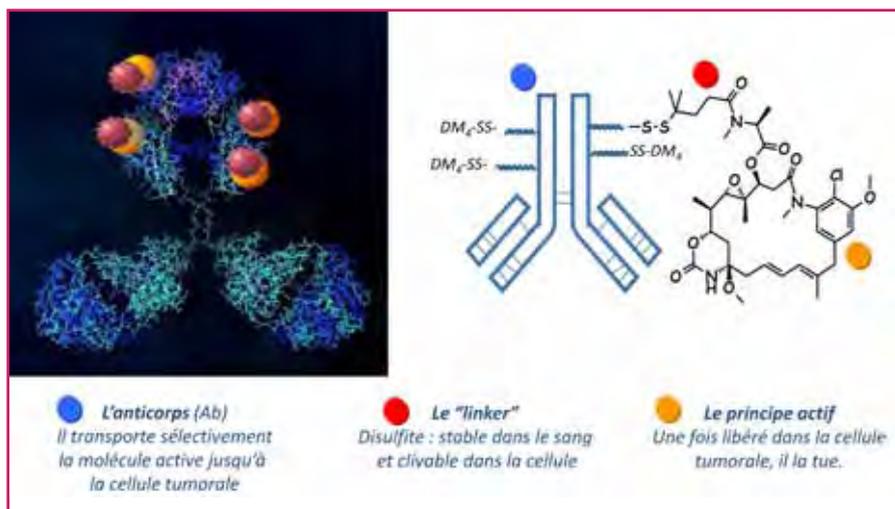


Figure 6 - Structure d'un immunoconjugué actuellement en phase de développement.

approche a modifié l'activité du laboratoire de RMN, avec un travail d'élucidation structurale plus difficile.

## La RMN, un outil au service des chimistes médicaux

Quatre unités thérapeutiques (fibrose, aging, oncologie et recherche exploratoire) sont présentes sur les sites de Chilly et Vitry, et plus de 150 chimistes participent à l'effort de recherche de nouvelles molécules au sein de ces unités. Une productivité soutenue est exigée de ces chimistes et pour les accompagner dans cet objectif, les laboratoires parisiens de RMN ont le devoir d'offrir des prestations de service de qualité avec des réponses analytiques rapides (délai moyen de 2 h) et fiables pour un flux quotidien d'environ 180 échantillons.

Ces analyses consistent à vérifier la conformité de la structure correspondant à la molécule synthétisée par le chimiste. Associée à la spectrométrie de masse, la RMN reste la méthode de choix pour ce contrôle. Il s'agit par ailleurs de pouvoir disposer de la description du spectre RMN  $^1\text{H}$  de la molécule, en prévision de la rédaction ultérieure d'un brevet d'invention.

Aujourd'hui, si les spectres 1D  $^1\text{H}$  sont généralement enregistrés pour tous les composés synthétisés, ils ne sont pas tous interprétés par les analystes.

## Vers la confirmation de structure automatisée

Avec l'apparition de nouvelles activités, comme décrites précédemment et comme nous le verrons ultérieurement, et pour faire face au flux important de besoin de confirmation de structure de petites molécules, l'introduction du libre-service au sein des laboratoires de RMN industriels s'est imposée.

L'évolution de la technologie a permis l'automatisation des spectromètres RMN et les chimistes médicaux sont incités à confirmer eux-mêmes la structure de leurs produits de synthèse. Mais quel que soit le processus de confirmation de structure mis en œuvre, par l'utilisation d'appareils en libre-

service ou par la sollicitation d'analystes en RMN, l'étape d'interprétation des données expérimentales constitue le goulot d'étranglement face à un flux important d'échantillons. Pour améliorer cette approche de la confirmation et accroître notre productivité, nous travaillons depuis longtemps sur des projets d'automatisation de cette phase d'interprétation de la confirmation de structure. Nous développons donc des solutions pour automatiser les étapes de traitement et d'analyse du spectre RMN, ainsi que la validation de la structure proposée par le chimiste. La figure 7 illustre comment il est possible d'accélérer le traitement des données RMN avec l'aide d'un support informatique complémentaire. Les spectres sont archivés électroniquement avec leur interprétation, la structure associée, le tout accessible aux chimistes des différents centres de recherche. L'un des avantages

de ce système est de détecter automatiquement si un composé synthétisé par le chimiste a déjà été analysé dans le passé. Dans ce cas, la compatibilité de la structure avec les données spectrales peut être établie de façon automatique en réalisant une simple comparaison des données d'archives avec les données expérimentales.

## Le développement d'une molécule et sa commercialisation

Lorsqu'une molécule a été sélectionnée pour entrer en phase de développement et devenir un futur médicament, le laboratoire de RMN collabore avec l'ensemble des départements impliqués. Les chercheurs du laboratoire participent notamment aux études de toxicité de la molécule en analysant des produits de sa métabolisation. Ils sont également impliqués, avec les chimistes des procédés et des affaires industrielles, pour caractériser les impuretés de synthèse pouvant être formées lors des différentes étapes de fabrication. La caractérisation structurale des produits formés, soit par

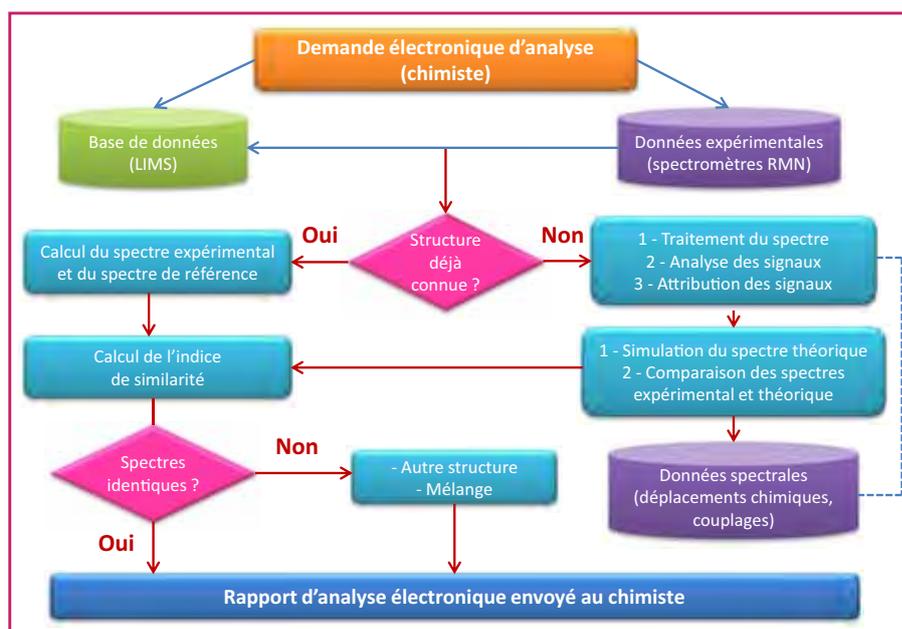


Figure 7 - Confirmation automatique de structure par RMN.

métabolisation digestive, soit résultant de la synthèse industrielle, est bien sûr primordiale pour assurer la sécurité du futur médicament et répondre aux exigences des autorités de santé.

Ces étapes de caractérisation sont souvent difficiles. Le challenge des analystes est d'autant plus important que les produits de métabolisation ou les impuretés de synthèse sont générés en très faible quantité et que leur isolement à partir de mélanges complexes s'avère très délicat. Depuis une dizaine d'années, le laboratoire a investi dans le développement du couplage chromatographique avec un spectromètre RMN.

### La CL-SPE-RMN, un outil dans le développement de nouvelles molécules

L'identification par RMN des structures des molécules présentes dans des mélanges est un problème complexe. Une étape de séparation préliminaire est incontournable pour étudier les composés contenus dans ces mélanges. Deux alternatives s'offrent alors à l'analyste :

- une chromatographie préparative est réalisée pour purifier les composés d'intérêt : ainsi isolés, les produits pourront alors être analysés séparément par RMN ;
- la chromatographie liquide (CL) est couplée au spectromètre RMN : l'association d'une technique séparative à une technique d'identification structurale permet d'obtenir un ensemble d'informations structurales sur les différents composés d'un mélange sans réaliser de chromatographie préparative.

Mais une des limites de la RMN est son manque de sensibilité par rapport aux autres méthodes d'analyse structurale comme la spectrométrie de masse ou la spectrophotométrie UV. Ainsi, depuis dix ans que cette technique est utilisée au laboratoire, les efforts ont surtout porté sur l'amélioration de la sensibilité de la méthode. Plusieurs moyens sont alors mis en œuvre simultanément pour augmenter cette sensibilité :

- l'extraction sur support solide (SPE) préconcentre l'échantillon avant son transfert dans la tête de mesure RMN : c'est un moyen très efficace pour disposer d'une quantité d'échantillon suffisante et permettre ainsi l'identification structurale (figure 8) ;
- l'utilisation d'une cryosonde, qui augmente la sensibilité du spectromètre.

Dans le cas de spectromètres équipés d'une cryosonde, l'installation de la sonde à flux nécessite au moins une journée de travail, ce qui est incompatible avec le fonctionnement d'un laboratoire d'analyse en milieu industriel. L'accessoire Cryofit® développé par la société Bruker résout ce problème en transformant en quelques minutes une cryosonde classique en cryosonde à flux.

### Du contrôle qualité à haute valeur ajoutée

L'implication des laboratoires s'inscrit également par une collaboration avec les affaires industrielles pour le contrôle qualité et la libération de lots de différents produits nécessitant une analyse RMN. C'est notamment le cas de l'héparine, médicament anticoagulant et antithrombotique, très largement utilisé en traitement post-opératoire. L'héparine pharmaceutique provient essentiellement de la muqueuse intestinale de porc. Jusqu'à très récemment, l'héparine était caractérisée principalement par son activité biologique. Mais

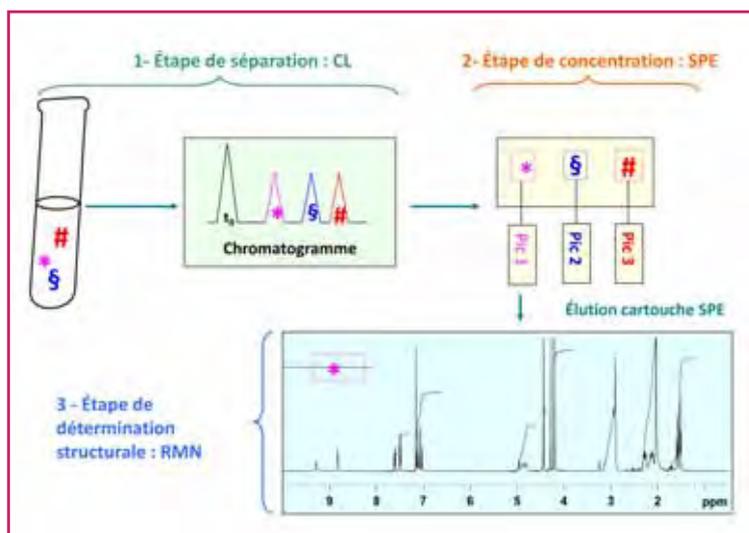


Figure 8 - Analyse structurale avec le couplage CL-SPE-RMN.

en 2007 et 2008, la contamination de l'héparine par de la chondroïtine polysulfatée (OSCS) provoque une crise de santé publique mondiale. Les autorités sanitaires imposent l'analyse RMN systématique pour le contrôle qualité de ce polysaccharide. Alors que les spectres proton de ce polysaccharide sont particulièrement complexes, la RMN 2D hétéronucléaire se révèle un outil très puissant pour identifier la présence d'impuretés et de contaminants, et pour caractériser leur structure. La figure 9 illustre comment la RMN permet la caractérisation du contaminant OSCS détecté dans un lot d'héparine commerciale. L'analyse par comparaison des spectres 2D montre l'exacte superposition des corrélations de l'OSCS (en noir) avec celle du contaminant présent avec l'héparine (en rouge).

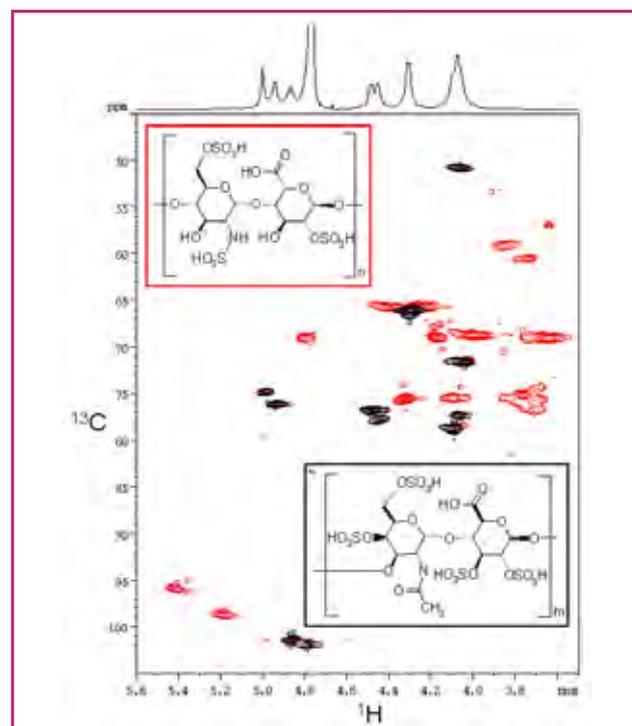


Figure 9 - Mise en évidence par RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de la contamination d'héparine de qualité pharmaceutique (en rouge) par la chondroïtine polysulfatée (en noir).

Aujourd'hui, le laboratoire assure le contrôle de plusieurs centaines de lots chaque année, en étroite collaboration avec certaines usines du groupe. Ces contrôles qualité nécessitent impérativement l'utilisation d'un spectromètre 500 MHz équipé d'une cryosonde et sont réalisés dans le respect des normes BPF (relatives aux bonnes pratiques de fabrication) comme l'exigent les autorités de santé.

## Conclusion

Technique structurale de choix pour l'observation des molécules, la RMN est utilisée tout au long du processus de recherche d'un nouveau médicament. Cette spécificité offre aux chercheurs du laboratoire de RMN la chance d'être des acteurs privilégiés de la découverte et de la vie d'un médicament, mais aussi de collaborer avec de nombreux chercheurs des différents domaines de la science pharmaceutique.

Et demain ? Le secteur de l'industrie pharmaceutique s'interroge sur sa R & D et sur son évolution industrielle. Les récentes acquisitions de Sanofi augurent de nouveaux défis analytiques pour notre laboratoire. L'effort de formation pluridisciplinaire des « RMNistes » doit être poursuivi pour répondre à ces défis avec le plus haut niveau de prestation.

Du point de vue de l'appareillage, notre spectromètre de plus haut champ est et restera très certainement un 600 MHz. Notre besoin de très haut champ est ponctuel mais il est essentiel. Nous avons choisi de mettre en place un partenariat avec le Laboratoire de chimie et de biologie structurales de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN/CNRS, Gif-sur-Yvette), dirigé par le professeur Éric Guittet, en signant un contrat de prêt pour l'accès aux spectromètres 800 et 950 MHz.

Notre priorité doit se focaliser sur l'amélioration de la sensibilité des expériences de RMN. Le développement de la technologie cryosonde nous a permis d'augmenter notre productivité, mais nous a surtout ouvert de nouveaux horizons analytiques en répondant à des besoins de déterminations structurales jusque là inaccessibles. C'est dans ce sens que devraient être poursuivis nos efforts.

Les auteurs remercient vivement l'ensemble des collaborateurs des deux laboratoires de Chilly-Mazarin et Vitry-sur-Seine qui contribuent quotidiennement à leur réussite : Gilles Barbalat, Valérie Bassin, Valérie Bernard, Adeline Broguy, Caroline Granier, Florine Grolet, Sylvie Guilleret, Marie-Line Monteiro, Hélène Olivan et Julien Thomas.

## Références

- [1] Guerrini M., Guglieri S., Casu B., Torri G., Mourier P., Boudier C., Lorenz M., Viskov C., Antithrombin-binding octasaccharides and role of extensions of the active pentasaccharide sequence in the specificity and strength of interaction, *J. Biol. Chem.*, **2008**, 39, p. 26662.
- [2] Guerrini M., Elli S., Gaudesi D., Torri G., Casu B., Mourier P., Herman F., Boudier C., Lorenz M., Viskov C., Effects on molecular conformation and anticoagulant activities of 1,6-anhydrosugars at the reducing terminal of antithrombin-binding octasaccharides isolated from low-molecular-weight heparin Enoxaparin, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, p. 8030.



F. Herman



I. Salliot-Maire



S. Sablé

### Frédéric Herman

est responsable du laboratoire de RMN du centre de recherche de Vitry/Alfortville, Sanofi.

### Isabelle Salliot-Maire

est responsable du laboratoire de RMN du centre de recherche de Chilly-Mazarin, Sanofi.

### Serge Sablé (auteur correspondant)

est responsable du Service d'analyse structurale des centres de recherche de Paris de Sanofi\*.

\* Centre de recherche de Vitry-Alfortville, Bâtiment Lavoisier, 13 quai Jules Guesde, F-94403 Vitry-sur-Seine Cedex. Courriel : serge.sable@sanofi.com



## CNRS Formation Entreprises

Le CNRS | Annuaire | Mots-Clefs CNRS | Autres sites

du 8 au 11 octobre 2012 **Initiation à la RMN du solide haute résolution**  
au MANS (72)

du 8 au 12 octobre 2012 **ICP-MS : niveau 1 (du 8 au 10/10) et/ou niveau 2 (du 11 au 12/10)**  
à LYON (69)

le 15 octobre 2012 **Le nouvel étiquetage des produits chimiques dangereux**  
à GIF SUR YVETTE (91)

du 19 au 23 novembre 2012 **Cryogénie : niveau ingénieur**  
à GRENOBLE (38)

du 19 au 23 novembre 2012 **Assemblages formés par les lipides et les tensioactifs : outils de caractérisation et diagrammes de phase**  
à CHATENAY MALABRY (92)

le 23 novembre 2012 **La fiche de données de sécurité : outil de prévention**  
à GIF SUR YVETTE (91)

du 26 au 28 novembre 2012 **Adsorption : application en caractérisation des matériaux et séparation / stockage des gaz**  
à MARSEILLE (13)

Stage à la carte. **Initiation à la pratique d'analyses thermiques :**  
Nous consulter. - analyse calorimétrique différentielle (DSC)  
à VILLEURBANNE (69) - analyse thermogravimétrique (ATG)

### Centre de ressources en formation

Un besoin de formation particulier ?

Contactez-nous au 01.69.82.44.96

Catalogue, programmes et inscriptions : 01 69 82 44 55 - <http://cnrsformation.cnrs-gif.fr>

# Déterminer la structure d'une protéine par RMN

## Un problème d'optimisation complexe

Yves Nominé et Bruno Kieffer

**Résumé** Le calcul de structures de protéines en solution par résonance magnétique nucléaire a bénéficié de nombreux développements au cours des dernières années. Ces innovations ont permis d'améliorer l'efficacité de l'ensemble du processus de détermination de structure, de la production d'échantillons de protéines enrichies avec des isotopes stables à la modélisation sous contraintes. Le répertoire des observables RMN utilisées dans le calcul de structures s'est considérablement enrichi et de nouvelles expériences offrent des perspectives inédites et originales sur la structure et la dynamique des assemblages macromoléculaires. L'intégration de données hétérogènes pour construire un modèle rendant compte des multiples réalités des protéines en solution reste une entreprise passionnante.

**Mots-clés** Protéines, structure, RMN du liquide, biologie structurale, méthodes.

**Abstract** **The determination of protein structures by NMR: a complicated optimization problem** Nuclear magnetic resonance spectroscopy, already a powerful tool for the determination of protein structures, has recently seen significant improvement as a result of a number of key developments. These advancements have touched all steps of the structure determination process ranging from the production of isotopically labeled protein samples to the development of innovative modelling strategies. The panel of NMR experiments used to obtain exploitable information on proteins has enlarged considerably and now offers an unprecedented view on the structure and dynamics of macromolecular assemblies. Integrating heterogeneous data to build a model that accounts for the multiple aspects of proteins in solution remains a challenging and fascinating task.

**Keywords** Protein, structure, liquid state NMR, structural biology, methods.

Il y a près de trente ans, l'équipe dirigée par Kurt Wüthrich à l'ETH de Zürich démontrait la possibilité de déterminer la structure d'une petite protéine en solution à partir des informations issues des spectres de RMN [1]. En offrant une alternative au cadre rigide et peu physiologique imposé par l'empilement cristallin, cette première a fait naître, dans la jeune communauté de la biologie structurale, l'espoir d'approcher d'encore plus près la nature intime du repliement des protéines. Pourtant, la cristallisation des protéines en vue de résoudre leur structure par diffraction des rayons X reste aujourd'hui le moyen privilégié d'accéder à l'information structurale et la contribution nette en termes de nombre de structures résolues par RMN reste modeste (elle représente près de 12 % des structures de protéines déposées dans la banque PDB<sup>(1)</sup>).

En revanche, la possibilité d'observer individuellement les atomes des protéines en solution par RMN a conduit à de profonds bouleversements de notre compréhension de la relation qui existe entre la structure et la fonction d'une protéine [2]. De nombreuses protéines étudiées depuis les débuts de cette méthode se sont montrées plus flexibles et dynamiques que ce qui était initialement attendu. Dans ce cas, les mesures RMN ne résultent plus d'une organisation géométrique unique des atomes dans l'espace, mais d'un ensemble très large de conformations différentes. Cette situation a conduit les chercheurs à s'interroger sur la façon d'extraire des informations pertinentes des spectres RMN de tels systèmes, ainsi que sur les possibilités de traduire cette

complexité dans un modèle moléculaire. Ces travaux ont conduit à développer de nouvelles méthodes permettant d'obtenir des informations sur la structure et la dynamique des protéines, élargissant ainsi considérablement la palette qui s'offre au biologiste.

Initiés au début des années 2000, les programmes de génomique structurale avaient pour ambition la description complète de l'ensemble des repliements de protéines. Si cet objectif n'est pas encore complètement atteint, ces initiatives ont conduit à un développement sans précédent des outils et méthodes permettant d'accélérer les études structurales [3]. Dans les programmes les plus avancés de biologie structurale, l'analyse RMN des échantillons de protéines a été placée au cœur du dispositif associant l'ensemble des techniques de biophysiques structurales. Pourtant, après trente années de développements, la détermination d'une structure de protéine par RMN reste une aventure multidisciplinaire dont la richesse ne s'exprime pas forcément dans le modèle final enregistré au sein de la banque PDB. Ce modèle résulte d'un processus complexe qui intègre les techniques d'analyse de séquences, de biochimie, de spectroscopie RMN et de modélisation les plus avancées (figure 1). L'optimisation de l'une ou l'autre de ces étapes est très souvent nécessaire pour mener à bien l'étude d'une protéine particulière. L'objet de cet article est d'illustrer le caractère multidisciplinaire d'une étude structurale de protéine par RMN, où chaque étape peut faire l'objet d'un passionnant travail de recherche et d'optimisation.

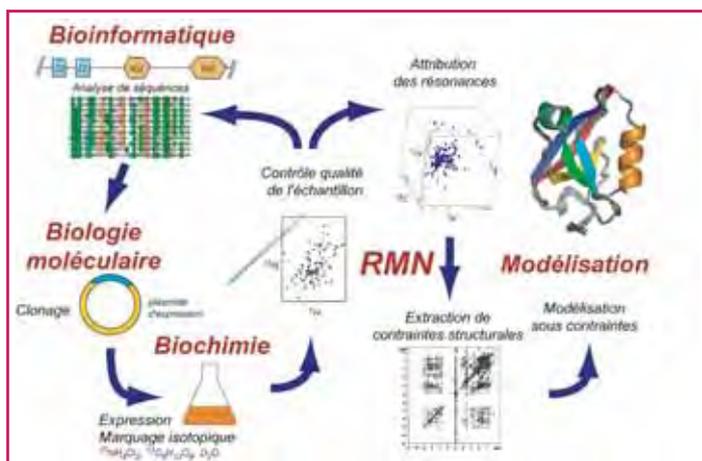


Figure 1 - De la séquence d'une protéine à sa structure.

Résoudre une structure de molécule par RMN ne se limite pas aux seules expériences de RMN. En amont, un travail important d'analyse de séquences, de biologie moléculaire et de biochimie est indispensable pour obtenir des échantillons de qualité. La production de protéines par expression dans un système bactérien permet l'incorporation d'isotopes stables dans la molécule. L'enregistrement de spectres RMN intervient dès les premières étapes de la production afin de guider et d'affiner les choix technologiques en amont (système d'expression, définition précise du système étudié, etc.). Le processus de détermination de structures par RMN se poursuit par l'enregistrement et le traitement de spectres permettant d'attribuer une valeur de déplacement chimique à chacun des atomes de la molécule, puis par l'enregistrement de spectres permettant l'extraction d'informations structurales (distances, angles dièdres, RDC, PRE...). La modélisation de structures sous contraintes et la validation des modèles constituent les étapes finales du processus.

## « Exprime-toi et je te dirai qui tu es » : l'étape critique de la préparation de l'échantillon

L'obtention d'un échantillon de protéine pour une étude RMN constitue une étape indissociable du processus qui va conduire à l'obtention d'un modèle moléculaire. Le succès final va être largement conditionné par les choix qui sont réalisés en amont de l'étude proprement dite. Ces choix concernent essentiellement la définition précise du ou des polypeptides à étudier, la stratégie d'attribution des signaux RMN, ainsi que la méthode de production de l'échantillon.

### L'analyse couplée bioinformatique/RMN : un préalable indispensable à toute étude structurale et fonctionnelle

Les protéines de grande taille sont souvent composées de plusieurs domaines structuraux, capables de se replier de façon autonome [4]. Ces domaines peuvent parfois être associés à une fonction spécifique et, dans le cas idéal, conservent cette fonction lorsqu'ils sont étudiés en dehors du contexte de la protéine entière. Cette fonction peut être liée, par exemple, à une activité catalytique, ou bien à l'interaction avec une autre protéine ou d'autres composants chimiques de la cellule (ADN, glucides, lipides...). Cette partition en domaines fonctionnels est fondamentale, car elle permet de réduire l'étude globale d'une protéine à celle des domaines individuels qui la composent. Ces domaines sont généralement de taille modeste (quelques dizaines à quelques centaines d'acides aminés), ce qui facilite leur étude structurale par RMN. Le repliement tridimensionnel d'un domaine ainsi que sa fonction imposent des contraintes sur sa composition en acides aminés. Un petit nombre d'acides aminés sont conservés à certaines positions de la séquence

primaire, indépendamment de l'organisme vivant considéré. La définition d'un domaine particulier repose donc sur l'identification de ces acides aminés conservés au cours de l'évolution de la protéine. Cette analyse consiste à aligner les séquences des différentes protéines similaires (assurant une fonction identique au sein d'organismes différents), de façon à identifier les acides aminés identiques ou présentant des propriétés physico-chimiques voisines. Dans la plupart des cas, elle permet d'identifier un ou plusieurs domaines et suggère un « découpage » possible de la protéine (figure 1).

Cependant, l'expérience montre que de petites variations de séquence, en particulier au sein des régions limitrophes du domaine, peuvent avoir des conséquences importantes sur le comportement du domaine en solution et la qualité des spectres obtenus. C'est pourquoi il est souvent nécessaire d'affiner la définition d'un domaine particulier, en combinant l'analyse de séquences avec la caractérisation par RMN de différents polypeptides à l'aide de spectres de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (figure 2).

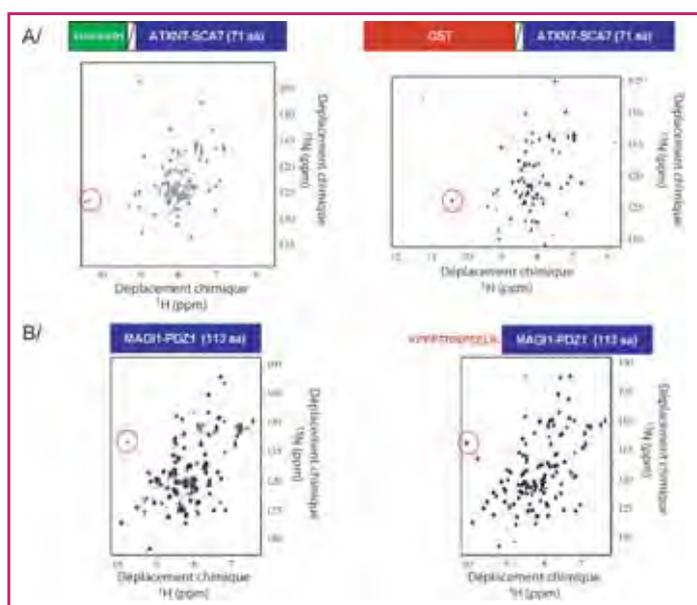


Figure 2 - Les spectres de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , juges arbitres de la qualité d'un échantillon.

Le spectre de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  permet d'évaluer rapidement la qualité d'un échantillon de protéine. La très grande sensibilité de cette spectroscopie autorise l'enregistrement de spectres sur des petites quantités d'échantillons, voire sur des extraits cellulaires bruts. Chaque tâche de corrélation correspondant à un acide aminé, le décompte des corrélations donne immédiatement une indication sur l'état de la protéine. Un nombre de corrélations inférieur à celui attendu traduit souvent la présence d'hétérogénéité dynamique de la protéine et interdit la détermination de structure. Il est alors nécessaire de modifier les stratégies utilisées en amont, comme celui de l'étiquette, un polypeptide additionnel fusionné à la protéine et permettant une purification plus aisée. A/ Dans le cas du domaine SCA7 de l'ataxie 7, le doigt de zinc présent dans ce domaine n'était pas compatible avec l'utilisation d'une étiquette poly-histidine. Le passage sur une colonne d'affinité contenant du cobalt conduisait à des échanges entre les ions zinc de la protéine et les ions cobalt de la colonne, entraînant des hétérogénéités dans les spectres. Le problème a été résolu par l'utilisation d'une étiquette composée de la protéine glutathione-S-transférase (GST), comme le montre la plus grande homogénéité de la forme des pics (par exemple ceux entourés en rouge). B/ Dans le cas du domaine PDZ-1 de la protéine MAGI-1<sup>(2)</sup>, il a été nécessaire d'ajouter douze acides aminés en amont de la protéine pour obtenir des spectres homogènes.

### Expression bactérienne et marquage isotopique : un couple indissociable

La détermination de la structure d'une protéine (ou de l'un de ses domaines) par RMN nécessite des quantités relativement importantes de matériel (de l'ordre de quelques milligrammes de protéine pure). De plus, l'attribution des

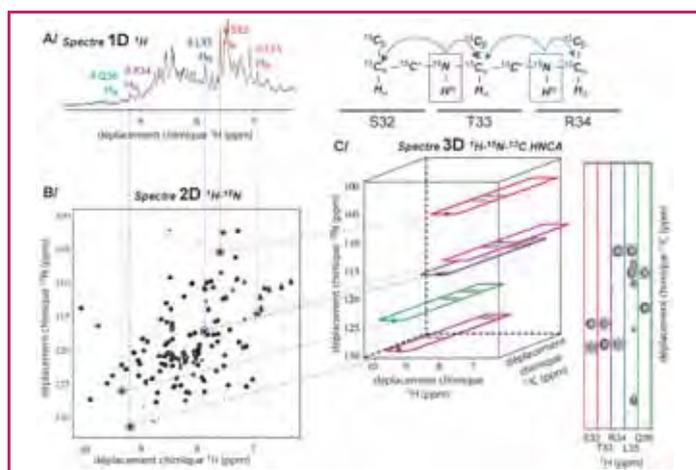


Figure 3 - Attribution des déplacements chimiques.

L'attribution consiste à établir la correspondance entre chaque noyau de la protéine pour lequel on peut observer un signal et la fréquence de ce signal (le déplacement chimique). A/ Dans le cas des protéines, la complexité des spectres 1D ne permet pas une attribution directe. B/ Une première simplification des spectres est obtenue en enregistrant des spectres bidimensionnels de corrélation  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ . Ce type de spectre, qui nécessite un marquage à l'azote-15, permet d'observer individuellement les protons amides du squelette peptidique. C/ Une simplification supplémentaire des spectres peut être obtenue en enregistrant des spectres triple résonance à trois dimensions nécessitant un enrichissement supplémentaire en carbone-13. L'expérience HNCA par exemple permet de visualiser les corrélations entre le couple de fréquences (proton, azote) d'un acide aminé et les fréquences des carbones alpha du même acide aminé ainsi que celui du voisin sur la chaîne. L'enchaînement séquentiel de ces corrélations sur des bandes extraites du spectre 3D permet de propager l'attribution des atomes du squelette peptidique de proche en proche.

fréquences de résonance requiert, dans la plupart des cas, l'incorporation d'un ou plusieurs isotopes stables ( $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ) dans la protéine. Le type de spectroscopie qui va être mise en œuvre pour l'attribution va être déterminé par le marquage isotopique de l'échantillon, de sorte que le choix du système d'expression fait partie intégrante du processus de détermination de structure (figure 1). Le processus complet de caractérisation structurale par RMN nécessite souvent la production de plusieurs échantillons différents, ce qui impose l'utilisation d'un système d'expression efficace et peu onéreux. Dans la grande majorité des cas, la protéine est obtenue en exprimant le gène correspondant dans la bactérie *Escherichia coli*, qui permet à la fois de multiples combinaisons de marquage isotopique à partir de précurseurs métaboliques simples (sels d'ammonium pour l'azote-15, glucose pour le carbone-13, eau lourde pour le deutérium), ainsi que l'obtention de rendements élevés. Dans cet organisme, la protéine est souvent exprimée sous la forme d'un polypeptide plus long, comportant, outre la protéine d'intérêt, un second polypeptide (comme une poly-histidine ou la protéine glutathione-S-transferase), appelé « étiquette », qui permet la purification du produit par chromatographie d'affinité. Le choix de cette étiquette dépend de la protéine étudiée et doit également faire l'objet d'optimisation. Une fois la protéine obtenue en quantité suffisante, l'utilisation de techniques de spectroscopie 3D triple résonance permet une simplification considérable des spectres RMN, qui autorise une automatisation partielle du processus d'attribution (figure 3).

### La RMN n'est pas limitée à l'étude de protéines de petite taille

Il y a quelques années, les difficultés posées par la détermination de structures de protéines ou de complexes

protéiques de grande taille semblaient insurmontables. D'une part, l'augmentation du nombre de noyaux entraîne inévitablement un encombrement spectral qui complique l'attribution des signaux. D'autre part, le ralentissement des mouvements de diffusion rotationnelle de la protéine conduit à un élargissement des raies de résonance sous l'effet d'une relaxation dipolaire plus efficace. L'efficacité de la relaxation peut être réduite en diminuant la densité de protons à l'aide d'échantillons de protéines uniformément enrichies au deutérium et marquées à l'azote-15 et au carbone-13. Combiné à l'utilisation d'expériences de corrélation de type TROSY (« transverse relaxation optimized spectroscopy », qui exploite des propriétés de relaxation de certains noyaux pour réduire la largeur des signaux de résonance, ce type d'approche permet d'obtenir des spectres à haute résolution sur des objets de grande taille (plus de 200 acides aminés) [5]. L'encombrement spectral reste néanmoins souvent un problème pour l'attribution qui peut être résolue en mettant en œuvre des techniques particulières, comme le marquage spécifique de certains types d'acides aminés ou le marquage par fragments [6]. Lorsque la taille de la protéine ou du complexe protéique devient très importante (jusqu'à 1 MDa), l'incorporation sélective et stéréospécifique d'un carbone-13 sur les groupes méthyles des leucines et des valines d'une protéine uniformément perdeutérée devient la seule façon d'obtenir des informations sur sa structure et sa dynamique. Cette incorporation repose sur l'utilisation de précurseurs des voies de biosynthèse de ces acides aminés comme l'acide  $\alpha$ -cétoisovalérique marqué sur des positions spécifiques [7]. Un exemple d'utilisation fructueuse de ce type d'approche est donné par l'étude en solution du protéasome, un complexe multi-protéique de 670 kDa [8].

Le bref aperçu des méthodes de marquage isotopique des protéines montre à quel point la production de l'échantillon est indissociable de l'étude structurale d'une protéine par RMN. Le développement des méthodes de marquage isotopique associé à celui des outils spectroscopiques a permis de repousser les limites imposées par la taille des protéines, et il est fort probable que cette tendance perdure dans les années futures avec l'automatisation et la production en parallèle d'échantillons et avec le développement de nouvelles techniques d'incorporation d'acides aminés artificiels, pour ne citer que deux exemples.

### Une palette d'expériences très riche

Le chercheur qui aborde l'étude d'une protéine par RMN dispose d'une palette très large d'expériences pour obtenir des informations de structure. L'approche classique repose sur la mesure de la relaxation croisée entre les protons de la molécule (phénomène à l'origine de l'effet Overhauser nucléaire ou NOE) afin d'extraire des distances, ainsi que sur l'analyse des constantes de couplage pour obtenir des informations sur les angles dièdres. Cette combinaison fournit la très grande majorité des contraintes structurales qui sont utilisées pour le calcul des structures déposées dans la banque PDB. Plusieurs développements récents sont venus enrichir la gamme des contraintes à disposition pour la construction de modèles de structures (figure 4 p. 52). L'analyse des interactions dipolaires résiduelles en milieu anisotrope, l'utilisation de sondes paramagnétiques ou encore le calcul de déplacements chimiques peuvent maintenant être utilisés soit pour fournir des contraintes géométriques supplémentaires, soit pour valider les structures finales.

## L'épineux problème de la validation des structures

Près d'un quart de siècle après la publication de la première structure de protéine en solution, l'évaluation de la qualité d'un modèle obtenu à partir des données RMN reste l'objet de recherches actives et d'intenses débats. Dans certains domaines, comme la recherche de sites de liaison pour des ligands potentiels à la surface des protéines, les structures RMN sont systématiquement écartées, du fait de l'absence d'indicateurs fiables de la qualité du modèle. Cette situation est intimement liée à la façon dont une structure de protéine est obtenue, ainsi qu'à l'étroite imbrication existant entre les informations sur la structure et la dynamique du système étudié. Les avancées récentes dans les méthodes de modélisation ainsi que l'élargissement de la palette des contraintes expérimentales laissent cependant entrevoir la possibilité d'obtenir un modèle qui rend compte à la fois de la structure et de ses mouvements.

### Justesse et précision

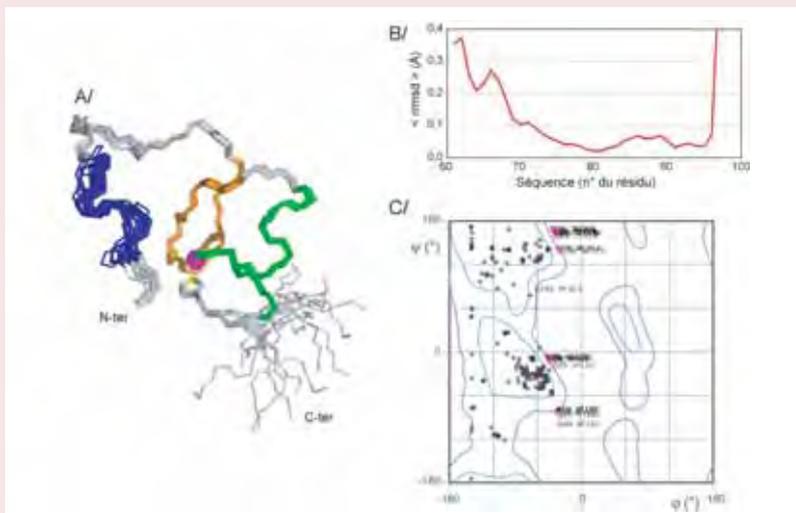
L'évaluation de la qualité d'un modèle structural repose sur la réponse à deux questions :

- 1) Le jeu de contraintes expérimentales permet-il de définir un modèle unique ?
- 2) Le modèle obtenu rend-il compte de l'ensemble des observations ?

La réponse à ces questions est loin d'être triviale, du fait de l'absence d'une transformation directe permettant de passer des observables RMN à des coordonnées moléculaires. La réponse à la première question est en général obtenue en multipliant le nombre de structures calculées à partir de structures initiales différentes. Les différents jeux de coordonnées sont ensuite comparés en calculant la largeur d'une distribution de distances qui séparent les atomes équivalents, pris dans les différents modèles alignés. Cette valeur (appelée RMSD pour « root mean square deviation ») fournit une mesure de la précision du modèle, qui affiche très souvent des valeurs inférieures à 0,5 Å pour les atomes de la chaîne principale. Le caractère partiel des informations géométriques fournies par les différentes observables RMN ainsi que la multiplicité de ces dernières rendent la réponse à la seconde question très délicate. Le calcul d'un facteur d'accord, tel qu'il est couramment pratiqué pour les structures cristallographiques, n'a pour le moment pas été adopté pour les structures en solution en dépit de plusieurs propositions dans ce sens. En l'absence de critères satisfaisants pour juger de la qualité d'une structure RMN, son appréciation repose souvent sur une analyse qualitative du jeu de données. Ainsi, le nombre moyen de contraintes de distances par acide aminé a été adopté comme critère pour évaluer la qualité d'un modèle. On considère qu'un modèle est fiable si ce nombre est supérieur à 10. Dans certains cas, la mesure d'un jeu de couplages dipolaires résiduels (RDC) est utilisée comme un moyen indépendant de vérifier la justesse des structures obtenues à partir des contraintes de distances et d'angles dièdres. L'utilisation de ce type de données pour obtenir un ensemble représentatif de conformères a également fait l'objet de plusieurs travaux récents. En effet, les valeurs moyennes de RDC proviennent d'ensembles conformationnels plus larges, car le temps caractéristique de cette mesure est plus long que celui du NOE. Une interprétation rigoureuse des données RDC a ainsi permis de proposer récemment un ensemble de structures de l'ubiquitine qui rend compte à la fois de la valeur moyenne des coordonnées et de la dynamique de la chaîne peptidique, ouvrant ainsi la voie à une description complète du système [a].

### La tyrannie du Ramachandran

L'un des outils les plus répandus pour juger de la conformité d'un modèle de protéine est le diagramme de Ramachandran, qui présente les angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$  du squelette peptidique sous la forme de points dans un graphique bidimensionnel. La présence de points dans des régions dites « défavorables » de ce diagramme permet de repérer rapidement les acides aminés qui ont une conformation locale potentiellement altérée (voir figure). Si les premières structures de protéines calculées à partir de contraintes de distances RMN s'écartaient notablement des critères de qualité communément admis en biologie structurale, la situation a, depuis, beaucoup évolué grâce aux développements des protocoles d'affinement. Cette dernière étape du calcul de structure permet d'incorporer des contraintes visant à favoriser les interactions à l'intérieur de la protéine ou bien entre la protéine et les molécules d'eau du solvant. La prise en compte de ce genre de contraintes qui ne proviennent pas directement de l'expérience, mais de ce qui est généralement connu et admis pour les protéines, a permis d'améliorer considérablement la « qualité » des modèles de structures RMN, et des initiatives proposant de recalculer des structures publiées dans la banque PDB ont été proposées [b].



### Évaluation de la qualité d'un jeu de structures RMN.

La résolution de la structure en solution d'un domaine dit C2H2 de la protéine Sgf73 [c] a permis d'obtenir un jeu de structures représenté par la superposition des dix modèles de plus basse énergie (c'est-à-dire présentant la valeur la plus faible possible de la fonction cible). A/ Le repliement de ce domaine est stabilisé par la coordination d'un atome de zinc (en magenta) par les chaînes latérales de deux cystéines et de deux histidines (d'où le nom C2H2). Lors des étapes finales du calcul de structure, des contraintes supplémentaires correspondant à une géométrie de coordination tétraédrique sont ajoutées au jeu de contraintes expérimentales. Ces contraintes ne correspondent pas à une observation expérimentale directe, mais contribuent à la précision des coordonnées. B/ La courbe de la valeur de l'écart quadratique moyen (rmsd) en fonction de la séquence montre que la position de l'hélice située dans la partie N-terminale du polypeptide (en bleu sur la figure) est moins bien définie que celle du motif de coordination du zinc (en vert). C/ Le diagramme de Ramachandran indique que la géométrie locale de quelques acides aminés reste à affiner. Ces acides aminés possèdent des couples de valeurs des angles dièdres ( $\phi$ ,  $\psi$ ) qui s'écartent des régions dites favorables (contours violets et bleus).

[a] Vendruscolo M., Determination of conformationally heterogeneous states of proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, *17*, p. 15.

[b] Nederveen A.J., Doreleijers J.F., Vranken W., Miller Z., Spronk C.A., Nabuurs S.B., Guntert P., Livny M., Markley J.L., Nilges M., Ulrich E.L., Kaptein R., Bonvin A.M., RECOORD: a recalculated coordinate database of 500+ proteins from the PDB using restraints from the BioMagResBank, *Proteins*, **2005**, *59*, p. 662.

[c] Bonnet J., Wang Y.H., Spedale G., Atkinson R.A., Romier C., Hamiche A., Pijnappel W.W., Timmers H.T., Tora L., Devys D., Kieffer B., The structural plasticity of SCA7 domains defines their differential nucleosome-binding properties, *EMBO Rep.*, **2010**, *11*, p. 612.

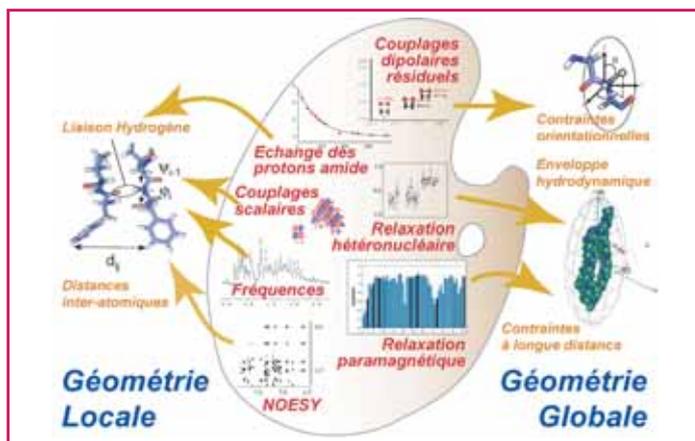


Figure 4 - Mesures RMN et information structurale.

Traditionnellement, la construction d'un modèle moléculaire de protéine en solution repose sur l'interprétation des NOE et des constantes de couplage à trois liaisons pour extraire des informations de distances et d'angles dièdres. Ces informations d'ordre local peuvent être complétées par l'observation de liaisons hydrogène révélées en mesurant la vitesse d'échange des protons amides avec ceux de l'eau. D'autres mesures nous renseignent sur la géométrie globale de la molécule. Ainsi, la forme de l'enveloppe moléculaire peut être obtenue par une analyse détaillée des vitesses de relaxation des noyaux d'azote-15 situés sur le squelette peptidique. L'étude des paramètres de relaxation renseigne également sur l'orientation relative de deux domaines d'une même protéine. Ce type d'information peut également être obtenu en observant des couplages dipolaires résiduels sur des échantillons placés dans des milieux anisotropes. Les ambiguïtés résultant de la faible portée des distances interatomiques extraites de l'analyse des NOE (6 Å) sont levées par des mesures de relaxation paramagnétique électronique, qui donnent une information sur des distances plus longues (20-30 Å).

### Une règle d'arpentage incontournable : l'effet Overhauser nucléaire

L'effet Overhauser nucléaire est lié à la relaxation croisée entre les protons d'une même molécule. Il conduit au transfert d'une quantité d'aimantation d'un proton à son voisin au sein d'une même molécule et la vitesse de ce transfert varie en fonction de l'inverse de la puissance sixième de la distance ainsi que de la dynamique du système [9]. Ce phénomène est révélé à l'aide de spectres multidimensionnels comprenant des périodes d'échange d'aimantation de type NOESY. Dans la pratique, ces échanges interviennent entre deux protons si la distance qui les sépare est inférieure à 6 Å. L'observation d'un tel échange entre deux protons ou groupes de protons éloignés les uns des autres au sein de la chaîne peptidique fournit une contrainte topologique très importante. Par exemple, l'observation de quelques NOE entre des protons situés sur deux brins adjacents d'une structure en feuillet  $\beta$  permet d'identifier les acides aminés qui établissent des liaisons hydrogène entre les deux brins. La conversion de l'intensité de l'effet Overhauser en une distance est généralement réalisée en effectuant une calibration à partir des intensités de NOE mesurées pour des couples de protons séparés par une distance connue. La fiabilité d'un modèle tridimensionnel de protéine obtenu à partir de l'analyse des NOE repose sur la redondance importante de ce type d'information. Ces dernières années, plusieurs algorithmes ont été développés afin d'exploiter cette redondance et d'augmenter ainsi la fiabilité des modèles calculés à partir de l'analyse des NOE.

### Constantes de couplage et mesure d'angles dièdres

La constante de couplage entre deux noyaux séparés par trois liaisons covalentes dépend de la géométrie du système.

Une équation phénoménologique a été proposée par M. Karplus pour décrire ce phénomène. Ainsi, la valeur de la constante de couplage entre les deux uniques protons de la chaîne principale d'un peptide,  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ , dépend de la valeur de l'angle dièdre  $\varphi$ , un des trois angles déterminant la géométrie du squelette peptidique. On constate cependant que si l'équation de Karplus donne une valeur unique de constante de couplage pour un angle dièdre donné, la réciproque n'est pas nécessairement vraie, et plusieurs valeurs de l'angle dièdre peuvent correspondre à une même valeur  $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$  mesurée (figure 5). L'obtention de paramètres géométriques à partir de la mesure de constantes de couplage résume très simplement le problème d'indétermination qui se pose lors du calcul de structures de protéines par RMN.

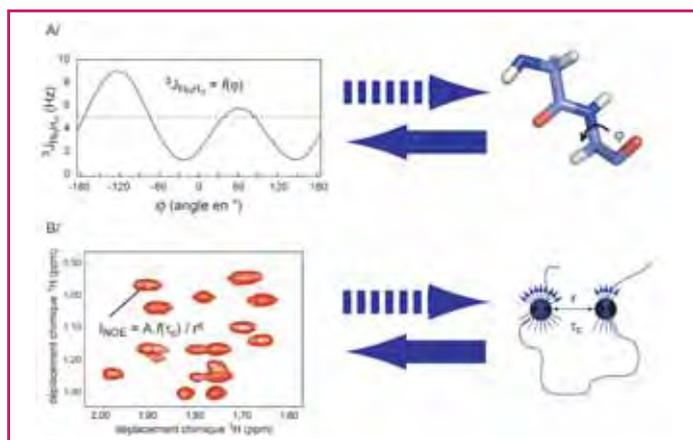


Figure 5 - Indétermination et problème inverse.

L'indétermination des informations structurales obtenues par RMN résulte de plusieurs effets différents. A/ Dans le cas de la constante de couplage, il n'existe pas de fonction réciproque permettant d'obtenir un angle dièdre à partir de la mesure d'une constante de couplage  $^3J$ . Par exemple, la mesure d'un couplage de 5 Hz entre un proton amide et un proton  $\text{H}\alpha$  peut correspondre à quatre valeurs différentes de l'angle dièdre  $\varphi$ . B/ Dans le cas d'une distance mesurée à partir de l'intensité d'un pic de corrélation sur une carte NOESY, l'indétermination provient de la présence possible de mouvements internes (qui se traduisent par des variations du temps de corrélation  $\tau_c$  en fonction de la distance considérée), ou bien de la superposition des tâches de corrélation sur la carte NOESY.

### Une palette de contraintes qui s'enrichit

Si les contraintes de distances issues des NOE constituent encore et toujours le noyau central de l'information structurale, le répertoire des observables RMN utilisées dans le calcul de structures s'est considérablement enrichi au cours des dernières années. Parmi les plus utiles et les plus populaires, se trouvent des mesures qui permettent de palier les limitations intrinsèques des contraintes extraites des NOE ou des constantes de couplage. Ainsi, la mesure de constantes de couplage dipolaire résiduel, ou RDC, a été particulièrement développée car elle offre une information qui complète naturellement celle issue des NOE [10]. L'expérience consiste à mesurer l'interaction dipolaire entre deux noyaux séparés par une distance fixe sur des échantillons de protéine placés dans un milieu anisotrope, c'est-à-dire présentant une orientation privilégiée dans l'espace. Les interactions dipolaires, dont l'effet sur les fréquences de résonance est en principe annulé par les mouvements de diffusion rotationnelle de la molécule, se manifestent alors dans le spectre de la protéine sous la forme d'un dédoublement des raies de résonance et de variations des valeurs de constantes de couplage. Cette contribution, qui est de l'ordre de quelques hertz, dépend de l'orientation par rapport au champ magnétique statique du vecteur reliant

les deux noyaux en interaction. L'analyse de l'ensemble de ces contributions mesurées pour une protéine donnée permet de définir l'orientation préférentielle de la protéine par rapport au champ magnétique et fournit des contraintes sur l'orientation relative des vecteurs internucléaires. Différents milieux anisotropes ont été proposés pour l'étude des protéines comme des gels de polyacrylamide contraints, des agents surfactants ou des bicelles phospholipidiques, pour ne citer que les plus courants. Dans la pratique, les contraintes RDC sont surtout utilisées dans l'affinement de structure, ou bien pour définir l'orientation relative de domaines structuraux dans le cas de systèmes plus complexes.

L'utilisation de sondes paramagnétiques permet, dans certains cas, de combler la faible portée des distances obtenues par NOE (5 Å) en offrant des informations à longue distance. La méthode consiste à greffer un centre paramagnétique sur la surface de la protéine et à mesurer la relaxation induite par la présence de l'espèce paramagnétique sur les noyaux. La relaxation paramagnétique s'exerce jusqu'à des distances d'une trentaine d'ångströms du centre paramagnétique, ce qui offre un gain considérable par rapport aux contraintes NOE. Les composés comportant un groupe nitroxyde sont en général privilégiés, car ils sont assez compacts et ils permettent un contrôle efficace du phénomène de relaxation paramagnétique, mais il est également possible d'utiliser des métaux paramagnétiques associés à des groupes chélateurs. L'utilisation de ces sondes a évolué depuis son introduction par G. Wagner en 2000 [11], et une des retombées significatives est la mise en évidence de complexes transitoires dans les phénomènes de reconnaissance protéine-protéine [12].

### Retour aux sources : extraire l'information structurale contenue dans les fréquences de résonance

L'attribution d'une fréquence de résonance (ou déplacement chimique) à un noyau ou à un groupe de noyaux de la protéine étudiée constitue un préalable obligé du calcul de structure, car elle permet d'associer les paramètres structuraux issus des mesures RMN à des régions spécifiques de la protéine (figure 3 p. 50). Ces fréquences dépendent fortement de la structure locale et globale de la protéine, et contiennent donc une information structurale essentielle. Les fréquences mesurées pour les noyaux situés sur le squelette peptidique, comme le carbone C $\alpha$  par exemple, dépendent fortement de la structure secondaire dans laquelle se trouve l'acide aminé. La corrélation étroite entre structure secondaire et déplacements chimiques est exploitée de façon systématique par le programme TALOS, qui propose des valeurs pour les angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$ , une fois l'attribution connue [13]. Ce programme recherche, dans une banque validée associant structures et fréquences, l'ensemble des tripeptides présentant des similarités à la fois de séquences et de fréquences avec celles de la protéine étudiée. L'utilisation des fréquences de résonance pour extraire des informations sur le repliement global d'une protéine a été longtemps limitée par la complexité liée au calcul de déplacement chimique dans le cas de macromolécules. Cependant, l'augmentation du nombre de protéines étudiées par RMN a permis la mise au point de modèles semi-empiriques fiables pour le calcul de déplacements chimiques. Ces modèles ont été exploités dans plusieurs approches qui permettent d'obtenir une structure 3D complète à partir des fréquences des noyaux d'une protéine. Le logiciel

CS-ROSETTA, par exemple, utilise une approche qui combine la recherche de fragments similaires dans la banque PDB et le calcul de déplacements chimiques à l'aide du logiciel SPARTA [14].

### La modélisation : un outil essentiel pour exploiter les données RMN

Le calcul d'une structure à partir de données RMN appartient à la classe des problèmes dits « inverses », mal conditionnés comme cela est illustré par l'absence de fonction réciproque pour l'équation de Karplus (figure 5). Dans ce type de problèmes, les paramètres expérimentaux peuvent être calculés à partir de l'ensemble des solutions de façon univoque, mais pas l'inverse. Le principe du calcul de structure consiste alors à explorer l'espace des solutions le plus efficacement possible en ne retenant *in fine* que les modèles dont les paramètres recalculés sont en accord avec l'expérience. Beaucoup de progrès ont été réalisés ces dernières années pour optimiser ce processus. Ils ont permis d'améliorer l'efficacité de l'exploration conformationnelle, la convergence des calculs, la tolérance aux erreurs ou la prise en compte de la dynamique des systèmes.

### Une fonction cible hybride

L'accord entre un modèle et les données expérimentales est quantifié par une fonction de plusieurs variables (qui sont les coordonnées du modèle) appelée fonction cible. Cette fonction rend également compte des contraintes liées à la chimie de la protéine comme le respect de la géométrie idéale des liaisons covalentes ou l'optimisation des interactions non liées. Selon le cas, des termes supplémentaires pourront être ajoutés pour favoriser des interactions interatomiques favorables, comme l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires ou l'exposition de groupes polaires au solvant. La recherche des minima de la fonction cible permet alors d'obtenir des modèles moléculaires qui satisfont à la fois à la géométrie de la chaîne polypeptidique et à son repliement, sous la contrainte des données RMN. La nature différente des informations contenues dans chaque type de données RMN contribue au caractère complexe de la fonction cible. Par exemple, certaines distances issues des NOE apportent des contraintes topologiques très fortes sur la chaîne, alors qu'un angle dièdre issu de la mesure d'une constante de couplage aura un impact plus localisé sur le modèle. Dans le cas d'un équilibre rapide entre plusieurs conformations, le problème devient encore plus complexe, car les valeurs moyennes calculées pour différents types de contraintes deviennent alors incohérentes (figure 6). Ce phénomène est lié à un biais systématique pour les petites distances introduit par la moyenne de l'interaction dipolaire. Les travaux les plus récents ont permis de bien comprendre les biais introduits par le calcul de moyenne et de les exploiter pour rendre le calcul de structure plus tolérant vis-à-vis des erreurs d'attribution ou de calibration. Plusieurs distances peuvent ainsi être regroupées et seule la moyenne est prise en compte dans le calcul de la fonction cible. Les distances non respectées (qui sont en général trop longues dans le modèle) ne contribuent alors que faiblement à la moyenne et n'affectent pas la convergence du calcul de structure. Cette méthode est utilisée, par exemple, pour l'interprétation des NOE ambigus qui ne peuvent pas être attribués à un couple unique de protons (figure 7) [15]. La forme mathématique de la fonction cible a également fait l'objet de progrès très récents. Ainsi,

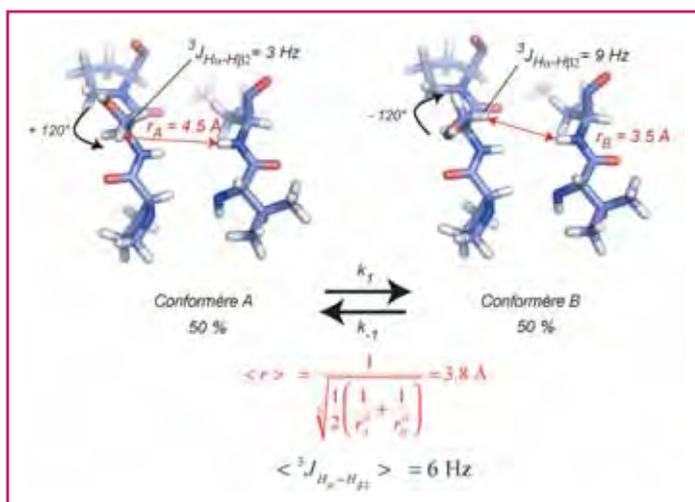


Figure 6 - Des moyennes trompeuses.

Les paramètres RMN donnent des valeurs moyennes qui résultent de la contribution d'un très grand nombre de molécules. Dans le cas d'un système dynamique, en échange entre plusieurs conformations, la valeur moyenne dépend à la fois de la nature de l'interaction à l'origine de la mesure ainsi que de la vitesse de transition entre les différentes conformations de la molécule ( $k_{12}$ ). Lorsque cette vitesse est plus grande que la fréquence caractéristique de l'interaction (quelques Hz dans le cas d'un couplage scalaire par exemple), on mesure une moyenne arithmétique à partir des valeurs caractéristiques de chaque état. Dans l'exemple simple de la rotation d'une chaîne latérale d'une thréonine, la fluctuation entre deux rotamères conduit à une valeur moyenne de 6 Hz, dont l'interprétation en termes d'une valeur unique de l'angle dièdre conduira à une conclusion erronée. La moyenne d'une interaction dipolaire, quant à elle, fait intervenir l'inverse de la distance, élevée à la puissance sixième, ce qui favorise la contribution des petites distances. Dans le cas de l'échange ci-dessus, la valeur moyenne favorisera la conformation B, pour laquelle la distance entre un proton amide distant et le proton  $H_{\beta}$  de la chaîne latérale est la plus courte. L'analyse simultanée de la constante de couplage et des valeurs de NOE fait apparaître une incohérence (la distance extraite du NOE ne correspond pas à l'angle dièdre déduit de la constante de couplage) qui indique la présence de plusieurs conformations.

l'introduction de fonctions de type log-normales dans le calcul de la fonction cible a permis d'améliorer la convergence du calcul de structure [16].

### Le protocole de recuit simulé : un algorithme efficace pour l'exploration conformationnelle

La recherche de l'ensemble des conformations en accord avec les données expérimentales repose sur une exploration aussi large que possible de l'espace conformationnel accessible à la protéine. Ce problème est similaire à celui du repliement des protéines qui est à l'origine du paradoxe de Levinthal : en ne considérant qu'un nombre limité de conformations pour chaque acide aminé d'une chaîne peptidique, le nombre de combinaisons devient très vite énorme pour l'ensemble de la chaîne, ce qui interdit son exploration systématique. Pourtant, dans une cellule, les mécanismes de repliement permettent d'obtenir la conformation globale la plus stable en quelques millisecondes. De la même façon, des algorithmes informatiques d'optimisation efficaces permettent de proposer des solutions à des problèmes très complexes dans un temps réduit. Les méthodes employées pour le calcul de structures de protéines par RMN utilisent les algorithmes de simulation de la dynamique moléculaire : ils permettent de reproduire les mouvements aléatoires des atomes pendant un temps donné. L'amplitude de ces mouvements est liée à la température. Le protocole classiquement employé est appelé « recuit simulé », par analogie avec les processus utilisés en métallurgie. C'est une méthode heuristique empirique dans

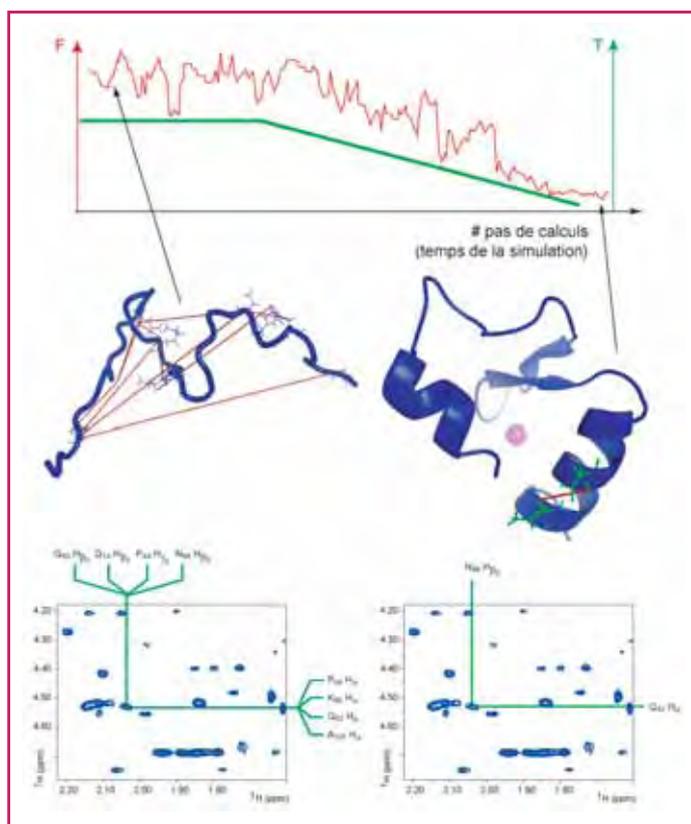


Figure 7 - Recuit simulé et attribution des NOE ambigus.

Le calcul d'un modèle de structure consiste à rechercher le minimum d'une fonction  $F$ , qui dépend des coordonnées de la molécule, et qui donne une mesure de l'écart entre les paramètres RMN calculés à partir du modèle et les paramètres expérimentaux. Cette fonction, appelée fonction cible, possède de nombreux minima secondaires, ce qui rend difficile la recherche du minimum principal (qui correspond au jeu de coordonnées reproduisant au mieux les contraintes expérimentales). La recherche de ce minimum est réalisée au cours d'un algorithme de recuit simulé, qui comporte une phase initiale dite à haute température permettant d'explorer un espace très large de solutions. Au cours de cette phase, des structures associées à des valeurs importantes de la fonction cible peuvent être temporairement acceptées, facilitant la sortie des minima locaux. Pendant la phase de refroidissement, seules les solutions conduisant à une réduction de la fonction cible sont considérées. Une des innovations majeures dans le domaine du calcul de structures par RMN a consisté à coupler l'algorithme de recuit simulé avec l'interprétation des NOE. Dans la phase exploratoire à haute température, l'ensemble des combinaisons de couples de protons pouvant expliquer l'observation d'une tâche de corrélation sur une carte NOESY est pris en compte. Dans le cas ci-dessus, la superposition des fréquences de quatre protons différents dans chaque dimension conduit à seize combinaisons possibles. Les propriétés de la moyenne de l'interaction dipolaire permettent d'inclure l'ensemble des hypothèses dans les étapes initiales du calcul, sans affecter les propriétés de convergence. Dans la structure finale, seule une combinaison est retenue.

laquelle on procède à un réchauffage (recuit) rapide de la molécule à haute température (qui permet une exploration de l'espace conformationnel), suivi d'un refroidissement contrôlé ayant pour effet de minimiser la valeur de la fonction cible (figure 7). Cette fonction contient l'information expérimentale sous la forme de pseudo-potentiels, dont la contribution peut varier au cours du calcul.

### Description statistique de l'ensemble des solutions

L'estimation de l'incertitude sur les modèles moléculaires obtenus à l'issue de la procédure décrite ci-dessus est acquise en répétant le calcul d'optimisation un grand nombre de fois, à partir de structures initiales différentes. Des statistiques sont alors effectuées sur l'ensemble des modèles caractérisés par une valeur de la fonction cible la plus basse

possible. Une distribution unimodale caractérise par exemple l'unicité de la solution. Cependant, ces distributions sont fortement dépendantes du poids respectif de chacune des contraintes expérimentales et topologiques dans la fonction cible, ce qui affecte l'estimation de l'incertitude sur le modèle final. Afin de rendre le calcul plus objectif, une approche basée sur les probabilités a été proposée dans le groupe de M. Nilges à l'Institut Pasteur [17]. Cette méthode repose sur une évaluation *a priori* de l'ensemble des solutions possibles (sous la forme de modèles moléculaires). Chaque solution est ensuite associée à une probabilité en fonction de l'accord entre les paramètres calculés à partir du modèle et les données expérimentales. Les modèles qui possèdent les probabilités les plus importantes sont alors sélectionnés et leur analyse permet une estimation non biaisée de l'ensemble des solutions définies par le jeu de données expérimentales. L'utilisation de cette approche est pour le moment limitée par le temps de calcul qui est très important, mais le traitement statistique des données expérimentales associé à l'analyse bayésienne<sup>(3)</sup> a fait progresser la prise en compte de l'incertitude sur les données RMN dans le calcul de structure par les méthodes traditionnelles.

## Conclusions

La détermination de structures de protéines en solution par RMN a bénéficié d'importants efforts de développement au cours des dix dernières années. Les chercheurs disposent à présent d'outils instrumentaux, méthodologiques et logiciels très efficaces et, dans les cas les plus favorables, la résolution d'une structure de protéine de taille modeste (inférieure à 20 kDa) peut être réalisée en quelques semaines. Libérés des contraintes qui mobilisaient, il y a encore peu de temps, des ressources importantes pour la détermination d'une seule structure, les laboratoires se tournent aujourd'hui vers des problèmes plus complexes, comme l'étude de grands complexes moléculaires (protéasome, ribosome, exosome, nucléosome...), la caractérisation structurale d'états excités minoritaires ou encore la caractérisation d'interactions à l'intérieur des cellules. Dans chaque cas, les défis technologiques sont considérables et trouvent généralement leur solution dans l'association étroite entre des méthodes spectroscopiques de pointe et les dernières innovations de la biologie moléculaire. Le regard porté par la RMN révèle alors souvent la nature dynamique et subtile des protéines, et plus généralement des molécules biologiques. En associant structures, mouvements et énergie, la RMN est appelée à jouer un rôle important dans les nouvelles approches intégratives de la biologie structurale.

## Notes et références

- (1) PDB (« protein data bank ») : site unique de dépôt des structures 3D de protéines.
- (2) MAGI-1 : protéine membre de la famille des « membrane-associated guanylate kinase ».
- (3) Analyse bayésienne : méthode statistique intégrant explicitement une distribution de probabilités *a priori* fondée sur une opinion subjective ou des données objectives comme les résultats d'une recherche antérieure (HTAGlossary.net).
- [1] Wüthrich K., NMR - this other method for protein and nucleic acid structure determination, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **1995**, *51*, p. 249.

- [2] Birlirakis N., Bontems F., Guittet E., Leroy J.-L., Lescop E., Louis-Joseph A., Morellet N., Sizun C., Van Heijenoort C., Nuclear magnetic resonance: a tool for structural biology, *L'Act. Chim.*, **2011**, 353-354, p. 100.
- [3] Güntert P., Automated structure determination from NMR spectra, *Eur. Biophys. J.*, **2009**, *38*, p. 129.
- [4] Baron M., Norman D.G., Campbell I.D., Protein modules, *Trends Biochem. Sci.*, **1991**, *16*, p. 13.
- [5] Fernandez C., Wider G., TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2003**, *13*, p. 570.
- [6] Liu D., Xu R., Cowburn D., Segmental isotopic labeling of proteins for nuclear magnetic resonance, *Methods Enzymol.*, **2009**, *462*, p. 151.
- [7] Gans P., Hamelin O., Sounier R., Ayala I., Dura M.A., Amero C.D., Noirclerc-Savoye M., Franzetti B., Plevin M.J., Boissbouvier J., Stereospecific isotopic labeling of methyl groups for NMR spectroscopic studies of high-molecular-weight proteins, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2010**, *49*, p. 1958.
- [8] Sprangers R., Kay L.E., Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR, *Nature*, **2007**, *445*, p. 618.
- [9] Canet D., Boubel J., Soulas E.C., *La RMN : Concepts, Méthodes et Applications*, UniverSciences, Dunod, **2002**.
- [10] Bax A., Grishaev A., Weak alignment NMR: a hawk-eyed view of biomolecular structure, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2005**, *15*, p. 563.
- [11] Battiste J.L., Wagner G., Utilization of site-directed spin labeling and high-resolution heteronuclear nuclear magnetic resonance for global fold determination of large proteins with limited nuclear Overhauser effect data, *Biochemistry*, **2000**, *39*, p. 5355.
- [12] Iwahara J., Clore G.M., Detecting transient intermediates in macromolecular binding by paramagnetic NMR, *Nature*, **2006**, *440*, p. 1227.
- [13] Cornilescu G., Delaglio F., Bax A., Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology, *J. Biomol. NMR*, **1999**, *13*, p. 289.
- [14] Shen Y., Lange O., Delaglio F., Rossi P., Aramini J.M., Liu G., Eletsky A., Wu Y., Singarapu K.K., Lemak A., Ignatchenko A., Arrowsmith C.H., Szyperski T., Montelione G.T., Baker D., Bax A., Consistent blind protein structure generation from NMR chemical shift data, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, p. 4685.
- [15] Nilges M., Macias M.J., O'Donoghue S.I., Oschkinat H., Automated NOESY interpretation with ambiguous distance restraints: the refined NMR solution structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin, *J. Mol. Biol.*, **1997**, *269*, p. 408.
- [16] Nilges M., Bernard A., Bardiaux B., Malliavin T., Habeck M., Rieping W., Accurate NMR structures through minimization of an extended hybrid energy, *Structure*, **2008**, *16*, p. 1305.
- [17] Rieping W., Habeck M., Nilges M., Inferential structure determination, *Science*, **2005**, *309*, p. 303.



Y. Nominé

### Yves Nominé

est maître de conférences, rattaché à l'Université de Strasbourg, dans l'équipe Oncoprotéines de l'Institut de Recherche de l'École supérieure de biotechnologie de Strasbourg\*.



B. Kieffer

### Bruno Kieffer (auteur correspondant)

est professeur à l'École supérieure de biotechnologie de Strasbourg, responsable du groupe de RMN biomoléculaire à l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Strasbourg\*\*.

\* Équipe Oncoprotéines, UMR 7242 CNRS/Université de Strasbourg, Institut de Recherche de l'École supérieure de biotechnologie de Strasbourg, Boulevard Sébastien Brandt, BP 10413, F-67412 Illkirch Cedex.

\*\* Biomolecular NMR Group, UMR 7104 CNRS/Université de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Rue Laurent Fries, F-67400 Illkirch.  
Courriel : bruno.kieffer@igbmc.fr

# La RMN biomoléculaire ou la révolution en mouvement

Loïc Salmon et Martin Blackledge

- Résumé** La résonance magnétique nucléaire permet de sonder au niveau atomique le mouvement des molécules biologiques à un niveau de détail et de précision jusqu'alors inaccessible. Aussi anodin que cela puisse paraître, les récentes découvertes associées à ce domaine sont en train de bouleverser notre compréhension des mécanismes moléculaires régissant le fonctionnement du vivant, offrant ainsi l'opportunité de redessiner un cadre conceptuel pour la rationalisation de ces phénomènes.
- Mots-clés** **RMN, biologie structurale, mouvements moléculaires, interaction dipolaire, dynamique conformationnelle.**
- Abstract** **The biomolecular RMN or the revolution in motion**  
Nuclear magnetic resonance probes molecular motions at atomic resolution in hitherto inaccessible detail. Recent discoveries are revolutionising our understanding of the molecular mechanisms that govern biological function, providing the opportunity to reconsider the role of protein dynamics in the molecular processes of life.
- Keywords** **NMR, structural biology, molecular motions, dipolar interaction, conformational dynamics.**

La compréhension du fonctionnement des organismes vivants reste l'un des grands défis de la science contemporaine, mobilisant une incroyable diversité de disciplines et de techniques différentes. La RMN est un outil de choix pour s'intéresser à ces questions. Si les analyses issues de l'imagerie par résonance magnétique – nucléaire – (IRM) restent relativement connues par leurs applications en neurosciences ou en imagerie médicale, la RMN, appliquée à l'étude des macromolécules biologiques, se fait quant à elle beaucoup plus discrète, bien qu'elle soit en train de créer une véritable petite révolution scientifique dans le monde de la biologie structurale. Retour sur l'apparition d'un nouveau paradigme.

C'est à la toute fin du XIX<sup>e</sup> siècle que les premières hypothèses sur les mécanismes régissant les interactions entre molécules biologiques ont été émises. Le principe alors proposé par Emil Fischer est basé sur la complémentarité de forme. Si deux partenaires ont des structures tridimensionnelles complémentaires, alors ils peuvent interagir ensemble créant une entité appelée complexe dont l'interface est dictée par leur complémentarité topologique. Ce principe sous-tend toute la biologie structurale ; en effet, connaître la structure d'une molécule, par exemple une protéine, permettait de déterminer avec qui elle pouvait interagir : une autre protéine, l'ADN, un médicament... et ainsi trouver sa fonction ou expliquer son fonctionnement.

Historiquement la première source d'information sur la structure des macromolécules biologiques fut la cristallographie aux rayons X qui, par l'observation de figures de diffraction, permet de remonter à la structure tridimensionnelle d'un composé. La RMN, développée plus tardivement, a passé de nombreuses années à courir après la cristallographie afin de faire ses preuves comme méthode d'intérêt pour caractériser la structure des protéines. Jusque là, rien de révolutionnaire.

Au fil du temps et du développement d'appareils et d'expériences de plus en plus précises, les spectroscopistes se sont aperçus qu'une description structurale de leurs données était insuffisante pour en décrire tous les aspects. C'est alors qu'ils ont – enfin – commencé à pouvoir décrire les systèmes qu'ils étudiaient avec toute la complexité qu'ils requièrent, c'est-à-dire en décrivant les mouvements de ces systèmes. En effet, des composés tels que les protéines sont constitués de centaines, voire de milliers d'atomes soumis à l'agitation thermique ; ainsi vibrations, rotations et réorientations de domaines les animent constamment.

Mais comment observe-t-on de tels phénomènes ? Par exemple, les protéines ont des dimensions de l'ordre de quelques dizaines d'ångströms et l'observation de mouvements dans de tels objets nécessite de pouvoir les observer à une résolution très fine, si possible atomique. Le premier atout de la RMN est de pouvoir fournir cette résolution atomique par l'utilisation de très hauts champs et d'expériences multidimensionnelles. En effet, cela permet d'obtenir des expériences à très haute résolution pour lesquelles la majorité – voire la totalité – des signaux observés peuvent être identifiés puis attribués à un atome donné (*figure 1*, spectre bleu). Le second et tout aussi important atout de la RMN est d'être sensible à des échelles de temps très variées, s'étalant de la dizaine de picosecondes jusqu'à la seconde et au-delà.

La principale source d'information en RMN sur la dynamique des macromolécules biologiques vient de l'interaction dipolaire. Chaque atome actif en RMN, c'est-à-dire possédant un spin nucléaire non nul, engendre dans son voisinage un petit champ magnétique (*figure 2* représentant deux spins nucléaires, I (bleu) et S (rouge), et les lignes de champs magnétiques qu'ils génèrent). Ce champ magnétique va alors interagir avec les spins adjacents – eux aussi source

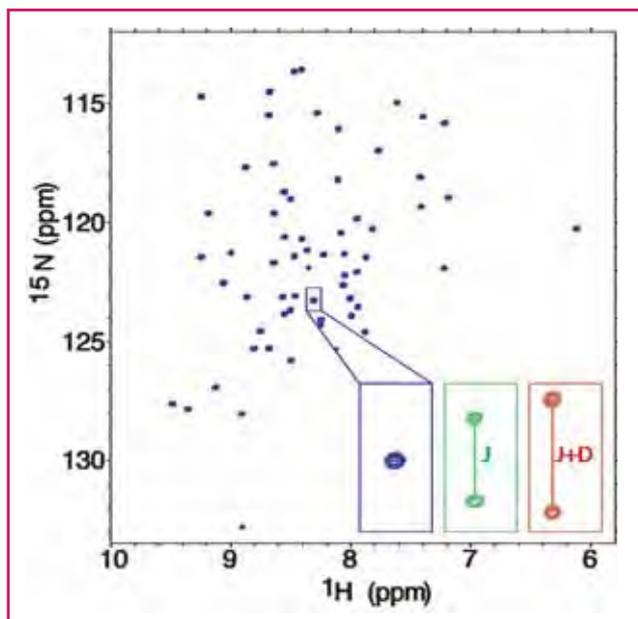


Figure 1 - Spectre RMN bidimensionnel caractéristique d'une protéine.

Chaque résonance du spectre peut être attribuée à une liaison chimique entre les atomes d'azote et d'hydrogène d'une fonction amide de la chaîne principale. En présence de découplage adéquat (bleu), un seul signal est observé par liaison. Néanmoins, un couplage scalaire ( $J$ ) existe naturellement entre ces deux atomes. Il est observable en absence de découplage (vert). Si de plus la mesure se fait en milieu anisotrope, alors le couplage mesuré est la somme des couplages scalaire et dipolaire (rouge).

de petits champs magnétiques – pour engendrer l'interaction dipolaire. Si l'arrangement spatial entre deux spins interagissant est modifié, alors l'interaction dipolaire va elle aussi être altérée car le champ ressenti par les spins va être modifié (figure 2 : le spin S bouge de la position rouge à la position orange). Les mouvements internes incessants des molécules vont moduler la géométrie de l'édifice moléculaire et ainsi induire de petits champs magnétiques variables dans le temps, aux fréquences caractéristiques des mouvements présents. Ces derniers pourront alors induire des transitions entre différents états de spin, contribuant ainsi au processus de relaxation, c'est-à-dire de retour à l'équilibre d'un échantillon placé hors équilibre (la mise hors équilibre constituant l'expérience RMN). Cette source d'information permet d'obtenir de l'information aux échelles de temps dites rapides, soit plus rapides que la réorientation moléculaire – typiquement de l'ordre de la dizaine de nanosecondes –, car celle-ci va masquer l'effet des mouvements internes.

Cette interaction peut être aussi observée de manière plus directe par des études de RMN en milieu liquide anisotrope comme les cristaux liquides. En effet, l'interaction dipolaire tend à globalement s'annuler dans les milieux isotropes, où la réorientation moléculaire se fait librement et ne se manifeste dans un spectre RMN qu'à travers les propriétés de relaxation du composé étudié. La présence d'anisotropie permet d'atténuer cet estompement et d'observer directement cette interaction, sous forme de couplages dipolaires résiduels. Dans le cas de deux spins interagissant déjà par l'intermédiaire de couplages scalaires – à travers les liaisons chimiques –, cette interaction dipolaire résiduelle va venir s'ajouter à ce couplage et devient ainsi directement accessible (figure 1, encadré vert, même spectre que le spectre bleu mais le couplage scalaire est observé ; encadré rouge, même spectre que le vert mais réalisé en milieu

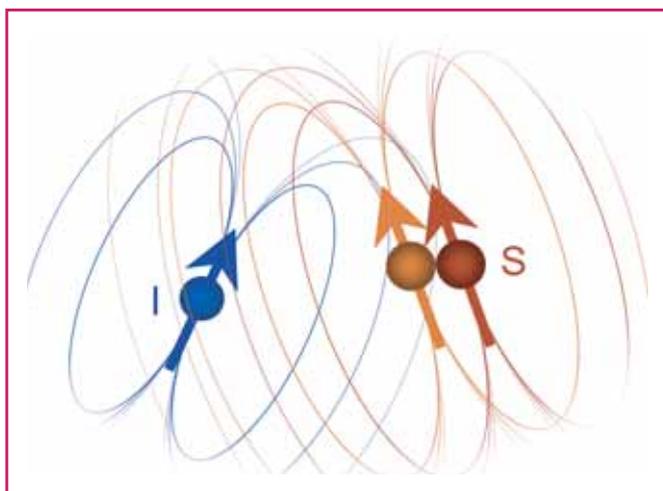


Figure 2 - Interaction dipolaire et relaxation.

Le spin I (bleu) génère un champ magnétique, représenté par ses lignes de champs, ressenti par le spin S (rouge) et inversement. Cette interaction réciproque constitue l'interaction dipolaire. Si le spin S se rapproche spatialement (orange), alors le champ magnétique ressenti par le spin I est modifié (et vice versa), ce qui entraîne une modulation de l'interaction dipolaire. L'agitation thermique, qui induit aléatoirement de telles modulations, est à l'origine des processus de relaxation.

anisotrope). L'effet de la dynamique lente, jusqu'à la milliseconde, n'étant plus complètement gommé par la réorientation moléculaire, va enfin être accessible. Et c'est ici que la révolution commence, les mouvements d'intérêt biologique – catalyse, reconnaissance moléculaire... – se déroulant typiquement aux échelles de temps allant de la micro- à la milliseconde.

Mais si la RMN permet d'obtenir de l'information sur les mouvements moléculaires, reste encore à la décoder. Pour ce faire, plusieurs approches sont concevables : il est possible d'utiliser un modèle de mouvement raisonnable – justifiable par les propriétés physico-chimiques du système – ou de s'aider des simulations moléculaires. Dans le premier cas, certaines hypothèses sont faites sur le mouvement moléculaire, par exemple la chaîne principale d'une protéine peut être découpée en petites entités rigides, les plans peptidiques, qui se réorientent les uns par rapport aux autres en suivant un mouvement diffusif (figure 3). Ce type

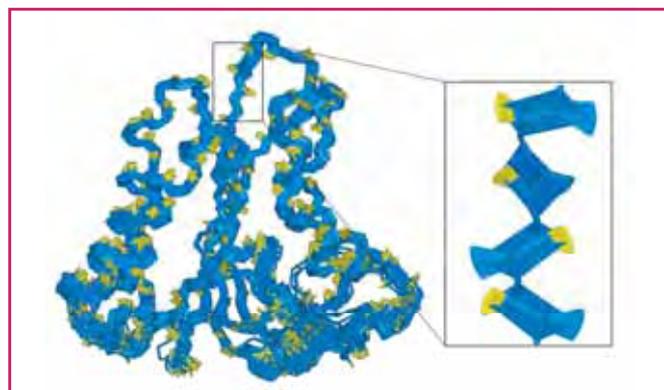


Figure 3 - Modélisation du mouvement de la chaîne principale d'une protéine par un modèle biophysique (encart).

Chaque plan peptidique (représenté par un quadrilatère) peut se réorienter selon des directions propres au modèle utilisé. La dynamique obtenue est alors présentée sous forme d'une déviation angulaire par rapport à leur orientation moyenne.

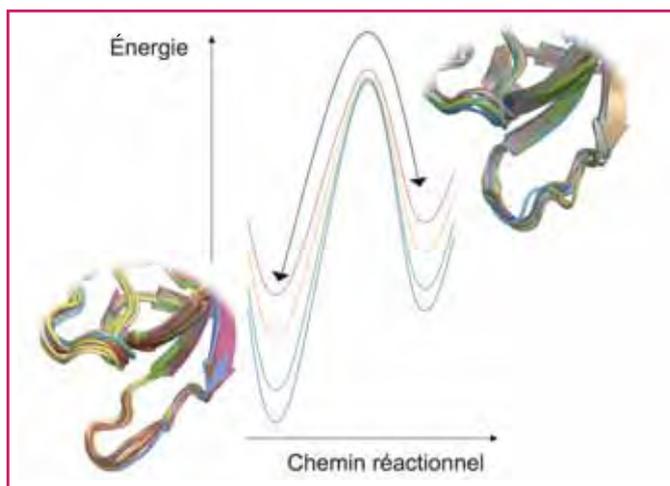


Figure 4 - Simulations moléculaires et accélération temporelle.

Pour réaliser la transition entre deux conformations (minimum énergétique à gauche et à droite), une importante barrière énergétique (centre, bleu) doit être franchie. Le temps nécessaire à cette transition dépend de la hauteur de la barrière énergétique. La dynamique moléculaire accélérée abaisse artificiellement cette barrière (accélération croissante de vert à rouge) et permet d'accroître artificiellement la vitesse de transition entre ces deux états.

d'approche analytique a conduit à de nombreuses avancées dans la caractérisation du mouvement des protéines, permettant de déterminer quantitativement l'amplitude et la direction des mouvements des plans peptidiques et de montrer la présence de mouvements corrélés, et de mettre en lumière l'existence de mouvements lents dans les régions clés pour la reconnaissance moléculaire.

Une autre approche très complémentaire consiste à utiliser les simulations de dynamiques moléculaires pour générer des ensembles de structures représentatives de la dynamique du système considéré. Ces simulations sont fondamentalement guidées par la dynamique newtonienne, au sein d'un potentiel d'énergie censé représenter l'état physico-chimique du système. Ce potentiel, appelé champ de force, tend à décrire toutes les interactions régissant le comportement d'une molécule : forces de van der Waals, liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, déformations de la géométrie des liaisons chimiques, interactions avec le solvant... Une fois ce potentiel connu, il est possible de laisser le système évoluer et de suivre ses modifications au cours du temps. Ces trajectoires permettent d'obtenir une caractérisation des mouvements moléculaires, mais restent encore limitées avec des supercalculateurs modernes à des durées souvent inférieures à la microseconde, soit juste avant la plage d'intérêt pour les mouvements biologiquement importants. Dommage. Mais s'agissant de simulations moléculaires, la notion de temps – nécessaire pour observer un phénomène – reste intimement prédéfinie par le potentiel utilisé. Si une barrière énergétique est difficile à franchir, elle ne le sera que rarement et demandera beaucoup de temps pour pouvoir être observée. Si cette barrière est artificiellement diminuée, alors la transition sera plus fréquente et le « temps » s'en trouvera accéléré (figure 4). Ces dynamiques moléculaires accélérées permettent de sonder les échelles de temps pertinentes pour l'interprétation des couplages dipolaires résiduels et ainsi d'apporter une description complémentaire à celles basées sur des modèles biophysiques.

Ces deux types d'approche, encore en plein développement, ont pour l'instant été appliquées avec succès à l'étude de plusieurs protéines aboutissant à une surprenante convergence. Cette convergence extrêmement encourageante témoigne d'un niveau de précision suffisant pour enfin pouvoir s'intéresser au véritable impact de cette dynamique sur les processus biologiques tels que la transmission d'information sur de longues distances et les processus de reconnaissance moléculaire. Cette dernière question reste particulièrement débattue aujourd'hui. En effet, si les molécules sont en constant mouvement, comment expliquer en détail leurs interactions, puisqu'il devient *stricto sensu* impossible d'appliquer le principe de complémentarité de forme ? Est-ce que chaque partenaire échantillonne différentes conformations indépendamment et interagissent-ils ensuite lorsqu'ils adoptent deux formes complémentaires ? Ou est-ce que ces composés commencent à interagir et peu à peu modulent leur topologie pour pouvoir conduire à une possible complémentarité ?

Ce n'est qu'aujourd'hui qu'il devient enfin possible d'étudier de tels processus dynamiques à une résolution atomique permettant ainsi de déterminer l'impact d'un comportement dynamique sur des systèmes biologiques jusqu'ici souvent analysés en termes statiques. Ces questions demeurent encore ouvertes car ce domaine de recherche particulièrement jeune n'a pas encore eu le temps de s'épanouir pleinement pour atteindre la taille suffisante pour prétendre à une véritable généralité, mais il permet déjà de toucher du doigt un monde jusqu'alors ignoré.

Il a fallu d'incroyables révolutions scientifiques pour concevoir que l'homme n'était qu'une espèce en perpétuelle évolution, vivant dans un univers hautement dynamique ; il n'en faudra qu'une de plus pour concevoir que les principes nécessaires à la vie, au moins telle que nous l'entendons, sont intimement basés sur un incessant ballet d'éléments en perpétuel mouvement. Même si nous ne commençons qu'à l'entr'apercevoir, encore une fois, la révolution est en marche !

### Pour en savoir plus

- Salmon L., Bouvignies G., Markwick P., Blackledge M., Nuclear magnetic resonance provides a quantitative description of protein conformational flexibility on physiologically important time scales, *Biochemistry*, 2011, 50(14), p. 2735-47.



L. Salmon

Après sa thèse sous la direction de Martin Blackledge, **Loïc Salmon** travaille actuellement dans le groupe du professeur Hashim al-Hashimi à l'Université du Michigan (Ann Arbor, E.-U.), où il étudie la dynamique des molécules d'ARN.



M. Blackledge

**Martin Blackledge** (auteur correspondant) est directeur de recherche au CEA Énergies alternatives et directeur de l'équipe « Protein Dynamics and Flexibility by NMR » à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble\*.

\* Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel, 41 rue Jules Horowitz, F-38027 Grenoble Cedex 1.  
Courriel : martin.blackledge@ibs.fr

# La métabolomique par RMN et ses applications en biologie végétale, toxicologie et médecine

Cécile Canlet, Laetitia Shintu et Bénédicte Elena-Herrmann

**Résumé** Cet article présente les principes ainsi que les outils analytiques et chimiométriques qui sont au cœur du développement des approches d'analyse métabolomique par RMN. Il en illustre les applications variées au travers d'exemples choisis dans différents domaines de la biologie et de la médecine, concernant l'étude des organismes génétiquement modifiés, les interactions plantes/environnement, la toxicologie environnementale, la pharmacologie, la cancérologie ou l'épidémiologie moléculaire.

**Mots-clés** RMN, métabolomique, métabolites, chimiométrie, biostatistique, biofluides.

**Abstract** NMR metabolomic approaches for plants, toxicology and medicine

This article describes the principles as well as the analytical and chemometric tools that support the development of NMR metabolomic approaches. These analytical methods are illustrated through a range of selected examples in various domains of biology and medicine, concerning the study of genetically modified organisms, plant/environment interactions, environmental toxicology, pharmacology, cancerology, or molecular epidemiology.

**Keywords** NMR, metabolomics, metabolites, chemometrics, biostatistics, biofluids.

Si l'essor de la technique de RMN a été lié pendant plusieurs décennies au développement de méthodes pour l'étude de systèmes moléculaires de plus en plus complexes, tels que protéines ou assemblages macromoléculaires, l'étude par RMN de petites molécules dans des systèmes naturels fait l'objet d'un intérêt ravivé et croissant depuis une quinzaine d'années. À l'opposé des problématiques classiques de détermination structurale sur des produits isolés et souvent isotopiquement marqués, l'enjeu réside à présent dans la caractérisation de mélanges complexes, impliquant la détection et l'analyse simultanée d'un grand nombre de molécules individuellement simples. Telle est l'ambition d'une analyse de type *métabolomique*, dont l'objet se porte généralement sur l'étude de fluides biologiques (urine, sérum ou plasma sanguin, liquide amniotique, liquide céphalo-rachidien...), d'extraits de plantes, de cellules, par RMN en solution, mais également sur l'analyse de tissus intacts (biopsies) ou d'organismes modèles entiers (levures, nématodes *C. elegans*...) par la technique de RMN dite « à haute résolution à l'angle magique » (HR-MAS) adaptée pour des échantillons semi-solides. La métabolomique peut être définie comme l'identification et la quantification non sélective de l'ensemble des *métabolites* d'un système biologique (voir encadré 1).

Le développement de ces approches a été nettement favorisé par les progrès technologiques récents de la RMN, notamment l'accessibilité des hauts champs magnétiques (600 MHz et plus) qui améliore simultanément sensibilité et résolution spectrale, mais également la mise au point de technologies robustes pour l'acquisition de données à haut débit (jusqu'à une centaine d'échantillons par jour) permettant l'analyse de grandes cohortes d'échantillons [1]. Les travaux de J. Lindon et J.K. Nicholson (Imperial College,

Londres) ont été pionniers dans l'exploitation de ces ressources analytiques pour la détection d'empreintes métaboliques, contribuant de façon majeure aux développements des protocoles expérimentaux et des méthodes adaptées pour l'exploitation des données spectrales, tout en dévoilant le vaste potentiel des approches de métabolomique pour des applications dans de nombreux domaines, tels que le diagnostic médical, la toxicologie, l'épidémiologie moléculaire, ou plus récemment de la médecine personnalisée.

La RMN contribue sans exclusivité, parmi un ensemble de techniques analytiques, à l'essor de cette vaste entreprise d'exploration du métabolome, qui inclut notamment des approches de spectrométrie infrarouge, des techniques de

## Encadré 1

### Des métabolites au métabolisme : quelques définitions

**Métabolisme** : ensemble de toutes les réactions chimiques présentes dans un organisme et dont les réactifs, intermédiaires et produits sont les métabolites.

**Métabolite** : petite molécule présente dans un organisme, de masse molaire inférieure à 1 kDa (1 kg/mol). Les métabolites dits *primaires* sont directement impliqués dans les processus normaux de croissance, développement ou reproduction d'un organisme, et comprennent entre autres acides aminés, lipides, sucres ou acides nucléiques. Les métabolites *secondaires* ne sont pas essentiels à ces processus et sont associés généralement au métabolisme des plantes, bactéries et champignons. Ils participent principalement à l'adaptation de ces organismes à leur environnement.

**Métabolome** : ensemble des métabolites présents dans un organisme.

chromatographie, d'électrophorèse ou de spectrométrie de masse. Cette dernière, couplée à des méthodes séparatives de chromatographie en phase gazeuse ou liquide, est un outil largement exploité pour ce type d'études, qui bénéficie pour des analyses ciblées de seuils de détection très inférieurs à ceux proposés par la RMN (généralement limitée à la détection de concentrations micromolaires ou supérieures). Cet atout majeur est nuancé par une moindre robustesse en matière de quantification, si bien que spectrométries de masse et de RMN génèrent en pratique des données très complémentaires pour l'analyse métabolomique. Cet article se focalise sur l'utilisation de la RMN dans ce contexte, mais les outils de chimiométrie et les applications présentés ici sont plus largement pertinents, indépendamment de la méthode spectroscopique utilisée.

## Métabolomique par RMN : la démarche analytique

L'acquisition des données RMN exploitées dans le cadre d'une analyse métabolomique repose principalement sur des expériences relativement simples de RMN 1D du proton avec présaturation du signal de l'eau (pour en éliminer la contribution) permettant l'acquisition de profils métaboliques quantitatifs, ou de type CPMG (voir *encadré 2*), qui atténuent sélectivement la contribution (minoritaire) des signaux larges associés à un éventuel contenu protéique des échantillons. Ces expériences fournissent des profils métaboliques 1D complexes, tels qu'illustrés en *figure 1*, qui sont généralement enregistrés pour un ensemble, ou *cohorte*, d'échantillons (d'une ou quelques dizaines, jusqu'à plusieurs milliers) dans le but de déterminer des empreintes, ou *signatures métaboliques*, représentatives de sous-groupes d'échantillons donnés.

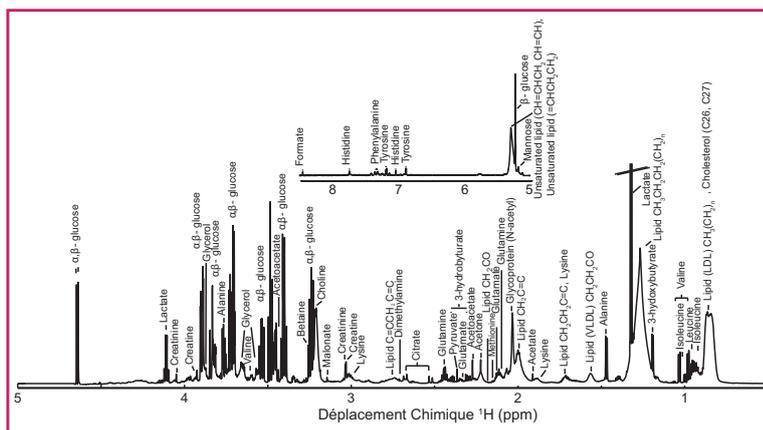


Figure 1 - Spectre de RMN  $^1\text{H}$  caractéristique pour un échantillon de sérum sanguin humain, enregistré à 800 MHz.

L'identification des métabolites ne pouvant être directement extraite de ces profils 1D complexes, des expériences de RMN multidimensionnelles sont enregistrées en complément pour quelques échantillons représentatifs d'une cohorte donnée. Elles comprennent typiquement des expériences 2D de corrélation  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ou  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  permettant l'identification simultanée non ambiguë de plusieurs dizaines de métabolites, voire jusqu'à une centaine de métabolites détectés par exemple dans des urines.

La complexité des données RMN, liée au grand nombre de métabolites simultanément détectés dans les profils 1D, et le nombre élevé d'échantillons analysés au cours des études métabolomiques rendent difficile l'évaluation qualitative ou quantitative des variations métaboliques par comparaisons directes des spectres enregistrés. L'utilisation de méthodes statistiques, fréquemment appelées dans ce contexte *méthodes chimiométriques* ou *biostatistiques*, pour l'exploration des données et l'extraction des informations pertinentes est ainsi nécessaire et largement répandue. Le terme *chimiométrie* représente une appellation générique désignant les outils mathématiques ou statistiques appliqués à l'analyse de données physico-chimiques. Cette modélisation statistique des données permet d'une part la visualisation des différences et similitudes globales entre échantillons et variables, associées par exemple à une classification selon un profil métabolique caractéristique d'un effet considéré (pathologie, mutation, exposition à un composé xénobiotique...). D'autre part, elle mène à l'identification plus précise des signaux métaboliques responsables de ces différences *statistiquement significatives* entre groupes d'échantillons, et à la mise en évidence des voies métaboliques affectées. Pour cela, un grand nombre de méthodes statistiques sont à disposition, mais nous n'aborderons ici que quelques outils et notions essentiels, les plus fréquemment utilisés.

## Traitement statistique des données RMN

La première étape préalable à l'analyse statistique des données RMN est leur transformation ou *réduction* en un jeu de données numériques adapté au traitement par des logiciels de statistique. Cette étape, illustrée en *figure 2*, consiste généralement en une segmentation systématique des spectres, permettant de produire un tableau (matrice X) synthétisant l'ensemble du jeu de données pour une cohorte

### Encadré 2

#### Quelques outils de RMN à l'usage du « métabolomiste »

##### Expériences classiques de RMN 2D pour l'identification structurale des métabolites

**HSQC** : expérience 2D hétéronucléaire, généralement  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , permettant la corrélation d'un hétéronoyau ( $^{13}\text{C}$ ) avec le ou les protons qui lui sont directement attachés par une liaison chimique.

**J-résolue (ou J-RES)** : expérience 2D homonucléaire  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permettant pour chaque type de proton observé de séparer dans la seconde dimension d'observation la structure en multiplet due aux couplages J entre protons.

**TOCSY** : expérience 2D homonucléaire  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  permettant la corrélation de tous les protons d'un même système de spins, c'est-à-dire directement ou indirectement (de façon relayée) par un couplage J à travers les liaisons chimiques.

##### RMN pour l'étude des tissus biologiques

**HR-MAS** : technique de RMN « haute résolution sous rotation à l'angle magique », adaptée à l'étude d'échantillons semi-solides tels que tissus biologiques, biopsies, cellules, etc. Elle met en œuvre une rotation très rapide de l'échantillon (plusieurs kHz) autour d'un axe orienté selon un angle dit « magique » de  $54,7^\circ$  avec le champ magnétique principal, permettant d'obtenir pour ce type d'échantillon des spectres RMN à une haute résolution en moyennant les effets liés à l'inhomogénéité de susceptibilité magnétique, l'anisotropie de déplacement chimique et les interactions dipolaires.

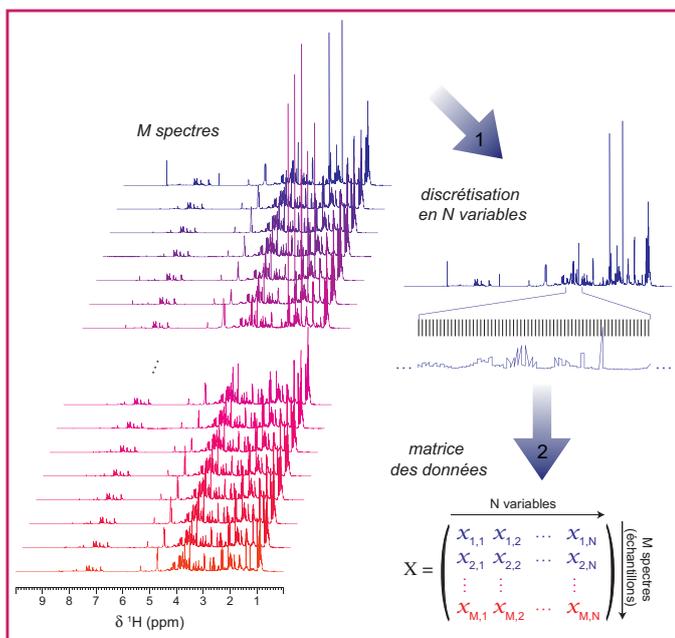


Figure 2 - Principe de mise en forme d'un jeu de données RMN 1D pour une cohorte de M échantillons.

Les spectres sont segmentés en N régions de largeur fixe, par exemple  $10^{-3}$  ppm, ou éventuellement variable. L'intégrale  $X_{i,j}$  du signal RMN mesurée pour chaque segment produit une matrice X, de dimensions (M, N), synthétisant l'ensemble de l'information spectrale exploitable pour la cohorte d'échantillons étudiée.

d'échantillons analysés. D'autres procédés de transformation des données existent, tels que des méthodes de déconvolution qui permettent une estimation directe de la

concentration relative ou absolue des métabolites par reconnaissance de leur enveloppe spectrale et intégration totale des signaux correspondants. Elles restent toutefois peu exploitées car il n'existe pas à ce jour d'outils informatiques pour leur application fiable et automatisée à l'analyse de larges cohortes de spectres RMN.

L'analyse métabolomique privilégie ensuite la modélisation des données RMN ainsi formatées par des approches d'analyse statistique multivariée (voir encadré 3). L'intérêt de ces méthodes est de réduire la dimension de l'espace des variables (initialement N) en recherchant les combinaisons linéaires de celles-ci, appelées composantes ou variables latentes, qui synthétisent l'information métabolique recherchée. Les résultats des analyses multivariées peuvent être visualisés dans deux espaces distincts (figure 3) : l'espace des individus ou « scores », dans lequel les échantillons s'arrangent en sous-populations (ou classes), et l'espace des variables ou « loadings », qui met en évidence les *signatures métaboliques* correspondantes, c'est-à-dire les différences caractéristiques, entre classes d'échantillons, de concentration des métabolites détectés.

Deux grandes familles de méthodes statistiques multivariées se distinguent selon le caractère *non supervisé* ou *supervisé* de l'analyse. La première s'intéresse à la description des caractéristiques intrinsèques des profils métaboliques définissant un jeu de données, sans connaissance *a priori* de groupes d'appartenance des échantillons, tandis que les méthodes supervisées exploitent des informations complémentaires sur la nature des échantillons (par exemple individus sains vs. malades, traités vs. non traités, etc.). La méthode non supervisée la plus répandue est l'analyse en composantes principales (ACP),

### Encadré 3

#### Principes d'analyse statistique multivariée

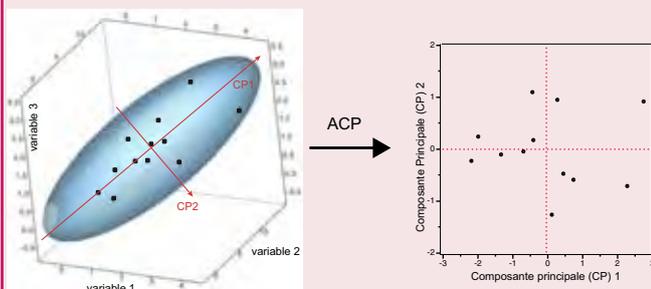


Figure A - Analyse en composantes principales, i.e. non supervisée (illustrée pour N = 3).

L'analyse en composantes principales (ACP) consiste à appliquer une rotation dans l'espace des variables à N dimensions, de façon à ce que le nouveau système d'axes, constitué par les composantes principales, maximise l'étalement des projections des individus (de coordonnées initiales définies par les colonnes de la matrice X). La première composante principale CP1 représente la direction de l'espace contenant la plus grande variance exprimée dans les données analysées. La deuxième composante principale CP2 représente la 2<sup>e</sup> direction de plus grande variance, dans le sous-espace orthogonal à CP1, etc. La procédure se poursuit jusqu'à ce que la totalité de la variance soit expliquée et permet ainsi de synthétiser l'information essentielle contenue au sein du jeu de données par un nombre limité de CP (généralement  $\ll N$ ). Chaque CP correspond à une combinaison linéaire des N variables d'origine, les poids représentant la

contribution des variables (métabolites) à ces composantes. La représentation de ces composantes permet d'en visualiser les signatures métaboliques associées (schéma des « loadings », voir figure 3 p. 62).

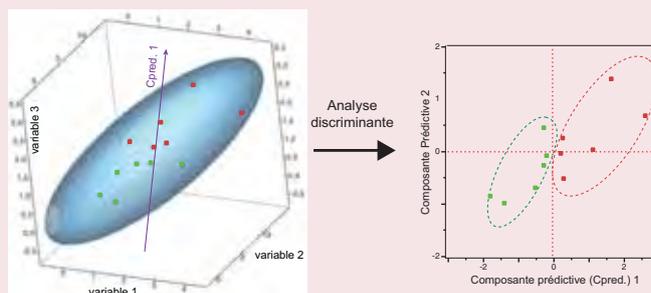


Figure B - Principe d'analyse supervisée discriminante (pour N = 3).

Les méthodes d'analyse supervisées (de type PLS) prennent en compte l'appartenance de chaque échantillon à un groupe donné. Le nouveau système d'axes (combinaisons linéaires des variables d'origine) maximise les distances inter-groupes. Les méthodes supervisées doivent être appliquées avec prudence, car elles peuvent conduire à des résultats surestimés. Chaque modèle statistique supervisé doit être rigoureusement évalué selon différentes méthodes, dont la plus connue est la validation croisée, pour en déterminer la *sensibilité* et la *prédictivité*. L'article de Broadhurst et Kell approfondit plus spécifiquement ces problématiques de validation [18].

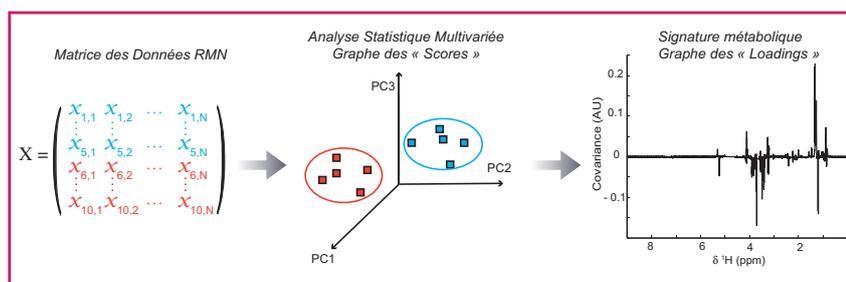


Figure 3 - Principe de modélisation statistique multivariée des données RMN.

particulièrement utile pour l'exploration des données et la détection d'échantillons aberrants. Elle permet de résumer la variance contenue dans les données dans un nombre réduit de composantes principales. Des algorithmes de classification hiérarchique ou « clustering » sont également largement utilisés pour une mise en évidence sans *a priori* de similarités en groupes d'échantillons. Cependant, il est possible que les sources principales de variance au sein d'une cohorte d'échantillons ne soient pas liées à l'effet étudié et par conséquent qu'une analyse de type ACP ne conduise pas à la séparation des échantillons souhaitée. Les méthodes supervisées telles que la régression des moindres carrés partiels (PLS, « partial least square »), l'analyse discriminante PLS ou l'analyse linéaire discriminante permettent alors d'extraire les composantes du profil métabolique spécifiquement corrélées aux paramètres d'intérêt de l'étude. Une extension de ces approches, la méthode OPLS (« orthogonalised projection on latent structures ») [2], développée plus récemment et qui sépare la variation corrélée au paramètre prédictif de classification de la variation orthogonale (non corrélée), est maintenant régulièrement employée pour l'analyse métabolomique.

## Vers la biologie des systèmes...

Pour une meilleure compréhension des mécanismes biologiques au sein d'approches de biologie intégrée des systèmes, la métabolomique peut être combinée à des données biochimiques ou à d'autres données « omiques », telles que la transcriptomique et la protéomique. Pour comprendre le métabolisme de la cellule et les réponses de ces cellules à des facteurs environnementaux et appréhender la complexité des systèmes biologiques, il est nécessaire d'étudier la cellule à différents niveaux, celui des gènes (génomique), de l'ARN messager (transcriptomique), des protéines (protéomique) et des métabolites (métabolomique), ainsi que leurs interactions (voir encadré 4). Dans la plupart des cas, ces différents types de données sont analysés de manière isolée, d'où une perte de l'information. Il existe différentes techniques statistiques permettant d'intégrer plusieurs jeux de données issues de techniques analytiques ou « omiques » différentes ; l'une des méthodes utilisées est l'O2PLS. Cette méthode supervisée est une généralisation de l'OPLS, décrite précédemment, qui permet la modélisation et la prédiction selon deux directions, à partir de matrices de données X et Y, représentant respectivement deux ensembles distincts de mesure, par exemple métabolomique par RMN et protéomique, collectés en parallèle sur des échantillons des mêmes individus. Ce type d'approche permet par exemple de déterminer les corrélations entre les métabolites discriminants et les protéines et vice versa [3].

## Reconstruction des réseaux métaboliques

La reconstruction des réseaux métaboliques à partir des données de métabolomique est une étape importante pour l'interprétation biologique des perturbations observées, car elle permet de visualiser les parties du réseau métabolique qui sont affectées par la perturbation biologique étudiée (pathologie, mutation, etc.). Les voies métaboliques perturbées impliquant les métabolites identifiés et

quantifiés par RMN sont repérées grâce à l'exploitation de bases de données comme KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), puis reconstruites et visualisées à l'aide d'un outil logiciel tel que cytoscape [4]. L'étude de Zhang *et coll.* illustre par exemple les perturbations métaboliques observées en fonction de l'inactivation du cycle de l'acide tricarboxylique (figure 4) [5].

### Encadré 4

#### D'autres grandes approches « omiques »...

**La génomique** est l'étude du génome, c'est-à-dire l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce codée dans son ADN.

**La protéomique** désigne la science qui étudie des ensembles de protéines synthétisées par une cellule, leurs rôles, leurs structures, leurs localisations et leurs interactions. La démarche classique de l'analyse protéomique consiste, dans un premier temps, à séparer les protéines présentes dans une cellule ou un compartiment cellulaire. Chaque protéine d'intérêt est ensuite hydrolysée en fragments (peptides), qui sont analysés par spectrométrie de masse.

**La transcriptomique** est l'étude de l'ensemble des ARN messagers produits lors du processus de transcription d'un génome. Elle repose sur la quantification systématique de ces ARNm, ce qui permet d'avoir une indication relative du taux de transcription de différents gènes dans des conditions données. Plusieurs techniques, telles que les puces à ADN ou la PCR quantitative, donnent accès à ce type d'informations.

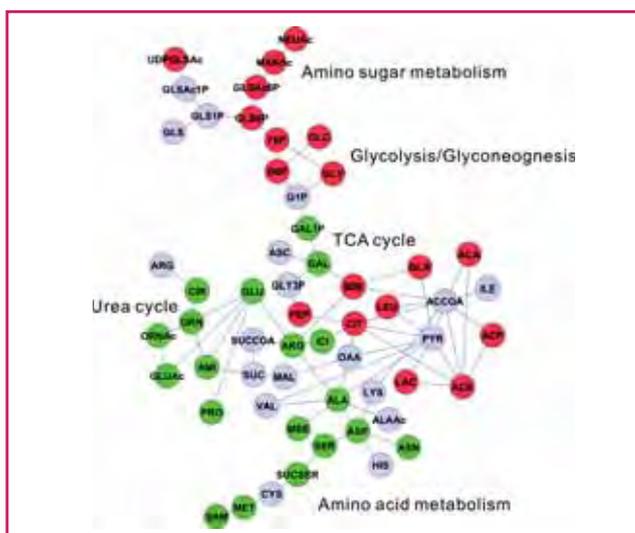


Figure 4 - Réseau métabolique représentant les variations des concentrations des métabolites causées par l'inactivation du cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) : sont représentés en rouge ou vert les métabolites dont la concentration augmente ou respectivement diminue. Reproduit de [5] avec permission, © 2011 American Chemical Society.

La suite de cet article s'attache à présenter quelques grands domaines d'applications de l'analyse métabolomique par RMN concernant l'étude des plantes, la toxicologie ou la médecine, au travers de quelques exemples choisis.

## Applications à l'analyse par RMN métabolomique des plantes

À l'heure actuelle, environ 23 000 métabolites ont été identifiés dans les plantes (toutes variétés confondues), mais il est cependant estimé que ce royaume compterait entre 200 000 à 1 million de composés [6]. L'analyse métabolomique de tels systèmes complexes peut non seulement fournir des informations sur la nature fondamentale du phénotype des plantes en relation avec leur développement, leur physiologie et l'environnement, mais aussi aider à une meilleure compréhension de la nature interactive des réseaux métaboliques et de leurs réponses face aux changements génétiques. Bien que l'utilisation de la RMN pour l'analyse de plantes reste limitée, la plupart des métabolites ayant une concentration plus faible que la limite de détection de l'instrument, elle offre toutefois un certain nombre d'avantages par rapport aux autres techniques analytiques, tels qu'une préparation des échantillons simple et rapide, un temps d'acquisition spectrale très court (moins de 10 min en moyenne) et une excellente reproductibilité. De plus, la RMN permet de visualiser et de quantifier sur un même spectre les métabolites primaires (sucres, acides aminés...), majoritaires dans les plantes, et les métabolites secondaires (flavonoïdes, glucosinolates...) en fortes concentrations dans certains organismes.

Une particularité des plantes est leur très forte sensibilité aux variations environnementales (température, lumière, humidité), ce qui rend difficile la mise au point d'un protocole d'analyse reproductible. Il est souvent nécessaire de rassembler plusieurs plantes pour former un échantillon, pour des raisons de quantité de matériel, mais également pour moyenniser cette variabilité biologique. De nombreux efforts ont été faits pour mettre au point des procédés d'extraction fiables, capables de fournir une représentation fidèle du métabolisme [7]. Dans la suite, est présentée une sélection des applications de la RMN métabolomique pour l'analyse des plantes, dans deux des domaines les plus étudiés : les organismes génétiquement modifiés (OGM) et les interactions plantes/micro-organismes.

### Organismes génétiquement modifiés

La modification génétique des cultures agricoles (blé, riz, maïs...) a souvent pour but d'améliorer leur résistance aux agressions environnementales (climat, insectes) ou leur valeur nutritionnelle (augmentation de la concentration en antioxydants). Ces modifications génétiques consistent en la surexpression, l'addition, la suppression ou l'inactivation d'un ou de plusieurs gènes, spécifiquement sélectionnés pour leur influence sur le métabolisme de la plante. Cependant, les interactions entre métabolites sont difficiles à prévoir, et aux changements métaboliques attendus, peuvent s'associer des variations inattendues, pouvant rendre la plante impropre à la consommation. La recherche de méthodes capables d'évaluer ces risques de façon fiable est donc une problématique essentielle. La métabolomique par RMN, méthode quantitative et non ciblée, représente un outil de choix pour détecter ces modifications métaboliques inattendues. Elle permet de comparer l'ensemble du métabolisme des extraits de plantes non modifiées par rapport à leurs équivalents

transgéniques, dès que les molécules sont en concentration suffisante pour être détectées.

Considérons l'exemple du gène *Cry1Ab*, identifié comme étant responsable des qualités insecticides de la bactérie *Bacillus thuringiensis* qui est parfois utilisée comme insecticide en lieu et place d'un traitement chimique. L'expression de ce gène dans une plante, et notamment dans le maïs, permet la production par la plante elle-même d'une protéine insecticide dite protéine Crystal (la protéine *Cry1Ab*) qui tue en particulier les lépidoptères (papillons). La plupart des cultures agricoles génétiquement modifiées commercialisées sont porteuses de ce gène, et notamment les graines de maïs MON 810 commercialisées par Monsanto. Une équipe de recherche s'est intéressée aux variations métaboliques existant entre des graines de maïs exprimant ce gène par rapport aux mêmes graines non modifiées [8]. Dans leur étude, l'analyse statistique des spectres RMN du proton d'extraits hydroalcooliques des graines de maïs fournies par Monsanto a montré que la modification génétique entraînait des variations métaboliques importantes impliquant principalement l'asparagine, la glutamine, l'acide gamma-aminobutyrique, la choline et le succinate. Les auteurs ne concluent cependant pas sur les risques potentiels que ces modifications métaboliques peuvent engendrer en cas de consommation par l'homme ou l'animal. Ce sujet a cependant été abordé quelques années plus tard par une autre équipe de recherche, qui a étudié les effets allergènes de ces mêmes graines transgéniques (MON 810) sur des souris par RMN métabolomique [9]. Dans cette étude, les protéines extraites des graines de maïs transgéniques et de leur équivalent non-OGM ont été administrées à des souris par voie orale pendant 26 jours. L'urine de chaque souris a ensuite été prélevée avant consommation des protéines de maïs, et à 24 et 48 h après la dernière administration de celles-ci, puis analysée par RMN liquide. Une analyse discriminante linéaire a permis de mettre en évidence des différences métaboliques entre les souris traitées avec les protéines issues des graines OGM par rapport à celles traitées par les protéines issues des graines non-OGM (figure 5). Les auteurs de cette étude ont observé

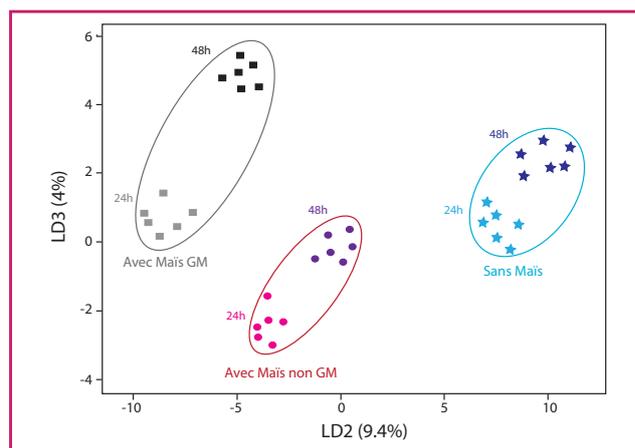


Figure 5 - Analyse linéaire discriminante des profils RMN <sup>1</sup>H d'échantillons d'urine de souris prélevés pour des individus contrôles n'ayant pas consommé de protéines de maïs (étoiles), ayant consommé des protéines de maïs non transgéniques (ronds) ou transgéniques (carrés) pendant 26 jours.

Les trois différents groupes sont bien séparés suivant l'axe LD2, ce qui démontre l'effet du régime alimentaire administré sur le métabolisme des souris. Pour chaque groupe, les urines ont été prélevées 24 et 48 h après les 26 jours d'alimentation spécifique. Les variations métaboliques des urines au cours du temps sont bien mises en évidence le long de l'axe LD3.

une plus faible production de phénylalanine et d'hippurate et une plus forte production de tryptophane dans l'urine des souris traitées par les protéines du maïs MON 810. Cependant, ces variations ne représentent que 1 % de la variance métabolique totale et ne sont pas considérées comme des marqueurs d'inflammation ou de réactions immunologiques.

Ces deux exemples ne constituent qu'un petit échantillon des nombreuses études effectuées par RMN métabolomique sur les OGM. Des travaux plus fondamentaux sont également menés sur des plantes modèles (généralement sur la variété *Arabidopsis*) afin d'identifier la fonction métabolique de certains gènes. Ceci représente en principe la première étape dans la sélection des gènes qui pourraient être utilisés dans la modification génétique des cultures agricoles.

### Interactions entre les plantes et leur environnement

De la cohabitation entre les plantes et différents micro-organismes (pathogènes ou non pathogènes) résultent des variations importantes dans la réponse biochimique de la plante. On se trouve alors confronté à des réactions en cascades conduisant soit à une réponse mutuelle bénéfique, soit à un mécanisme de défense ciblé contre un pathogène. Par exemple, au moment de la pollinisation, les aracées vont sécréter des molécules volatiles et odorantes, imitant l'odeur du lieu de pondaison des mouches qui vivent dans leur environnement direct. Suivant la nature de ces mouches, ces plantes sécréteront donc de façon privilégiée une odeur de fruits pourris, d'excréments ou de charognes... Les mouches femelles ainsi leurrées viendront pondre dans les fleurs des aracées et repartiront avec le pollen de la plante qui pourra ainsi être dispersé. Ces mécanismes d'interaction, témoignant de la faculté d'adaptation des plantes à leur environnement, sont extrêmement intéressants, mais aussi excessivement complexes. De nombreux chercheurs se sont appliqués à comprendre ces mécanismes et certains ont focalisé leur intérêt sur l'identification des différentes classes chimiques impliquées dans les changements métaboliques liés à ces comportements, à l'aide de la RMN métabolomique.

Cette approche a été choisie par un groupe de chercheurs hollandais et français pour étudier les modifications du métabolisme des feuilles de tabac *Nicotiana tabacum* infectées par un virus (le virus mosaïque du tabac) [10]. Les auteurs de cette étude ont donc comparé les spectres RMN 2D J-résolue des feuilles infectées par rapport aux feuilles saines respectivement 1, 3, 7 et 10 jours après infection en utilisant une analyse en composantes principales. Ils ont ainsi montré que, dans une première étape, la plante développe un programme de mort cellulaire pour les cellules infectées par le virus. Métaboliquement, cette étape est associée à une altération des phénylpropanoïdes<sup>(1)</sup> impliqués dans le renforcement des parois cellulaires, ainsi qu'à une augmentation de la production en acide caffeoylquinique, connu pour contribuer à la résistance des plantes, et en acide alpha-linoléique, probablement impliqué dans la synthèse d'acide jasmonique qui contribue à l'activation des protéines de défense. Dans une seconde étape, ils assistent à une émission de signaux en cascades impliquant la production de composés tels que l'acide salicylique, qui permettent à la plante d'acquiescer une résistance systémique, et qui permettra à celle-ci de répondre de façon plus rapide et efficace en cas de futures expositions.

## Applications de la métabolomique en toxicologie

Les premières applications de la métabolomique dans le domaine de la toxicologie sont apparues il y a une quinzaine d'années. Les travaux fondateurs produits par l'équipe de J.K. Nicholson à Londres portant sur différentes études pharmacologiques ou toxicologiques ont permis de dépasser les limites rencontrées avec des techniques conventionnelles pour l'évaluation de la toxicité d'un certain nombre de substances modèles. L'objectif d'une étude métabolomique dans un contexte de toxicologie est de révéler un ensemble de biomarqueurs décrivant les perturbations métaboliques engendrées par l'exposition de l'organisme à des composés toxiques, permettant de produire des hypothèses quant au mécanisme de toxicité impliqué. De nombreuses études ont évalué les effets de substances toxiques par une approche de métabolomique par RMN, notamment pour l'évaluation toxicologique de médicaments, de préparations de médecine chinoise traditionnelle, de pesticides ou de contaminants environnementaux... Nous nous intéressons ci-après plus particulièrement à deux exemples dans le domaine de la pharmacologie et de la toxicologie de contaminants.

### Toxicologie des médicaments : pharmaco-métabolomique par RMN

L'évaluation de la toxicité des médicaments est un enjeu important pour l'industrie pharmaceutique. Les toxicités les plus problématiques sont celles qui apparaissent tard au cours d'un traitement, et qui ne sont pas détectables lors des études précliniques et cliniques de ces médicaments. Un défi majeur est donc l'identification précoce des biomarqueurs des réactions secondaires de ces médicaments, c'est-à-dire avant que le patient ne subisse de potentiels effets toxiques liés au traitement. L'analyse métabolomique par RMN de biofluides de rongeurs après traitement s'avère être une technique particulièrement pertinente pour l'évaluation de la toxicité de médicaments potentiels, démontrée par des études sur de nombreuses substances modèles. La prédiction de lésions au niveau du foie de rongeurs peut être également évaluée à partir d'études par RMN sur des biofluides prélevés en amont de tout traitement. Prenons l'exemple du paracétamol qui a été largement étudié par des approches de métabolomique par RMN.

Le paracétamol (connu également sous le nom d'acétaminophène) est un médicament couramment utilisé, analgésique et antipyrétique. Il est sans danger pour des doses thérapeutiques ; cependant, une overdose peut conduire à des lésions importantes du foie et du rein. La N-acétylcystéine (NAC) est l'un des antidotes les plus utilisés en cas d'intoxication par le paracétamol. Dans une première étude, Zira *et coll.* ont utilisé une approche métabolomique par RMN pour évaluer l'hépatotoxicité provoquée par une forte dose de paracétamol chez le lapin [11]. Les effets de l'antidote NAC ont également été étudiés. L'analyse en composantes principales (ACP) des données RMN a montré que l'intoxication par le paracétamol entraînait des variations métaboliques plasmatiques importantes (*figure 6*), impliquant une augmentation des lipides LDL et VLDL, des acides aminés, des lipides insaturés, ainsi qu'une diminution du glucose et du lactate. L'intoxication au paracétamol conduit donc à des variations du métabolisme des lipides et du

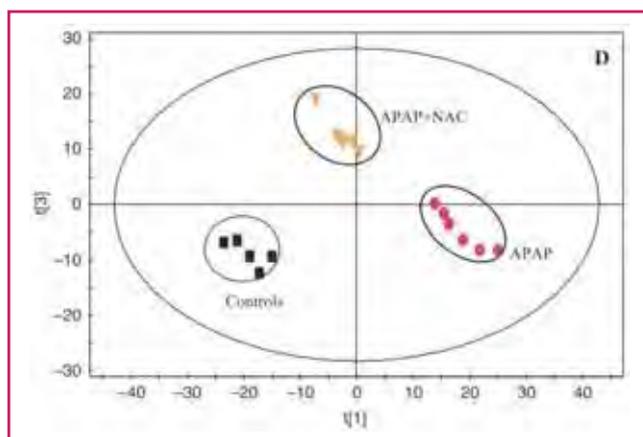


Figure 6 - Analyse en composantes principales de profils RMN  $^1\text{H}$  d'échantillons de sérum sanguin de lapin, prélevés pour des individus contrôles non traités (noir), traités par une forte dose de paracétamol, APAP 2 g/kg masse de l'animal (rouge), ou par une combinaison de paracétamol et d'antidote N-acétylcystéine, APAP 2 g/kg + NAC 150 mg/kg (jaune).

Cette analyse sépare distinctement les trois groupes d'échantillons, révélant des profils métaboliques caractéristiques de l'exposition au paracétamol ou à la combinaison paracétamol + antidote (reproduit de [11] avec permission).

métabolisme énergétique, ce qui a déjà été montré dans des études précédentes.

Le potentiel de la métabolomique pour prédire la toxicité d'un médicament au niveau du foie a été suggéré pour la première fois par Clayton *et coll.* [12]. Dans cette étude, des rats ont reçu une unique dose de paracétamol (600 mg/kg). Les urines avant le traitement (- 48 h, - 24 h) et après le traitement (24 h) ont été collectées et analysées par RMN du proton. Les lésions au niveau du foie ont été mesurées par histopathologie. Les rats traités ne présentent pas les mêmes lésions du foie. Les auteurs ont montré que les profils métaboliques enregistrés par RMN pour des urines collectées avant le traitement sont corrélés aux lésions du foie observées chez les rats après le traitement. Les principaux métabolites reliés au taux de nécrose dans le foie sont la taurine, le triméthylamine-N-oxyde (TMAO) et la bêtaïne. La toxicité du paracétamol est due à sa transformation en un métabolite réactif, la N-acétyl-p-benzoquinone (NAPQI) dans le foie, induisant les lésions hépatiques. La prédiction de l'hépatotoxicité due à l'intoxication au paracétamol par le métabolome avant le traitement peut s'expliquer par le fait que le métabolome avant traitement est corrélé à l'aptitude du foie à produire et accumuler ces réactifs. Cette technique est très prometteuse mais demande des développements supplémentaires pour pouvoir prédire de manière fiable la toxicité des médicaments chez l'homme.

### Toxicologie environnementale

Les perturbateurs endocriniens sont largement répandus dans l'environnement et dans la chaîne alimentaire, ce qui peut conduire à un risque pour la santé des consommateurs. Les polluants organiques permanents (POP) regroupent des substances telles que les polychlorobiphényles (PCB), les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD), les polychlorobenzofuranes (PCDF) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces composés sont très étudiés dans le domaine de la toxicologie environnementale car ce sont des substances toxiques, persistantes dans l'environnement et

qui s'accumulent dans les tissus vivants (bioaccumulation). La plupart des travaux de recherche sur la toxicité de ces composés et la santé humaine ont concerné des études toxicologiques conventionnelles de composés pris individuellement. Si l'on considère que les hommes sont exposés quotidiennement à des mélanges complexes de polluants, il apparaît important d'en étudier la toxicité, et la métabolomique semble être une méthode de choix pour cette évaluation.

Par exemple, Lu *et coll.* ont étudié récemment les effets des PCB et PCDD seuls ou en mélange chez des rats par une approche de métabolomique par RMN [13]. Les profils urinaires des rats ont été obtenus après administration orale de PCDD et PCB. En parallèle, l'histopathologie du foie et des analyses biochimiques du sérum ont montré une hépatotoxicité. L'analyse en composantes principales (ACP) des données RMN a montré que l'administration de ces contaminants entraînait des variations métaboliques importantes impliquant le lactate, le glucose, la taurine, la créatine, le 2-oxo-glutarate, le citrate, le succinate, l'hippurate et le triméthylamine-N-oxyde. Ces variations sont accentuées pour les rats traités avec le mélange des deux contaminants. Ces variations métaboliques peuvent être considérées comme des biomarqueurs potentiels de l'hépatotoxicité. Ces résultats ont montré que l'approche métabolomique par RMN est une technique efficace pour l'évaluation de la toxicité de mélanges de contaminants.

Une autre famille de contaminants alimentaires a été largement étudiée ces dernières années : les phtalates et le bisphénol A. Ces composés sont largement utilisés en plasturgie car ils permettent de renforcer la souplesse de ces matériaux. Les phtalates sont répertoriés comme de possibles anti-androgènes et possèderaient des propriétés œstrogéno-mimétiques. Dans une étude récente, les effets du diéthylhexylphtalate (DEHP) ont été étudiés par une approche métabolomique par RMN couplée à une approche transcriptomique [14]. Les souris ont été traitées tous les jours par gavage pendant 14 jours par différentes doses de DEHP (0, 30, 180 ou 1 100 mg/j/kg). Les urines, le plasma et les extraits aqueux de foie ont été analysés par RMN du proton. Les empreintes métaboliques ont montré un effet hypolipémiant du DEHP ainsi qu'une modification du métabolisme énergétique. En complément, une analyse du transcriptome a été réalisée sur les échantillons de foie des mêmes animaux. L'intégration des données de transcriptomique et métabolomique du foie à l'aide d'une analyse O2PLS a révélé une corrélation entre les effets du DEHP sur l'expression des gènes et sur les métabolites. L'analyse de type O2PLS met en évidence plusieurs covariations entre les transcripts et les métabolites affectés par le traitement au DEHP (figure 7). Par exemple, des variations de concentration des acides aminés (thréonine) sont reliées à des variations de l'expression de deux gènes (Vnn1 et Alas1). Ceci a conduit les auteurs à supposer que différentes régulations étaient impliquées dans l'augmentation de la synthèse de l'hème.

### Métabolomique par RMN et applications médicales

La RMN est recrutée depuis maintenant plusieurs années dans le cadre de projets de recherche translationnelle, vers des applications cliniques basées sur l'analyse métabolomique. Ces approches visent à l'utilisation de la spectrométrie de RMN comme outil à part entière de

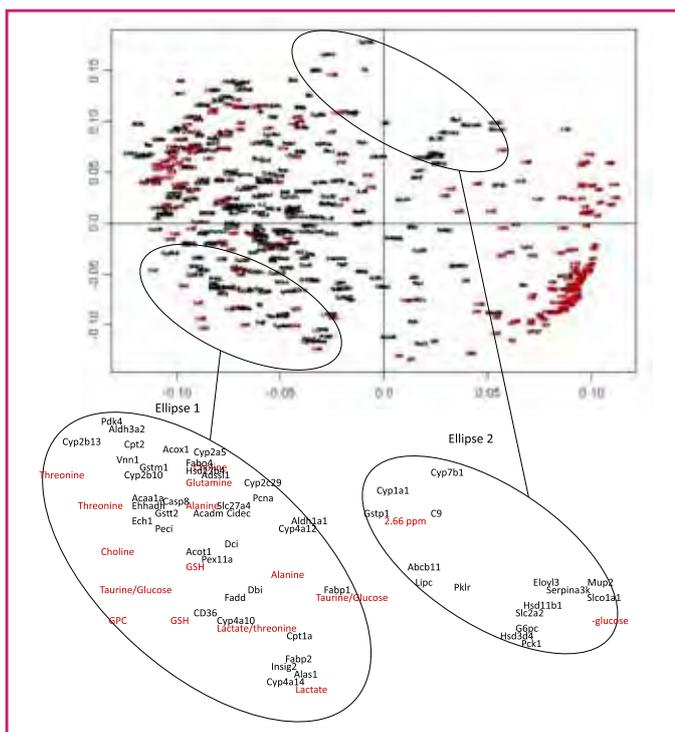


Figure 7 - Régression PLS des transcrits et des métabolites.

Les données de transcriptomique du foie et des métabolites des extraits aqueux du foie ont été traitées par une analyse O2PLS. Projection des métabolites (rouge) et des transcrits (noir). Les agrandissements (ellipses 1 et 2) montrent bien des corrélations entre les variations des métabolites et des transcrits. D'après [14] avec permission, © 2009 Elsevier.

diagnostic médical, permettant de détecter de façon non invasive, et potentiellement de manière précoce, des marqueurs métaboliques associés à diverses pathologies. De nombreuses études illustrent depuis une dizaine d'années les efforts et moyens mis en œuvre pour explorer le potentiel de cette approche pour l'étude de pathologies extrêmement variées – diabète, obésité, maladies cardio-vasculaires, cancer, maladies génétiques ou neurologiques, maladies infectieuses – au sein de projets cliniques localisés ou bien dans le cadre d'initiatives épidémiologiques plus larges. Au-delà de ces ambitions diagnostiques, la métabolomique se propose de sonder les effets de causalité et interactions entre nutrition, autres facteurs environnementaux (tabagisme, activité physique, etc.) et pathologies, et de mettre en évidence des populations ou individus à risque. Enfin, les approches de métabolomique représentent un potentiel intéressant pour la médecine personnalisée – par exemple pour l'adaptation du traitement à un patient selon des critères révélés par son profil métabolique urinaire ou sanguin – et prédictive, par la détermination précoce de l'évolution d'une pathologie (risques de complications, rechutes, effets toxiques d'un traitement...). Nous présentons plus spécifiquement ci-après quelques exemples d'applications de la métabolomique dans le domaine du cancer et de l'épidémiologie moléculaire.

### Métabolomique en cancérologie

De nombreux exemples dans la littérature traitent de la caractérisation par RMN des tissus tumoraux par la technique HR-MAS. Le potentiel de l'approche métabolomique a été en effet illustré en médecine en premier lieu pour l'analyse de biopsies cancéreuses, permettant de

démontrer d'une part la fonctionnalité de la technique comme outil de classification appliqué à la gradation des tumeurs (classification déjà maîtrisée, bien que de façon moins objective, par les techniques classiques d'histopathologie), et d'autre part de proposer une étude plus fine du métabolisme tumoral, se focalisant sur la compréhension des mécanismes et voies métaboliques impliqués dans la tumorigénèse ou la prolifération tumorale.

Plus récemment, la contribution de la métabolomique vers des applications cliniques en cancérologie s'est tournée vers l'étude non invasive des fluides excrétés ou circulants (urines et sérum ou plasma sanguins principalement) pour la détection de marqueurs métaboliques, ou *biomarqueurs*, associés aux pathologies cancéreuses. L'exemple suivant illustre plus spécifiquement l'une de ces initiatives prometteuses.

Une étude récente montre l'utilisation d'une analyse de métabolomique par RMN pour la détection des stades précoces I/II du carcinome épithélial de l'ovaire [15]. Cette étude exploratoire a été menée selon un design expérimental original utilisant de très faibles quantités d'échantillons (20  $\mu$ l), à l'aide d'une sonde RMN à micro-flux continu (figure 8). L'utilisation de méthodes de régression logistique et d'analyse en composantes principales des spectres RMN  $^1\text{H}$  a permis de dévoiler une signature sérique spécifique associée aux patientes atteintes de cancer de l'ovaire, comparées à des individus sains. Elle a également montré la spécificité de cette signature par rapport à d'autres types de cancers, les patientes atteintes de cancer du rein avancé n'étant pas selon ce critère diagnostiquées de façon erronée comme atteintes d'un cancer de l'ovaire. Cette étude souligne donc le potentiel remarquable de la RMN comme outil de diagnostic non ou peu invasif en cancérologie, pouvant être en théorie appliqué à grande échelle pour la détection précoce, en particulier pour des populations à fort risque de cancer de l'ovaire. D'autres travaux de même

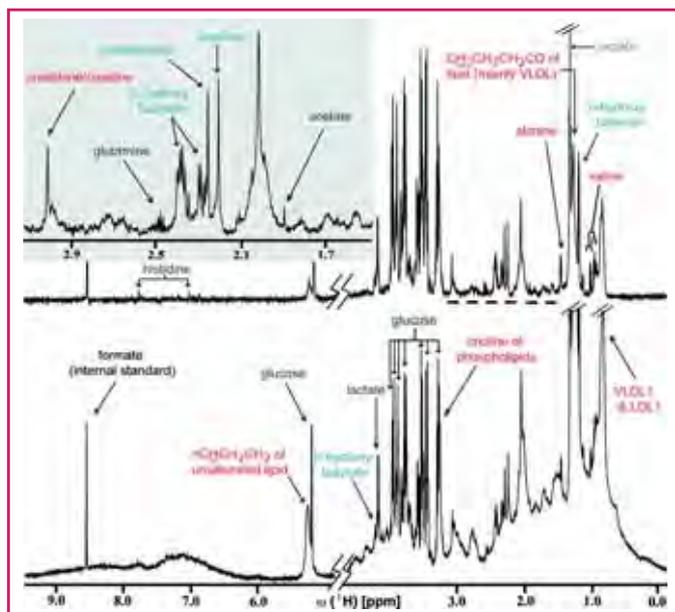


Figure 8 - Spectres  $^1\text{H}$  représentatifs de sérum sanguin de type CPMG (haut) ou d'acquisition classique (bas), pour une patiente atteinte de cancer épithélial de l'ovaire.

Les métabolites identifiés en rouge correspondent à des concentrations détectées significativement plus faibles pour des patientes cancéreuses par rapport à des sujets sains, et en bleu ceux qui sont présents en quantité plus élevée dans les cas de cancer. Reproduit de [15] avec permission, © 2011 American Chemical Society.

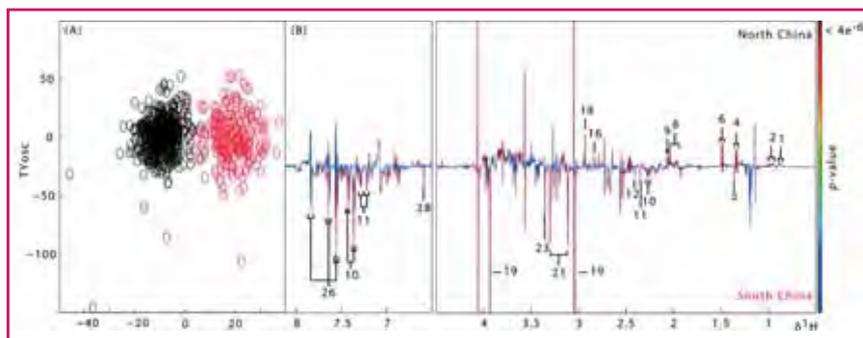


Figure 9 - (A) Diagramme des « scores » pour une analyse OPLS discriminante appliquée aux spectres RMN d'urine de populations du nord (noir) ou du sud (rouge) de la Chine, mettant en évidence une distinction nette entre les profils métaboliques observés pour ces deux populations. (B) Diagramme de covariance ou « loadings » identifiant les métabolites différenciant les populations nord-sud de la Chine.

Les signaux positifs représentent les métabolites observés en plus forte concentration pour la population du nord ; les massifs négatifs correspondent aux métabolites en concentration plus élevée pour la population du sud. 1 : acide pentanoïque/heptanoïque ; 2 : acides aminés branchés ; 4 : lactate ; 5 : 2-hydroxyisobutyrate ; 6 : alanine ; 8 : N-acétyls de fragments de glycoprotéines (incluant l'uromoduline) ; 9 : acide N-acétyl neuraminique ; 11 : sulfate de 4-crésyl ; 12 : succinate ; 16 : méthylguanidine ; 18 : diméthylglycine ; 19 : créatine ; 21 : prolinebétaine ; 23 : scyllo-inositol ; 10 : phénylacétylglutamine ; 26 : hippurate ; 28 : trans-aconitate (d'après [16] avec permission, © 2010 American Chemical Society).

nature démontrent des qualités similaires de l'analyse métabolomique par RMN pour la détection précoce ou de stades plus avancés dans différents types de cancers.

### Épidémiologie moléculaire

De nouvelles initiatives et un grand intérêt sont apparus depuis quelques années pour l'utilisation de techniques de profilage métabolique dans le cadre d'études épidémiologiques à grande échelle. La robustesse de la technique de RMN rend son utilisation dans ce cadre particulièrement pertinente, et la disponibilité ou la constitution de cohortes d'échantillons adaptées, dont les conditions de prélèvement et de conservation selon des protocoles rigoureux et standardisés constituent un élément clé pour la fiabilité des études de métabolomique, ont permis le développement de projets exploratoires d'épidémiologie moléculaire par RMN métabolomique.

Dans le cadre d'un projet à grande échelle baptisé INTERMAP (« International Study of Macro/Micronutrients and Blood Pressure »), Yap *et coll.* se sont intéressés aux différences pouvant être détectées dans des profils urinaires pour des populations des régions du nord ou du sud de la Chine, pour lesquelles les taux de pathologies cardiaques ou d'accidents vasculaires cérébraux constatés sont sensiblement différents [16]. L'étude par RMN d'échantillons d'urines pour plus de 750 volontaires provenant de ces deux régions a permis d'identifier par analyse discriminante de type OPLS une signature métabolique caractéristique distinguant ces deux populations (figure 9). Un ensemble de métabolites associés à ces différences a pu être identifié, comprenant notamment pour les populations du sud des co-métabolites de la flore microbienne (hippurate, 4-crésyl sulfate, phénylacétylglutamine, 2-hydroxyisobutyrate). Ces observations soulignent l'importance des facteurs environnementaux (régime alimentaire), du métabolisme endogène, ainsi que du co-métabolisme mammifère/flore intestinale, qui peuvent expliquer les différences nord-sud observées en Chine concernant les risques de survenue de maladies cardiovasculaires.

Dans une autre étude basée sur cette même initiative INTERMAP, Holmes *et coll.* ont étudié plus largement la

diversité du phénotype métabolique humain et son association avec le régime alimentaire et la tension artérielle [17]. Des échantillons d'urine ont été analysés pour plus de 4 500 individus provenant de différentes populations de Chine, du Japon, des États-Unis et du Royaume-Uni. Ils ont montré que les profils d'excrétion urinaire permettaient d'établir des phénotypes métaboliques différenciés pour des populations d'Asie orientale ou provenant de régions occidentales caractérisées par des habitudes alimentaires et des taux de maladies cardio-vasculaires très différents, de même que pouvaient être identifiés des sous-groupes correspondant à une alimentation végétarienne, riche en protéines animales, ou caractérisant des profils distincts de pression artérielle (figure 10). Ces profils métaboliques font apparaître différents métabolites discriminants, tels que le formate, l'alanine ou l'hippurate, reflétant le régime alimentaire

et l'activité de la flore microbienne (ou *microbiote*), et associés à l'hypertension artérielle.

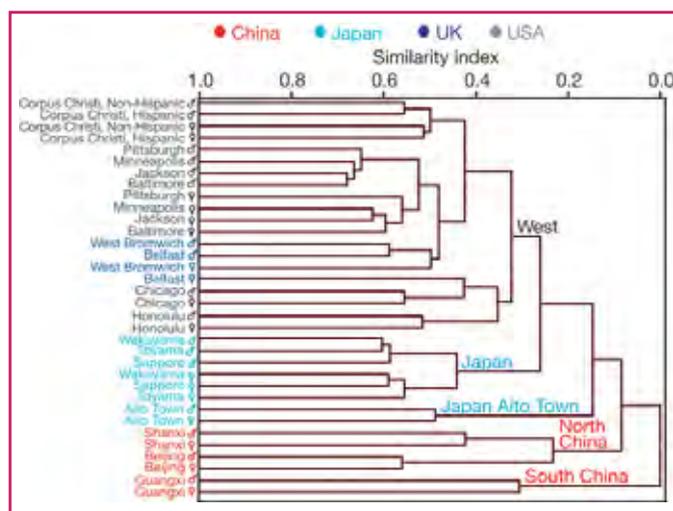


Figure 10 - Analyse par clustering hiérarchique pour des échantillons humains d'urine de populations variées analysés par RMN 1D  $^1\text{H}$ .

Le dendrogramme souligne les similarités/différences entre populations, la proximité des différentes classes dans ce diagramme étant directement reliée à la similitude des profils métaboliques moyens pour ces populations. L'indice de similarité en abscisse mesure la distance multivariée entre clusters d'échantillons (une valeur nulle indique une séparation maximale, une valeur unité correspond à une identité des profils métaboliques caractéristiques des sous-populations concernées). Certaines populations locales présentent des empreintes métaboliques remarquablement singulières, comme la population de la province de Guangxi en Chine. Les profils métaboliques des habitants de la ville rurale d'Aito au Japon se démarquent également de ceux de populations plus urbaines du Japon (Wakayama, Toyama, Sapporo), qui présentent des profils nettement plus similaires à ceux observés pour des populations occidentales. Reproduit de [17] avec la permission de Macmillan Publishers Ltd, © 2008.

Les quelques exemples développés ci-dessus donnent un aperçu du potentiel analytique et de la diversité des applications offertes par les approches de métabolomique par RMN. Il est à noter que ces applications ne se limitent pas aux domaines illustrés dans cette revue, mais couvrent un champ beaucoup plus large, sur le plan fondamental par exemple au sein d'études de biologie cellulaire ou de génomique fonctionnelle, ou bien vers des applications

industrielles de contrôle-qualité alimentaire, de lutte contre la fraude concernant les produits d'origine contrôlée, ou encore de lutte contre le dopage.

## Note et références

- (1) *Phénylpropanoïdes* : classe de composés organiques, dérivés de plantes, biosynthétisés à partir d'un acide aminé, la phénylalanine. Ils ont une grande variété de fonctions, comme la défense contre les herbivores, les attaques microbiennes et les autres agresseurs potentiels.
- [1] Lindon J.C., Nicholson J.K., Recent advances in high-resolution NMR spectroscopic methods in bioanalytical chemistry, *TrAC-Trends Anal. Chem.*, **1997**, *16*(4), p. 190.
- [2] Trygg J., Wold S., Orthogonal projections to latent structures (O-PLS), *J. Chemom.*, **2002**, *16*(3), p. 119.
- [3] Rantalainen M., Cloarec O., Beckonert O., Wilson I.D., Jackson D., Tonge R., Rowlinson R., Rayner S., Nickson J., Wilkinson R.W., Mills J.D., Trygg J., Nicholson J.K., Holmes E., Statistically integrated metabolomic-proteomic studies on a human prostate cancer xenograft model in mice, *J. Proteome Res.*, **2006**, *5*(10), p. 2642.
- [4] www.cytoscape.org.
- [5] Zhang B., Halouska S., Schiaffo C.E., Sadykov M.R., Somerville G.A., Powers R., NMR analysis of a stress response metabolic signaling network, *J. Proteome Res.*, **2011**, *10*(8), p. 3743.
- [6] Saito K., Matsuda F., Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology, *Annual Review of Plant Biology*, **2010**, *61*, p. 463.
- [7] Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R., NMR-based metabolomic analysis of plants, *Nat. Protocols*, **2010**, *5*(3), p. 536.
- [8] Manetti C., Bianchetti C., Casciani L., Castro C., Di Cocco M.E., Miccheli A., Motto M., Conti F., A metabolomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids, *J. Exp. Bot.*, **2006**, *57*(11), p. 2613.
- [9] Adel-Patient K., Guimaraes V.D., Paris A., Drumare M.-F., Ah-Leung S., Lamourette P., Nevers M.-C., Canlet C., Molina J., Bernard H., Creminon C., Wal J.-M., Immunological and metabolomic impacts of administration of Cry1Ab protein and MON 810 maize in mouse, *PLoS One*, **2011**, *6*(1), p. e16346.
- [10] Choi Y.H., Kim H.K., Linthorst H.J.M., Hollander J.G., Lefeber A.W.M., Erkelens C., Nuzillard J.M., Verpoorte R., NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves, *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*(5), p. 742.
- [11] Zira A., Mikros E., Giannioti K., Galanopoulou P., Papalois A., Liapi C., Theocharis S., Acute liver acetaminophen toxicity in rabbits and the use of antidotes: a metabolomic approach in serum, *J. Appl. Toxicol.*, **2009**, *29*(5), p. 395.
- [12] Clayton T.A., Lindon J.C., Cloarec O., Antti H., Charuel C., Hanton G., Provost J.P., Le Net J.L., Baker D., Walley R.J., Everett J.R., Nicholson J.K., Pharmaco-metabolomic phenotyping and personalized drug treatment, *Nature*, **2006**, *440*(7087), p. 1073.
- [13] Lu C., Wang Y., Sheng Z., Liu G., Fu Z., Zhao J., Zhao J., Yan X., Zhu B., Peng S., NMR-based metabolomic analysis of the hepatotoxicity induced by combined exposure to PCBs and TCDD in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2010**, *248*(3), p. 178.
- [14] Eveillard A., Lasserre F., de Tayrac M., Polizzi A., Claus S., Canlet C., Mselli-Lakhal L., Gotardi G., Paris A., Guillou H., Martin P.G.P., Pineau T., Identification of potential mechanisms of toxicity after di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) adult exposure in the liver using a systems biology approach, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2009**, *236*(3), p. 282.
- [15] Garcia E., Andrews C., Hua J., Kim H.L., Sukumaran D.K., Szyperski T., Odunsi K., Diagnosis of early stage ovarian cancer by H-1 NMR metabolomics of serum explored by use of a microflow NMR probe, *J. Proteome Res.*, **2011**, *10*(4), p. 1765.
- [16] Yap I.K.S., Brown I.J., Chan Q., Wijeyesekera A., Garcia-Perez I., Bictash M., Loo R.L., Chadeau-Hyam M., Ebbels T., Iorio M.D., Maibaum E., Zhao L., Kesteloot H., Daviglus M.L., Stamler J., Nicholson J.K., Elliott P., Holmes E., Metabolome-wide association study identifies multiple biomarkers that discriminate North and South Chinese populations at differing risks of cardiovascular disease: INTERMAP study, *J. Proteome Res.*, **2010**, *9*(12), p. 6647.
- [17] Holmes E., Loo R.L., Stamler J., Bictash M., Yap I.K.S., Chan Q., Ebbels T., De Iorio M., Brown I.J., Veselkov K.A., Daviglus M.L., Kesteloot H., Ueshima H., Zhao L., Nicholson J.K., Elliott P., Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure, *Nature*, **2008**, *453*(7193), p. 396.
- [18] Broadhurst D.I., Kell D.B., Statistical strategies for avoiding false discoveries in metabolomics and related experiments, *Metabolomics*, **2006**, *2*(4), p. 171.



C. Canlet



L. Shintu



B. Elena-Herrmann

### Cécile Canlet

est ingénieur de recherche en RMN de la plate-forme AXIOM-MetaToul, INRA UMR 1331, TOXALIM, Université de Toulouse<sup>1</sup>.

### Laetitia Shintu

est maître de conférences à l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille<sup>2</sup>.

### Bénédicte Elena-Herrmann (auteur correspondant)

est ingénieur de recherche au CNRS à l'Institut des Sciences Analytiques, Centre de RMN à Très Hauts Champs, Université de Lyon<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> INRA UMR 1331, TOXALIM, Université de Toulouse, ENVT, INP, UPS, 180 chemin de Tournefeuille, F-31027 Toulouse.

Courriel : cecile.canlet@toulouse.inra.fr

<sup>2</sup> Institut des Sciences Moléculaires de Marseille, Aix-Marseille Université, iSm2-UMR CNRS 7313, Campus scientifique de Saint Jérôme, case 512, F-13397 Marseille Cedex 20.

Courriel : laetitia.shintu@univ-amu.fr

<sup>3</sup> Université de Lyon, CNRS/École Normale Supérieure de Lyon/UCBL, Institut des Sciences Analytiques, Centre de RMN à Très Hauts Champs, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne.

Courriel : benedicte.elena@ens-lyon.fr



**La SCF sur Facebook, vous aimez ?**  
Parlez-en autour de vous,  
et invitez vos amis et collègues à nous rejoindre !

• [www.facebook.com/pages/Soci%C3%A9t%C3%A9-Chimique-de-France/114534205270205](http://www.facebook.com/pages/Soci%C3%A9t%C3%A9-Chimique-de-France/114534205270205)

# La RMN pour la caractérisation moléculaire de produits de consommation agroalimentaire

Stefano Caldarelli

## Résumé

La capacité de la RMN à identifier un grand nombre de composés bioorganiques a donné à cette technique un rôle privilégié pour la caractérisation et l'authentification de produits alimentaires. Si d'une part les méthodes classiques de la RMN sont capables de résoudre la structure de molécules spécifiques (par exemple des protéines ou des petites molécules avec des effets nutritionnels), ceci demande des étapes de purification. En revanche, la possibilité d'analyser directement les produits dans un état aussi proche que possible de leur mode de consommation devient de plus en plus commune. Dans cet article, quelques exemples sont illustrés de développements méthodologiques récents qui vont dans ce sens, adaptés à l'étude de produits de différente nature tels que des solides (fromages, viandes) ou des liquides (huiles).

## Mots-clés

**Aliments, RMN, HRMAS, statistiques multivariées.**

## Abstract

**NMR, a tool for the molecular characterization of food products**

The ability of NMR to identify a large number of bio-organic compounds has given this technique a privileged role in the characterization and authentication of food products. If on the one hand the classical methods of NMR are able to solve the structure of specific molecules (e.g. proteins or nutritionally relevant small molecules), this requires purification steps. However, the possibility to directly analyze the products in a state as close as possible to their mode of consumption is becoming increasingly common. In this paper, some examples are illustrated of recent methodological developments in this direction, adapted to the study of products of various kinds such as solids (cheese, meat) or liquids (oils).

## Keywords

**Foodstuff, NMR, HRMAS, multivariate statistics.**

Les composés qui constituent un produit de consommation agroalimentaire ou ses précurseurs sont pour une large majorité des molécules bioorganiques, de taille et concentration très variables. Le seuil de sensibilité de la RMN pour des appareillages standards est de l'ordre du micromolaire pour le cas de l'analyse du proton. De plus, dans le cas d'un mélange, les composés à concentration plus élevée ont tendance à obscurcir les signaux des autres molécules. Il est donc commun, dans un premier niveau d'analyse, de se concentrer sur les produits dominants. En effet, il s'agit là d'un problème commun à toute analyse de produits biologiques, comme cela est expliqué plus en détail dans l'article de B. Elena-Herrmann *et coll.* concernant la métabolomique (voir p. 59), dont l'étude par RMN d'aliments dans leur forme complexe peut être considérée comme une branche. Il n'est donc pas surprenant que les méthodes de la métabolomique, en utilisant en priorité les composés les plus concentrés, aient été appliquées à l'agroalimentaire, notamment pour des questions de profilage de produits en association aux aspects de plus en plus liés de nutrition et de santé. Des points d'investigation centraux dans ce cadre sont l'âge et l'origine géographique, et donc l'authenticité des labels AOP (appellation d'origine protégée) et la traçabilité d'un produit. Des exemples de ce type de recherches font l'objet de la première partie de cet article qui concerne la caractérisation de fromages et de viandes par RMN.

L'identification de composés très proches en nature et structure chimique reste l'un des défis de la chimie analytique. Bien que les méthodes chromatographiques

progressent rapidement, la RMN a su apporter, grâce à sa facilité à décomposer des signaux complexes dans plusieurs dimensions, un apport original et autonome des techniques séparatives. Mis à part le gain de temps qui peut être attendu pour des mesures sur un échantillon brut, une technique de séparation « spectrale » a l'avantage de pouvoir être utilisée en aveugle, ce qui n'est pas souvent le cas pour la chromatographie.

La seconde partie concernera un exemple tout récent de RMN séparative.

## Analyse de produits alimentaires solides (fromages, viandes...) : la RMN HRMAS

Traditionnellement, la RMN des mélanges s'est concentrée sur l'étude des solutions. Mais étant donné que la large majorité des produits de consommation agroalimentaire sont à l'état solide, la possibilité d'analyser des produits directement dans cette forme, sans une extraction préalable, est naturellement attrayante.

Un problème lié à l'analyse d'aliments solides dérive de leurs compositions moléculaires et de leurs structures physiques très variées. En particulier, des compartiments caractérisés par une mobilité moléculaire différente peuvent exister, comme par exemple pour une même molécule liée à une matrice (lipides, membranes, etc.) ou libre de diffuser dans une phase pseudo-liquide. Dans ces conditions, les spectres RMN  $^1\text{H}$  peuvent perdre en résolution. Ceci est

dû à trois effets principaux : la réduction de la mobilité moléculaire pour les molécules figées réintroduit des interactions anisotropes (et notamment les couplages dipolaires), la relaxation pour ces mêmes molécules devient plus efficace, et enfin, les variations de l'anisotropie de la susceptibilité magnétique entre départements, qui se traduisent par un élargissement des signaux.

Du fait de cette dégradation de la résolution et du grand nombre de molécules présentes, l'analyse devient impossible en absence de mesures spécifiques. La méthode dite de la rotation à l'angle magique (MAS, « magic-angle spinning ») à haute résolution (HRMAS) répond bien à cette problématique. Introduite en 1995 pour faciliter la caractérisation de résines fonctionnalisées dans le cadre de la chimie combinatoire [1], la technique n'est en effet rien de plus que la combinaison de la rotation à l'angle magique optimisée pour des mesures de spectres RMN  $^1\text{H}$  sur des phases hétérogènes de qualité proche de celles obtenues en solution (voir figure 1). Effectivement, mis à part la relaxation, les deux autres effets sont éliminés ou fortement réduits par la rotation à l'angle magique. La différence en temps de relaxation entre signaux a un effet bénéfique tant qu'elle contribue à amplifier l'observabilité des molécules les plus mobiles (d'un facteur inversement proportionnel à la différence en largeur de raie).

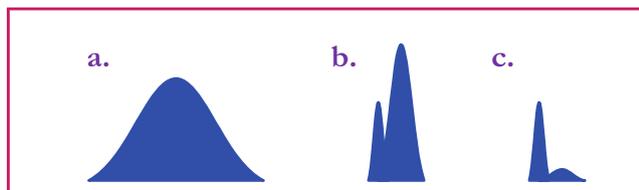


Figure 1 - La rotation à l'angle magique à haute résolution (HRMAS).

a. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  d'un mélange hétérogène donne des signaux larges ; b. la rotation à l'angle magique récupère de la résolution si les molécules sont au moins partiellement mobiles ; c. un filtre de relaxation (CPMG ou similaire) peut être utilisé pour réduire l'intensité des signaux en provenance des molécules moins mobiles.

Il faut considérer que ces signaux fins peuvent apporter des éléments de discrimination importants, étant associés à des métabolites issus d'un processus caractéristique de la production (par exemple par protéolyse) ou liés à la provenance géographique (par l'alimentation ou par un métabolisme spécifique). Pour le cas où les raies larges dominent, les spectres peuvent être enregistrés avec un artifice, la séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), qui produit un écho de spin dont l'intensité décroît du fait de la relaxation. Dans ces conditions, l'analyse amplifie ultérieurement le signal des molécules les plus mobiles (ayant une relaxation plus lente).

L'une des toutes premières études complètes HRMAS réalisées sur des produits alimentaires a concerné l'évolution de la composition moléculaire du Parmigiano Reggiano pendant sa maturation [2-3]. La qualité spectrale obtenue pour la RMN  $^1\text{H}$  HRMAS de ce fromage à pâte dure, très élevée, est illustrée en figure 2 pour deux échantillons d'âges différents.

Un point important à remarquer est que l'addition de quelques microlitres d'eau deutériée, nécessaires pour stabiliser le champ statique (« lock ») et homogénéiser le champ magnétique (« shim »), facilite certainement la dynamique moléculaire. En effet, les spectres HRMAS

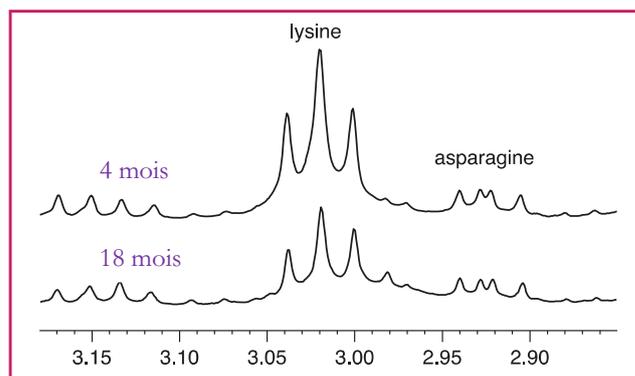


Figure 2 - Détail du spectre RMN  $^1\text{H}$  HRMAS d'échantillons de Parmigiano Reggiano à deux stades de maturation différents (d'après [2]).

obtenus dans ces conditions correspondent assez bien, en ce qui concerne les molécules hydrophiles, aux spectres mesurés sur un extrait. L'intérêt de la HRMAS ici est de fournir, en même temps que les résultats, une mesure de la teneur en lipides et d'autres espèces hydrophobes, ce qui permet de suivre l'évolution de la composition de l'échantillon d'une façon plus globale (voir figure 3).

Les spectres obtenus sont, par complexité et composition, du même type que ceux rencontrés dans les études de métabolomique par RMN (voir B. Elena-Herrmann

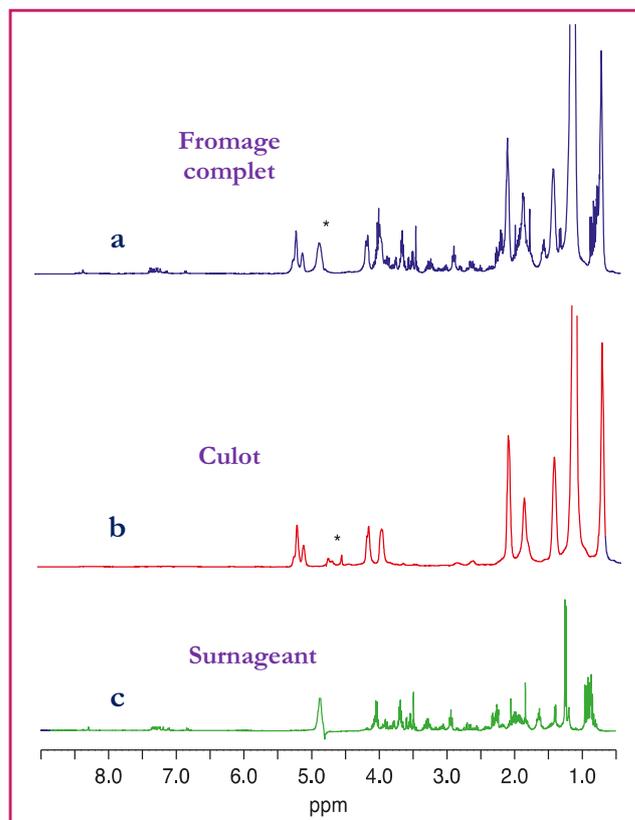


Figure 3 - HRMAS d'un fromage.

RMN HRMAS  $^1\text{H}$  sur un échantillon de fromage râpé (Parmigiano Reggiano) (a) et du même fromage centrifugé plusieurs fois : culot (b) et surnageant (c). Cette comparaison permet de comprendre la capacité de la méthode à caractériser un grand nombre de molécules de faible taille moléculaire (signaux fins) en même temps que d'autres de mobilité plus réduite (ici les lipides).

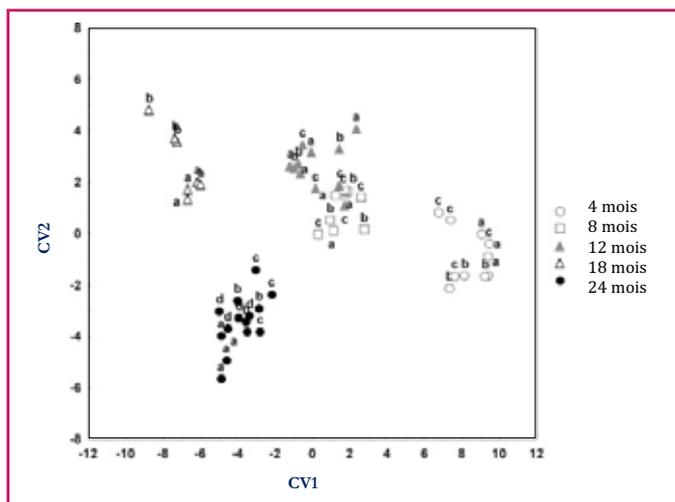


Figure 4 - Analyse canonique associée à une statistique supervisée (ADL) des spectres RMN HRMAS de cinq groupes de Parmigiano à différents âges de maturation (d'après [3]).

et coll. p. 59). Ainsi, le protocole d'analyse suivi peut être celui de la métabolomique :

- attribution des signaux et identification des composés par RMN 2D (TOCSY, HSQ...);
- classification des échantillons par rapport à leur qualité alimentaire (typiquement l'âge, la provenance géographique) par l'étude d'un nombre suffisant de cas et une analyse chimiométrique adaptée. Cette étape permet, dans des cas favorables, d'identifier des marqueurs moléculaires de qualité.

Une démonstration de ce protocole pour la détermination de l'âge d'affinage du Parmigiano Reggiano est illustrée sur la *figure 4* qui résume l'analyse HRMAS sur quinze échantillons de cinq âges de maturation : 4, 8, 12, 18 et 24 mois. Le graphe a été construit en utilisant une statistique supervisée (voir [4] pour une introduction aux méthodes chimiométriques en RMN). Ici, il s'agissait de l'analyse discriminante linéaire (ADL), qui a permis de condenser les variations significatives du spectre RMN (16 K points, donc 16 K variables) à juste deux variables (dites « canoniques » dans ce cas) [5-6]. Un aspect intéressant de cette analyse est que l'hétérogénéité structurale intrinsèque du fromage se traduit en une dispersion des points représentant les produits d'un même âge. Il est donc avisé d'échantillonner un même fromage plusieurs fois, pour avoir une description claire de cette variabilité en composition. L'effort de classification par RMN HRMAS est significatif seulement si cette dispersion de concentration (*intragroupe*) est inférieure aux changements induits par l'âge (*intergroupe*). Dans le cas du Parmigiano, il est intéressant de remarquer la présence de deux chemins métaboliques (les deux variables réduites du graphe) au long du processus de maturation. L'analyse de la composition des variables réduites montre qu'au long du premier de ces chemins (CV1), on observe la parution d'acides aminés due à la protéolyse, tandis que la deuxième variable (CV2) pointe vers la variation de composés spécifiques (la citrulline et la tyrosine, par exemple).

L'analyse de l'origine géographique, liée par exemple à des questions d'AOP, est un autre aspect intéressant pour établir la qualité et la valeur à la vente d'un produit. Une démonstration de la capacité de la HRMAS à apporter une contribution dans ce domaine a été faite avec une étude sur de l'Emmental en provenance de Suisse, France, Allemagne,

Autriche et Finlande [7-8]. Dans ce cas, les sources de variabilité moléculaire sont bien plus importantes (nature du lait, alimentation et origine des vaches, traitement du lait...). Cependant, la RMN HRMAS a permis de suggérer des marqueurs capables de faire la différence entre les différentes typologies d'Emmental analysées (*figure 5*). Notamment, les fortes différences observées entre Emmental au lait cru ou pasteurisé confirment un impact de cette procédure de stérilisation sur la qualité finale du produit.

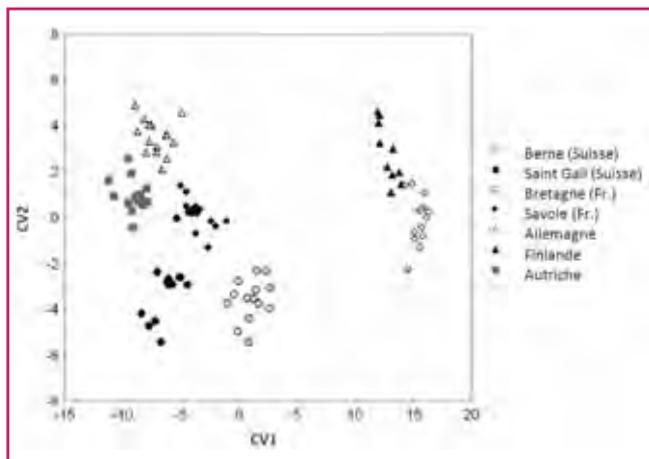


Figure 5 - Analyse canonique associée à une statistique supervisée (ADL) de la RMN HRMAS de fromages de type Emmental produits dans différents lieux. Les groupes d'échantillons à valeurs élevées de CV1 correspondent à des produits pasteurisés (d'après [7]).

La possibilité d'appliquer la HRMAS pour l'analyse de qualité de produits à base de viande est compliquée par le grand nombre de facteurs qui peuvent contribuer au profil métabolique de l'échantillon. En effet, aux variations possibles du métabolisme d'animaux de races différentes, élevés dans des conditions spécifiques, s'ajoutent les effets génétiques et le fait que les différentes parties du corps de l'animal n'ont pas la même constitution. Une étude exploratoire de l'applicabilité de la HRMAS pour la caractérisation de la traçabilité de la viande séchée a confirmé ces difficultés [9]. Bien qu'une minimisation des facteurs de variation ait été introduite dans la conception du protocole (certification de l'origine du bœuf, préparation de l'échantillon à partir d'un muscle spécifique), l'analyse HRMAS a permis de construire un modèle interprétatif/prédictif, mais moins performant que dans le cas du fromage (*figure 6*).

## La RMN maximum quantum : un exemple de RMN « séparative »

Bien que les méthodes RMN multidimensionnelles courantes soient déjà très performantes pour identifier un grand nombre de composés, la richesse et la variabilité en composition des produits agroalimentaires pourraient profiter d'une finesse d'analyse accrue. Un exemple dans ce sens est la technique de la RMN maximum quantum (RMN MaxQ) introduite en 2010 [10] (*figure 7*). Ici, une résolution accrue est obtenue grâce à l'excitation d'un signal particulier dû à la combinaison de plusieurs protons de façon cohérente (cohérence à plusieurs quanta). En effet, le signal RMN classique (1Q) d'un proton donné prend souvent la forme

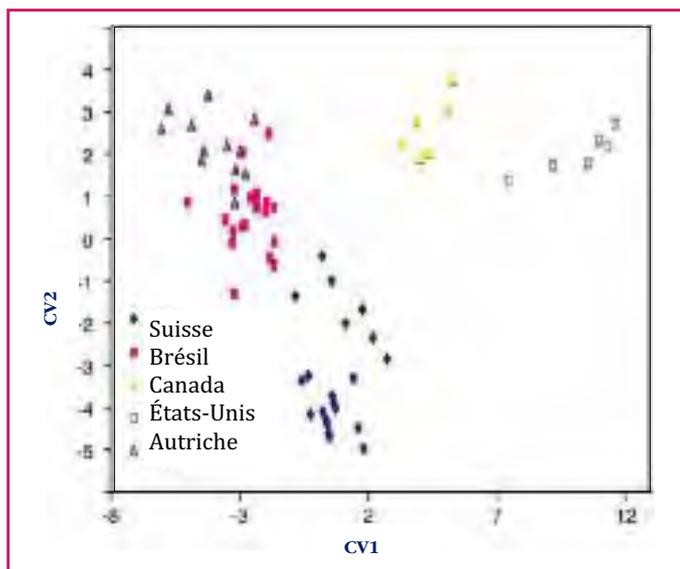


Figure 6 - Analyse statistique supervisée (ADL) de la RMN HRMAS d'échantillons de viande séchée préparée avec du bœuf élevé dans différents pays (d'après [9]).

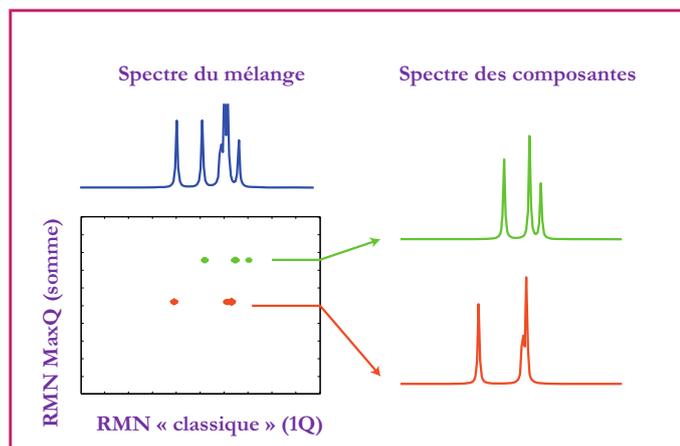


Figure 7 - La RMN maximum quantum (RMN MaxQ).

Cette méthode permet la résolution de spectres chevauchés de deux (ou plusieurs) systèmes de spins mutuellement couplés si la somme des déplacements chimiques des protons de chaque système est différente.

d'un multiplet du fait du couplage scalaire J avec d'autres protons le voisinant. Cependant, si tous les protons impliqués dans ce couplage mutuel sont excités dans la cohérence à plusieurs quanta correspondante, il ne reste plus de partenaire de couplage (spins passifs) et le signal est donc un simple singulet. Le spectre de corrélation correspondant prend la forme d'un hybride entre une TOCSY, qui révèle les fragments moléculaires par leur couplage J, et une DOSY, qui aligne des molécules dans la deuxième dimension selon un schéma très simple.

L'application de la RMN MaxQ à la spéciation des molécules phénoliques dans une huile d'olive extra-vierge est démontrée en figure 8, avec la différenciation de seize molécules grâce à l'analyse de la région aromatique des spectres de corrélation à 3Q et 4Q [11].

L'attribution de ces signaux à des structures moléculaires peut être faite en comparant les déplacements chimiques et les formes de couplage des signaux avec les données de la littérature, même si lorsque les sous-spectres

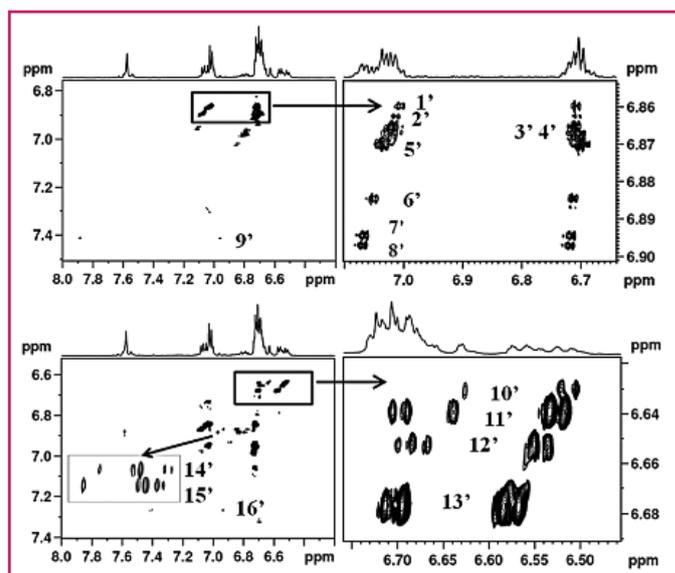


Figure 8 - Analyse RMN MaxQ d'un extrait polaire d'une huile d'olive extra-vierge, pour caractériser les molécules phénoliques (d'après [11]).

des composantes sont très proches (voir le spectre en figure 7), la reconnaissance précise des composantes reste un défi.

## Références

- [1] Anderson R.C., Stokes J.P., Shapiro M.J., Structure determination in combinatorial chemistry - Utilization of magic-angle-spinning HMQC and TOCSY NMR-spectra in the structure determination of Wang-bound lysine, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, p. 5311.
- [2] Shintu L., Ziarelli F., Caldarelli S., Is high-resolution magic angle spinning NMR a practical speciation tool for cheese samples? Parmigiano Reggiano as a case study, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2004**, 42, p. 396.
- [3] Shintu L., Caldarelli S., High-resolution MAS NMR and chemometrics: characterization of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese, *J. of Agric. and Food Chem.*, **2005**, 53, p. 4026.
- [4] Trygg J., Lunstedt T., Chemometrics techniques for metabonomics, *Handbook of Metabonomics and Metabolomics*, J. Lindon, J.K. Nicholson, E. Holmes (eds), Elsevier, **2006**.
- [5] Analyse canonique des corrélations ([http://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse\\_canonique\\_des\\_corr%C3%A9lations](http://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse_canonique_des_corr%C3%A9lations)).
- [6] Analyse discriminante linéaire ([http://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse\\_discriminante\\_lin%C3%A9aire](http://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse_discriminante_lin%C3%A9aire)).
- [7] Shintu L., Caldarelli S., Toward the determination of the geographical origin of emmental(er) cheese via high resolution MAS NMR: A preliminary investigation, *J. of Agric. and Food Chem.*, **2006**, 54, p. 4148.
- [8] Pillonel L., *Analytical development and traceability in food chemistry. Examples of application to Swiss and foreign Emmental cheese*, University of Neuchâtel (Suisse), **2004**.
- [9] Shintu L., Caldarelli S., Franke B.M., Pre-selection of potential molecular markers for the geographic origin of dried beef by HR-MAS NMR spectroscopy, *Meat Science*, **2007**, 76, p. 700.
- [10] Reddy G.N.M., Caldarelli S., Demixing of severely overlapping NMR spectra through multiple-quantum NMR, *Anal. Chem.*, **2010**, 82, p. 3266.
- [11] Reddy G.N.M., Caldarelli S., Maximum-quantum (MaxQ) NMR for the speciation of mixtures of phenolic molecules, *Chemical Comm.*, **2011**, 47, p. 4297.



### Stefano Caldarelli

est professeur à l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (ISM2)\*.

\* ISM2, UMR 7313 CNRS/Aix Marseille Université, Service 512, Campus scientifique de Saint-Jérôme, F-13397 Marseille Cedex 20 ; et UPR 2301 ICSN CNRS Gif-sur-Yvette.  
Courriel : s.caldarelli@univ-amu.fr

# Les spins nucléaires : des espions pour explorer la structure des matériaux

Florence Babonneau, Christian Bonhomme, Christel Gervais, Thierry Azaïs, Guillaume Laurent, Olivier Lafon, Lionel Montagne, Julien Trébosc, Laurent Delevoye, Grégory Tricot, Jean-Paul Amoureux, Thibault Charpentier, Frédéric Angeli, Franck Fayon, Michaël Deschamps, Sylvian Cadars, Pierre Florian et Dominique Massiot

## Résumé

Cet article illustre combien la RMN du solide, qui est par nature une technique spectroscopique locale, est aussi capable de faire dialoguer les spins nucléaires entre eux sur des distances allant au-delà du nanomètre. L'accès à ces échelles de distances est rendu en particulier possible par des expériences mono- ou multidimensionnelles qui enregistrent la signature non pas d'un atome unique témoignant de la nature de son environnement, mais d'un groupe d'atomes chimiquement liés ou proches spatialement. En ce sens, elle apparaît comme un outil d'investigation parfait pour des matériaux aux compositions et structures de plus en plus complexes. Les exemples choisis appartiennent à des familles de matériaux développés pour répondre à des applications relevant des domaines de l'énergie (verres pour le stockage de déchets nucléaires), de la santé (matériaux hybrides pour le relargage de principes actifs) et du développement durable (catalyseurs hétérogènes).

## Mots-clés

**RMN du solide, verres, matériaux hybrides, catalyseurs, interfaces, surfaces, modélisation, calculs DFT.**

## Abstract

### **Nuclear spins as spies to explore the structure of materials**

This article illustrates how solid state NMR, which is by nature a local spectroscopic technique, is also able to establish dialogs between nuclear spins over distances up to few nanometers. Access to such length scales is possible through one-dimensional and multidimensional experiments that give chemical signatures not only from one unique atom in relation with its environment, but from groups of atoms chemically bonded or spatially close. In that sense, solid state NMR appears as a perfect investigation tool for materials with more and more complex compositions and structures. The selected examples belong to families of materials that have been developed for applications in the fields of energy (glasses for nuclear waste management), health (hybrid materials for controlled release of drugs) and sustainable development (heterogeneous catalysts).

## Keywords

**Solid state NMR, glasses, hybrid materials, catalysts, interfaces, surfaces, modelling, DFT calculations.**

Les matériaux sont de plus en plus incontournables dans la vie de tous les jours afin de répondre à des besoins sociétaux importants. Dans les domaines de l'énergie, de la santé ou du développement durable, une demande de plus en plus forte de matériaux innovants a vu le jour, ce qui a conduit les chimistes à faire preuve de créativité pour élaborer des compositions et des nanostructures de plus en plus complexes, alliant non seulement des composantes minérales cristallisées ou non, mais également des composantes organiques.

Les développements remarquables de la RMN du solide dans les deux dernières décennies ont ouvert des perspectives immenses dans le domaine de la caractérisation structurale de ces matériaux. Cette technique spectroscopique, qui est une sonde locale par nature, est aussi capable de faire dialoguer les spins nucléaires entre eux sur des distances de l'ordre de quelques angströms à quelques nanomètres. En ce

sens, la RMN du solide apparaît désormais comme un outil d'investigation parfait pour des matériaux aux compositions et structures de plus en plus complexes. La versatilité de l'approche RMN est basée sur la possibilité de jouer avec toutes les interactions RMN, à savoir le déplacement chimique ( $\delta$ ), le couplage scalaire ( $J$ ), les interactions dipolaires ( $D$ ) et quadripolaires ( $Q$ , pour des noyaux de spin  $I > 1/2$ ), mais aussi de pouvoir prédire les signatures spectroscopiques RMN par des calculs *ab initio*.

Récemment, des améliorations spectaculaires en termes de résolution ont été réalisées pour les noyaux quadripolaires en utilisant des méthodes sophistiquées comme l'expérience MQ MAS (« multiple quantum magic angle spinning ») ou en tirant parti des augmentations de sensibilité et de résolution à hauts champs magnétiques. Certains de ces noyaux comme l'aluminium-27 ( $^{27}\text{Al}$ ) ou le bore-11 ( $^{11}\text{B}$ ), très accessibles par RMN du fait de leur forte sensibilité, ont largement bénéficié

de ces avancées, mais également l'oxygène-17 ( $^{17}\text{O}$ ) qui est évidemment un noyau clef pour la description de réseaux d'oxydes complexes. Dans ce dernier cas, sa faible abondance naturelle requiert la préparation d'échantillons isotopiquement enrichis. La spectroscopie  $J$  à l'état solide, basée sur l'interaction de couplage indirect, a offert aussi récemment de nouvelles opportunités pour décrire l'enchaînement des liaisons au sein du réseau solide. Quant aux proximités spatiales entre sites, elles peuvent être établies en utilisant l'interaction dipolaire,  $D$ , et le processus de diffusion de spins. L'expérience de polarisation croisée (notée CP pour « cross polarisation »), souvent employée dans l'étude de solides par RMN, permet de mettre en contact des spins couplés par cette interaction dipolaire, interaction qui est proportionnelle à  $1/r^3$ ,  $r$  désignant la distance internucléaire. L'utilisation de cette séquence, déclinée en version bidimensionnelle, est donc une méthode de choix pour mettre directement en évidence des proximités spatiales entre sites *via* des couplages dipolaires hétéronucléaires.

Dans cet article, nous avons choisi d'illustrer les apports de la RMN du solide par des exemples appartenant à trois familles de matériaux développés pour répondre à des applications relevant des domaines de l'énergie (verres pour le stockage de déchets nucléaires), de la santé (matériaux hybrides pour le relargage de principes actifs) et du développement durable (catalyseurs hétérogènes).

## Notions d'ordres chimique et géométrique

La RMN du solide apporte un point de vue complémentaire à d'autres méthodes comme les techniques de diffraction ou de diffusion (rayons X, neutrons, lumière), partant de l'échelle de la première sphère de coordination de l'atome (échelle de l'ångström) pour aller vers l'échelle du motif moléculaire au-delà du nanomètre.

L'accès à ces échelles de distances est rendue en particulier possible par des expériences mono- ou multidimensionnelles qui enregistrent la signature non pas d'un atome unique témoignant de la nature de son environnement, mais d'un groupe d'atomes chimiquement liés (interaction de couplage indirect,  $J$ ) ou proches spatialement (interaction dipolaire,  $D$ ). L'approche utilisant les interactions caractéristiques des liaisons chimiques, qui sont généralement faibles, a été longtemps peu utilisée en RMN du solide. Ce n'est que récemment qu'elle s'est révélée particulièrement pertinente pour décrire l'enchaînement de motifs moléculaires au sein d'un réseau [1]. De plus, ces couplages  $J$  peuvent être mesurés et les valeurs peuvent être comparées à des calculs basés sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT : « density functional theory ») portant sur des éléments de structure (clusters) ou des réseaux périodiques pour mieux identifier les structures locales de phases complexes [2], ou approcher directement les distributions d'angles de liaisons dans des systèmes vitreux [3].

Ces expériences peuvent prendre des formes diverses et reposent sur la capacité d'exciter des états de cohérence collective (cohérences multi-quanta). Les contributions spectrales peuvent être séparées par analyse de Fourier [2] ou filtrage [3], permettant de mettre en évidence les paires, triplets, quartets de noyaux couplés et leurs signatures spectrales. Les états sélectionnés peuvent correspondre à des ensembles de noyaux d'une même famille –  $^{31}\text{P}$ - $^{31}\text{P}$ ,  $^{29}\text{Si}$ - $^{29}\text{Si}$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  – ou de familles différentes –  $^{27}\text{Al}$ - $^{31}\text{P}$ ,  $^{27}\text{Al}$ - $^{29}\text{Si}$ ,  $^{17}\text{O}$ - $^{27}\text{Al}$ , etc.

Une illustration particulièrement intéressante est l'application de ces méthodes à la caractérisation de structures vitreuses, mais le domaine d'applicabilité est très étendu, allant de la caractérisation de phases cristallines aux variations obtenues par dopage, substitution, solution solide, amorphisation ou vitrification. Considérons une phase cristalline, supposément parfaitement ordonnée, qui peut être décrite par un nombre limité de sites cristallographiquement inéquivalents. En RMN haute résolution du solide, chacun de ces sites donne lieu à une raie de résonance. L'introduction progressive d'un désordre se traduit par un élargissement des résonances témoignant de distributions des paramètres RMN et aboutissant à des spectres le plus souvent larges et peu résolus (figure 1).

Comme démontré dans le cas de systèmes moléculaires impliquant un désordre structural, il est possible, dans des expériences de corrélation, de mettre en évidence l'ordre local sous-jacent dans un désordre géométrique global [4]. Dans le cas des verres de phosphates étudiés par RMN du phosphore-31, l'application de filtres de paires et de triplets

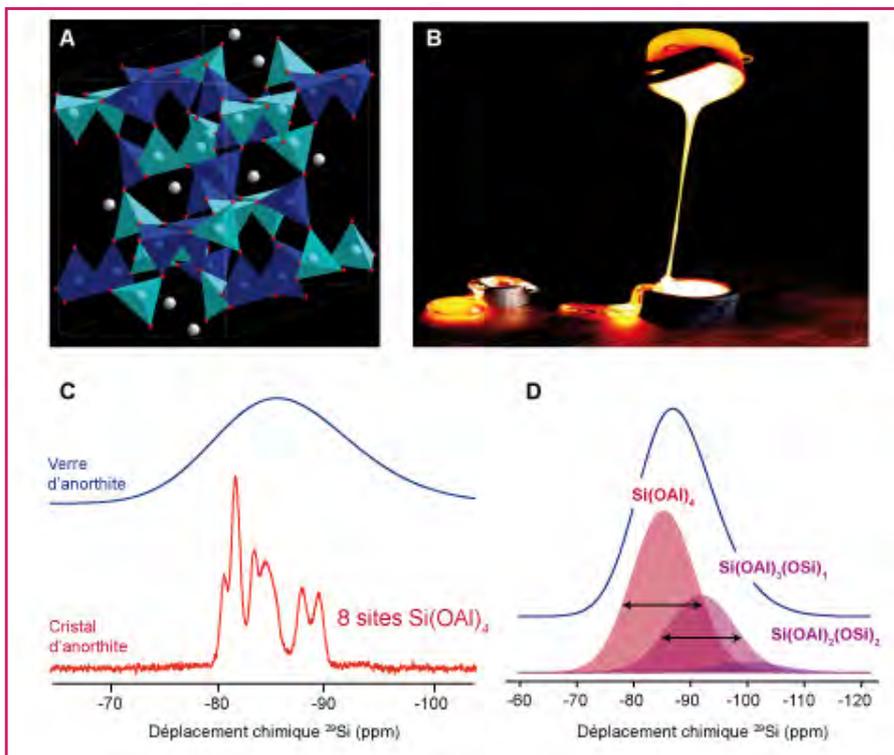


Figure 1 - L'anorthite, de formule  $\text{Si}_3\text{AlO}_8\text{Ca}$ , présente huit sites cristallographiques chimiquement semblables  $\text{Si}(\text{OAl})_4$ , mais inéquivalents par leurs angles et distances de liaisons (A) et partiellement résolus dans son spectre RMN du silicium-29 (C). Le verre de composition équivalente et préparé par fusion (B) présente un spectre large (C, D) qui peut être interprété à partir d'expérience de « comptage de spin » séparant successivement les différents environnements  $\text{Si}(\text{OAl})_{4-x}(\text{OSi})_x$  en comptant le nombre de tétraèdres  $\text{SiO}_4$  autour d'un tétraèdre central. La largeur de chacune de ces contributions signe alors le désordre géométrique pour chaque motif chimique.

permet de séparer les monomères, les dimères, les fins de chaînes de trimères, les milieux de chaînes de tétramères ou de pentamères, etc., et de mesurer pour chacun, d'une part une valeur de déplacement chimique moyen, et d'autre part une distribution (largeur de raie gaussienne) correspondant alors à la contribution du désordre géométrique pour chaque espèce chimique [5-6]. Des démarches similaires s'appliquent aux silicates et aluminosilicates (le plus souvent après enrichissement en silicium-29 pour la réalisation des expériences RMN) [3, 7-8] pour lesquels ces expériences permettent de faire la part, dans un spectre large et peu informatif par lui-même, entre les contributions liées au *désordre chimique* et au *désordre géométrique* [8]. Ce faisant, notre description de la structure du matériau s'étend de l'échelle de l'angström à celle du nanomètre en considérant les motifs moléculaires ainsi identifiés. Ces résultats nous incitent à revisiter sous un jour nouveau les notions d'homogénéité chimique, de séparation de phases ou de démixtion spinodale dans les verres et les liquides de haute température dont ils sont issus [9].

## Structures vitreuses

Les verres sont aujourd'hui des matériaux dont l'usage est de plus en plus répandu car leurs propriétés macroscopiques peuvent être adaptées à des exigences très diverses. En effet, elles peuvent être modulées de manière précise par la complexité de leur composition chimique et par les nombreux paramètres physiques qui contrôlent leurs procédés d'élaboration. Dans le contexte des verres de confinement des radionucléides issus du traitement des combustibles nucléaires usés, la compréhension précise de leurs propriétés physico-chimiques est un sujet de recherche très actif pour répondre aux évolutions des exigences d'élaboration, de solubilisation d'une grande variété d'éléments à incorporer (produits de fission, terres rares...) et de résistance à des sollicitations internes (auto-irradiation, stabilité thermique) et externes (altération par l'eau souterraine). L'omniprésence des verres dans notre société fait que la compréhension des relations entre la composition chimique du verre et ses propriétés macroscopiques est au cœur d'enjeux scientifiques et industriels importants. À ce titre, l'amélioration de notre connaissance de la structure des verres à l'échelle atomique est cruciale. Comme illustré précédemment, la RMN du solide est particulièrement bien adaptée aux matériaux (dits amorphes) tels que les verres : malgré l'absence d'ordre à longue distance des arrangements atomiques constitutifs du matériau, elle est capable d'identifier les motifs structuraux de base (trièdre, tétraèdre, pentaèdre...), ainsi que leurs enchaînements qui construisent le « squelette » du matériau (le réseau vitreux).

Un verre nucléaire a généralement une composition très complexe (pouvant contenir plus de trente oxydes) dont la base est un verre aluminoborosilicaté. Nombre de ces oxydes ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{Li}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaO}$ ...) contiennent des noyaux actifs en RMN :  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{11}\text{B}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^7\text{Li}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{17}\text{O}$  et  $^{43}\text{Ca}$ . Cela multiplie d'autant les possibilités de sonder sa structure et d'appréhender sa grande complexité chimique et géométrique. Une question essentielle et fondamentale est de comprendre le rôle de chaque élément : comment participe-t-il à la structure du verre ? Comment les éléments interagissent entre eux ? Quel est leur comportement au cours du temps ? Ce sont des questions délicates auxquelles la RMN peut répondre, notamment grâce à l'étude de verres de composition simplifiée permettant d'isoler les paramètres prépondé-

rants pouvant être ensuite extrapolés aux verres complexes comme les verres nucléaires [10]. Par exemple, le bore peut s'insérer dans le réseau sous forme de deux motifs structuraux dont les proportions peuvent notablement influencer la viscosité du verre fondu (et donc sa température d'élaboration) ainsi que sa durabilité chimique. Le bore peut se trouver sous forme soit d'un trièdre  $\text{BO}_3$ , soit d'un tétraèdre  $(\text{BO}_4)^-$  inséré dans le réseau silicaté (nécessitant la présence à proximité d'un cation dit compensateur de charge tel que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ). La proportion relative de ces deux espèces, très fortement dépendante de la composition chimique du verre, peut être déterminée très précisément par RMN du bore-11 (*figure 2a*). La connaissance de la spéciation du bore est indispensable pour l'élaboration de modèles structuraux de verres borosilicatés [11] ; en comprenant mieux la distribution du bore au sein de la matrice vitreuse, il devient alors possible d'adapter la formulation du verre en fonction des propriétés recherchées. Par exemple, dans un verre soumis à une irradiation électronique, la sensibilité de la RMN du bore-11 permet d'observer clairement la conversion des unités  $(\text{BO}_4)^-$  en  $\text{BO}_3$  qui accompagne la formation d'oxygène moléculaire mais révèle aussi l'existence de phénomènes de migrations d'alcalins [12].

Bien que nécessitant un enrichissement isotopique, l'oxygène-17 a aussi démontré un formidable potentiel, tel qu'une vision globale des enchaînements des motifs structuraux qui participent à la construction de l'édifice atomique du verre. Si la résolution des expériences unidimensionnelles (MAS) est insuffisante pour des verres complexes (en pratique au-delà de deux oxydes) (*figure 2b*), l'utilisation d'expériences à deux dimensions (MQ-MAS) permet de révéler toute la richesse des liaisons chimiques et électrostatiques présentes (*figure 2c*). Ce sont les sites d'oxygènes dits pontants tels que Si-O-Si, Si-O-B, Si-O-Al, B-O-B qui construisent le réseau vitreux et les sites d'oxygènes dits non pontants, Si-O<sup>-</sup> porteur d'une charge négative, dont la compensation peut être soit simple (par exemple  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) soit partagée, mettant en évidence l'existence de régions mixtes de cations (par exemple  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ) [13-14] (*figure 2d*). La RMN de l'oxygène-17 permet aussi de suivre directement la formation de la pellicule d'altération qui se forme lors de réactions d'hydrolyse et de condensation des formateurs de réseaux, en particulier le silicium, à la surface du verre [14] : le verre est altéré dans une solution enrichie en oxygène-17, ce qui permet de mettre en évidence les échanges entre le verre et la solution. Cette approche est complémentaire d'approches multinucléaires basées sur des techniques de polarisation croisée entre le proton ( $^1\text{H}$ ) et un autre noyau tel que le silicium-29 ou l'aluminium-27. Le proton permet en effet d'être sélectif sur uniquement la pellicule hydratée du verre [15]. Le suivi de l'évolution structurale de cette dernière montre les paramètres qu'il convient de considérer pour développer des modèles mécanistiques prédictifs de l'altération des verres. De telles prédictions sont au cœur de défis scientifiques majeurs pour comprendre et modéliser le comportement du verre (et des matériaux de manière générale) sur des échelles de temps difficilement accessibles expérimentalement et parfois théoriquement par des calculs numériques. La RMN apporte de nombreux éléments d'information sur la structure qu'il convient d'assembler ou de coordonner dans de nouvelles stratégies de modélisation telles que les méthodes de Monte Carlo.

La RMN du calcium-43, un domaine actuellement en pleine expansion, notamment pour les systèmes biocompatibles, a aussi démontré de fortes potentialités pour mieux comprendre la structure des verres silicatés [16]. L'application

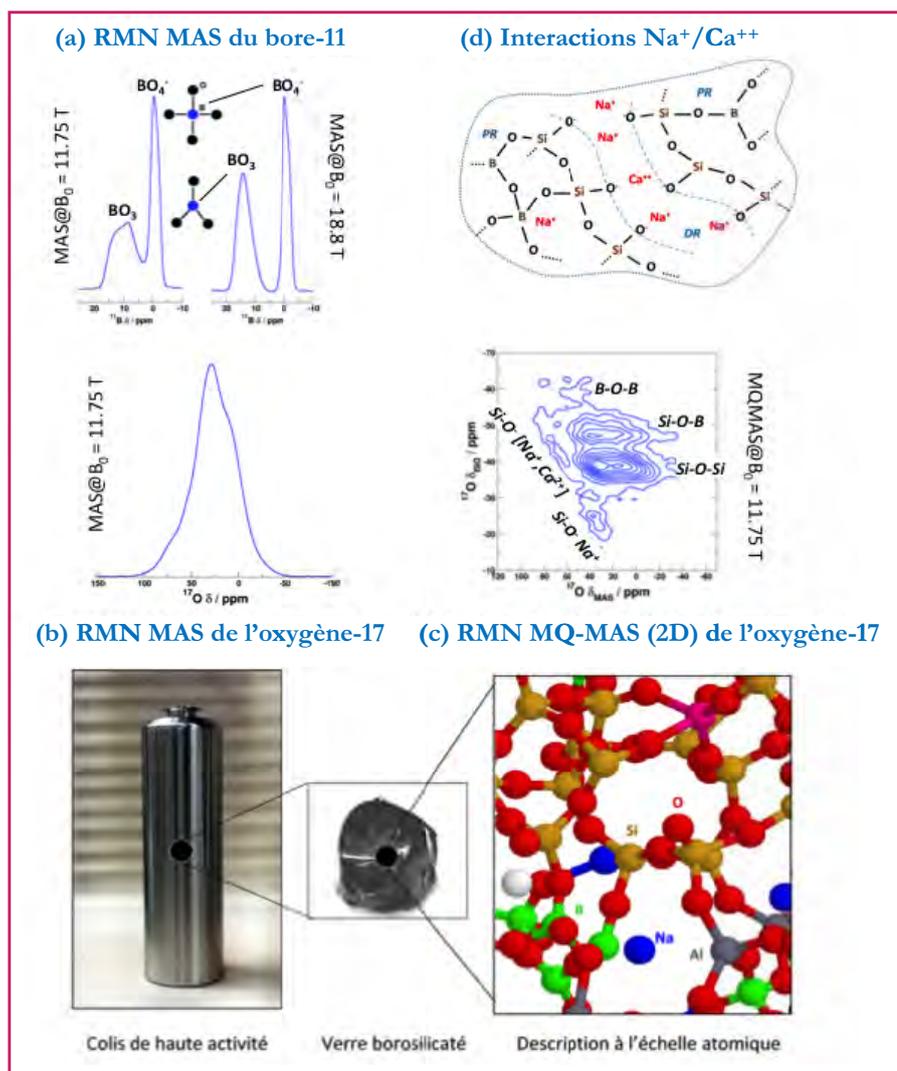


Figure 2 - Structure d'un verre borosilicaté  $\text{SiO}_2\text{-B}_2\text{O}_3\text{-Na}_2\text{O-CaO}$ .

Pour un champ magnétique suffisamment fort (ici 11,75 T), la RMN du bore-11 permet de résoudre directement les deux environnements du bore. L'utilisation d'un champ magnétique plus intense (18,8 T) permet un accroissement de la résolution (a). Dans le cas de l'oxygène-17, la RMN MAS seule n'est pas capable de résoudre tous les environnements (b). Il est alors nécessaire de recourir à des techniques bidimensionnelles (RMN MQ-MAS) (c) qui permettent de révéler toutes les composantes sur spectres de RMN. On obtient alors de précieuses informations telles que les liaisons chimiques entre le silicium et le bore (les éléments qui assurent la rigidité du verre) et les interactions électrostatiques entre les alcalins et alcalino-terrestres (le sodium et le calcium). L'analyse détaillée et quantitative de ces données permet alors de bâtir des modèles structuraux du verre (d). Ici, la RMN de l'oxygène-17 permet notamment de mettre en évidence des régions mélangant sodium et calcium au sein de la matrice vitreuse.

de la RMN haute résolution à des matériaux radioactifs est actuellement en cours ; la faisabilité de mesures a déjà été démontrée sur une céramique modèle  $\text{ZrSiO}_4$  dopée au plutonium [17]. Concernant l'utilisation d'isotopes radioactifs, l'introduction du tritium dans le giron de la RMN haute résolution (MAS) est récente [18] et offre aussi de nombreuses perspectives dans le contexte des matériaux pour le nucléaire.

D'une manière générale, l'étude des verres continue de bénéficier largement de l'amélioration quasi continue des techniques RMN comme celles évoquées dans le paragraphe précédent. Toutefois, le niveau de sophistication atteint apportant un accroissement continu de son pouvoir de résolution structurale demande aujourd'hui le développement d'outils plus précis et puissants pour l'interprétation, la modélisation et le traitement des données collectées. Dans le contexte de l'étude des verres, ce n'est que récemment que l'utilisation combinée de simulations par dynamique

moléculaire et de calculs de chimie quantique par la fonctionnelle de la densité (DFT) a ouvert de nouvelles perspectives pour une compréhension plus approfondie des données RMN [19]. En effet, la très grande sensibilité des paramètres RMN à de faibles variations de la structure locale (angle de liaison, longueur de liaison, distance interatomique avec les seconds voisins...) peut être désormais quantifiée à l'aide de ces méthodes de calculs, et sur des environnements plus représentatifs de la structure du verre que des approximations par fragments moléculaires (la boîte complète modélisant le verre est prise en compte dans le calcul des paramètres RMN, ce qui permet notamment d'intégrer l'influence des interactions de longue portée). Ces modélisations permettent aussi de mieux caractériser l'effet du désordre sur les spectres RMN qui se manifeste par une distribution parfois complexe de paramètres RMN (au-delà du simple modèle populaire de la distribution normale ou gaussienne). Il est alors possible de proposer une transposition du spectre RMN en une distribution de paramètres structuraux, tels que les angles de liaison (non accessibles directement par les techniques de diffraction qui sont plus sensibles aux distances interatomiques entre premier et second voisins). Cette méthodologie en pleine émergence [19] a été appliquée à des verres simples –  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2\text{-B}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CaO-SiO}_2$  et  $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O}$  –, mais l'accroissement continu des performances des moyens de calculs permet d'envisager des compositions plus complexes et des systèmes de plus grande taille. C'est le cas d'une étude portant sur des verres biocompatibles ( $\text{CaO}$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) ; ces calculs se sont montrés indispensables pour l'interprétation avancée des données : l'absence de liaison chimique entre sites phosphore et silicium et l'existence d'une fraction non négligeable de point de rupture des chaînes sili-

catées sont des points essentiels qui expliquent les propriétés biocompatibles de ce verre. Malgré leur introduction récente, ces calculs sont arrivés à un niveau de maturité qui les rend désormais pratiquement incontournables (voire indispensables) dans toute la richesse des domaines concernés par la RMN [19].

## Matériaux hybrides

Les verres décrits dans le paragraphe précédent étaient obtenus par fusion. Mais depuis quelques décennies, une voie alternative pour la fabrication des verres a vu le jour, qui met en jeu des réactions d'hydrolyse-condensation de pré-curseurs moléculaires en solution conduisant à la formation d'un réseau d'oxyde dans des conditions douces de synthèse. Cela a donné naissance à ce que l'on appelle les procédés sol-gel, largement utilisés pour élaborer une grande variété de matériaux inorganiques, mais surtout hybrides

organiques-inorganiques [20]. En effet, les conditions de synthèse employées, en solution et à température ambiante, permettent la construction de très nombreux matériaux innovants alliant une composante organique au réseau inorganique, soit par liaison covalente, soit par liaison faible, souvent de type liaison hydrogène. Certains biomatériaux naturels comme l'os ou la nacre sont de merveilleux exemples de matériaux hybrides pour lesquels l'arrangement des composantes organiques et inorganiques à plusieurs échelles confère des propriétés, en particulier mécaniques, remarquables. Leur observation a conduit les chimistes des matériaux à développer des modes de construction bioinspirés, qui ne permettent néanmoins pas encore d'atteindre les mêmes performances.

Une large famille de matériaux hybrides est à base de silice, un composé qui joue un rôle important dans de nombreux secteurs industriels. Avec leur inertie chimique et thermodynamique et leur faible coût, les poudres de silice sont couramment utilisées dans une large gamme d'applications (pneus, cosmétiques, dispositifs en microélectronique, abrasifs, supports de catalyseurs, colonnes chromatographiques...). Il est possible de contrôler très finement leur morphologie et leur porosité (taille et distribution des pores, topologie du réseau poreux), et beaucoup d'applications innovantes sont liées aux possibilités quasi infinies offertes au chimiste de moduler les propriétés de surface par fonctionnalisation.

De par sa forte biocompatibilité, son hydrophilicité et sa dissolution en milieu aqueux qui dépend du pH, la silice apparaît aussi comme un composé très intéressant dans le domaine de la santé, pour le développement de nouveaux vecteurs permettant le relargage contrôlé de principes actifs. Or d'un point de vue pharmaceutique, il est très important de caractériser précisément l'état physique d'un médicament dans sa forme galénique. En effet, le polymorphisme d'un médicament peut conduire à différentes propriétés physiques et chimiques. Parmi les différentes techniques spectroscopiques développées pour caractériser le principe actif, l'excipient et la forme galénique finale, la spectroscopie RMN occupe une place de choix car elle permet non seulement de différencier les différentes formes à l'état solide du principe actif, mais aussi de sonder intimement ses caractéristiques structurales et ses éventuelles interactions avec l'excipient.

Des poudres de silice à large porosité ( $> 1\,000\text{ m}^2/\text{g}$ ) et avec des pores parfaitement calibrés (de 2 à 15 nm) peuvent être élaborées, en particulier par l'utilisation d'agents structurants amphiphiles, et ont été étudiées comme potentiels vecteurs de principes actifs, en considérant l'ibuprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien, comme composé modèle [21]. Tout d'abord, elles peuvent encapsuler une quantité importante d'ibuprofène ( $\leq 500\text{ mg/g}$  de silice), un principe actif peu soluble dans l'eau. Ceci permet ainsi une meilleure solubilisation du principe actif, mais aussi sa libération programmée dans le

temps, une meilleure protection contre le milieu extérieur et un ciblage de l'organe ou de la lésion à traiter.

La caractérisation par RMN à l'état solide a permis de démontrer que l'ibuprofène encapsulé présente un état physique différent de l'ibuprofène pur qui est un solide cristallin (figure 3b et d) [21-22]. En fait, les molécules qui occupent un volume d'environ  $0,5 \times 0,8 \times 1,1\text{ nm}^3$ , une fois piégées dans

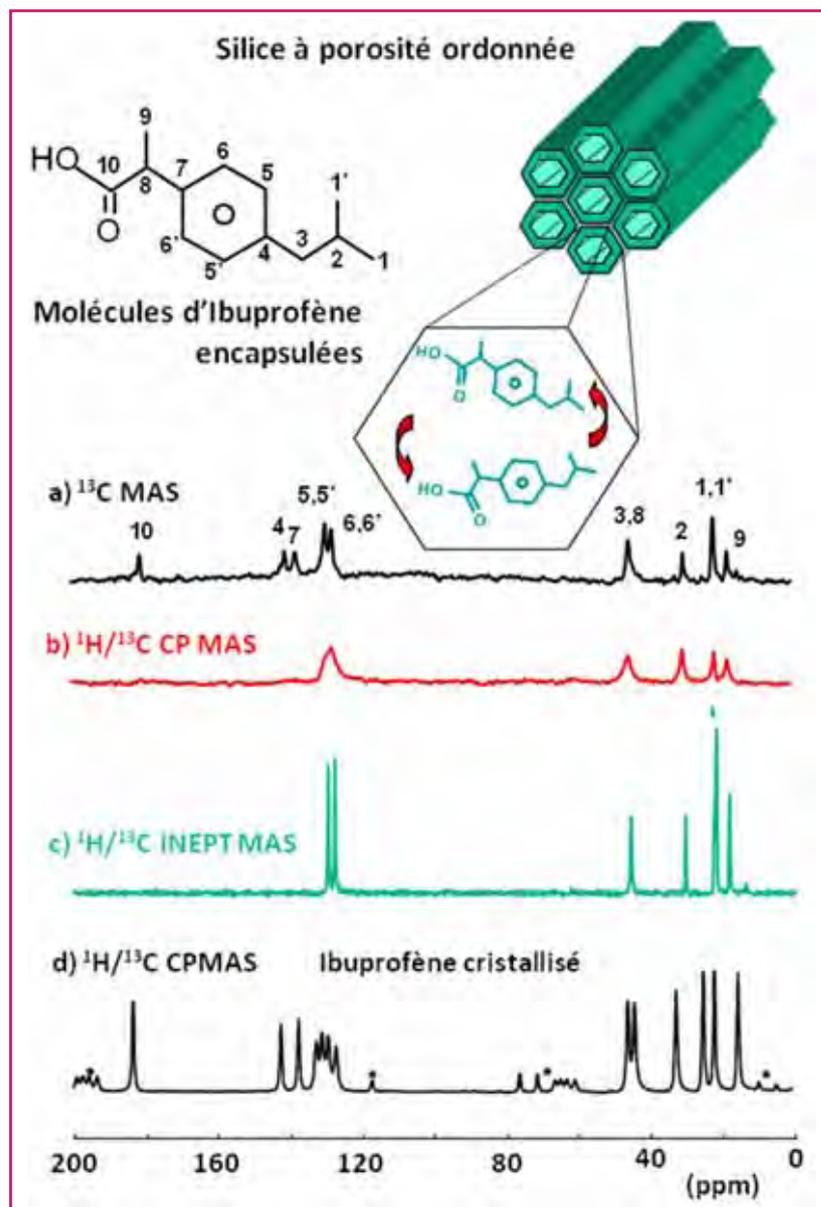


Figure 3 - Les silices mésoporeuses comme matrice-hôte pour le relargage de principes actifs.

Il est possible d'encapsuler dans des silices mésoporeuses de larges quantités de principes actifs hydrophobes ( $> 500\text{ mg/g}$ ). Leur relargage en milieu biologique peut être contrôlé par une fonctionnalisation de surface qui va moduler les interactions hôte-invité et influencer la vitesse de relargage. La figure montre pour les molécules encapsulées une réponse spectrale très différente des mêmes molécules composant un réseau cristallin d'ibuprofène, traduisant une mobilité accrue due à des effets de confinement. Une utilisation astucieuse des interactions mises en jeu dans les séquences RMN multinucléaires  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  basées sur le couplage dipolaire  $D$  (qui agit à travers l'espace) ou le couplage scalaire  $J$  (qui lui agit à travers les liaisons) permet en fait de discriminer plusieurs populations de molécules selon leur mobilité : le spectre (a) est caractéristique de toutes les molécules d'ibuprofène encapsulées, alors que les spectres (b) et (c) distinguent deux populations selon leur mobilité, plus élevée pour (c) que pour (b). À remarquer que les carbones quaternaires, et donc non protonés, ne sont pas détectés dans le spectre CP (b) compte tenu des paramètres expérimentaux employés. Le symbole \* indique la présence de bandes de rotation liées à la rotation à l'angle magique, que l'on ne détecte que dans l'échantillon cristallin du fait de l'existence d'une anisotropie de déplacement chimique importante pour les sites de carbones de type  $\text{sp}^2$  (carbones aromatiques et groupe  $\text{C}=\text{O}$ ). Dans le cas des molécules encapsulées, leur mobilité permet une réduction de cette interaction, d'où l'absence de bandes de rotation pour la vitesse de rotation à l'angle magique utilisée.

des pores de taille variant entre 3 et 10 nm, ont le comportement d'un fluide visqueux en raison des effets de confinement. En jouant astucieusement avec les séquences RMN employées (la séquence de polarisation croisée, basée sur le couplage dipolaire hétéronucléaire  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , d'une efficacité optimale dans le cas de systèmes rigides, et la séquence INEPT tirée des séquences de RMN en solution et basée sur les couplages  $J$ ), il est possible d'éditer sélectivement les sites  $^{13}\text{C}$  selon leur mobilité (figure 3). Dans l'étude de ces systèmes, la RMN apparaît comme un outil précieux à plusieurs titres. Au niveau de leur synthèse, elle permet de confirmer, avec une meilleure sensibilité que la diffraction des rayons X, l'efficacité des étapes de lavage qui servent à éliminer les molécules qui auraient pu recristalliser en surface des grains poreux de silice après les étapes d'imprégnation. Au niveau des performances comme vecteurs de principes actifs, l'étude par RMN permet de corréler les cinétiques de relargage des molécules encapsulées et leur état physique (mobilité, interactions avec le support poreux), et ceci en fonction de la taille des pores et de la topologie du réseau poreux.

La RMN est aussi une méthode de choix pour caractériser les interfaces organiques-inorganiques présentes dans les matériaux hybrides [23-24]. Ceci a été élégamment illustré par une étude menée là encore sur un matériau spécialement imaginé pour servir de dispositif de relargage contrôlé [25]. Il s'agit de liposils qui associent un liposome (bicouche unilamellaire et sphérique de phospholipides) à une coque de silice amorphe précipitée par voie sol-gel. Comparés au précédent

exemple, ces matériaux offrent l'avantage de pouvoir solubiliser, selon son affinité, le principe actif dans les phases aqueuse ou hydrophobe du liposome. Une étude complète menée par RMN a été réalisée afin de caractériser la nature des interactions entre la tête polaire des liposomes (un groupe phosphatidylcholine) et la surface de la silice par des expériences de double transfert de polarisation  $^1\text{H}$ → $^{29}\text{Si}$ → $^1\text{H}$  permettant de filtrer sélectivement les protons spatialement proches de la surface de silice, ainsi que la dynamique locale des phospholipides au sein des liposils, via une étude en température des paramètres d'anisotropie de déplacement chimique  $^{31}\text{P}$ . Ces données spectroscopiques ont été combinées à des calculs DFT pour déterminer les configurations les plus favorables de la tête du phospholipide adsorbée sur une surface de silice amorphe préalablement modélisée ; des molécules d'eau interfaciales ont dû être introduites afin de rendre compte de la valeur de déplacement chimique  $^{31}\text{P}$  de la tête phosphate et de proposer une configuration possible, qui est aussi en accord avec la dynamique observée (figure 4).

### Catalyseurs hétérogènes

La catalyse hétérogène est une pierre angulaire de l'industrie chimique puisque 80 % des procédés industriels reposent sur l'emploi de catalyseurs hétérogènes. Elle intervient notamment pour la production d'énergie (raffinage), de composés chimiques et la dépollution. La recherche de gain de productivité, l'accroissement de la consommation énergétique

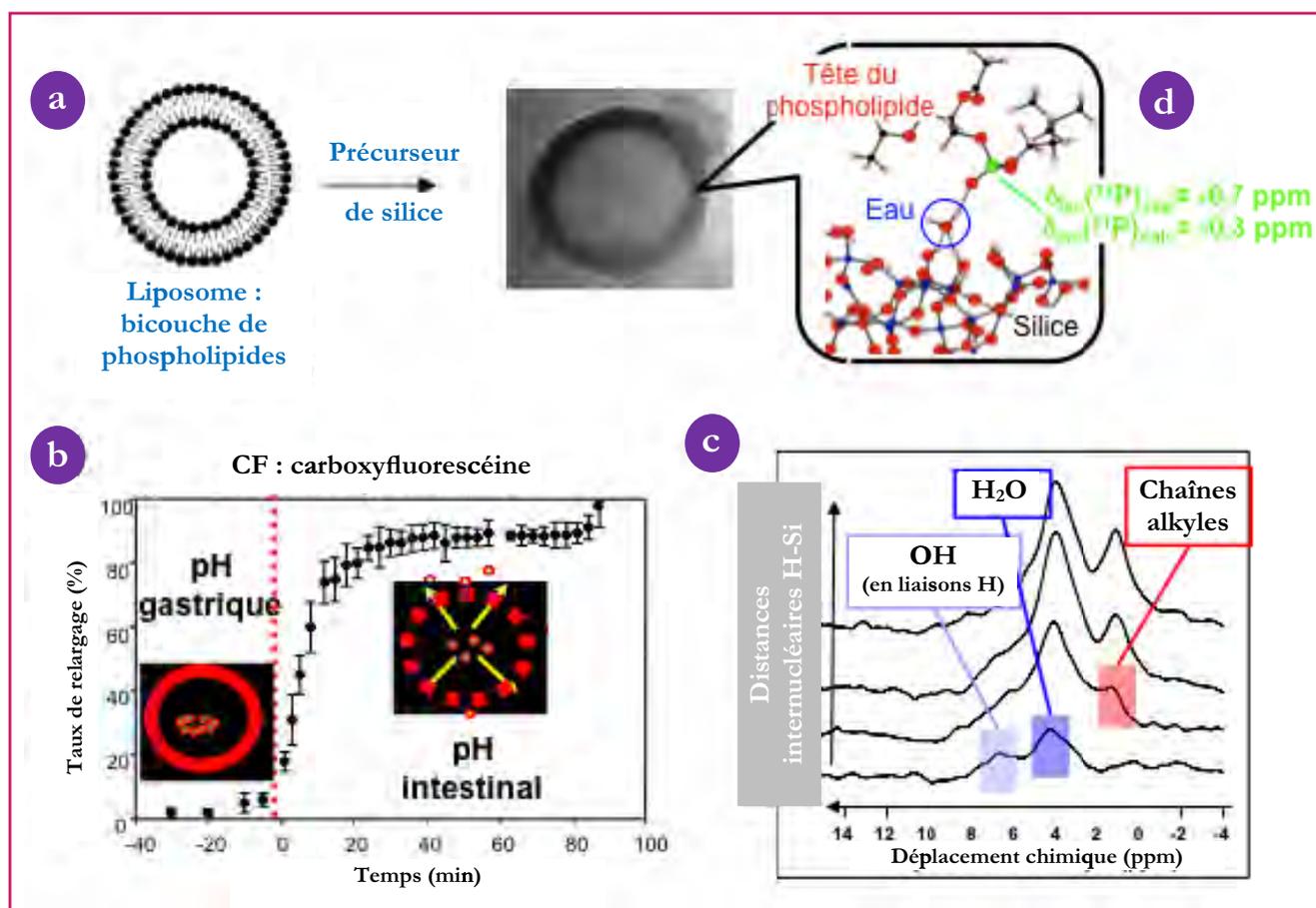


Figure 4 - Les liposils, des objets hybrides insolites.

Les liposils sont des liposomes recouverts d'une couche de silice amorphe (a) qui présentent d'intéressantes propriétés de relargage de substances organiques, modulées en fonction du pH (b). Une étude complète menée par RMN (c) a été combinée avec une étude de modélisation par dynamique moléculaire (d) afin de déterminer la façon dont le phospholipide interagit avec la surface de silice. La présence de molécules d'eau a dû être considérée pour rendre compte des données spectroscopiques, en particulier en termes de dynamique.

mondiale, la raréfaction des ressources pétrolières et le renchérissement des matières premières stimulent, aujourd'hui plus que jamais, l'amélioration des procédés catalytiques, qui se doivent d'être à la fois économes en matières et en énergie.

Pour concevoir de façon rationnelle de nouveaux catalyseurs hétérogènes, il est nécessaire de caractériser leur structure et leur dynamique aux différentes échelles spatiales et temporelles (figure 5a). Cependant, pour ces systèmes complexes, cet objectif d'une description exacte et complète reste malheureusement hors d'atteinte dans l'état actuel des techniques analytiques. Plusieurs raisons concourent à rendre difficile la caractérisation de ces systèmes : (i) ils sont généralement constitués de plusieurs phases de composition complexe ; (ii) ils sont la plupart du temps mal cristallisés, voire amorphes ; (iii) leur réactivité est souvent liée à l'existence de défauts de surface, qui ne peuvent pas être observés par les techniques de diffraction ; (iv) les phases actives sont constituées de quelques couches atomiques, déposées sur un support, parfois associées à des agents promoteurs ; et (v) la mobilité moléculaire au sein des catalyseurs peut être élevée. Les techniques employées pour caractériser les catalyseurs hétérogènes comprennent notamment les microscopies électroniques, la diffraction des rayons X et les spectroscopies de photoélectrons induits par rayons X, d'absorption des rayons X, UV-visible, IR, Raman, RPE et RMN (figure 5a).

Parmi ces différentes techniques d'analyse, la spectroscopie RMN fournit des informations spécifiques sur la structure et la dynamique à l'échelle atomique. En particulier, sa grande sensibilité à l'environnement chimique des atomes et son applicabilité pour des systèmes désordonnés en font une des techniques de choix pour la caractérisation des catalyseurs. De nombreuses études de catalyseurs ont exploité les avancées récentes en RMN des solides pour l'observation des proximités spatiales ou des connectivités *via* des liaisons covalentes [26]. Cependant, la spectroscopie RMN est une méthode d'analyse de cœur et elle est *a priori* peu sensible à l'état de surface des matériaux. Par conséquent, l'observation sélective des interfaces nécessite l'emploi d'expériences de transfert de polarisation entre moments magnétiques présents dans des phases distinctes [27], comme illustré précédemment avec l'étude sur les liposils. La faible sensibilité de la RMN empêche aussi l'observation des noyaux de faible abondance naturelle et/ou de faible rapport gyromagnétique ( $^{17}\text{O}$ ,  $^{47,49}\text{Ti}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{61}\text{Ni}$ ,  $^{67}\text{Zn}$ ,  $^{95}\text{Mo}$ ,  $^{103}\text{Rh}$ ,  $^{105}\text{Pd}$ ...), qui représentent souvent une proportion importante des isotopes présents au sein des catalyseurs.

La RMN des solides souffre aussi d'un manque de résolution spectrale, notamment pour les systèmes paramagnétiques, les noyaux soumis à des fortes interactions quadripolaires ou les réseaux de protons fortement couplés.

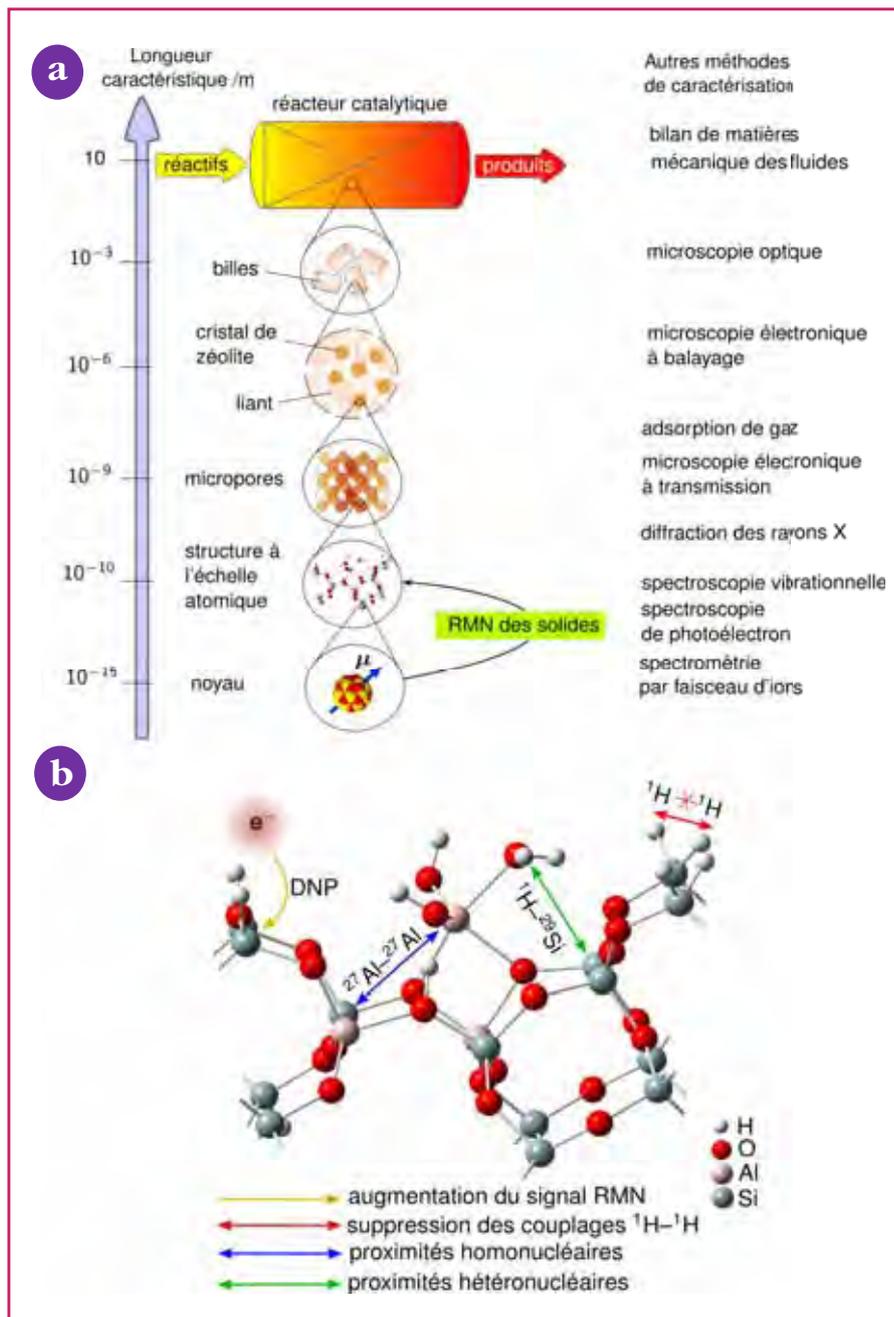


Figure 5 - Sites de surface d'un catalyseur hétérogène.

(a) Organisation des catalyseurs hétérogènes à base de zéolites aux différentes échelles spatiales : depuis l'échelle macroscopique jusqu'à l'échelle subatomique. Dans les réacteurs catalytiques, les cristaux de zéolite de 1 à 5  $\mu\text{m}$  sont dispersés au sein d'un matériau liant (argile, alumine, polymère...). Ce mélange est ensuite extrudé sous forme de billes de diamètre de l'ordre du millimètre. Ce matériau liant présente un réseau de macropores dont les diamètres sont compris entre 0,5 et 5  $\mu\text{m}$ . Les cristaux de zéolite comportent, eux, des micropores ayant des diamètres de l'ordre du nanomètre. En outre, la structure des zéolites présente des défauts tels que des sites aluminium extra-réseau. Différentes méthodes de caractérisation sont donc nécessaires pour décrire la structure de ces catalyseurs hétérogènes aux différentes échelles spatiales. En particulier, la spectroscopie RMN des solides permet d'obtenir des informations spécifiques sur la structure à l'échelle atomique, en observant les moments magnétiques des noyaux atomiques. (b) Sites de surface d'un catalyseur hétérogène. Il s'agit d'un agrandissement de la structure à l'échelle atomique présentée en (a). L'intérêt des principales méthodes de RMN des solides pouvant être employées pour l'étude des catalyseurs hétérogènes est illustré pour une surface de zéolite HY comportant une espèce aluminium extra-réseau,  $\text{Al}(\text{OH})^{2+}-\text{H}_2\text{O}$ . Des expériences RMN bidimensionnelles homo- et hétéronucléaires ont permis de mieux comprendre la structure de ce catalyseur et de préciser en particulier la structure des sites Al extra-réseau, qui influent sur l'activité catalytique des zéolites. La structure présentée sur cette figure a été optimisée par des calculs DFT, qui ont permis de prédire les déplacements chimiques isotropes  $^{27}\text{Al}$ , et qui ont pu être comparés aux valeurs expérimentales, extraites d'expériences RMN multidimensionnelles.

Plusieurs voies sont suivies actuellement par les équipes de méthodologie en RMN des solides afin de répondre aux demandes de caractérisation des catalyseurs hétérogènes. Pour observer les sites actifs peu concentrés ou les isotopes peu abondants, une solution prometteuse repose sur l'utilisation du phénomène de polarisation nucléaire dynamique (DNP) [28]. Cette méthode consiste à transférer la polarisation d'électrons non appariés au sein d'espèces paramagnétiques vers les noyaux environnants, et permet d'augmenter la sensibilité d'un ou deux ordres de grandeur. Dès lors que la sensibilité est suffisante, des expériences RMN spécifiques, illustrées sur la *figure 5b*, peuvent être employées afin d'extraire les informations structurales et dynamiques pertinentes, telles que les proximités et les connectivités interatomiques ou encore les vitesses d'échange entre sites. Par exemple récemment, des techniques hétéronucléaires ont été proposées pour mesurer, de façon très précise, la distance  $^{31}\text{P}$ - $^{51}\text{V}$  dans un composé polyoxométallate  $\text{K}_4\text{PVW}_{11}\text{O}_{40}$  [29]. Ce composé est utilisé comme catalyseur pour l'oxydation sélective des hydrocarbures. Des techniques hétéronucléaires bidimensionnelles ont aussi été introduites pour mettre en évidence les proximités spatiales entre noyaux de spin  $\frac{1}{2}$  ( $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) et noyaux quadripolaires ( $^{27}\text{Al}$ ). Ces expériences ont par exemple été exploitées pour caractériser des catalyseurs microporeux ainsi que des hydrures d'aluminium supportés [26]. Ces derniers sont utilisés pour catalyser les réactions de polymérisation et d'hydrogénation des hydrocarbures.

L'intérêt de la RMN des solides pour l'étude des catalyseurs hétérogènes est bien illustré par l'exemple des zéolites (*figure 5*). Les zéolites figurent parmi les catalyseurs les plus utilisés pour le raffinage du pétrole, puisqu'elles sont employées comme catalyseurs acides hétérogènes dans de nombreux procédés tels que le craquage, l'isomérisation, l'alkylation ou la dismutation des hydrocarbures. Elles interviennent notamment dans la production des biocarburants (conversion du méthanol en éthylène et propylène) ou de synthons essentiels, comme le *para*-xylène ou les alkylbenzènes. L'activité et la sélectivité des zéolites proviennent de la présence (i) de sites acides de Brønsted (groupements hydroxyles pontant SiOHAl) et (ii) de pores ayant des dimensions comparables aux tailles moléculaires (sélectivité de forme). L'activité et la sélectivité des zéolites sont accrues lorsqu'elles sont désaluminées (par exemple par chauffage sous vapeur d'eau). La RMN des solides s'est révélée être une méthode de choix pour la compréhension de ce mécanisme de désaluminisation. Par exemple, en sondant les proximités spatiales entre les noyaux  $^{27}\text{Al}$  via les couplages dipolaires  $^{27}\text{Al}$ - $^{27}\text{Al}$ , il a été possible d'identifier les sites aluminium extraréseau formés lors de cette réaction en fonction de la température de désaluminisation, et de proposer un mécanisme en plusieurs étapes pour ce procédé de désaluminisation [30]. Ces techniques de RMN des solides permettent ainsi une optimisation raisonnée des procédés catalytiques utilisés en pétrochimie.

Un dernier défi pour la RMN des catalyseurs hétérogènes est l'observation des protons, qui sont présents au sein des catalyseurs sous différentes formes : les réactifs et les produits ( $\text{H}_2$ ,  $\text{NH}_3$ , hydrocarbures...), les intermédiaires réactionnels ou les protons de surface (hydrures, Si-H, Si-OH...). Les protons sont facilement détectables par RMN car ils sont abondants et ont des moments magnétiques élevés. Mais la RMN  $^1\text{H}$  des solides souffre d'un manque de résolution spectrale qui empêche de distinguer les différents environnements chimiques. Ce manque de résolution est dû à des couplages

magnétiques élevés entre protons. Une solution pour identifier les sites  $^1\text{H}$  dans les catalyseurs consiste donc à atténuer les couplages  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  en combinant astucieusement la rotation de l'échantillon dans l'espace réel et la rotation des moments magnétiques des protons sous l'effet des champs radiofréquences appliqués [31].

## Conclusion

Dans cet article, nous avons voulu illustrer combien la RMN du solide est devenue une spectroscopie incontournable parmi les outils d'investigation structurale de matériaux. Grâce à des expériences mono- ou multidimensionnelles qui permettent d'accéder non seulement à l'environnement local d'un atome, mais également aux connectivités chimiques et proximités spatiales au sein de groupes d'atomes, l'accès à des échelles de distances au-delà du nanomètre est désormais possible. En exploitant la très grande sensibilité des paramètres RMN à de faibles variations de la structure locale, une description détaillée de réseaux vitreux, de surfaces d'oxydes ou d'interfaces organiques-inorganiques peut être obtenue. De plus, le niveau de sophistication atteint par les avancées tant techniques que méthodologiques apporte un accroissement continu du pouvoir de résolution structurale de cette technique spectroscopique, qui demande des outils de plus en plus précis pour interpréter, modéliser et traiter les données collectées. L'utilisation combinée de simulations par dynamique moléculaire et de calculs de chimie quantique par la théorie de la fonctionnelle de la densité a ouvert de nouvelles perspectives pour une compréhension toujours plus approfondie des données RMN. Cette approche combinée spectroscopie-modélisation est d'ailleurs maintenant utilisée dans de très nombreux groupes de RMN du solide travaillant dans le domaine des matériaux.

## Références

- [1] Massiot D., Fayon F., Deschamps M., Cadars S., Florian P., Montouillout V., Pellerin N., Hiet J., Rakhmatullin A., Bessada C., Detection and use of small J couplings in solid state NMR experiments, *C.R. Chim.*, **2010**, *13*, p. 117.
- [2] Cadars S., Brouwer D.H., Chmelka B.F., Probing local structures of siliceous zeolite frameworks by solid-state NMR and first-principles calculations of  $^{29}\text{Si}$ - $^{29}\text{Si}$  scalar couplings, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, p. 1825.
- [3] Florian P., Fayon F., Massiot D.,  $^{29}\text{Si}$ - $^{29}\text{Si}$  scalar spin-spin coupling in the solid-state: the case of crystalline and glassy wollastonite  $\text{CaSiO}_3$ , *J. Phys. Chem. C*, **2009**, *113*, p. 2562.
- [4] Cadars S., Lesage A., Emsley L., Chemical shift correlations in disordered solids, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, p. 4466.
- [5] Fayon F., King I.J., Harris R.K., Gover R.B.K., Evans J.S.O., Massiot D., Characterization of the room temperature structure of  $\text{SnP}_2\text{O}_7$  by  $^{31}\text{P}$  through-space and through-bond NMR correlations spectroscopy, *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, p. 2234.
- [6] Fayon F., Roiland C., Emsley L., Massiot D., Triple-quantum correlation NMR experiments in solids using J-couplings, *J. Magn. Reson.*, **2006**, *179*, p. 50.
- [7] Deschamps M., Fayon F., Hiet J., Ferru G., Derieppe M., Pellerin N., Massiot D., Spin-counting NMR experiments for the spectral editing of structural motifs in solids, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2008**, *10*, p. 1298.
- [8] Hiet J., Deschamps M., Pellerin N., Fayon F., Massiot D., Probing chemical disorder in glasses using silicon-29 NMR spectral editing, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, *11*, p. 6935.
- [9] Martel L., Allix M., Millot F., Sarou-Kanian V., Véron E., Ory S., Massiot D., Deschamps M., Controlling the size of nanodomains in calcium aluminosilicate glasses, *J. Phys. Chem. C*, **2011**, *115*, p. 18935.
- [10] a) Quintas A., Charpentier T., Majérous O., Caurant D., Dussossoy J.-L., Vermaut P., NMR study of a rare-earth aluminoborosilicate glass with varying  $\text{CaO}/\text{Na}_2\text{O}$  ratio, *Appl. Magn. Reson.*, **2007**, *32*, p. 613 ; b) Quintas A., Caurant D., Majérous O., Charpentier T., Dussossoy J.-L., Effect of compositional variations on charge compensation of  $\text{AlO}_4$  and  $\text{BO}_4$  entities and on crystallization tendency of a rare-earth-rich aluminoborosilicate glass, *Mater. Res. Bull.*, **2009**, *44*, p. 1895 ; c) Caurant D., Majérous O., Fadel E., Quintas A., Gervais C., Charpentier T., Neuville D., Structural investigations of borosilicate glasses containing  $\text{MoO}_3$  by MAS NMR and Raman spectroscopies, *J. Nucl. Mater.*, **2010**, *296* p. 94.

- [11] Angeli F., Charpentier T., de Ligny D., Cailleteau C., Boron speciation in soda-lime borosilicate glasses containing zirconium, *J. Amer. Ceram. Soc.*, **2010**, *93*, p. 2693.
- [12] Ollier N., Charpentier T., Boizot B., Petite G., A structural approach by MAS NMR spectroscopy of mechanisms occurring under beta-irradiation in mixed alkali aluminoborosilicate glasses, *J. Phys.-Condens. Mat.*, **2004**, *16*, p. 7625.
- [13] Angeli F., Villain O., Schuller S., Ispas S., Charpentier T., Insight into sodium silicate glass structural organization by multinuclear NMR combined with first principles calculations, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2011**, *75*, p. 2453.
- [14] Angeli F., Charpentier T., Gaillard M., Jollivet P., Influence of zirconium of pristine and leached soda-lime borosilicate glasses: Towards a quantitative approach by  $^{17}\text{O}$  MQMAS NMR, *J. Non-Cryst. Solids*, **2008**, *354*, p. 3713.
- [15] Angeli F., Gaillard M., Jollivet P., Charpentier T., Influence of glass composition and alteration solution on leached glass structure: A solid-state NMR investigation, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **2006**, *70*, p. 2577.
- [16] Angeli F., Gaillard M., Jollivet P., Charpentier T., Contribution of  $^{43}\text{Ca}$  MAS NMR for probing the structural configuration of calcium in glass, *Chem. Phys. Letter*, **2007**, *440*, p. 324.
- [17] Farnan I., Cho H., Weber W.J., Quantification of actinide alpha-radiation damage in minerals and ceramics, *Nature*, **2007**, *445*, p. 190.
- [18] Yuen A.K., Lafon O., Charpentier T., Roy M., Brunet F., Berthault P., Sakellariou D., Robert B., Rimsky S., Pillon F., Cintrat J.-C., Rousseau B., Measurement of long-range interatomic distances by solid-state tritium NMR spectroscopy, *J. Amer. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, p. 1734.
- [19] Charpentier T., The PAW/GIPAW approach for computing NMR parameters: A new dimension added to NMR study of solids, *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, **2011**, *40*, p. 1.
- [20] Sanchez C., Rozes L., Ribot F., Laberty-Robert C., Grosso D., Sassoey C., Boissiere C., Nicole L., « Chimie douce »: A land of opportunities for the designed construction of functional inorganic and hybrid organic-inorganic nanomaterials, *C.R. Chim.*, **2010**, *13*, p. 3.
- [21] Azaïs T., Tourné-Péteilh C., Aussenac F., Baccile N., Coelho C., Devoisselle J.-M., Babonneau F., Solid state NMR study of ibuprofen confined in MCM-41 material, *Chem. Mater.*, **2006**, *18*, p. 6382.
- [22] Azaïs T., Hartmeyer G., Quignard S., Laurent G., Babonneau F., Solution state NMR techniques applied to solid state samples: Characterization of benzoic acid confined in MCM-41, *J. Phys. Chem. C*, **2010**, *114*, p. 8884.
- [23] Bonhomme C., Coelho C., Baccile N., Gervais C., Azaïs T., Babonneau F., Advanced solid state NMR techniques for the characterization of sol-gel derived materials, *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, p. 738.
- [24] Babonneau F., Baccile N., Laurent G., Maquet J., Azaïs T., Gervais C., Bonhomme C., Solid-state nuclear magnetic resonance: a valuable tool to explore organic-inorganic interfaces in silica-based hybrid materials, *C.R. Chim.*, **2010**, *13*, p. 58.
- [25] Folliet N., Roiland C., Begu S., Aubert A., Mineva T., Goursoat A., Selvaraj K., Duma L., Tielens F., Mauri F., Laurent G., Bonhomme C., Gervais C., Babonneau F., Azaïs T., Investigation of the interface in silica-encapsulated liposomes by combining solid state NMR and first principles calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, p. 16815.
- [26] Mazoyer E., Trébosc J., Baudouin A., Boyron O., Pelletier J., Basset J.-M., Nicholas C.P., Vitorino M.J., Gauvin R.M., Taoufik M., Delevoye L., Heteronuclear NMR correlations to probe the local structure of catalytically active surface aluminum hydride species on  $\gamma$ -alumina, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, p. 9854.
- [27] Trébosc J., Wiench J.W., Huh S., Lin V.S.-Y., Pruski M., Studies of organically functionalized mesoporous silicas using heteronuclear solid-state correlation NMR spectroscopy under fast magic angle spinning, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, p. 7587.
- [28] Lafon O., Rosay M., Aussenac F., Lu X., Trébosc J., Cristini O., Klinowski C., Touati N., Vezin H., Amoureux J.-P., Beyond the silica surface by direct silicon-29 dynamic nuclear polarization, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, p. 8367.
- [29] Lu X., Lafon O., Trébosc J., Amoureux J.-P., Detailed analysis of the S-RESPDOR solid-state NMR method for inter-nuclear distance measurement between spin-1/2 and quadrupolar nuclei, *J. Magn. Reson.*, **2012**, *215*, p. 34.
- [30] Yu Z., Zheng A., Wang Q., Chen L., Xu J., Amoureux J.-P., Deng F., Insights into the dealumination of zeolite HY revealed by sensitivity-enhanced  $^{27}\text{Al}$  DQ-MAS NMR spectroscopy at high field, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, p. 1.
- [31] Lafon O., Wang Q., Hu B., Trébosc J., Deng F., Amoureux J.-P., Proton-proton homonuclear dipolar decoupling in solid-state NMR using rotor-synchronized z-rotation pulse sequences, *J. Chem. Phys.*, **2009**, *130*, p. 014504.



F. Babonneau



O. Lafon



T. Charpentier



D. Massiot

**Florence Babonneau** (auteur correspondant), directrice de recherche au CNRS, **Christian Bonhomme** et **Christel Gervais**, professeurs à l'Université Pierre et Marie Curie, **Thierry Azaïs**, maître de conférences à l'Université Pierre et Marie Curie, et **Guillaume Laurent**, ingénieur d'études au CNRS, sont membres du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP)<sup>1</sup>.

**Olivier Lafon**, **Lionel Montagne** et **Jean-Paul Amoureux**, professeurs à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, **Julien Trébosc**, ingénieur de recherche au CNRS, **Laurent Delevoye**, chargé de recherche au CNRS, et **Grégory Tricot**, maître de conférences à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, sont membres de l'Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UCCS)<sup>2</sup>.

**Thibault Charpentier** est chercheur au CEA, expert senior CEA, au Laboratoire de Structure et Dynamique par Résonance Magnétique (LSDRM) du CEA Saclay<sup>3</sup>.

**Frédéric Angeli** est chercheur CEA, expert senior CEA, au Laboratoire d'étude de Comportement à Long Terme des matrices de conditionnement (LCLT) au CEA Marcoule<sup>4</sup>.

**Dominique Massiot**, directeur de recherche au CNRS, **Franck Fayon** et **Sylvian Cadars**, chargés de recherche au CNRS, **Michaël Deschamps**, maître de conférences à l'Université d'Orléans, et **Pierre Florian**, ingénieur de recherche au CNRS, sont membres du CEMHTI (Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation)<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP), Université Pierre et Marie Curie, UMR CNRS 7574, Collège de France, 11 place Marcelin Berthelot, F-75005 Paris.

Courriel : florence.babonneau@upmc.fr

<sup>2</sup> UMR 8181 CNRS/Université de Lille Nord France, Unité de Catalyse et de Chimie du Solide (UCCS), Université de Lille 1, Sciences et Technologie, F-59652 Villeneuve d'Ascq.

<sup>3</sup> CEA, IRAMIS, SIS2M, UMR 3299 CEA/CNRS, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

<sup>4</sup> CEA-DEN, Laboratoire d'Étude de Comportement à Long Terme, F-30207 Bagnols-sur-Cèze.

<sup>5</sup> Conditions Extrêmes et Matériaux : Haute Température et Irradiation, 1D avenue de la Recherche Scientifique, F-45071 Orléans Cedex 2.

Connaissez-vous bien le site de l'AC ?  
[www.lactualitechimique.org](http://www.lactualitechimique.org)  
 Alors vite, à votre souris !

# La RMN à l'état solide

## Un outil clé pour la compréhension moléculaire des catalyseurs hétérogènes bien définis

David Gajan, Giuseppe Lapadula, Martin Schwarzwälder et Christophe Copéret

### Résumé

Le développement rationnel des catalyseurs hétérogènes nécessite de comprendre en détails leur structure à l'échelle moléculaire. Cet article résume l'apport de la RMN à l'état solide comme outil clé de l'identification d'espèces de surface, en particulier par la compréhension de la connectivité entre les atomes les constituant. Ceci fait intervenir la mesure ou la mise en évidence de couplage dipolaire ou couplage scalaire et implique en particulier le développement de la RMN multidimensionnelle. La RMN à l'état solide permet non seulement de s'intéresser à la structure des catalyseurs de départ (pré-catalyseurs), mais aussi d'identifier des intermédiaires réactionnels et d'étudier la dynamique de ces systèmes. En revanche, cette technique souffre de sa faible sensibilité, qui est d'autant plus exacerbée que les espèces de surface ne constituent qu'une faible fraction de l'échantillon. Ce problème majeur pourrait être résolu grâce au développement récent de la RMN de surface exaltée par polarisation nucléaire dynamique (SENS) qui permet de diminuer le temps d'acquisition d'un facteur 2 à 15 000 et donc de réaliser des expériences non imaginables auparavant.

### Mots-clés

**RMN, solide, catalyseurs hétérogènes, surface, SENS.**

### Abstract

**Solid-state NMR: a key tool for the understanding at a molecular level of well-defined heterogeneous catalysts**

Rational development of heterogeneous catalysts needs detailed comprehension of their structure at a molecular level. This review summarizes how solid-state NMR provides critical information for the identification of surface species, especially their atom connectivities. This is possible by exploiting and measuring dipolar and scalar couplings, which heavily relies on the development of multidimensional NMR. Solid state NMR allows not only the characterization of pre-catalysts but also of reaction intermediates. Furthermore, it also provides information about the dynamics of the active sites. However, this technique suffers from its low sensitivity in addition to the low content of active species (some %). Recent development of surface enhanced NMR spectroscopy by dynamic nuclear polarization (SENS) resulted in a gain of acquisition time by a factor of 2 to 15.000. This allows undertaking experiments that were not possible before in view of increase time efficiency.

### Keywords

**NMR, solid, heterogeneous catalysts, surface, SENS.**

La catalyse est sans doute l'un des outils clés du développement durable et donc des siècles à venir. Elle permet en effet *in fine* une transformation efficace des matières premières, qu'elles soient de source fossile ou renouvelable (faible coût énergétique et sélectivité accrue). Ce domaine a été historiquement fragmenté en trois sous-disciplines : la catalyse homogène, la catalyse hétérogène et la biocatalyse, ayant chacune ses avantages et ses inconvénients. Ainsi, suivant le type de molécules et de procédés considérés, on choisira plutôt l'une ou l'autre des approches.

En particulier, les catalyseurs hétérogènes ont un avantage clé pour la mise en œuvre de procédés continus car ils sont plus facilement séparables (du milieu réactionnel), régénérables et recyclables. Néanmoins, ils sont souvent de formulation complexe, et à l'instar de leurs homologues homogènes qui sont basés sur des systèmes bien identifiés, ils souffrent d'une méconnaissance de la structure de leurs sites actifs. Ceci rend leur développement par des approches structure-réactivité souvent difficile, voire impossible. Au vu de leur intérêt, un effort de recherche considérable a été orienté

vers la mise au point de catalyseurs hétérogènes par une approche moléculaire, souvent appelée chimie organométallique de surface [1], ce qui permet une approche plus rationnelle du développement de ces catalyseurs. Ce n'est donc pas surprenant que la RMN du solide ait joué un rôle important, pour ne pas dire fondamental, dans la caractérisation de ces systèmes. Il est bien évident que cette technique vient en renfort d'autres techniques puissantes comme la spectroscopie vibrationnelle ou d'adsorption des rayons X (EXAFS), et qu'associée aux approches de « chimie théorique », elle permet une réelle compréhension des sites de surface à l'échelle moléculaire [2].

De nombreux groupes de recherche se sont illustrés dans ce domaine et leurs travaux ont été souvent relayés dans des revues [3]. Nous nous sommes limités ici en grande partie à des études ciblées de nos travaux de recherche réalisés en commun avec le Centre européen de RMN à très hauts champs (C-RMN, Lyon). L'objectif est d'illustrer l'apport de la RMN à la compréhension des catalyseurs bien définis et de présenter une nouvelle approche prometteuse

de la caractérisation des sites de surface, qui devrait avoir une portée au-delà de la communauté de la catalyse. Cette technique a été appelée (en anglais dans le texte) « surface enhanced solid-state NMR spectroscopy » (SENS), car elle permet d'exalter préférentiellement les signaux des espèces présentes en surface de matériaux.

## RMN 1D de noyaux de spin 1/2

### Proton

Malgré une abondance naturelle de 100 % et une très bonne sensibilité définie principalement par le rapport gyromagnétique  $\gamma$  ( $\gamma_H = 267,5 \cdot 10^6 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$ ), la RMN du solide du proton est souvent ignorée dans le domaine des matériaux et de la catalyse, car ces systèmes comportent typiquement une forte densité de protons, ce qui induit un élargissement colossal des signaux RMN (par couplages dipolaires). Néanmoins, les avancées méthodologiques (c'est-à-dire séquences modernes de découplage proton) et technologiques (rotation à l'angle magique à très haute vitesse – « magic angle spinning » (MAS) – avec  $\nu_{\text{MAS}} = 30\text{--}65 \text{ kHz}$ ) ont permis des avancées considérables dans ce domaine.

Dans le cas particulier des complexes de surface à site unique, obtenus par greffage de complexes moléculaires sur des surfaces fortement déshydroxylées, le réseau de protons est typiquement peu dense, et la RMN solide du proton effectuée dans des conditions standards ( $\nu_{\text{MAS}} = 5\text{--}12 \text{ kHz}$ ) et sans découplage permet déjà d'obtenir de bonnes résolutions spectrales (largeur du pic à mi-hauteur  $\Delta\nu_{1/2} = 200\text{--}300 \text{ Hz}$ ) et ainsi d'identifier différents sites.

Néanmoins, la résolution peut être accrue en modifiant ses séquences impulsionnelles, en ajoutant du découplage ou un écho de spin dans la séquence ( $\Delta\nu_{1/2} < 100 \text{ Hz}$ ) [4].

La résolution peut être aussi fortement augmentée par l'utilisation de très haute vitesse de rotation à l'angle magique. Ainsi, dans le cas des matériaux hybrides, qui comportent une plus grande densité de protons (de un à plusieurs ordres de grandeur), cette technique est indispensable pour obtenir des spectres comportant de bonnes résolutions. Par exemple, il est difficile de distinguer les différents sites présents à la surface d'un matériau hybride à une vitesse de rotation de 10 kHz, alors qu'à 60 kHz, les protons des aromatiques, du phénol et des fragments éthoxy de surface sont bien résolus et identifiables (figure 1, [5]). Cette approche combinée à des techniques multidimensionnelles (*vide infra*) permet d'obtenir une attribution aisée des signaux en RMN du proton d'espèces de surface.

### Carbone-13

La RMN du solide du carbone-13 est particulièrement difficile sur les systèmes non enrichis de par la faible densité de site, la faible abondance naturelle de cet isotope (1,1 %) et sa plus faible sensibilité ( $\gamma_C/\gamma_H = 0,25$ ). L'acquisition de spectres RMN est typiquement réalisée avec des séquences impliquant un transfert de la polarisation des protons vers les

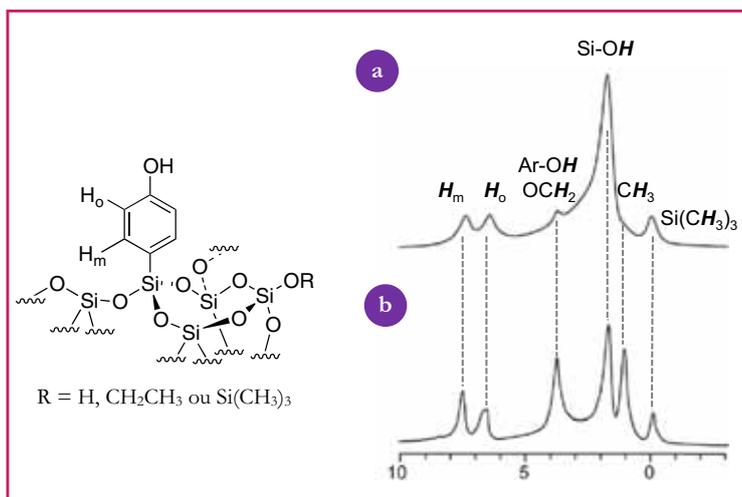


Figure 1 - Comparaison de spectres RMN  $^1\text{H}$  à 10 kHz (a) et à 60 kHz (b) d'un matériau hybride contenant des fonctionnalités phénols [5].

Tableau I - Déplacement chimique du carbone-13 dans des complexes perhydrocarbyles.

		Composés									
		Ti Zr Hf			Ta		W Mo		W Mo		Re Os
Déplacements chimiques ( $\delta_{\text{iso}}$ )	M≡C	-	-	-	-	318	329	-	-	292	263
	M=C	-	-	-	245	-	-	255	279	247	-
	M-C	113	96	106	96	95	90	60	56	44	22

carbones dans les conditions optimales de Hartman-Ahn :  $\omega_H = \gamma_H B_H = \gamma_C B_C = \omega_C$  (polarisation croisée, en anglais « cross-polarization », CP), ce qui a l'avantage d'exalter l'intensité des carbones. Néanmoins, dans le cas de la caractérisation des espèces de surface, il est tout de même nécessaire d'enrichir ces échantillons au carbone-13 (10–100 %). Malgré ces problèmes, c'est une méthode de choix pour l'identification de composés de surface. En effet, les déplacements chimiques associés au carbone directement lié au métal sont bien spécifiques, et il est relativement facile de différencier des fragments alkyles (40–100 ppm), alkylidènes (150–250 ppm), ou alkylidynes (250–350 ppm) (tableau I, groupe 4 (Ti, Zr et Hf) [6], Ta [7], groupe 6 (Mo et W [7], Re [7], Os [8]), ainsi que les métallacycles [9].

### Azote-15

Tout comme le carbone-13, la RMN de l'azote-15 souffre de la faible abondance naturelle de cet isotope (0,37 %) en plus de sa plus faible sensibilité ( $\gamma_N/\gamma_H = 0,1$ ). Néanmoins, certains systèmes peuvent être facilement marqués, ce qui permet une identification des composés de surface. Par exemple, la réaction de l'ammoniac avec l'hydrure de tantale permet d'identifier la nature du ligand azoté grâce à la grande gamme de déplacement chimique de l'azote-15 : amine coordonnée ( $\delta = -390 \text{ ppm}$ ), amidure ( $\delta = -270 \text{ ppm}$ ), imidure

Tableau II - Déplacement chimique de l'azote-15 de la pyridine chimisorbée sur divers supports en fonction du type d'interactions [11].

Déplacement chimique (ppm)	Exemple de support	Type d'interaction
- 65	silice	physisorption
- 88	silice	liaison hydrogène
- 110	zircone	acidité de Lewis
- 180	zircone sulfatée	acidité de Brønsted

( $\delta = -90$  ppm) [10]. Enfin, la pyridine marquée à l'azote-15 est une sonde idéale pour évaluer l'acidité de Lewis et de Brønsted de sites de surface (tableau II) [11].

### Phosphore-31

La RMN du phosphore-31 a l'avantage, comme le proton, de reposer sur un noyau ayant une abondance isotopique idéale (100 %), même si sa sensibilité est inférieure au proton ( $\gamma_P/\gamma_H = 0,40$ ). Néanmoins, ce noyau est particulièrement intéressant car les dérivés organophosphorés sont des ligands classiques de la chimie organométallique. Par exemple, l'addition de triméthylphosphine sur des complexes de surface d'Au(I) a permis de mettre en évidence deux types de sites et ainsi d'illustrer l'hétérogénéité d'une surface de silice : 30 % des sites pouvant coordonner deux phosphines, et les autres, une seule (figure 2) [12]. Enfin, les oxydes de phosphines, en particulier l'oxyde de triéthylphosphine, sont utilisés comme sondes pour mesurer l'acidité d'un centre métallique (échelle de Drago) [13].

### Silicium-29

Enfin, pour les matériaux siliciques, la RMN du silicium-29 est particulièrement importante car elle permet de distinguer les sites suivant le nombre d'atomes d'oxygène liés au silicium et si ces oxygènes sont liés ou non à d'autre silicium (sites  $Q_n$  et  $T_n$ , tableau III) [14].

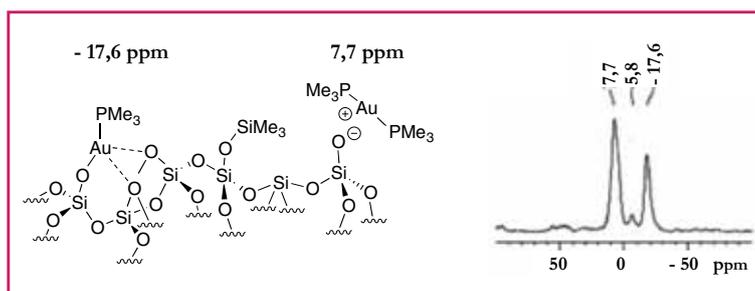


Figure 2 - RMN  $^{31}\text{P}$  CP-MAS de l'espèce de surface Au(I) après réaction avec un excès de  $\text{PMe}_3$  [12b].

Le signal à - 5,8 ppm correspond à  $\text{OPMe}_3$ , impurité présente au cours de la réaction.

Tableau III - Différents sites  $Q_n$  et  $T_n$  et leurs déplacements chimiques en RMN  $^{29}\text{Si}$  [14].

Site	$Q_4$	$Q_3$	$Q_2$	$T_3$	$T_2$	$T_1$
Structure						
$\delta$	-110 ppm	-101 ppm	-90 ppm	-80 ppm	-70 ppm	-62 ppm

Néanmoins, elle souffre de la faible abondance naturelle du silicium (4,7 %), de sa faible sensibilité ( $\gamma_{Si}/\gamma_H = 0,20$ ) et souvent d'un temps de relaxation très important (plusieurs dizaines de minutes dans des conditions inertes). Les méthodes CP et CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), impliquant une série d'échos de spins, permettent évidemment d'accélérer les méthodes d'analyse, mais en perdant alors toute information quantitative.

### Fluor-19

Malgré des caractéristiques intéressantes (100 % d'abondance naturelle,  $\gamma_F/\gamma_H = 0,94$ ), peu de composés de surface fluorés ont été étudiés – à noter, l'étude des espèces de surface de silice fluorées [15].

### Noyaux quadropolaires

Même si peu de travaux ont été réalisés sur les noyaux quadropolaires en chimie de surface, il est difficile de ne pas en discuter brièvement ; en particulier, la RMN de l'aluminium-27 permet de caractériser les silico-aluminates et les aluminates. En effet, les déplacements caractéristiques des aluminates tétra-, penta- et hexacoordinés diffèrent fortement (environ 70, 40 et 10 ppm respectivement). En revanche, comme tous noyaux quadropolaires, la largeur du signal (plusieurs MHz) dépend largement de la symétrie du système et rend difficile l'observation des sites de surface [16].

Il est certain que des études sur des systèmes quadropolaires apparaîtront dans le futur au vu des applications récentes dans le domaine de la chimie organométallique moléculaire et de la catalyse. Néanmoins la richesse de l'information apportée par les noyaux quadropolaires ( $\delta_{iso}$ ,  $C_Q$ ,  $\eta$ ) permet, combinée avec des études théoriques, de définir à l'échelle moléculaire des sites aluminium provenant de l'interaction d'un organoaluminique avec une silice (tableau IV) [17].

### Connectivité par RMN multidimensionnelle

#### RMN multidimensionnelle homonucléaire double quanta proton-proton

Les séquences RMN 2D double quanta permettent d'observer sélectivement les protons voisins interagissant par couplage dipolaire (interactions à travers l'espace) [18]. Les spectres 2D obtenus se présentent sous la forme d'une carte 2D avec l'échelle de déplacement chimique dans la dimension  $F_2$  (e.g. 0-13 ppm) et l'échelle double-quanta en  $F_1$  (échelle double, e.g. 0-26 ppm). Ainsi, deux protons  $H_A$  et  $H_B$  ayant des déplacements chimiques différents,  $\delta_A$  et  $\delta_B$  respectivement, apparaissent en  $F_2$  à leur déplacement chimique respectif et en  $F_1$  à la somme de leur déplacement chimique ( $\delta_A + \delta_B$ ). Les protons ne percevant pas de voisin n'apparaîtront pas dans la deuxième dimension (exclus par la règle de sélection double quanta), et les protons voisins équivalents, de même déplacement chimique,  $\delta_C$ , feront apparaître une tâche de corrélation à ( $2 \times \delta_C$ ) en  $F_1$  (figure 3a).

Ainsi la RMN double quanta permet aussi de repérer des sites et de suivre leur changement lors de réactions, par exemple le proton

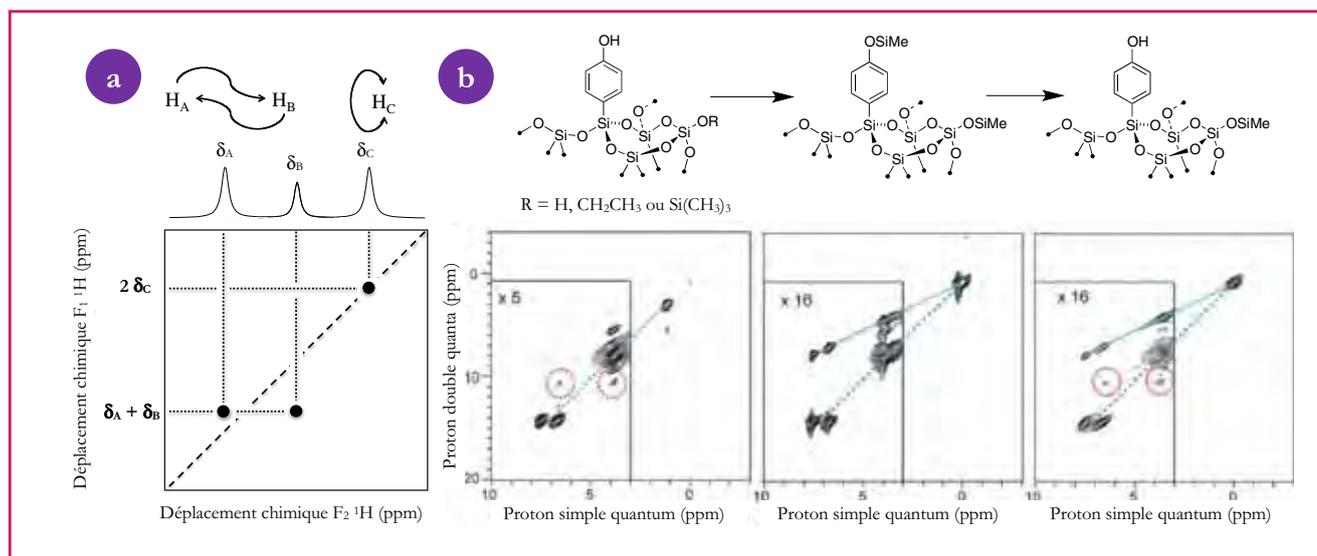


Figure 3 - RMN multidimensionnelle double quanta proton-proton.

a) Modèle des pics de corrélation attendus entre deux protons A et B, ayant pour déplacements chimiques respectifs  $\delta_A$  et  $\delta_B$ , couplés dipolairement et deux protons C ayant le même déplacement chimique,  $\delta_C$ . b) Suivi de réaction du proton échangeable d'une fonctionnalité phénolique d'un matériau hybride par RMN double quanta [5].

Tableau IV - Identification des espèces de surface provenant de la réaction d'un organoaluminique avec une silice grâce à la combinaison des valeurs expérimentales et théoriques de la RMN  $^{27}\text{Al}$  [17].

		Composés								
Valeurs de $^{27}\text{Al}$ (RMN)		$\delta_{\text{iso}}$ (ppm)	$C_Q$ (MHz)	$\eta_Q$	$\delta_{\text{iso}}$ (ppm)	$C_Q$ (MHz)	$\eta_Q$	$\delta_{\text{iso}}$ (ppm)	$C_Q$ (MHz)	$\eta_Q$
Experimental	X = Si <sub>surf</sub>	98	19,9	0,8	154	27,3	0,8	60	15,1	0,4
Théorique	X = H	104	18	0,9	150	26	0,8	52	17	0,5

échangeable d'une fonctionnalité phénol d'un matériau hybride (figure 3b) [5]. On remarque que les protons voisins ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$  des éthoxys de surface et  $\text{CH}_3$  des  $\text{SiMe}_3$  de surface) corrélient entre eux (ligne en tirets bleus), alors que les protons aromatiques corrélient seulement avec leurs voisins mais pas sur la ligne d'autocorrélation (14 ppm en  $F_1$ , 7,5 et 6,5 ppm en  $F_2$ ). De plus, on note une corrélation à 11,5 ppm en  $F_1$  et 6,5 et 4 ppm en  $F_2$ , correspondant au couplage dipolaire entre les OH phénoliques et les protons aromatiques en ortho (cercles en pointillés rouges). Cette corrélation disparaît suite à la réaction avec une espèce passivante (formation de fonctionnalité  $\text{OSiMe}_3$ ) et réapparaît après la déprotection sélective des OH phénoliques. On peut aussi observer, suite à la réaction avec l'espèce passivante, la présence d'une corrélation avec  $\delta F_1 = \delta F_2$  (ligne en pointillés bleus), correspondant à l'interaction des espèces de surface avec les fonctionnalités  $\text{OSiMe}_3$  de  $\delta = 0$  ppm (en fait,  $\delta F_1 = \delta F_2 + 0$ , ce qui respecte les règles de corrélation de la RMN double quanta, DQ).

Enfin, il est possible de modifier les règles de sélection pour n'observer que les corrélations entre trois spins (RMN triple quanta, TQ). En combinant RMN DQ et TQ, il a ainsi été possible d'établir la structure de dérivés amidures et imidures provenant de la coupure de  $\text{N}_2$  sur l'hydru de tantale [10, 19].

### RMN multidimensionnelle hétéronucléaire

De la même façon qu'en solution, la RMN hétéronucléaire apporte des informations essentielles pour établir la connectivité au sein de fragments organo-métalliques supportés. En RMN du solide, les techniques classiques HETCOR (« heteronuclear correlation », ou corrélation hétéronucléaire) exploitent les interactions dipolaires à travers l'espace entre atomes voisins, ce qui permet d'évaluer indirectement la connectivité. Ainsi, en optimisant le temps de contact (court, soit 0,5-1 ms, ou long, soit 5 ms), il est possible de « sélectionner » des couples de spins plus ou moins éloignés, les temps courts favorisant les interactions à courte distance et donc les atomes les plus proches. Grâce à ces techniques, il a été possible de déterminer pas à pas (corrélation à courtes et longues distances) la connectivité de composés de surface et d'établir la structure de ces derniers (par exemple Mo [4] et Re [20]). Par cette approche, il a même été possible de caractériser la formation d'intermédiaires réactionnels sur la surface d'un catalyseur de métathèse des alcènes – les métallacyclobutanes et les alkylidènes – et de montrer leur implication dans le cycle catalytique de cette réaction (figure 4) [21].

### Mesure de constantes de couplage J et considérations structurales

Au-delà de la connectivité, la constante de couplage scalaire J est une signature caractéristique de l'hybridation d'un noyau considéré, ce qui permet donc dans certains cas d'évaluer les angles de liaison. Par exemple, la constante  $J_{\text{C-H}}$  des carbones de ligands alkylidènes liés à un métal de transition est très sensible et rend compte de la présence et de la force d'une liaison agostique (liaison trois centres-deux électrons), car la constante de couplage est liée à l'angle M-C-H (plus

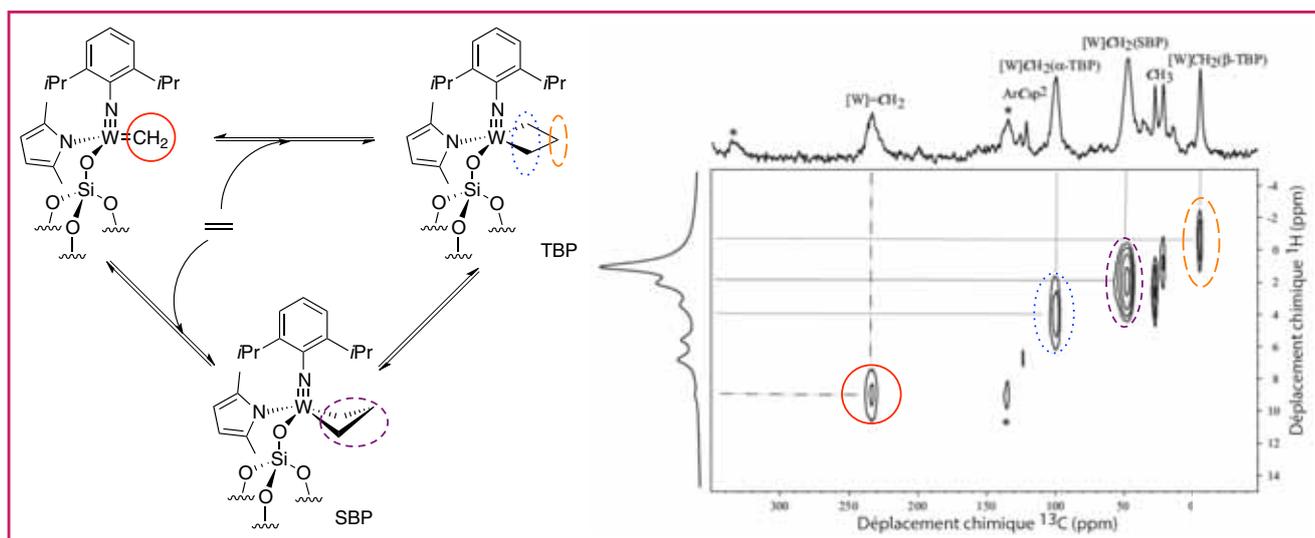


Figure 4 - Mise en évidence des intermédiaires métallocyclobutanes et alkyldènes de la métathèse des oléfines avec un complexe de tungstène (W) supportés sur silice [9].

Le cercle rouge indique la corrélation entre le carbone et les protons de  $W=CH_2$ , le cercle en pointillés bleus de  $WCH_2(\alpha-TBP)$ , le cercle en tirets violets de  $WCH_2(SBP)$  et le cercle en tirets longs oranges de  $WCH_2(\beta-TBP)$ .

Tableau V - Comparaison des constantes de couplage  $^1J_{CH}$  calculées à partir des angles M-C-H et déterminées expérimentalement par RMN [7].

		Composés					
Angle M-C-H (°)		94.5	98.8	98.9	99.5	103.5	121.8
$^1J_{CH}$ (Hz)	Calculé	94	105	106	107	107	141
	Expérimental	80	110	109	107	109	159

ou moins inférieur à  $120^\circ$ ). D'ailleurs, il existe une relation empirique (quadratique) entre ces deux paramètres, déterminée sur une série de complexes moléculaires. C'est ainsi que celle-ci peut donc servir à évaluer un angle de liaison par RMN. En RMN du solide, la mesure de cette constante de couplage n'est pas triviale car sa valeur est très inférieure à celle d'un couplage dipolaire et de l'anisotropie de déplacement chimique. Néanmoins, en optimisant les séquences d'impulsion et de découplage [22], il est possible d'y accéder et ainsi de mesurer un angle de liaison sur une surface. Ceci a été réalisé sur une série de complexes de surface, et les valeurs expérimentales sont très comparables avec les valeurs obtenues par calcul basé sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) (tableau V) [7].

### Anisotropie de déplacement chimique pour la compréhension moléculaire des sites actifs (structures et dynamiques)

Le déplacement chimique est une valeur tensorielle (tenseur d'ordre 2), c'est-à-dire que sa valeur intrinsèque dépend de l'orientation de la molécule dans le champ magnétique  $B_0$  du spectromètre. Si on positionne la molécule selon son axe naturel, le tenseur correspond à une matrice diagonale dont les valeurs (sur la diagonale) sont  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$  et  $\delta_{33}$  et leur moyenne

correspond au déplacement chimique isotrope mesuré en solution :  $\delta_{iso} = 1/3(\delta_{11} + \delta_{22} + \delta_{33})$  (résultant du mouvement rapide des molécules qui moyenne ces valeurs). On caractérise la signature spectrale d'un site par son anisotropie de déplacement chimique,  $\Omega = \delta_{11} - \delta_{33}$ , et son paramètre d'asymétrie,  $\eta = \frac{(\delta_{22} - \delta_{11})}{(\delta_{33} - \delta_{iso})}$ .

Sans rotation à l'angle magique, on aura, pour un solide amorphe, un signal large et on pourra facilement repérer  $\delta_{11}$ ,  $\delta_{22}$  et  $\delta_{33}$  ( $\delta_{11}$  et  $\delta_{33}$  correspondant aux bornes de ce signal et  $\delta_{22}$  étant le déplacement chimique du point de plus haute intensité de ce signal large). Ensuite, la rotation à l'angle magique va moyenniser cette anisotropie, et pour une vitesse de rotation supérieure à l'anisotropie, on retrouvera un signal unique à la valeur de déplacement chimique  $\delta_{iso}$  (la rotation à l'angle magique à grande vitesse va moyenniser les valeurs comme en solution). Dans les cas intermédiaires, le signal RMN correspondra à une série de signaux fins espacés entre eux par la vitesse de rotation du rotor et ils décriront une enveloppe (correspondant au signal large observé sans rotation). Ainsi, la RMN du solide permet d'accéder à l'anisotropie de déplacement chimique et donc d'évaluer soit l'hybridation de l'atome (figure 5), soit la dynamique du système.

La mesure de l'anisotropie de déplacement chimique d'une série de complexes de surface comportant un ligand alkyldène a montré que les systèmes monogreffés à la surface de silice étaient assez rigides, malgré la liaison unique entre la surface et le centre métallique, et ceci en particulier pour les complexes comportant des ligands assez larges et aromatiques [7]. Ce manque de dynamique à température ambiante a été attribué à l'interaction de van der Waals entre la surface du matériau et les fragments organiques du complexe organométallique de surface.

Enfin, ces études ont montré que l'anisotropie de déplacement chimique des carbones  $C_{sp^2}$  du fragment alkyldène était aussi une bonne signature de la présence et de la force

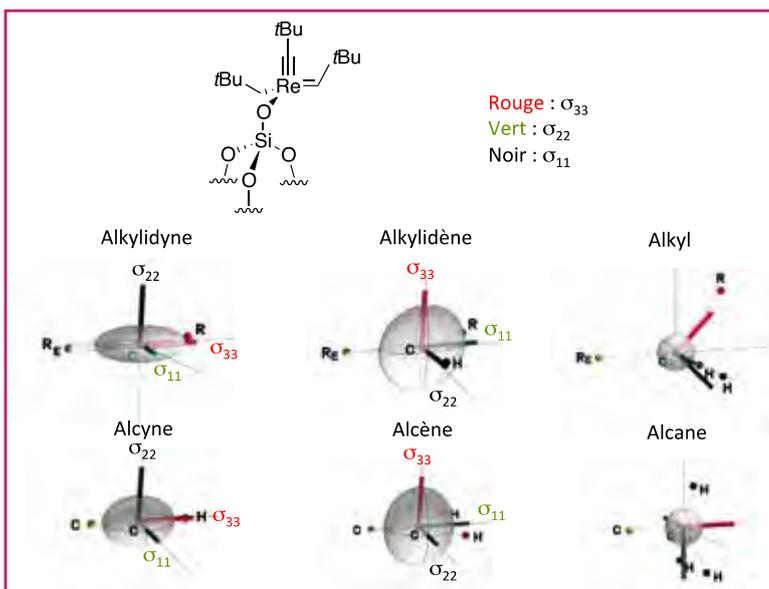


Figure 5 - Modélisation de l'orientation des tenseurs de déplacements chimiques de fragments organométalliques d'un complexe de Rhénium (Re) supporté sur silice : alkylidyne (Re≡CR), alkylidène (Re=CHR) et alkyl (Re-CH<sub>2</sub>R) comparés aux fragments organiques : alcyne (C≡CH), alcène (C=CH<sub>2</sub>) et alcane (C-CH<sub>3</sub>) [7].

## RMN de surface exaltée par polarisation nucléaire dynamique

L'un des problèmes majeurs de la RMN est sa faible sensibilité, qui est d'autant plus renforcée ici par le fait que les espèces en surface ne représentent qu'un faible pourcentage de l'échantillon (1 à 10 %), ce qui correspond à 0,1-2,0 mmol d'un atome particulier par gramme d'échantillon, ou encore pour le carbone-13 de 1 à 20 μmol de noyau actif par gramme d'échantillon. C'est pourquoi les études structurales d'espèces de surface par RMN requièrent souvent un marquage isotopique sélectif (e.g. carbone-13, azote-15...). Typiquement, l'exaltation des signaux de noyaux de faibles abondances naturelles est réalisée par polarisation croisée (CP) à partir des protons voisins (*vide supra*). Néanmoins, au vu de la faible abondance des espèces de surface, cette technique permet uniquement d'obtenir des spectres monodimensionnels dans des temps d'acquisition raisonnables (< 12-24 h pour un spectre carbone-13, 72 h pour le silicium-29), ce qui empêche donc d'utiliser toute technique plus avancée (RMN multidimensionnelle).

L'exaltation des signaux d'un noyau (i) par polarisation croisée avec les protons est directement reliée à leur rapport de constante gyromagnétique,  $\gamma_H/\gamma_i$ , et il est donc clair que les électrons, qui possèdent une constante gyromagnétique  $\gamma_e$  - 660 fois plus élevée que les protons sont de meilleurs « agents » de polarisation. Ceci a été proposé dès les premiers pas de la RMN et a conduit à l'utilisation de radicaux organiques stables (molécules organiques possédant un électron non apparié). Cette approche, appelée polarisation nucléaire dynamique (« dynamic nuclear polarization », DNP) a bénéficié d'avancées technologiques majeures [23].

Fort de ces résultats, il a donc été possible d'envisager d'appliquer cette technique pour augmenter le signal RMN des fonctionnalités de surface de matériaux. Un des points clés de cette technique a été la préparation de l'échantillon, qui implique d'utiliser une méthode d'imprégnation à sec (« incipient wetness impregnation », IWI). Ceci permet de mouiller le matériau avec une quantité minimale de solution contenant le radical organique (le volume correspond approximativement au volume poreux du matériau). Ensuite, le matériau, d'aspect légèrement mouillé – ressemblant un peu à de la neige de printemps – est introduit dans un

rotor en saphir ou un rotor en zircone comportant des parois fines, perméables aux micro-ondes du gyrotron, et les mesures sont réalisées à ca. 100 K avec rotation à l'angle magique de plusieurs kHz. Dans ces conditions, une exaltation du signal RMN est observée ; cette technique, appelée RMN de surface exaltée par polarisation nucléaire dynamique (RMN SENS, en anglais « surface enhanced solid-state NMR spectroscopy », SENS-NMR), permet d'exalter préférentiellement les signaux des espèces présentes à la surface de matériaux.

Les premiers résultats positifs ont été obtenus sur l'analyse de matériaux hybrides organiques-inorganiques, une nouvelle classe prometteuse de matériaux [24]. L'un des défis de ce domaine est de vérifier l'intégrité des fonctions organiques au sein de ces matériaux hybrides et leur interaction avec la surface inorganique, ce qui est souvent inaccessible

Tableau VI - Comparaison de l'évolution des tenseurs de déplacement chimique et la constante de couplage  $J_{C-H}$  avec la force de la liaison agostique.

	Composés			
Orientation du tenseur Rouge : $\sigma_{33}$ Vert : $\sigma_{22}$ Noir : $\sigma_{11}$				
Angle M-C-H (°)	94,5	98,8	103,5	121,8
$^1J_{CH}$ (Hz)	80	110	109	159

d'une liaison agostique. En effet, les composantes principales du tenseur de déplacement chimique changent d'orientation avec la force de la liaison agostique en passant de  $\delta_{33}$  (la plus blindée) : aligné avec un axe perpendiculaire au plan du ligand alkylidène en l'absence de liaison agostique à  $\delta_{33}$ , orienté le long de la liaison M-C pour un système comportant une liaison agostique forte. Ceci est en parfait accord avec le fait que le carbone évolue d'un carbone  $sp^2$  à un carbone comportant de plus en plus de caractère  $sp$  avec l'augmentation de la liaison agostique. Ceci se passe en parallèle avec la diminution de la constante de couplage  $J_{C-H}$  (tableau VI).

Il est donc clair qu'une étude rigoureuse de l'anisotropie de déplacement chimique en combinant expérience et théorie peut être essentielle pour comprendre la variation de coordination d'un ligand sur un centre métallique à l'échelle moléculaire.

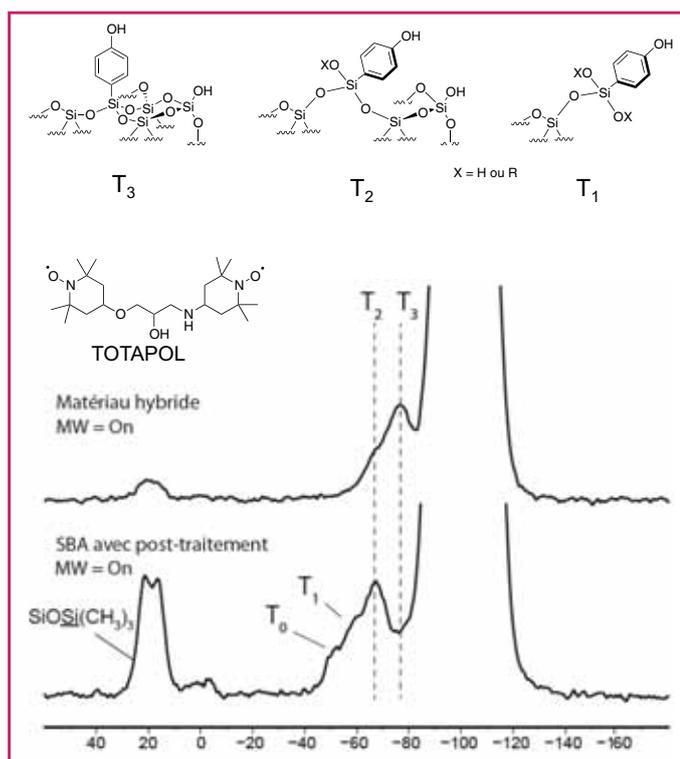


Figure 6 - Observation des sites T d'un matériau hybride préparé par synthèse directe (spectre du haut) ou par post-greffage sur silice SBA (spectre du bas) par RMN du silicium-29 exaltée par polarisation dynamique nucléaire (3,5 h d'acquisition) [24b].

avec des matériaux dilués (comportant souvent moins d'une fonctionnalité par  $\text{nm}^2$  et peu de protons dans certains cas). Le matériau hybride étudié est un matériau mésoporeux comportant une fonctionnalité phénol par  $\text{nm}^2$  [5]. Ainsi, la RMN du solide réalisée dans des conditions classiques permet d'obtenir en 24 h un spectre RMN du carbone-13 comportant les signaux caractéristiques de la fonction organique, mais avec un faible rapport signal sur le bruit. Néanmoins, un spectre RMN du silicium-29 de qualité, permettant de mettre en évidence l'intégration du fragment organique lié au silicium (les sites T, voir *tableau III* p. 84), ne peut même pas être obtenu en 60 h !

En utilisant la RMN SENS, on observe une augmentation du signal en RMN du carbone-13 [24a] et silicium-29 [24b] d'un facteur 40 à 50, ce qui permet d'effectuer des acquisitions de spectres dans des temps record, souvent en quelques dizaines de minutes (au lieu de dizaines d'heures). Par exemple, les signaux associés aux sites T du silicium, qui ne pouvaient pas être observés en 60 h dans des conditions classiques, le sont maintenant en quelques heures (*figure 6*) [5]. Cette méthode permet ainsi de distinguer facilement le mode d'ancrage des fonctionnalités organiques au sein des matériaux silicieux et de distinguer les matériaux hybrides suivant leurs méthodes de synthèse. Le matériau provenant de synthèse directe présente principalement le signal associé aux sites  $T_3$  ainsi qu'à des sites  $T_2$  minoritaires, montrant une incorporation quasi parfaite du fragment organique au sein de la matrice, alors que le matériau préparé par post-fonctionnalisation ne montre pas le signal associé aux sites  $T_3$ , mais principalement ceux associés aux sites  $T_2$  et  $T_1$ , illustrant ainsi la difficulté d'intégrer le fragment organique par l'approche « greffage ». La diminution du temps d'acquisition permet aussi de réaliser des expériences RMN multi-dimensionnelles.

Enfin, tout dernièrement, nous avons montré que cette méthode était aussi utilisable avec une large gamme de solvants organiques non protiques en présence de radicaux solubles dans ces milieux. Ainsi, la RMN SENS réalisée à partir de solution 10 mM de bTbK (bis-TEMPO-bis-Kétal) dans le tétrachloroéthane permet d'obtenir des facteurs d'exaltation de l'ordre de 25 [25]. Ceci offre de nouvelles perspectives en ouvrant cette technique à une large gamme de systèmes solides, en particulier les matériaux sensibles aux conditions ambiantes (humidité/oxygène), comme souvent les catalyseurs hétérogènes ou les surfaces fonctionnalisées par des dérivés organométalliques ou issues de la chimie de coordination.

## Conclusion

Dans ce bref exposé, principalement orienté vers la caractérisation des espèces de surface de catalyseurs hétérogènes, nous avons vu que l'apport de la RMN du solide est essentielle pour la compréhension de ces derniers à l'échelle moléculaire (structure et dynamique) et donc pour envisager une approche vraiment moléculaire de la chimie de surface et des catalyseurs hétérogènes en particulier. Les avancées aussi bien méthodologiques (séquences de pulses de plus en plus sophistiquées) que technologiques (sondes à haute vitesse, cryosondes, RMN par DNP) ont révolutionné le domaine de la chimie de surface. Parmi celles-ci, la RMN SENS, avec la possibilité d'augmenter *sélectivement* le signal RMN des sites de surface, souvent difficilement accessible par d'autres méthodes de la chimie du solide, devrait permettre des percées majeures dans le domaine de la chimie de surface, avec l'obtention de données structurales qui étaient difficilement envisageables auparavant. « *Time will tell !* »

## Références

- [1] a) Copéret C., Chabanas M., Petroff Saint-Arroman R., Basset J.M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, p. 156 ; b) Thomas J.M., Raja R., Lewis D.W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, p. 6456 ; c) Tada M., Iwasawa Y., *Coord. Chem. Rev.*, **2007**, 251, p. 2702.
- [2] a) Solans-Monfort X., Copéret C., Eisenstein O., *Quantum Chemical Calculations of Surfaces and Interfaces*, V.A. Basiuk, P. Ugliengo (eds), American Scientific Publishers, **2009**, p. 145 ; b) Sautet P., Delbecq F., *Chem. Rev.*, **2010**, 110, p. 1788.
- [3] a) Massiot D., *High Magnetic Fields: Applications in Condensed Matter Physics and Spectroscopy*, C. Berthier, L.P. Levy, G. Martinez (eds), Springer-Verlag, **2001**, vol. 595, p. 435-453 ; b) Bonhomme C., Coelho C., Baccile N., Gervais C., Azais T., Babonneau F., *Acc. Chem. Res.*, **2007**, 40, p. 738 ; c) Blanc F., Copéret C., Lesage A., Emsley L., *Chem. Soc. Rev.*, **2008**, 37, p. 518 ; d) Lesage A., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2009**, 11, p. 6876 ; e) Rossini A.J., Mills R.W., Briscoe G.A., Norton E.L., Geier S.J., Hung I., Zheng S., Autschbach J., Schurko R.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, p. 3317.
- [4] Blanc F., Copéret C., Thivolle-Cazat J., Basset J.M., Lesage A., Emsley L., Sinha A., Schrock R.R., *Inorg. Chem.*, **2006**, 45, p. 9587.
- [5] Roussey A., Gajan D., Maishal T.K., Mukerjee A., Veyre L., Lesage A., Emsley L., Copéret C., Thieuleux C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, p. 4230.
- [6] Petroff Saint-Arroman R., Basset J.M., Lefebvre F., Didillon B., *Appl. Catal. A-Gen.*, **2005**, 290, p. 181.
- [7] Blanc F., Basset J.M., Copéret C., Sinha A., Tonzetich Z.J., Schrock R.R., Solans-Monfort X., Clot E., Eisenstein O., Lesage A., Emsley L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, p. 5886.
- [8] Berthoud R., Rendon N., Blanc F., Solans-Monfort X., Copéret C., Eisenstein O., *Dalton Trans.*, **2009**, p. 5879.
- [9] Blanc F., Berthoud R., Copéret C., Lesage A., Emsley L., Singh R., Kreickmann T., Schrock R.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2008**, 105, p. 12123.
- [10] Avenier P., Lesage A., Taoufik M., Baudouin A., De Mallmann A., Fiddy S., Vautier M., Veyre L., Basset J.M., Emsley L., Quadrelli E.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, p. 176.
- [11] Haw J.F., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2002**, 4, p. 5431.
- [12] a) Gajan D., Guillois K., Delichere P., Basset J.M., Candy J.P., Caps V., Copéret C., Lesage A., Emsley L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, p. 14667 ; b) Gajan D., Levine D., Zocher E., Copéret C., Lesage A., Emsley L., *Chem. Sci.*, **2011**, 2, p. 928.

- [13] Osegovic J.P., Drago R.S., *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*, p. 147.  
 [14] Burkett S.L., Sims S.D., Mann S., *Chem. Commun.*, **1996**, p. 1367.  
 [15] Hartmeyer G., Marichal C., Lebeau B., Caullet P., Hernandez J., *J. Phys. Chem. C*, **2007**, *111*, p. 6634.  
 [16] Magnenet C., Massiot D., Klur I., Coutures J.P., *J. Mater. Sci.*, **2000**, *35*, p. 115.  
 [17] Kerber R.N., Kermagoret A., Callens E., Florian P., Massiot D., Lesage A., Copéret C., Delbecq F., Rozanska X., Sautet P., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, p. 6767.  
 [18] a) Brown S.P., Schnell I., Brand J.D., Mullen K., Spiess H.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, p. 6712; b) Brown S.P., Spiess H.W., *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, p. 4125.  
 [19] Avenier P., Taoufik M., Lesage A., Solans-Monfort X., Baudouin A., de Mallmann A., Veyre L., Basset J.M., Eisenstein O., Emsley L., Quadrelli E.A., *Science*, **2007**, *317*, p. 1056.  
 [20] Chabanas M., Baudouin A., Copéret C., Basset J.M., Lukens W., Lesage A., Hediger S., Emsley L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, p. 492.  
 [21] Blanc F., Thivolle-Cazat J., Basset J.M., Copéret C., *Chem.-Eur. J.*, **2008**, *14*, p. 9030.  
 [22] Lesage A., Emsley L., Chabanas M., Copéret C., Basset J.M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, p. 4535.  
 [23] N° thématique consacré à la polarisation nucléaire dynamique : *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*, p. 5725.  
 [24] a) Lesage A., Lelli M., Gajan D., Caporini M.A., Vitzthum V., Mieville P., Alauzun J., Roussey A., Thieuleux C., Mehdi A., Bodenhausen G., Copéret C., Emsley L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, p. 15459; b) Lelli M., Gajan D., Lesage A., Caporini M.A., Vitzthum V., Mieville P., Heroguel F., Rascon F., Roussey A., Thieuleux C., Boualleg M., Veyre L., Bodenhausen G., Copéret C., Emsley L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, p. 2104.  
 [25] Zagdoun A., Rossini A.J., Gajan D., Bourdolle A., Ouari O., Rosay M., Maas W.E., Tordo P., Lelli M., Emsley L., Lesage A., Copéret C., *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, p. 654.



De gauche à droite : G. Lapadula, M. Schwarzwälder, C. Copéret et D. Gajan.

**David Gajan** est post-doctorant, **Giuseppe Lapadula** et **Martin Schwarzwälder** sont doctorants, et **Christophe Copéret** (auteur correspondant) est professeur, à l'ETH Zürich\*.

\* ETH Zürich, Department of Chemistry, Wolfgang Pauli Strasse 10, CH-8093 Zürich (Suisse).  
 Courriel : ccoperet@inorg.chem.ethz.ch



Le Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) a pour vocation générale le développement de recherches à l'interface triple entre la Chimie, la Biologie et la Physique. L'objectif commun de ces recherches est de mettre en œuvre les méthodes de la Chimie et de la Physique pour développer une investigation multi-échelles des systèmes vivants, de la molécule à la Biologie intégrative, afin d'en comprendre les mécanismes de fonctionnement. Ces recherches fondamentales débouchent sur des applications dans des domaines aussi divers que le cancer et la cosmétique. Le CBM regroupe 26 chercheurs CNRS, 4 chercheurs Inserm, 19 enseignants-chercheurs et 38 ingénieurs et techniciens. Les thématiques de recherche s'organisent autour de 3 départements qui fédèrent 15 équipes de recherche.

#### LES DEPARTEMENTS

##### ► Aspects mécanistiques en vivant

Comprendre les mécanismes fondamentaux qui sous-tendent l'activité et la régulation des biomolécules en abordant 1) les interactions ARN-protéine et ADN-protéine ; 2) la migration cellulaire ; 3) les petites protéines de défense riches en cystéine et 4) la biologie computationnelle pour la dynamique, les mouvements et les interactions des biomolécules.

##### ► Biologie cellulaire et voies transmembranaires

Identifier des cibles thérapeutiques au travers des voies de signalisation cellulaires et de l'apoptose. Rechercher des thérapies innovantes pour le cancer et les maladies génétiques et dégénératives, en développant notamment la vectorisation des acides nucléiques médicamenteux par des cellules endothéliales, des méthodes ultrasonores et des vecteurs chimiques. Les techniques d'imagerie sont des outils essentiels pour ces recherches.

##### ► Imagerie, Spectroscopie et Chimie en vivant

Visualiser les molécules qui sont la signature d'une pathologie donnée, ce qui représentera une percée en biologie et pour le diagnostic clinique. Cette évolution exige une interaction étroite entre les spécialistes de l'imagerie et les chimistes. Les principales techniques d'imagerie sont la résonance magnétique (IRM et SRM), l'imagerie optique, l'imagerie spectrale Raman et la microscopie à force atomique. Le développement d'approches originales d'imagerie repose sur la conception de sondes chimiques à base de complexes métalliques et de lanthanides luminescents.

#### LES PLATEFORMES

Quatre plateformes sont ouvertes à la communauté scientifique régionale, nationale et internationale, qu'il s'agisse de laboratoires publics (CNRS, Université,...) ou d'entreprises privées.

##### ► Spectroscopie Optique

Ce plateau technique permet de regrouper en un seul lieu de nombreux appareils de spectroscopie optique pour la caractérisation biophysique d'échantillons biologiques.

##### ► Cytométrie et Imagerie cellulaire

Ce plateau constitue un ensemble unique offrant l'accès à une grande diversité de méthodes et techniques d'analyse en fluorescence au niveau cellulaire, intracellulaire et tissulaire par cytométrie en flux, vidéo-microscopie en flux et microscopie confocale.

##### ► Spectrométrie de masse

Outre les analyses classiquement réalisées en spectrométrie de masse, ce plateau permet des études plus spécifiques : interactions moléculaires, spectrométrie de masse native, identification de protéines par méthodes protéomiques, identification de structures moléculaires...

##### ► RMN

Les équipements permettent une large variété d'applications de la RMN chimique et biologique : Spectres 1D, 2D proton (COSY, TOCSY, NOESY ...), Spectres 1D hétéronucléaires  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  ; Spectres 2D hétéronucléaires  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  (HSQC, HMBC ...).



# La cristallographie par RMN

Jean-Nicolas Dumez

**Résumé** La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de choix pour explorer la matière à l'échelle atomique. Pour les solides, il est désormais possible d'exploiter les interactions RMN pour caractériser des structures inaccessibles aux méthodes de diffraction, dans une démarche qu'il convient d'appeler « cristallographie par RMN ». Cet article présente l'utilisation de la RMN pour la cristallographie, et plus particulièrement celle du couplage dipolaire et du déplacement chimique, et montre des exemples d'applications récentes dans différents domaines de la chimie.

**Mots-clés** RMN du solide, structure, matériaux, protéines, déplacement chimique, couplage dipolaire.

**Abstract** NMR crystallography

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy is ideally suited for the exploration of matter at the atomic level. In the solid state, NMR interactions can now be used to determine structures that are beyond the reach of diffraction-based methods. This approach has come to be called « NMR crystallography ». In this article, the use of NMR for crystallographic purposes is discussed (more precisely that of the dipolar and chemical-shift interactions), and examples taken in various fields of chemistry are given.

**Keywords** Solid-state NMR, structure, materials, proteins, chemical shift, dipolar coupling.

La juxtaposition des termes « cristallographie » et « résonance magnétique nucléaire » (RMN) est encore susceptible d'interpeller certains chimistes. La naissance de la cristallographie est associée aux travaux de l'abbé Haüy « sur la structure des cristaux », dans la deuxième moitié du XVIII<sup>e</sup> siècle. Plus d'un siècle s'est écoulé avant que n'apparaisse la radiocristallographie, en 1912, mais ses développements ont été tels qu'on considère souvent la diffraction de rayonnements comme la seule forme de cristallographie expérimentale. Pourtant, dès les débuts de la RMN de la matière condensée, découverte en 1945, son potentiel pour la caractérisation structurale des solides était connu. Ainsi, dès 1946, Pake étudiait par RMN des cristaux de gypse, et évoquait la complémentarité entre radiocristallographie et RMN du solide. Il a fallu surmonter un certain nombre d'obstacles aussi bien théoriques qu'expérimentaux, mais on assiste depuis une dizaine d'années au développement rapide de la « cristallographie par RMN » [1].

La RMN est susceptible de fournir de précieux renseignements pour de nombreux matériaux à l'état solide. Elle s'accommode de nombreuses formes de désordre et peut être appliquée à des matériaux totalement amorphes ou présentant une grande mobilité à l'échelle atomique. Dans le cadre de la cristallographie, la RMN du solide est particulièrement utile pour les matériaux ordonnés à l'échelle atomique, mais difficile à produire sous la forme d'un cristal unique de grande taille. Elle permet de plus de caractériser certains aspects moins accessibles aux méthodes de diffraction, comme la position des noyaux d'hydrogène. Loin de concurrencer les méthodes de diffraction,

la RMN du solide leur est le plus souvent complémentaire. Il a ainsi été montré que la cristallographie par RMN permet de déterminer la structure de nombreux types de solides, comme des zéolites, des petites molécules organiques ou des fibrilles amyloïdes (figure 1), dont l'étude par une méthode de diffraction seule n'est pas toujours envisageable.

Les interactions qui régissent le comportement des spins nucléaires dans les solides constituent naturellement des sondes de la structure des matériaux à l'échelle atomique. Deux d'entre elles jouent un rôle prépondérant en cristallographie par RMN : l'interaction dipolaire et le déplacement chimique. Dans les deux cas, bien qu'existe en principe un lien entre structure et mesures expérimentales, celui-ci n'est pas simple à établir. Utiliser des sondes locales pourrait de plus sembler paradoxal en cristallographie, mais c'est justement

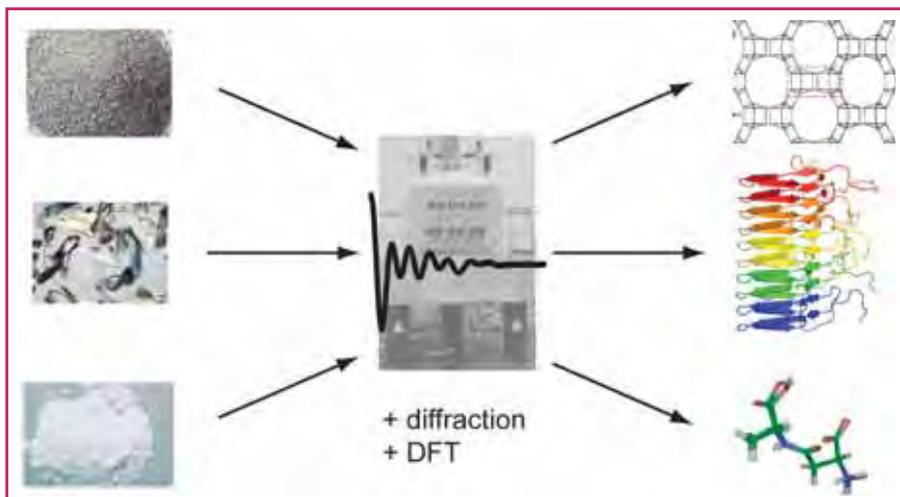


Figure 1 - Cristallographie par RMN : l'utilisation combinée de la spectroscopie de RMN et d'autres techniques permet de déterminer la structure de solides variés, comme illustré ici avec une zéolite, une fibrille amyloïde et une petite molécule organique.

parce qu'elle ne requiert pas d'ordre à grande distance que la RMN peut fournir des informations structurales pour des solides qui ne peuvent pas être caractérisés de manière simple par des méthodes de diffraction.

Cet article décrit la manière dont l'information structurale peut être extraite des expériences de RMN et utilisée pour la cristallographie. L'acquisition de spectres en RMN du solide est également un défi à part entière [2], qui ne sera pas abordé en détail ici. Différents exemples montreront que la cristallographie par RMN s'attaque déjà à des questions qui resteraient sinon sans réponse.

## Interaction dipolaire et distance internucléaire

L'interaction dipolaire, moins connue des chimistes, joue un rôle prépondérant en RMN du solide. Cette interaction est liée de manière simple à la géométrie du système. C'est donc un outil de choix pour la cristallographie par RMN, dont l'utilisation présente cependant quelques obstacles.

### L'interaction dipolaire

En électromagnétisme classique, deux moments magnétiques dipolaires sont couplés entre eux par une interaction dite dipôle-dipôle ou dipolaire. En mécanique quantique existe une interaction analogue qui couple les moments magnétiques de spin [2]. On parle d'interaction « à travers l'espace », pour la distinguer du couplage  $J$  qui opère « à travers les liaisons ». L'intensité de l'interaction dipolaire pour une paire de spins dépend de la distance internucléaire  $r$  et, lorsque le système est placé dans un champ magnétique statique intense, de l'orientation du vecteur internucléaire par rapport au champ magnétique statique (figure 2). Elle est quantifiée par le couplage dipolaire  $\omega_D$ , exprimé par :

$$\omega_D = -\frac{\mu_0 \gamma^2 \hbar}{4\pi r^3} (3 \cos^2 \theta - 1)$$

où  $\mu_0$  est la permittivité magnétique du vide,  $\gamma$  le rapport gyromagnétique du noyau étudié, et  $\hbar = h/2\pi$  la constante de Planck réduite.

Pour des molécules en solution, l'agitation moléculaire, et en particulier la réorientation rapide des molécules, moyenne à zéro l'interaction dipolaire sur une échelle de temps très courte ; elle n'influence donc pas la position des pics dans le spectre. En revanche, pour un solide, l'effet de cette interaction n'est pas supprimé, et pour de nombreux noyaux, le cou-

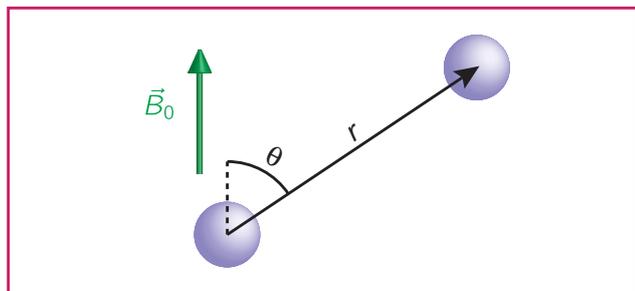
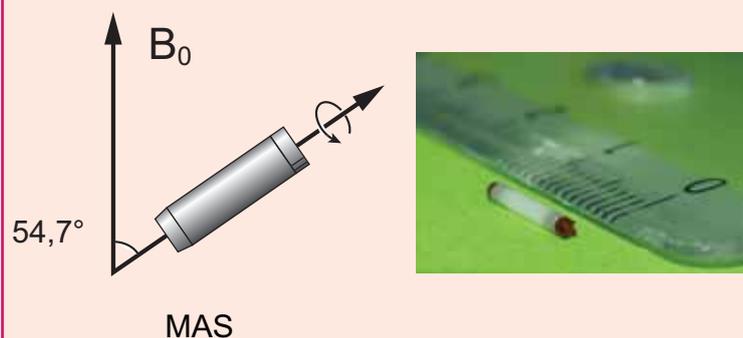


Figure 2 - Interaction dipolaire : l'intensité du couplage entre les noyaux dépend de la géométrie du système, à la fois de la distance internucléaire  $r$  et de l'orientation  $\theta$  par rapport au champ magnétique  $B_0$ .

### Encadré 1

#### Découplage et recouplage

La majorité des expériences de RMN du solide utilise aujourd'hui la technique de la rotation à l'angle magique (RAM ou MAS, pour « magic-angle spinning »). L'échantillon solide est placé dans un rotor de quelques millimètres de diamètre et soumis à une rotation très rapide dont la fréquence peut atteindre 80 kHz. Cette technique permet d'éliminer l'effet sur le spectre des interactions dont l'intensité dépend de l'orientation, comme le couplage dipolaire ou l'anisotropie de déplacement chimique, afin de n'observer que l'effet des interactions isotropes (dont le déplacement chimique isotrope). Quasiment indispensable pour la spectroscopie haute résolution, la RAM a plusieurs conséquences : d'une part certaines interactions sont trop intenses pour être éliminées par les vitesses de rotation accessibles actuellement ; d'autre part on souhaite parfois mesurer une interaction éliminée par la RAM. Dans les deux cas, on peut utiliser des séquences d'impulsions radiofréquences pour éliminer ou réintroduire l'interaction souhaitée. Le développement de telles séquences de découplage et de recouplage est un domaine actif en RMN du solide.



Rotation à l'angle magique : schéma indiquant l'orientation de l'axe de rotation par rapport au champ magnétique externe, et rotor d'un diamètre externe de 1,3 mm, pouvant atteindre une fréquence de rotation de 60 kHz.

plage dipolaire est l'interaction dominante en RMN du solide. Ainsi, pour les composés organiques, les interactions dipolaires impliquant les noyaux d'hydrogène peuvent atteindre des valeurs de  $\omega_D/2\pi = 50$  kHz, à comparer aux couplages  $J$  dont l'intensité est au plus de quelques dizaines de hertz.

Puisque le couplage dipolaire dépend de la distance internucléaire, mesurer sa valeur fournit une information structurale précieuse. Comme le couplage  $J$ , qui cause une multiplicité des pics fréquemment exploitée en RMN en solution, le couplage dipolaire peut dans certains cas conduire à un doublet résolu ; il est alors possible d'obtenir sa valeur en mesurant simplement l'espacement entre les pics. Cette procédure, qui souffrirait de plus d'une précision limitée, n'est cependant pas applicable la plupart du temps. En effet, puisque l'interaction dipolaire agit à travers l'espace, tous les spins sont couplés entre eux ; ajoutée au fait que l'interaction est très intense, cette caractéristique conduit à des spectres informes dans lesquels les couplages ne sont pas résolus (voir encadré 1). Il est donc nécessaire de procéder différemment.

#### Mesure de distances

Afin de mesurer des couplages dipolaires et donc des distances internucléaires avec précision, on utilise une famille d'expériences qui peut être envisagée comme une forme de télégraphie à l'échelle atomique. Le principe, schématisé dans la figure 3, consiste à exciter sélectivement un type de spin, puis à mesurer la propagation de l'excitation initiale vers les autres spins, qui est causée par le couplage dipolaire. On

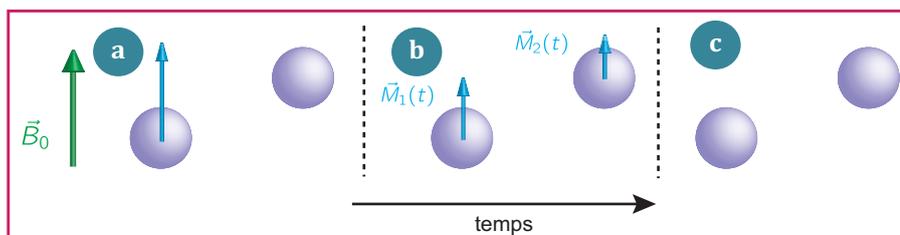


Figure 3 - Télémétrie nucléaire.

L'excitation initiale du spin 1 (a) se propage vers le spin 2 sous l'effet du couplage dipolaire. En mesurant l'excitation du spin 2 au cours des temps (b), on peut en déduire la distance entre 1 et 2. Après un temps long, le système retourne à l'équilibre (c).

obtient ainsi des courbes de transfert ; si l'équation qui régit la propagation est connue, on peut alors remonter à la distance internucléaire.

Le fait que tous les spins soient couplés par l'interaction dipolaire, qui permet en principe d'accéder à l'ensemble des distances internucléaires, est un obstacle pour l'utilisation de la méthode décrite précédemment. En effet, dans un système comportant de nombreux spins, la propagation de l'excitation initiale se fait d'une manière complexe et l'information relative au couplage pour une paire de spins donnée est rapidement noyée. Le problème peut être grandement simplifié par une approche synthétique. Par exemple, dans une molécule organique, il est possible d'effectuer un enrichissement isotopique sélectif, de telle sorte que seuls deux noyaux d'intérêt soient observés au cours des expériences de RMN. La courbe de transfert est alors très simple et l'on peut déterminer des distances précises. Cette technique est plus couramment utilisée pour le carbone-13, l'azote-15 ou le deutérium, mais le « record de distance » est actuellement détenu pour un enrichissement sélectif en tritium ( $^3\text{H}$ ), qui a permis de mesurer une distance de plus de 10 Å [3].

L'enrichissement isotopique sélectif n'est cependant pas toujours possible. Son coût est de plus très élevé, au point de devenir prohibitif lorsque l'on souhaite mesurer un grand nombre de distances, puisqu'il faudrait alors produire un échantillon différent pour chaque distance à mesurer. Afin de surmonter cette difficulté, de nombreux développements sont en cours pour simplifier le problème par une méthode spectroscopique (voir [4] pour un exemple récent) ; il n'existe cependant pas encore de méthode générale.

En l'absence de méthode de sélection synthétique ou spectroscopique, il est nécessaire de décrire le processus de transfert pour un grand nombre de spins simultanément afin d'interpréter quantitativement les mesures expérimentales. L'équation du mouvement régissant l'évolution d'un système de spins est connue, et sa résolution par des méthodes numériques joue un rôle important dans le développement et l'interprétation des expériences de RMN [5]. Cependant, la difficulté d'une simulation numérique pour un système quantique croît très rapidement, de manière exponentielle, lorsque la taille du système augmente. Ainsi, même avec des méthodes de pointe, comme illustré par exemple dans la référence [6], l'accord entre simulation et expérience n'est en général que qualitatif quand un grand nombre de spins est mis en jeu. Le développement d'approximations adaptées pour un

très grand nombre de spins pourrait pallier à ce problème [7].

Bien que la mesure quantitative de distances ne soit en général pas possible sans méthode de sélection de paires de spin, il est tout à fait possible d'utiliser des approximations certes relativement grossières, mais qui, judicieusement exploitées, permettent de caractériser des systèmes variés.

## Cristallographie

À défaut de disposer de mesures précises de distances, il est possible de caractériser qualitativement la proximité internucléaire à l'aide d'expériences RMN 2D de corrélation dipolaire. L'observation d'un pic de corrélation pour une paire de spins permet de fixer une borne supérieure pour la distance entre ces deux spins, ce qui fournit une contrainte sur la géométrie du système. En accumulant un nombre suffisamment important de contraintes, et si la topologie du système est connue, on peut calculer la structure tridimensionnelle du système étudié. Cette approche est analogue à celle développée par Kurt Wüthrich et son équipe pour déterminer la structure de biomolécules en solution, qui lui a valu l'attribution du prix Nobel de chimie en 2002.

C'est également en 2002 qu'a été déterminée pour la première fois la structure d'une protéine à l'état solide par cette méthode [8]. Depuis, plusieurs autres systèmes ont été étudiés et la cristallographie des protéines par RMN du solide ne cesse de se développer. Bien que les systèmes étudiés soient encore pour la plupart des modèles, cette approche est potentiellement très puissante puisqu'elle s'applique en principe à des protéines qui ne peuvent pas être étudiées avec d'autres techniques, soit parce qu'elles ne forment pas de cristaux, soit parce qu'elles ne sont pas solubles.

Ce potentiel est parfaitement illustré par l'étude de systèmes susceptibles de former des fibrilles amyloïdes, impliquées notamment dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. La structure représentée dans la figure 4 n'aurait pas pu être obtenue avec une telle résolution par une

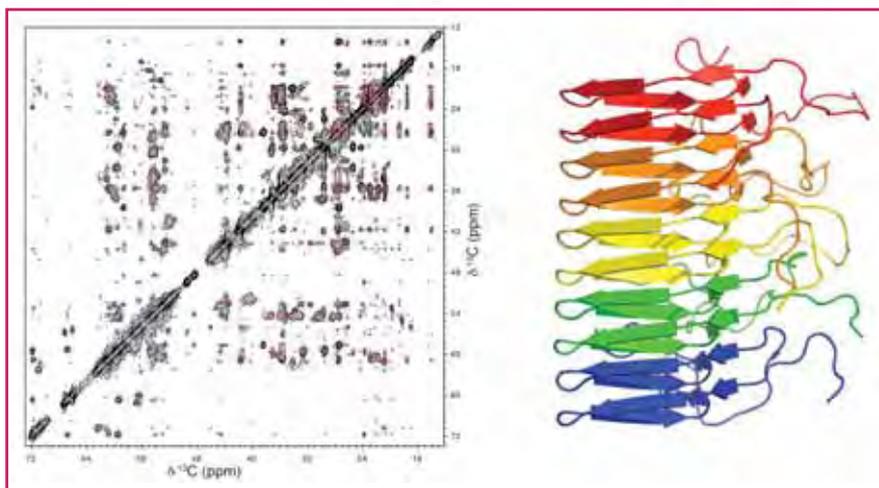


Figure 4 - Cristallographie des protéines : spectre de corrélation dipolaire  $^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  et structure tridimensionnelle de la fibrille amyloïde HET-s(218-289).

Dans ce type de spectre, la présence d'un pic hors diagonale renseigne sur la proximité entre deux noyaux. Les pics de corrélation résultent en effet d'un transfert sous l'effet de l'interaction dipolaire, décrit dans la figure 3, pendant la période de mélange de l'expérience de RMN 2D. Par exemple, un pic de coordonnées  $(\nu_1, \nu_2)$  indique que les carbones de fréquence de résonance  $\nu_1$  et  $\nu_2$  sont proches dans l'espace. L'information fournie par chaque pic est imprécise, mais la prise en compte simultanée d'un grand nombre de pics et de plusieurs spectres permet de déterminer la structure du système. Figure extraite de [9]. © 2008 American Association for the Advancement of Science.

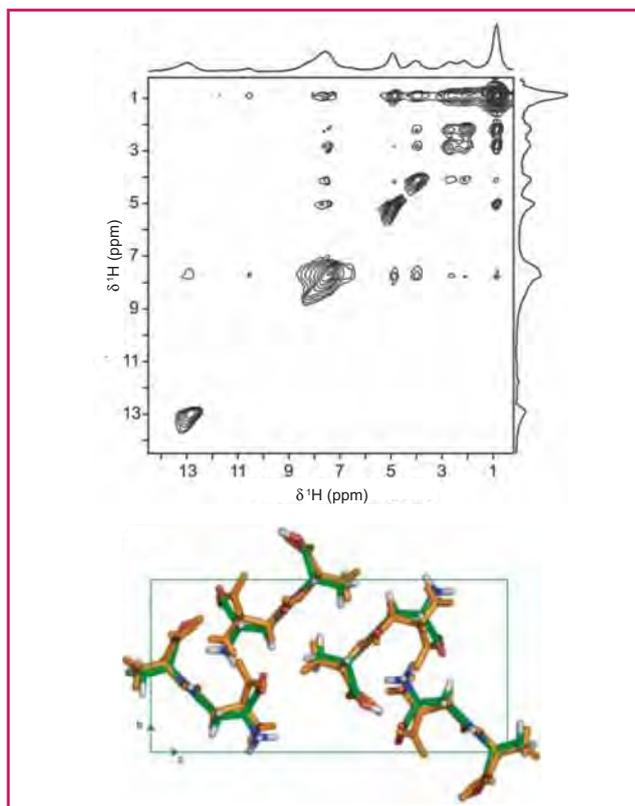


Figure 5 - Cristallographie d'une petite molécule : spectre de corrélation dipolaire  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et structure tridimensionnelle de  $\beta$ -L-aspartyl-L-alanine.

Dans ce type de spectre, la présence d'un pic hors diagonale renseigne sur la proximité entre deux noyaux et l'analyse d'une série de spectres permet de déterminer la structure du système, comme expliqué dans la figure 4. Figure extraite de [11]. © 2008 American Chemical Society.

autre méthode [9] ; ce type d'information est particulièrement pertinent pour les fibrilles amyloïdes, puisqu'on soupçonne que seul un changement de la structure tridimensionnelle est responsable de leur effet pathogène.

La cristallographie par RMN exploitant l'interaction dipolaire est également une approche prometteuse pour l'étude des petites molécules organiques sous forme de solide en poudre, et notamment des composés pharmaceutiques. En effet, pour de tels composés, la diffraction de rayons X ne permet pas systématiquement de déterminer la structure du système. Les techniques RMN de corrélation dipolaire peuvent être utilisées, conjointement à des informations provenant d'expériences de diffraction sur poudre, pour pallier à ce problème. La stratégie employée pour les petites molécules diffère par plusieurs aspects de celle utilisée pour les protéines. Il est souhaitable de disposer d'une méthode qui ne nécessite pas d'enrichissement isotopique pour pouvoir être appliquée de manière systématique. Cet objectif impose des contraintes fortes sur les expériences de RMN qui peuvent être employées ; il devient en effet quasiment indispensable de travailler avec les protons, notamment pour des raisons de sensibilité, et cela rend plus difficile l'obtention de

spectres haute résolution. De plus, lors de l'exploitation des données, il faut prendre en compte les interactions intermoléculaires au sein d'un système étendu. Malgré ces obstacles, une série d'études a montré qu'il était possible de déterminer la structure d'une petite molécule par RMN du solide [10-11], comme illustré dans la figure 5.

Enfin, les principes de la cristallographie par RMN sont également pertinents pour les solides inorganiques, comme illustré par une étude de plusieurs zéolites [12]. Il est particulièrement difficile de produire des cristaux de taille suffisante pour étudier les zéolites par diffraction de rayons X sur cristal unique. L'utilisation de contraintes géométriques issues d'expériences de corrélation dipolaire permet de faciliter grandement l'interprétation des données obtenues par diffraction sur poudre (figure 6).

## Déplacement chimique et structure

Le déplacement chimique fournit d'irremplaçables renseignements sur la structure chimique des molécules. Tous les chimistes sont familiers avec l'utilisation de tables empiriques pour l'analyse des spectres RMN obtenus pour des molécules en solution. En RMN du solide, l'utilisation de telles tables est moins répandue, certes parce que l'ensemble des données expérimentales disponibles est plus restreint, mais également parce que le déplacement chimique pour une même fonction est susceptible de connaître de grandes variations sous l'effet de l'environnement cristallin. Le déplacement chimique ne contient pour autant pas moins d'information structurale ; des outils plus sophistiqués sont cependant utiles, voire indispensables pour extraire cette information.

### Calculs de déplacements chimiques dans les solides

Le déplacement chimique est dû au champ magnétique induit localement par les courants électroniques qui naissent

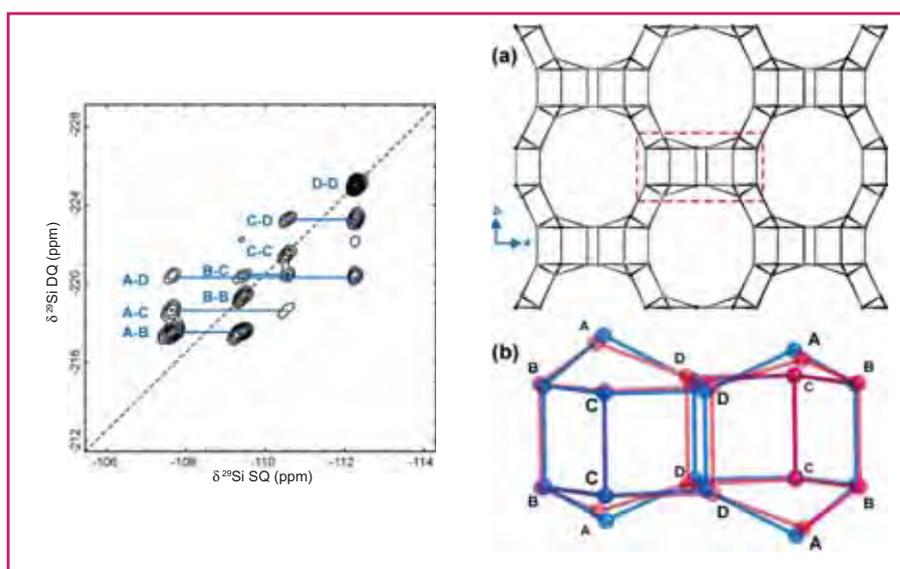


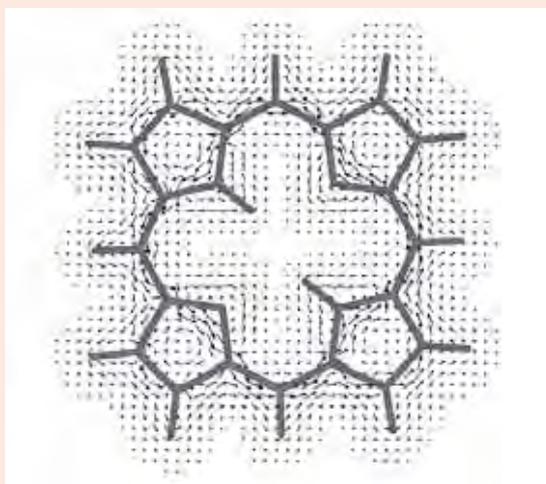
Figure 6 - Cristallographie d'une zéolite : spectre de corrélation dipolaire  $^{29}\text{Si}$ - $^{29}\text{Si}$  et structure tridimensionnelle.

Dans ce type de spectre, dit double quanta-simple quantum, les paires de pic (une de chaque côté de la diagonale) renseignent sur la proximité entre deux noyaux. Les paires observées sur le spectre sont attribuées dans l'agrandissement de la structure. Pour la paire B-C par exemple, deux pics sont observés ; leur fréquence dans l'axe vertical est la somme  $\nu_B + \nu_C$  des fréquences de résonances de B et C, tandis que leur fréquence dans la dimension directe est  $\nu_B$  pour l'un et  $\nu_C$  pour l'autre. L'intensité de ces pics permet d'obtenir une estimation de la distance entre B et C. Figure extraite de [12]. © 2005 American Chemical Society.

## Encadré 2

## Ondes planes et orbitales localisées

La structure électronique des solides est aujourd'hui principalement étudiée par des approches qui combinent la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT, pour « density functional theory ») avec l'utilisation d'ondes planes pour décrire les électrons. Ce choix permet de rendre compte de la nature périodique et étendue des solides cristallins. L'alternative consiste à décrire avec des orbitales localisées les électrons d'un groupe d'atomes de taille suffisante pour présenter les caractéristiques d'un solide, mais il est alors toujours difficile de s'affranchir des effets de surface. Les méthodes de type ondes planes ne se limitent pas aux solides cristallins et permettent également d'étudier des surfaces ou des molécules isolées. Elles sont également fréquemment employées pour les simulations de dynamique moléculaire *ab initio*. En RMN du solide, ces méthodes sont particulièrement utiles pour le calcul de déplacements chimiques.



Courants électroniques dans une porphyrine : les méthodes de chimie numérique permettent de calculer le courant induit par le champ magnétique externe, qui permet ensuite d'obtenir le champ magnétique induit localement et donc le déplacement chimique.

en réponse à l'application d'un champ magnétique externe. Pour un noyau donné, la valeur du déplacement chimique dépend de la structure électronique au voisinage de ce noyau, et donc indirectement de la géométrie du système. Cette dépendance est subtile, et l'établissement d'un lien quantitatif entre géométrie et déplacement chimique est un thème de recherche en chimie théorique.

La chimie théorique s'efforce de développer des méthodes permettant, en résolvant de manière approchée l'équation de Schrödinger, de calculer la structure électronique et les propriétés d'un système à partir de sa structure moléculaire ou cristalline. Les principes du calcul de déplacements chimiques ont été posés dès les débuts de la RMN [13]. Dans un solide cristallin, qui peut être considéré comme infiniment périodique, il est plus naturel, et surtout plus efficace, d'utiliser des ondes délocalisées dans tout le solide pour décrire les électrons (voir encadré 2). Ce choix entraîne cependant un certain nombre de difficultés pour décrire l'effet d'un champ magnétique et donc pour calculer des déplacements chimiques. Ces problèmes ont été résolus de manière élégante il y a une dizaine d'années [14], et il est aujourd'hui possible de prédire de manière précise la valeur des déplacements chimiques pour une structure donnée (figure 7).

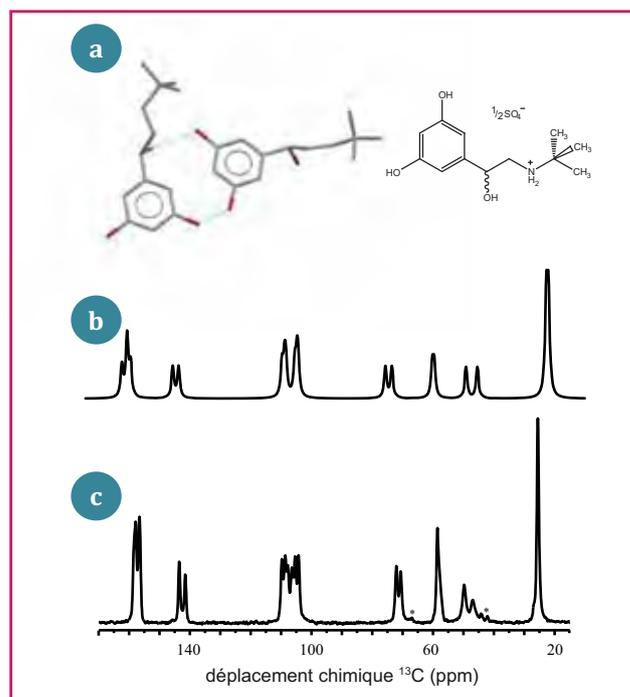


Figure 7 - Prédiction d'un spectre RMN : le spectre  $^{13}\text{C}$  calculé (b) à partir de la structure du sulfate de terbutaline (a) est en très bon accord avec le spectre expérimental (c) [15].

L'usage des calculs de déplacements chimiques a mis quelques années à se répandre chez les chimistes expérimentateurs. La fiabilité de la méthode est aujourd'hui bien établie pour les noyaux les plus couramment étudiés, comme le proton et le carbone-13, ou encore l'aluminium-27 et le silicium-29. Pour les noyaux plus exotiques, il reste nécessaire d'établir au cas par cas des paramètres robustes. Les noyaux de masse atomique élevée nécessitent de plus la prise en compte d'effets relativistes dans la description de la structure électronique.

Il existe différentes pistes pour améliorer encore la qualité des calculs de déplacements chimiques [16], parmi lesquelles la prise en compte du mouvement atomique. En effet, les calculs sont le plus souvent effectués pour des structures statiques et ne prennent donc pas en compte l'effet de la température. Le nombre et la diversité des applications publiées relèvent cependant que les méthodes de calculs sont suffisamment robustes pour figurer dans la boîte à outils de la cristallographie par RMN.

## Cristallographie

Le calcul de déplacements chimiques peut jouer un rôle essentiel dans l'étape d'attribution du spectre RMN d'un échantillon solide. Lorsque la structure du système est connue, les déplacements chimiques calculés peuvent être utilisés pour confirmer l'attribution d'un spectre, ou pour l'achever lorsque l'ensemble des expériences disponibles ne permet pas d'effectuer une attribution complète. Cette approche est particulièrement utile lorsque les expériences de corrélations ne peuvent être acquises avec une résolution suffisante ou en un temps raisonnable, comme cela a par exemple été illustré pour des spectres  $^1\text{H}$  [15] et  $^{19}\text{F}$  [17].

L'utilisation d'une structure connue pour confirmer ou compléter l'attribution d'un spectre expérimental ne constitue pas au sens strict un exemple de cristallographie par RMN.

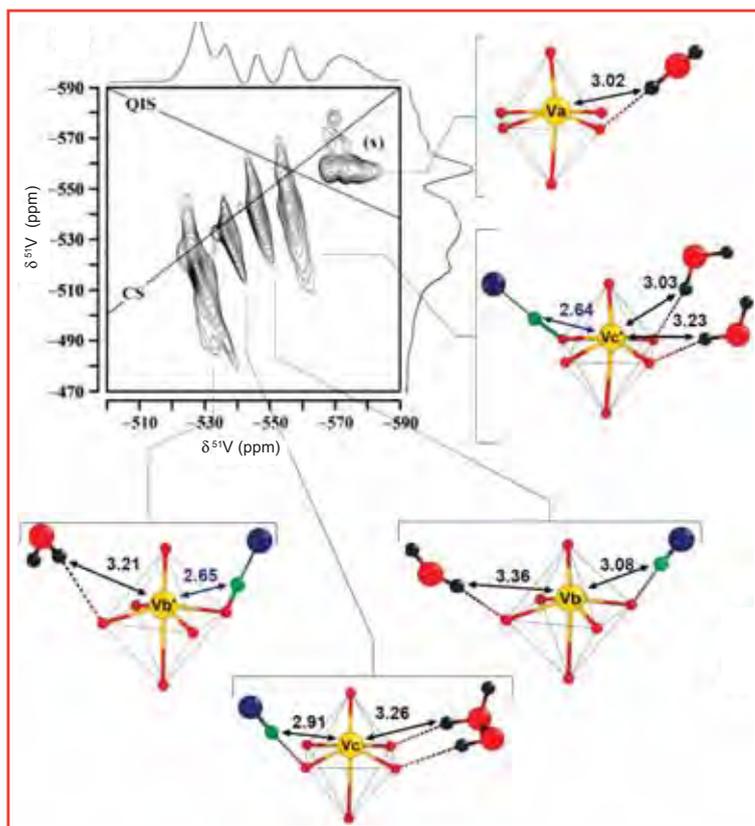


Figure 8 - Liaisons H dans un POM : les calculs de déplacements chimiques ont contribué à l'identification des différents environnements pour ce polyoxovanadate.

Le vanadium-51 est un noyau de spin demi-entier  $I > 1/2$  dont les spectres RMN sont dominés par l'interaction quadrupolaire. Pour accéder au déplacement chimique, il est nécessaire d'effectuer une expérience bidimensionnelle dite « triple quanta et rotation à l'angle magique » (MQMAS). L'interprétation de chaque dimension est complexe, mais le déplacement chimique isotrope peut être mesuré le long de la diagonale du spectre MQMAS, notée ici CS. Les calculs de déplacements chimiques permettent l'attribution des pics aux différents environnements possibles pour le vanadium. Figure extraite de [18]. © 2010 American Chemical Society.

Le grand nombre d'études de ce type a cependant permis d'établir la fiabilité de la méthode de calcul, au point de pouvoir remettre en question la validité d'une structure pour laquelle le spectre calculé serait en désaccord avec le spectre expérimental. Des anomalies ont ainsi pu être détectées dans des structures déterminées par radiocristallographie [15]. De manière plus générale, les structures obtenues par radiocristallographie sont parfois incomplètes. En particulier, il est difficile avec cette technique de déterminer avec précision la position des noyaux d'hydrogène. La comparaison entre les déplacements chimiques calculés pour différentes hypothèses structurales et les spectres RMN expérimentaux permet alors de sélectionner la bonne hypothèse. Une étude récente de polyoxovanadates, plus précisément du décavanadate  $Cs_4 [H_2V_{10}O_{28}] \cdot 4H_2O$ , a par exemple montré qu'il était possible d'identifier la position des groupements hydroxyles de surface, et plus généralement de caractériser le réseau de liaisons hydrogène en s'appuyant sur les paramètres RMN (déplacement chimique mais aussi couplage quadrupolaire) expérimentaux et calculés du proton et du vanadium-51 [18] (figure 8).

Ces exemples illustrent bien la complémentarité entre les différentes techniques et la manière dont elles peuvent être combinées pour des études de cristallographie. La chimie numérique peut également jouer un rôle supplé-

mentaire et améliorer la qualité d'une structure déterminée par une autre méthode. Les méthodes basées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité permettent en effet d'effectuer des « optimisations de géométrie » en recherchant la structure la plus stable possible au voisinage d'une hypothèse structurale de départ. Ces optimisations nécessitent de disposer d'un point de départ suffisamment proche du résultat final. La structure de départ peut être obtenue par diffraction de rayons X, comme illustré récemment par l'étude d'un mélange de fluorure de baryum et de fluorure de bore [17] ; une comparaison des déplacements chimiques calculés avant et après l'optimisation permet alors de confirmer l'amélioration de la structure. Les exemples combinant RMN du solide, diffraction de rayons X et calculs de déplacements chimiques pour la cristallographie se multiplient, pour des systèmes et des noyaux très variés [19-21].

L'ensemble des ingrédients évoqués précédemment peut être réuni en un protocole s'appuyant principalement sur la RMN pour déterminer la structure d'un solide, décrit dans la figure 9. Tout d'abord, des expériences de corrélations dipolaires sont analysées pour obtenir une structure suffisamment proche de la structure expérimentale. Cette structure est ensuite soumise à une optimisation de géométrie, après laquelle la structure finale est validée par une comparaison des déplacements chimiques expérimentaux et calculés.

Cette démarche a été illustrée pour deux des systèmes décrits précédemment, de petites molécules organiques [22] ainsi que des zéolites [23], dans les deux cas pour des solides en poudre. Ces preuves de principe, obtenues pour des systèmes de structure connue, permettent de valider une approche qui doit désormais être étendue à des systèmes de structure inconnue.

## Conclusion

La cristallographie par RMN est une discipline en plein essor, qui offre des perspectives uniques pour la caractérisation à l'échelle atomique de nombreux matériaux, comme les catalyseurs inorganiques ou hybrides, les biomacromolécules ou encore les composés pharmaceutiques. Comme illustré plusieurs fois au cours de cet article, c'est la complémentarité des informations obtenues par différentes approches (RMN, diffraction, chimie numérique...) qui permet de caractériser les systèmes les plus complexes. Les développements futurs de la cristallographie par RMN iront de pair avec ceux des aspects plus fondamentaux sur lesquels

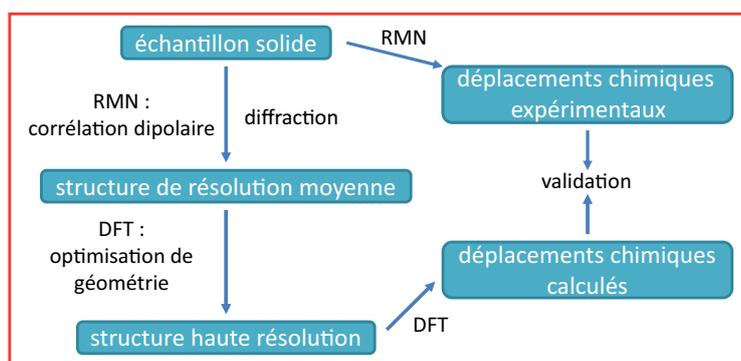


Figure 9 - Protocole de cristallographie s'appuyant principalement sur la RMN.

elle repose, à la fois pour l'acquisition des données spectroscopiques et pour leur interprétation structurale.

L'auteur remercie Lyndon Emsley pour ses conseils, ainsi qu'Alessandro Marchetti, Guido Pintacuda et Michael Knight pour les photographies reproduites dans cet article, et Jonathan Yates pour la figure de l'encadré 2.

## Références

- [1] *NMR Crystallography*, R.K. Harris, R.E. Wasylshen, M.J. Duer (eds), Wiley-Blackwell, 2009.
- [2] Duer M.J., *Introduction to Solid-State NMR Spectroscopy*, Wiley-Blackwell, 2004.
- [3] Yuen A.K.L., Lafon O., Charpentier T., Roy M., Brunet F., Berthault P., Sakellariou D., Robert B., Rimsky S., Pillon F., Cintrat J.C., Rousseau B., Measurement of long-range interatomic distances by solid-state tritium-NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, p. 1734
- [4] Thureau P., Sauerwein A.C., Concistre M., Levitt M.H., Selective internuclear coupling estimation in the solid-state NMR of multiple-spin systems, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, 13, p. 93.
- [5] Hodgkinson P., Emsley L., Numerical simulation of solid-state NMR experiments, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2000, 36, p. 201.
- [6] Bradley J.P., Tripson C., Filip C., Brown S.P., Determining relative proton-proton proximities from the build-up of two-dimensional correlation peaks in  $^1\text{H}$  double-quantum MAS NMR: insight from multi-spin density-matrix simulations, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, p. 6941.
- [7] Dumez J.-N., Butler M.C., Salager E., Elena-Herrmann B., Emsley L., *Ab initio* simulation of proton spin diffusion, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, p. 9172.
- [8] Castellani F., van Rossum B., Diehl A., Schubert M., Rehbein K., Oschkinat H., Structure of a protein determined by solid-state magic-angle-spinning NMR spectroscopy, *Nature*, 2002, 420, p. 98.
- [9] Wasmer C., Lange A., Van Melckebeke H., Siemer A.B., Riek R., Meier B.H., Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core, *Science*, 2008, 319, p. 1523.
- [10] Elena B., Emsley L., Powder crystallography by proton solid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, p. 9140.
- [11] Elena B., Pintacuda G., Mifsud N., Emsley L., Molecular structure determination in powders by NMR crystallography from proton spin diffusion, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, p. 9555.
- [12] Brouwer D.H., Darton R.J., Morris R.E., Levitt M.H., A solid-state NMR method for solution of zeolite crystal structures, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, p. 10365.
- [13] Abragam A., *Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, 1983.
- [14] Pickard C.J., Mauri F., All-electron magnetic response with pseudopotentials: NMR chemical shifts, *Phys. Rev. B*, 2001, 63.
- [15] Harris R.K., Hodgkinson P., Zorin V., Dumez J.-N., Elena-Herrmann B., Emsley L., Salager E., Stein R.S., Computation and NMR crystallography of terbutaline sulfate, *Magn. Reson. Chem.*, 2010, 48, p. S103.
- [16] Charpentier T., The PAW/GIPAW approach for computing NMR parameters: a new dimension added to NMR study of solids, *Solid State Nuclear Magnetic Resonance*, 2011, 40, p. 1.
- [17] Martineau C., Fayon F., Suchomel M.R., Allix M., Massiot D., Taulelle F., Structure resolution of  $\text{Ba}_5\text{Al}_3\text{F}_{19}$  and investigation of fluorine ion dynamics by synchrotron powder diffraction, variable-temperature solid-state NMR, and quantum computations, *Inorg. Chem.*, 2011, 50, p. 2644.
- [18] Truflandier L.A., Boucher F., Payen C., Hajja R., Millot Y., Bonhomme C., Steunou N., DFT-NMR investigation and  $^{51}\text{V}$  3QMAS experiments for probing surface OH ligands and the hydrogen-bond network in a polyoxovanadate cluster: the case of  $\text{Cs}_4[\text{H}_2\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, p. 4653.
- [19] Schaller T., Buchele U.P., Klamer F.G., Blaser D., Boese R., Brown S.P., Spiess H.W., Koziol F., Kussmann J., Ochsenfeld C., Structure of molecular tweezer complexes in the solid state: NMR experiments, X-ray investigations, and quantum chemical calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, p. 1293.
- [20] Harper J.K., Doebbler J.A., Jacques E., Grant D.M., Von Dreele R.B., A combined solid-state NMR and synchrotron X-ray diffraction powder study on the structure of the antioxidant (+)-catechin 4.5-hydrate, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, p. 2928.
- [21] Johnston K.E., Tang C.C., Parker J.E., Knight K.S., Lightfoot P., Ashbrook S.E., The polar phase of  $\text{NaNbO}_3$ : a combined study by powder diffraction, solid-state NMR, and first-principles calculations, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, p. 8732.
- [22] Salager E., Stein R.S., Pickard C.J., Elena B., Emsley L., Powder NMR crystallography of thymol, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009, 11, p. 2610.
- [23] Brouwer D.H., Moudrakovski I.L., Darton R.J., Morris R.E., Comparing quantum-chemical calculation methods for structural investigation of zeolite crystal structures by solid-state NMR spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.*, 2010, 48, p. S113.



**Jean-Nicolas Dumez**

a effectué sa thèse au Centre de RMN à très hauts champs (CRMN, Lyon)\*.

\* Université de Lyon (ENS Lyon/CNRS/UCB Lyon 1), Centre de RMN à très hauts champs, 5 rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne.  
Courriel : jeannicolas.dumez@ens-lyon.org



les éditions d'île de france

102 avenue Georges Clemenceau - 94700 MAISONS ALFORT

Tél. : 01 43 53 64 00 - Fax : 01 43 53 48 00

edition@edif.fr - www.edif.fr

# Mobilité moléculaire et RMN

Daniel Canet et Pascal Palmas

**Résumé** La RMN s'avère une technique particulièrement puissante pour appréhender les mouvements moléculaires. La relaxation de spin dépend essentiellement des mouvements de rotation (d'ensemble ou internes) alors que les mouvements de translation sont révélés par les coefficients d'autodiffusion. Dans cet article, les deux approches seront décrites tant d'un point de vue expérimental (à l'aide des instruments élaborés dont on dispose aujourd'hui) que de leur exploitation en vue de caractériser des systèmes complexes. On verra notamment comment on peut accéder à la taille des édifices moléculaires, aux diverses interactions moléculaires, aux interactions de molécules-sondes avec une surface, à des informations concernant l'état liquide... On tentera de préciser les domaines d'application de ces techniques ainsi que leurs limites et leurs perspectives.

**Mots-clés** **Relaxation RMN, réorientation moléculaire, autodiffusion, gradients de champ, interactions moléculaires.**

**Abstract** **Molecular mobility and NMR**

NMR appears as a powerful technique in view of approaching molecular motions. Spin relaxation depends essentially on rotational motions (overall tumbling or internal motions) whereas translational motions are unravelled by self-diffusion coefficients. In this article, the two approaches will be described not only from an experimental point of view (with nowadays elaborated instruments) but also according to their ability at characterizing complex systems. In particular, it will be shown how one can access the size of molecular entities, the various interactions between molecules, the interaction between a spy-molecule and a surface, information about liquid state... Attempts will be made for delineating the application fields of these techniques, as well as their limitations and perspectives.

**Keywords** **NMR relaxation, molecular reorientation, self-diffusion, field gradients, molecular interactions.**

Dès la fin des années 40 ou le début des années 50, soit seulement cinq ans après la mise en évidence du phénomène de résonance magnétique nucléaire, on découvrait (en phase liquide) le déplacement chimique ainsi que les couplages J ou couplages indirects [1]. Il est frappant de constater que, à peu près à la même période, les bases théoriques de la relaxation de spin étaient jetées [2] et que l'on comprenait l'influence de la diffusion translationnelle (ou autodiffusion, ou encore diffusion moléculaire) sur les expériences d'écho de spin [3]. Alors que le déplacement chimique et les couplages J apportent des informations essentiellement structurales, les paramètres de relaxation et de diffusion dépendent surtout de la mobilité moléculaire. Les phénomènes dynamiques sont par nature très complexes et revêtent un caractère aléatoire et statistique. Les mouvements de réorientation, assimilables à des rotations, induisent des fluctuations du champ magnétique local qui peut exister au niveau des noyaux atomiques. Ces fluctuations sont pour l'essentiel responsables des processus de relaxation. Les mouvements de translation sont, quant à eux, à l'origine du phénomène d'autodiffusion.

Bien que pendant une assez longue période, les paramètres dynamiques n'aient pas soulevé tout l'intérêt qu'ils méritaient, ils sont devenus de nos jours un complément indispensable aux mesures spectroscopiques traditionnelles fondées principalement sur l'exploitation des déplacements chimiques et des couplages J. Les informations qu'ils apportent sont évidemment de première importance pour l'étude des molécules (ou macromolécules) d'intérêt biologique et de leur activité, mais également chaque fois que l'on a affaire à des interactions moléculaires [4-5], à des

systèmes complexes, à des liquides organisés [6] ou à des milieux poreux [7]. En outre, le mouvement moléculaire est un facteur essentiel qui conditionne de nombreuses propriétés physico-chimiques des matériaux. L'état physique et les performances mécaniques des polymères, la conduction thermique, les propriétés de transport de membranes... sont autant de domaines où l'aptitude des molécules à se mouvoir joue un rôle déterminant.

Cet article présente, en deux parties, un aperçu de la façon dont la mobilité moléculaire peut être sondée au moyen de mesures RMN de relaxation et de diffusion. Les principes fondamentaux de ces deux approches sont d'abord rappelés et leur intérêt est démontré au moyen d'exemples illustratifs.

## Relaxation de spin

Toute perturbation appliquée à un système physique se traduit par une réaction de ce dernier appelée « relaxation » qui tend à lui faire retrouver sa configuration d'équilibre. À l'équilibre, l'aimantation nucléaire est colinéaire au champ magnétique statique ( $B_0$ ) dont la direction est généralement notée Z. Après une perturbation, provoquée par exemple par une impulsion de champ radiofréquence (rf), le retour vers la configuration d'équilibre sera assuré par les phénomènes de relaxation de spin. Il faut d'emblée séparer deux types de relaxation :

- la relaxation longitudinale (ou spin-réseau), qui concerne la composante de l'aimantation selon Z et qui évolue exponentiellement selon une constante de temps notée  $T_1$  (on utilisera souvent la vitesse de relaxation  $R_1$  égale à l'inverse du temps de relaxation  $T_1$ ) ;

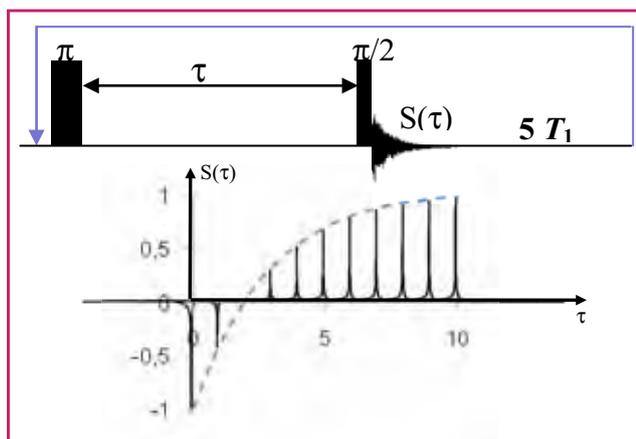


Figure 1 - Mesure de  $T_1$  par inversion-récupération.

L'aimantation nucléaire est d'abord inversée par l'impulsion radiofréquence  $\pi$ . Son évolution pendant le temps  $\tau$  est lue au moyen de l'impulsion  $\pi/2$ . La transformée de Fourier de  $S(\tau)$  fournit une (ou plusieurs raies) de résonance dont l'évolution permet d'accéder au temps de relaxation  $T_1$ .

- la relaxation transversale (ou spin-spin), qui se réfère à la disparition exponentielle (selon un temps de relaxation  $T_2$ ) des composantes de l'aimantation perpendiculaires à Z.

Différents mécanismes peuvent être à l'origine de la relaxation de spin, dont les plus courants sont : l'interaction dipolaire (entre les moments magnétiques de deux noyaux différents), l'interaction quadrupolaire (qui n'affecte que les noyaux de spin supérieur à  $1/2$ ), et l'anisotropie de déplacement chimique (on devrait plutôt parler du tenseur d'écran, qui est à l'origine du déplacement chimique).

$T_1$  est généralement mesuré par la séquence d'inversion-récupération [8] schématisée *figure 1* et qui peut être incorporée à des séquences plus compliquées, notamment à celles relevant de la spectroscopie multidimensionnelle.

La mesure de  $T_2$  fait appel à la séquence d'écho de spin [3] utilisée également à bien d'autres fins puisqu'elle permet de « refocaliser » l'aimantation transversale après que celle-ci ait évolué sous l'effet du déplacement chimique ou, tout simplement, de l'inhomogénéité du champ  $B_0$ . Cette séquence, schématisée *figure 2*, se retrouve dans de très nombreuses expériences, dont celles mises en œuvre pour les mesures de diffusion (voir ci-après).

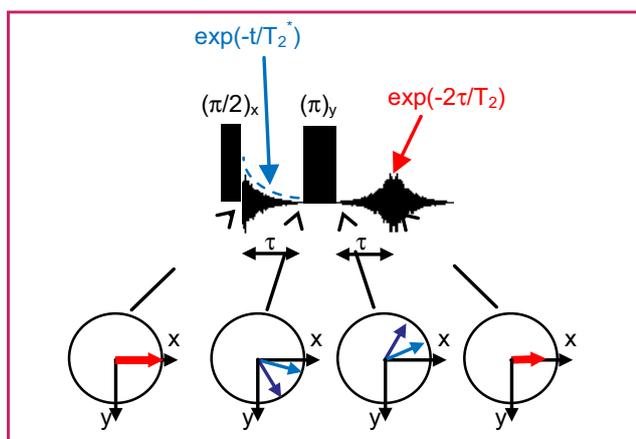


Figure 2 - Mesure de  $T_2$  par écho de spin.

L'aimantation transversale créée par la première impulsion  $\pi/2$  évolue pendant le temps  $\tau$  et décroît selon une constante de temps  $T_2$  qui intègre l'inhomogénéité de  $B_0$ . L'impulsion  $\pi$  permet de refocaliser l'aimantation sous forme d'un écho dont le sommet se situe à  $2\tau$ . C'est ici la transformée de Fourier du deuxième demi-écho qui permettra de suivre l'évolution des raies de résonance et d'en déduire le temps de relaxation  $T_2$ .

Par ailleurs, il existe un paramètre de relaxation très particulier, appelé vitesse de relaxation croisée, qui provient de ce que l'on nomme « effet Overhauser nucléaire » (NOE en anglais), d'après le phénomène de relaxation croisée électron-proton découvert par Overhauser [9]. Ce terme croisé couple les composantes longitudinales de l'aimantation nucléaire de deux noyaux différents et, ce qui en fait son intérêt, ne dépend que de l'interaction dipolaire entre ces deux noyaux. Ce paramètre recèle non seulement des informations dynamiques, mais fournit aussi une mesure quasi directe des distances interatomiques. Très prisé, il a donné naissance à une expérience bidimensionnelle (NOESY) qui fait partie de la batterie des expériences 2D classiques (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC ou HMQC, HMBC...).

### Appréhension des mouvements moléculaires

Toute vitesse de relaxation peut s'exprimer sous la forme d'une combinaison linéaire de densités spectrales  $J(\omega)$  avec comme expression la plus simple :

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} \quad (1)$$

où  $\omega = 2\pi\nu$  est la pulsation (exprimée en  $\text{rad.s}^{-1}$ ),  $\nu$  représente une fréquence de résonance, et  $\tau_c$  est un temps de corrélation dont la signification physique est directement liée aux propriétés dynamiques du système [10]. Par exemple, s'agissant d'un mouvement de rotation,  $\tau_c$  est le temps nécessaire à une réorientation de 1 radian. Dans le cas d'une petite molécule dans un milieu peu visqueux,  $\tau_c$  est très petit (de l'ordre de la picoseconde) et, compte tenu des fréquences actuelles de mesure RMN,  $\omega^2 \tau_c^2$  est très inférieur à 1. Les densités spectrales sont donc indépendantes de la fréquence de mesure et on se trouve dans le régime du « rétrécissement extrême ».

Bien que de très nombreux travaux, faisant appel à la relaxation de spin et relevant de ce régime, aient permis de mieux comprendre l'état liquide et la réorientation de petites molécules [11], c'est lorsqu'on a affaire à des temps de corrélation suffisamment grands pour être en dehors du rétrécissement extrême que la relaxation de spin apporte un maximum d'informations. D'après l'équation (1), les vitesses de relaxation doivent diminuer lorsque la fréquence de mesure augmente, par exemple lorsqu'on passe d'un appareil à 200 MHz (i.e. dont la fréquence d'observation du proton est de 200 MHz) à un appareil à 400 MHz. Cela est vrai pour la relaxation dipolaire mais ne l'est plus pour la relaxation par anisotropie de déplacement chimique. Les vitesses de relaxation sont toujours proportionnelles au carré de l'interaction et, dans le cas de l'anisotropie de déplacement chimique, cela se traduit par une dépendance proportionnelle au carré de la fréquence de mesure qui peut l'emporter sur l'évolution habituelle des densités spectrales (voir équ. (1)).

Ce comportement est illustré par la *figure 3* qui a trait à des complexes calixarène-cations monovalents (césium et thallium) [12]. Grâce à la relaxation des protons et carbones-13 du calixarène, il a pu être montré indirectement que ces cations monovalents (invités) étaient réellement localisés au centre de la molécule hôte (le calixarène). Une preuve plus directe est apportée par la relaxation longitudinale des ions eux-mêmes. Dans le cas du césium, on constate une diminution de  $R_1$  lorsque le champ  $B_0$  augmente, ce qui signifie i) que l'on est en dehors du rétrécissement extrême, donc que le cation est bien complexé; et ii) que les interactions dipolaires avec les protons du calixarène

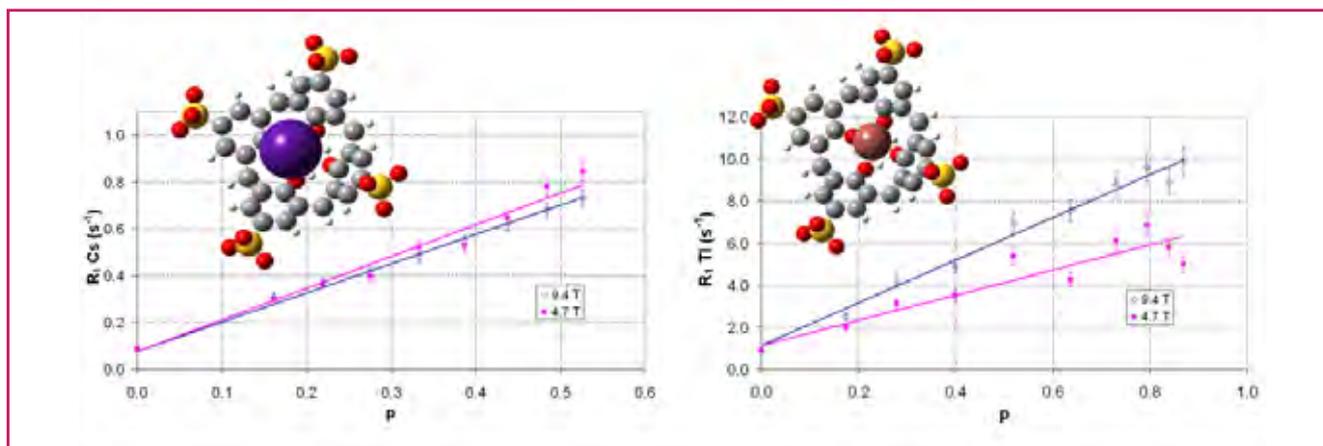


Figure 3 - Évolution des vitesses de relaxation longitudinale du césium (à gauche) et du thallium (à droite) à deux valeurs du champ  $B_0$  en fonction de la concentration en ion ( $p$ ) dans une solution aqueuse contenant un calixarène.

constituent le mécanisme de relaxation, donc que le cation est bien au centre de la molécule hôte.

Dans le cas du thallium, on constate le comportement inverse, ce qui traduit une importante contribution de l'anisotropie de déplacement chimique. Cette contribution étant très faible pour le thallium en solution aqueuse, ces résultats constituent une preuve supplémentaire de la complexation.

On peut également citer la « relaxométrie » [7] comme exemple actuel d'application de la relaxation de spin aux problèmes qui peuvent se poser au chimiste. Cette technique vise à mesurer l'évolution de la vitesse de relaxation longitudinale (généralement des protons, pour des raisons de sensibilité) dans une gamme de fréquence aussi large que possible et incluant les très basses fréquences (de quelques kHz à quelques dizaines de MHz). Eu égard à la sensibilité médiocre de la RMN, ces dernières ne peuvent être explorées qu'au moyen d'instruments spéciaux appelés « relaxomètres », qui fonctionnent généralement par la technique du champ cyclé comme indiqué figure 4.

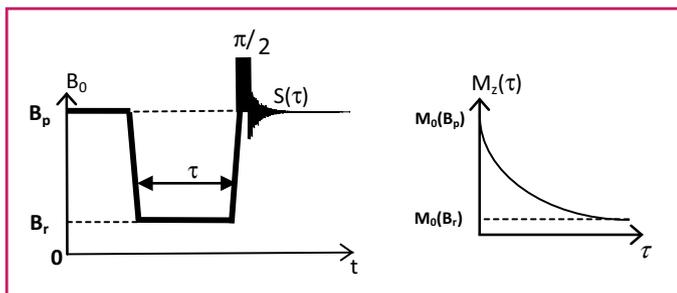


Figure 4 - Mesure de  $T_1$  par champ cyclé à une fréquence correspondant au champ magnétique statique (faible)  $B_r$ .

Les spins nucléaires sont tout d'abord polarisés dans un champ relativement élevé  $B_p$  qui est commuté aussi rapidement que possible vers le champ  $B_r$ . L'aimantation longitudinale évolue donc vers sa valeur d'équilibre dans  $B_r$  selon le temps de relaxation à la fréquence correspondant à  $B_r$ . Pour des raisons de sensibilité, la détection du signal RMN se fait à nouveau dans le champ  $B_p$ .

Le comportement du solvant dans un organogel (une fois celui-ci formé) constitue un bon exemple d'application des mesures de relaxation classique (carbone-13) et de diffusion (voir ci-après) couplées à des mesures de relaxométrie [13]. L'organogel considéré est formé à partir d'un aminoacide (la

phénylalanine) modifié par l'adjonction d'un groupement naphthalénique. Les mesures classiques montrent que la dynamique rotationnelle et translationnelle du toluène (le solvant) dans la phase organogel (le gélateur étant un aminoacide modifié) est identique à celle du liquide pur. Cependant, les courbes de dispersion ( $R_1$  du proton en fonction de la fréquence de mesure) montrent des différences considérables entre le liquide pur et la phase organogel (figure 5). La courbe de dispersion du toluène pur fait apparaître une forte dépendance en fréquence due à des interactions avec l'oxygène moléculaire (paramagnétique) de l'air dissous dans le liquide. Dans la phase gel, on retrouve à haute fréquence cette même courbe affectée d'un facteur inférieur à 1. Ce facteur représente la proportion du toluène à l'extérieur du gel qui doit se comporter comme le toluène pur. En revanche, aux très basses fréquences, on observe une forte décroissance de la courbe de dispersion. Cette décroissance est attribuée à des interactions intermoléculaires subies par le toluène emprisonné dans l'organogel. Il n'y joue cependant aucun rôle particulier puisque ses propriétés dynamiques ne sont pas modifiées (voir plus haut).

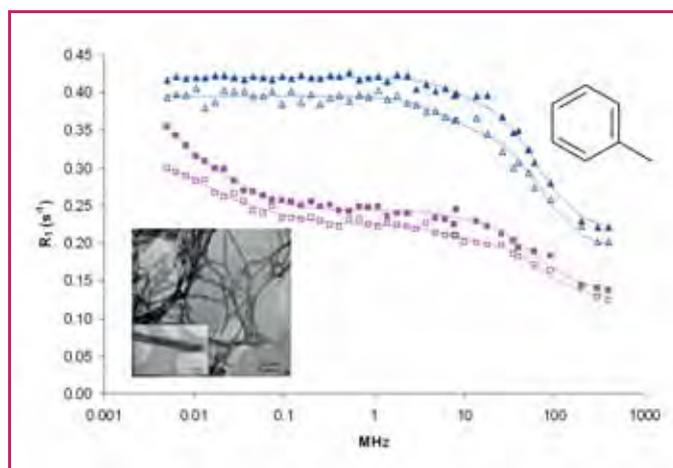


Figure 5 - Courbes de dispersion du toluène à deux températures : 20 °C (symboles pleins), 30 °C (symboles vides).

Toluène pur : courbes du haut ; toluène dans une phase organogel : courbes du bas. Encart : cliché obtenu par microscopie électronique montrant la structure fibreuse des organogels.

## Diffusion

L'autodiffusion caractérise l'aptitude des particules à se déplacer dans un fluide au repos sous le seul effet de l'agitation thermique. Elle résulte de ce que l'on appelle communément le mouvement brownien. Cette théorie permet de relier le coefficient de diffusion, noté  $D$ , au déplacement quadratique moyen pendant le temps  $t$  :

$$L_q = \langle L^2 \rangle = 6Dt$$

L'existence d'une variation spatiale du champ magnétique statique  $B_0$  peut rendre certaines expériences dépendantes des phénomènes de diffusion, si tant est que cette variation implique des distances de l'ordre de  $L_q$ . Par exemple, l'effet de la diffusion moléculaire est mis en évidence comme dans l'expérience d'écho de spin, où elle contribue, en plus de la relaxation transversale, à la décroissance du signal en fonction du temps (*figure 2*). Bien que cette expérience puisse être utilisée en principe pour évaluer le coefficient de diffusion, on cherche généralement à minimiser cette contribution (en réduisant les inhomogénéités de  $B_0$  au moyen de dispositifs appropriés), de façon à déterminer le plus précisément possible le temps de relaxation transversale  $T_2$ .

### Mesure du coefficient d'autodiffusion

La méthode couramment utilisée consiste à superposer au champ magnétique statique  $B_0$  (supposé homogène) un gradient de champ  $g$  qui correspond à une composante magnétique variant linéairement dans une direction donnée (par exemple  $Z$ ). Un codage de la dimension  $Z$  est ainsi réalisé du fait de la relation de proportionnalité entre fréquence de résonance et valeur du champ magnétique statique

$\nu_0 = \gamma(B_0 + gZ)/2\pi$ ,  $\gamma$  étant la constante gyromagnétique. Les gradients sont appliqués par impulsions brèves dont la durée  $\delta$  est de quelques millisecondes comme dans les expériences d'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Quelle que soit la technique utilisée, le principe de fonctionnement des expériences de diffusion suit un schéma commun, comme par exemple celui faisant appel à un écho de spin (voir *encadré 1* [14]) : après une excitation initiale du système de spins qui transforme l'aimantation d'équilibre (colinéaire à  $B_0$ ) en aimantation transversale, donc animée d'un mouvement de précession à la fréquence  $\nu_0$ , une première impulsion de gradient est appliquée afin de réaliser un codage spatial de la fréquence de résonance  $\nu_0$  (voir ci-dessus). Intervient ensuite une période d'évolution, appelée intervalle de diffusion  $\Delta$ , durant laquelle les molécules portant les spins nucléaires vont diffuser au sein de l'échantillon. Une deuxième impulsion de gradient, identique à la première mais dont l'effet est inversé (par l'impulsion  $\pi$  de la séquence d'écho de spin), est ensuite appliquée. Il en résulte une annulation du codage spatial de la première impulsion de gradient (on dit qu'il y a « refocalisation »). L'acquisition de l'écho permet alors de mesurer la décroissance de l'aimantation transversale. En effet, si les molécules restaient immobiles pendant  $\Delta$ , la refocalisation serait parfaite car chaque molécule subirait le même champ magnétique pendant les deux impulsions de gradient. En revanche, si les molécules se déplacent dans la direction du gradient pendant  $\Delta$ , le champ perçu par les spins n'est pas le même pendant les deux impulsions de gradient. La refocalisation est alors incomplète, ce qui se traduit par une atténuation du signal RMN :

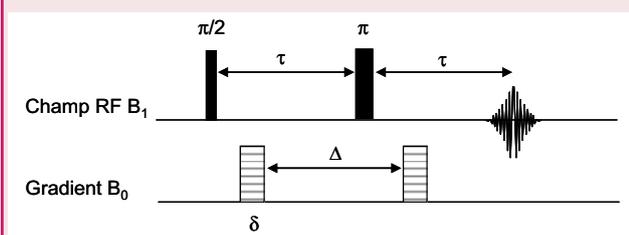
$$S = S_0 \exp(-\delta^2 \gamma^2 g^2 D \Delta) \quad (2)$$

Dans (2), l'atténuation du signal due aux phénomènes de relaxation a été omise.  $D$ , le coefficient de diffusion, peut en

#### Encadré 1

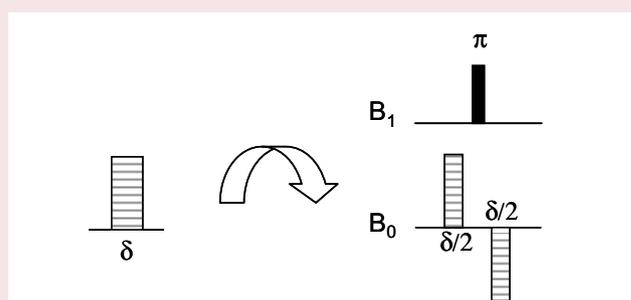
### Mesure du coefficient de diffusion

La séquence d'écho de spin en présence d'impulsions de gradient (dans chacune des deux parties de la séquence) constitue la méthode la plus simple pour mesurer la diffusion :



Pour les systèmes dont le temps de relaxation transversale  $T_2$  est plus court que  $T_1$ , il est plus avantageux de mettre en œuvre une autre catégorie de séquences utilisant un écho stimulé plutôt qu'un écho de spin. La technique d'écho stimulé consiste à ramener l'aimantation selon la direction du champ  $B_0$  après l'application de la première impulsion de gradient de telle sorte que la perte d'aimantation durant  $\Delta$  ne dépend plus que de  $T_1$ . Cela permet donc de bénéficier d'un meilleur rapport signal/bruit et donne la possibilité d'explorer de plus grandes valeurs de  $\Delta$ . L'effet des gradients de champ locaux sur la courbe de diffusion peut être minimisé en jouant sur la polarité du gradient appliqué. Ces gradients de champ locaux, qui se superposent aux gradients de champ nécessaires à la mesure du coefficient de diffusion, ont pour origine les différences de susceptibilité magnétique au sein d'un échantillon hétérogène. Ainsi, chaque impulsion de gradient

est remplacée par une ou plusieurs paires de gradients de polarité opposée séparés par une impulsion  $\pi$  :



Les deux impulsions de gradient, chacune d'une durée de  $\delta/2$ , agissent de la même manière qu'une seule impulsion de durée  $\delta$ . En revanche, l'effet des gradients locaux est annihilé par l'impulsion  $\pi$ . Ces méthodes sont efficaces tant que les molécules sont en présence du même gradient local de part et d'autre de l'impulsion  $\pi$ . Leur limite est donc dictée par le caractère incompressible de la durée des impulsions de gradient qui peut difficilement descendre en deçà de quelques centaines de microsecondes. Il existe une approche alternative qui offre une insensibilité totale aux gradients de champs locaux. Son principe réside dans l'utilisation de gradients de champ radiofréquence au lieu de gradients de champ statique [14]. Sa mise en œuvre requiert cependant un appareillage adapté.

principe être déterminé en faisant varier l'un des trois paramètres  $\delta$ ,  $g$  ou  $\Delta$ . En pratique, il est plus commode d'incrémenter l'intensité du gradient en gardant constant l'ensemble des délais de la séquence. Cette procédure permet principalement de maintenir constante toute décroissance due à la relaxation.

La gamme de coefficients de diffusion accessible est en pratique limitée aux faibles valeurs par le gradient de champ magnétique disponible et le temps de relaxation  $T_1$  du proton de l'espèce suivie. Lorsque la diffusion est très lente, par exemple dans des milieux très visqueux ou confinés, ou lorsque l'on a à faire à des biomolécules, polymères ou complexes de taille importante, la précision obtenue avec les méthodes traditionnelles n'est pas suffisante car les valeurs de  $\Delta$  accessibles sont trop courtes pour permettre un déplacement significatif des molécules. Un allongement de l'intervalle de diffusion est possible si l'information spatiale pendant ce délai est stockée soit dans des états de spins de longue durée de vie (produits par exemple par des systèmes de spin  $1/2$  couplés dans des molécules partiellement deutérées) [15], soit dans l'aimantation longitudinale d'hétéronoyaux possédant des  $T_1$  plus longs (tels que l'azote-15 dans des composés isotopiquement enrichis [16]).

### Intérêt du coefficient d'autodiffusion

L'aptitude d'une molécule à se déplacer dans un fluide dépend de la température, mais aussi de sa taille, de sa forme et des interactions avec les autres molécules. Pour ces différentes raisons, la mesure du phénomène d'autodiffusion est utilisée dans de nombreux domaines : elle permet de sonder le phénomène de complexation, en particulier l'interaction protéine/ligand ou la formation de phases organisées dans les liquides (dimères, micelles, cristaux liquides...), d'étudier les processus d'échanges chimiques, et de mesurer *in situ* la viscosité ou l'état de confinement d'un fluide dans un milieu complexe [17]. La mesure de  $D$  en fonction de la masse moléculaire donne accès à la dimension fractale  $\alpha$  associée à une famille de composés. Cet exposant, dont la valeur est comprise entre 1 et 3, traduit la compacité d'une molécule, *i.e.* la manière dont elle occupe l'espace à trois dimensions. Inversement, une fois  $\alpha$  déterminé, la masse molaire d'espèces en solution peut être déterminée. La méthode représente ainsi une alternative intéressante à la chromatographie d'exclusion stérique et est utilisable *in vivo* [18]. Dans un autre domaine, la diffusion couplée à l'imagerie fonctionnelle (IRMf) constitue l'un des outils majeurs utilisés pour établir une cartographie précise du cerveau et de ses interconnections.

Au lieu de considérer le coefficient  $D$  associé à l'ensemble ou à une partie du spectre RMN, le résultat de l'expérience peut également être représenté sous forme d'un diagramme à deux dimensions. Une transformée de Fourier est d'abord appliquée à la série de FID (« free induction decay ») qui correspondent aux signaux acquis lors d'une expérience de diffusion. On génère ainsi la première dimension qui sera celle des déplacements chimiques. La seconde dimension, constituée de courbes décroissantes, est traitée au moyen d'une procédure d'optimisation utilisant la transformée de Laplace inverse (TLI). Cette opération mathématique permet d'obtenir la distribution des facteurs d'amortissements, donc des coefficients de diffusion, à partir de chaque courbe considérée comme une somme d'exponentielles. Un tel diagramme bidimensionnel fait donc apparaître les corrélations coefficient de diffusion-déplacement chimique.

Une application importante de ce procédé (connu sous le nom de DOSY) est de séparer en solution les spectres RMN associés à chaque espèce en fonction de leur coefficient de diffusion [6]. L'efficacité de cette méthode ou de versions 3D plus élaborées a été montrée, entre autres, pour l'étude de mélanges complexes de produits naturels tels que les extraits de plantes ou de fluides biologiques [19-20], ou pour l'analyse et le suivi des réactions de polymérisation et de purification de copolymères à blocs [21]. La faible résolution dans la dimension de diffusion constitue la limitation majeure de cette technique. Celle-ci dépend principalement de l'algorithme utilisé pour l'optimisation et se dégrade fortement en présence de recouvrement spectral dans le spectre RMN. Il est possible d'augmenter la résolution de l'expérience DOSY pour l'étude de mélanges en exacerbant les différences de mobilité moléculaire au moyen d'une phase stationnaire ajoutée à l'échantillon analysé (figure 6). Cette approche dite « RMN chromatographique », ou « chrom-NMR », est un moyen de séparation qui présente des analogies avec la chromatographie en phase liquide, mais son mode de fonctionnement est statique et sans colonne. La formation d'un système biphasique induit cependant des élargissements de raies dus essentiellement aux différences de susceptibilités magnétiques aux interfaces. Cet inconvénient peut être quasiment éliminé en recourant à la procédure de rotation à l'angle magique MAS utilisée habituellement pour les solides. Les mesures réalisées à fréquence MAS modérée sur des échantillons de petite taille montrent que la rotation a peu d'effet sur la diffusion [22].

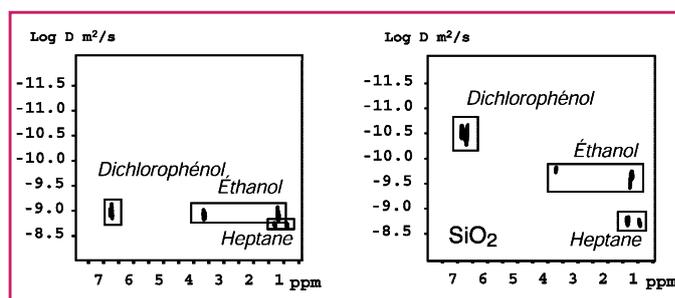


Figure 6 - Spectre DOSY d'un mélange de dichlorophénol, éthanol et heptane dans le cyclohexane deutéré : solution pure (à gauche), et après addition d'une phase de silice poreuse (à droite).

Il existe des variantes plus élaborées de la technique DOSY combinant la mesure de  $D$  avec une expérience sensible à l'échange chimique ou avec la mesure des temps de relaxation  $T_1$  ou  $T_2$ . Les diagrammes ( $D, D$ ) ou ( $D, T_1$ ) ou ( $D, T_2$ ) sont alors obtenus à l'issue d'une double TLI. Ces diagrammes permettent de caractériser chaque entité par des aspects différents de sa dynamique (nature et rapidité de tous les mouvements pouvant affecter l'entité considérée). Elles offrent donc un pouvoir discriminatoire accru par rapport à une simple mesure de chacune de ces observables. Ce type d'approche est très utile pour la quantification des phases aqueuses et organiques, en particulier lorsque les moyens mis en œuvre se limitent, pour des raisons de coût, d'environnement ou de manque d'accessibilité, à des mesures de spectres basse résolution. En prospection pétrolière, elle permet de caractériser *in situ* les roches pétrolières des puits de forages [23], et dans l'industrie agroalimentaire, elle sert à déterminer la qualité ou le degré de maturation d'un fromage [24] (figure 7).

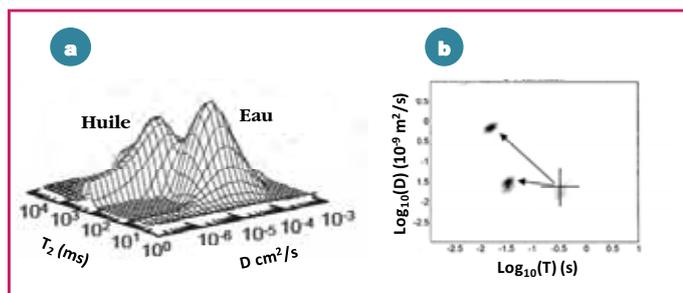


Figure 7 - Diagrammes ( $D, T_2$ ) (a) d'une roche pétrolière montrant la séparation des signaux du pétrole et de l'eau (en représentation tridimensionnelle) [23], (b) d'un échantillon de gouda après 74 jours de maturation (la croix indique l'emplacement initial des pics après seulement 1 jour) [24].

### Diffusion en milieu confiné

Lorsque les dimensions du système dans lequel évoluent les molécules de liquide pendant  $\Delta$  sont grandes vis-à-vis de leur déplacement quadratique moyen, on mesure un coefficient de diffusion libre qui constitue une grandeur intrinsèque du liquide. Dans le cas contraire, la présence des parois influe fortement sur la diffusion des particules, ce qui rend la mesure RMN sensible à son environnement. La mesure fournit alors un coefficient de diffusion apparent  $D_{app}$  qui diminue en fonction de  $\Delta$ .

Dans un composé poreux imprégné par un liquide, cette évolution est reliée aux caractéristiques structurales (figure 8) : pour des valeurs faibles de  $\Delta$ , les espèces diffusantes restent confinées localement, la diminution de  $D_{app}$  dépend quasi linéairement du rapport  $S/V$  caractérisant la porosité –  $S$  étant la surface des pores et  $V$  le volume du liquide en interaction avec cette surface. Ainsi, moyennant un modèle de cavité, il est possible de déterminer les dimensions et un facteur de forme caractéristiques des porosités. Lorsque les valeurs de  $\Delta$  sont suffisamment grandes pour que les molécules diffusent dans la structure poreuse,  $D_{app}$  atteint une valeur limite appelée « tortuosité » du réseau. Cette grandeur, qui traduit le degré de connectivité entre les pores, conditionne les propriétés de perméabilité et de conductivité [25].

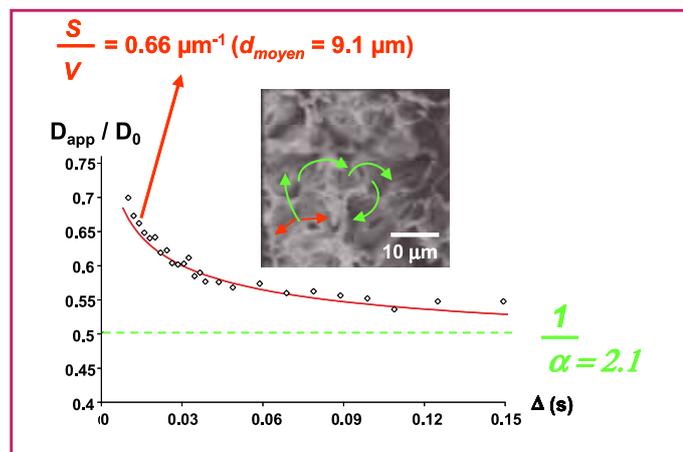


Figure 8 - Évolution du rapport  $D_{app}/D_0$  (avec  $D_0$ , coefficient de diffusion libre) en fonction de l'intervalle de diffusion  $\Delta$  obtenu pour un matériau polystyrène poreux.

L'analyse de la courbe permet de déterminer une dimension caractéristique moyenne  $d_{moyen}$  des cavités et la tortuosité  $\alpha$  du réseau interconnecté.

### Encadré 2

#### Hétérogénéité structurale et hétérogénéité de susceptibilité magnétique

Dans les milieux hétérogènes comportant des zones de susceptibilité magnétique différente, les interfaces sont le siège de modifications du champ magnétique, ce qui se traduit par l'apparition de gradients locaux qui sont ressentis, entre autres, par les noyaux atomiques. L'intensité et la direction de ces gradients ayant une certaine distribution, au lieu d'une résonance unique, le spectre RMN est constitué d'une multitude de résonances, d'où un élargissement et, éventuellement, une forme de raie particulière. Un second effet survient lorsque le déplacement quadratique moyen ne peut plus être considéré comme négligeable devant les dimensions caractéristiques des hétérogénéités structurales. Une telle situation peut survenir pour des tailles de cavités inférieures à quelques dizaines de micromètres. Les gradients locaux peuvent alors interférer avec les gradients appliqués en vue de la mesure du coefficient de diffusion. Ces gradients locaux sont alors responsables d'une mesure erronée du coefficient de diffusion.

### Mesure de l'hétérogénéité structurale

L'existence d'une hétérogénéité structurale s'accompagnant d'une hétérogénéité de susceptibilité magnétique induit un élargissement des raies RMN (voir encadré 2). Il a été montré récemment que chaque intervalle de fréquence élémentaire correspond à une taille donnée de pore [26]. Ainsi l'élargissement et la forme de la raie reflètent la distribution des dimensions des cavités au sein du réseau poreux (figure 9, en haut à droite). On peut prévoir que plus la taille d'un pore est petite, plus les gradients locaux sont importants et plus la fréquence de résonance augmente, ce qui explique la forme de raie.

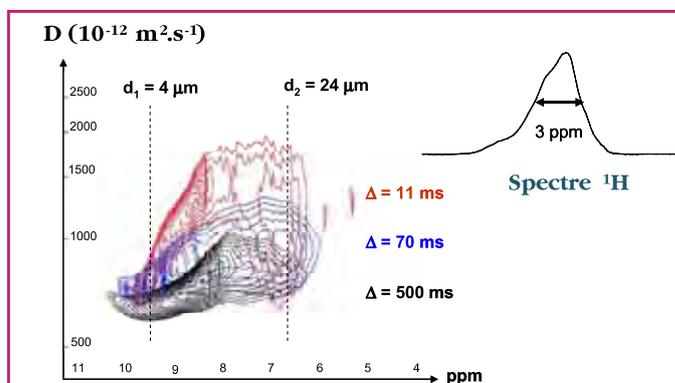


Figure 9 - Expérience DOSY appliquée à un polystyrène poreux pour trois valeurs de l'intervalle de diffusion  $\Delta$ . Les diamètres des pores sont indiqués par  $d_1$  et  $d_2$ . En haut à droite : le spectre RMN classique.

Ces propriétés peuvent être précisées et complétées par des mesures du coefficient de diffusion en fonction de la fréquence de résonance (expérience DOSY, figure 9). On constate en effet une diminution du coefficient de diffusion lorsque la fréquence de résonance augmente (pores de plus petite taille). Cependant, cette propriété n'est vraie que pour de faibles valeurs de  $\Delta$  (pour lesquelles les molécules restent plus ou moins confinées). Pour un temps plus long, on tend vers le palier de tortuosité et cet effet s'amenuise.

### La diffraction diffuse

Généralement, la décroissance du signal de diffusion  $E(q, \Delta)$ , exprimée en fonction de  $q = (2\pi)^{-1} \gamma \delta g$ , est de nature

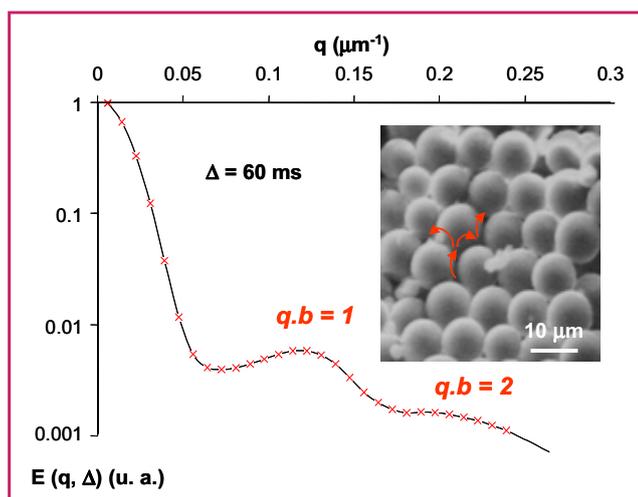


Figure 10 - Courbes de diffusion obtenues pour un système poreux modèle constitué de billes de polystyrène empilées.

La fréquence de l'oscillation détectée dans l'espace réciproque correspond à la distance moyenne  $b$  séparant deux cavités dans le réseau.

gaussienne. Cette forme est le reflet de la distribution  $P(r)$  des déplacements qui se déduit de  $E(q, \Delta)$  par transformée de Fourier et qui est également de nature gaussienne. La grandeur  $q$  constitue ainsi un espace réciproque comme en diffraction X. Dans un système périodique de pores interconnectés, il est possible d'observer une déviation au régime gaussien en utilisant des valeurs particulières de gradients et de temps de diffusion. Des « pics de diffraction » peuvent être détectés à des valeurs de  $q$  égales à l'inverse (ou des multiples) de la distance moyenne séparant deux cavités [27-28] (figure 10).

Dans des systèmes poreux réels, l'observation de ce phénomène est rendue difficile du fait de la forte hétérogénéité structurale associée à la présence de forts gradients de champs locaux qui, dans ce cas, sont particulièrement néfastes. La technique à base de gradients de champ radiofréquence [14] est la seule qui ait permis de détecter le phénomène de diffraction dans un composé poreux réel [29].

## Conclusion et perspectives

Il est bien clair que de nos jours, les mesures du coefficient d'autodiffusion par RMN jouissent d'un succès considérable. On parle même de « RMN diffusionnelle » qui, vraisemblablement, continuera à s'enrichir de nouvelles expériences (par le biais d'une instrumentation qui ne cesse de s'améliorer), permettant une investigation de plus en plus précise des milieux complexes. Les limitations liées à la faible sensibilité inhérente à la RMN peuvent être, en partie, levées grâce à des instruments à haut champ dotés d'une électronique de plus en plus performante. Cependant, l'augmentation du champ entraîne nécessairement un accroissement des gradients locaux (s'ils existent) et, par conséquent, des difficultés (voire des impossibilités) lors de la mesure du coefficient de diffusion.

Bien que les temps de relaxation RMN requièrent une interprétation plus fouillée que les coefficients de diffusion, ils apportent des informations complémentaires parce que spécifiques d'un site donné dans un édifice moléculaire, supramoléculaire ou macromoléculaire. Dans le même ordre

d'idée, l'étude des nanosystèmes peut bénéficier de la conjonction des mesures de diffusion et de relaxométrie (mesures de relaxation de spin en fonction de la valeur du champ magnétique statique), ce qui remet en perspective la RMN à bas champ.

## Références

- [1] Gutowsky H.S., Hoffmann C.J., *J. Chem. Phys.*, **1951**, 19, p. 1259.
- [2] Bloembergen N., Purcell E.M., Pound R.V., *Phys. Rev.*, **1948**, 73, p. 679.
- [3] Hahn E.L., *Phys. Rev.*, **1950**, 80, p. 580.
- [4] Bagno A., Rastrelli F., Saielli G., *Prog. Nuc. Magn. Spect.*, **2005**, 47, p. 41.
- [5] Klingenfus J., Palmas P., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2011**, 13, p. 10661.
- [6] Johnson S.J. Jr., *Encyclopedia of NMR*, John Wiley & Sons, **1996**, p. 1626-1643.
- [7] Kimmich R., *NMR: Tomography, Diffusometry, Relaxometry*, Springer, **1997**.
- [8] Vold R.L., Waugh J.S., Klein M.P., Phelps D.E., *J. Chem. Phys.*, **1968**, 48, p. 3831.
- [9] Overhauser A.W., *Phys. Rev.*, **1953**, 92, p. 401.
- [10] Canet D., Bouguet-Bonnet S., Leclerc S., *RMN Express: Spins ½, État liquide*, Presses Universitaires de Nancy, **2010**.
- [11] Kowaleski J., Mäler L., *Nuclear Spin Relaxation in Liquids: Theory, Experiments and Applications*; Taylor & Francis, **2006**.
- [12] Cuc D., Bouguet-Bonnet S., Morel-Desrosiers N., Morel J.P., Mutzenhardt P., Canet D., *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, p. 10800.
- [13] Yemlou M., Steiner E., Robert A., Bouguet-Bonnet S., Allix F., Jamart-Grégoire B., Canet D., *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115, p. 2511.
- [14] Canet D., *Prog. Nuc. Magn. Spect.*, **1997**, 30, p. 101.
- [15] Ahuja P., Sarkar R., Vasos P.R., Bodenhausen G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, p. 7498.
- [16] Augustyniak R., Ferrage F., Paquin R., Lequin O., Bodenhausen G., *J. Biomol. NMR*, **2011**, 50, p. 209.
- [17] Johnson S.J. Jr., *Prog. Nuc. Magn. Spect.*, **1999**, 34, p. 203.
- [18] Augé S., Schmit P.O., Crutchfield C.A., Islam T.I., Douglas J.H., Durand E. et al., *J. Phys. Chem.*, **2009**, 113, p. 1914.
- [19] Balayssac S., Delsuc M.-A., Gilard V., Prigent Y., Malet-Martino M., *J. Magn. Reson.*, **2009**, 196, p. 78.
- [20] Balayssac S., Trefi S., Gilard V., Malet-Martino M., Martino R., Delsuc M.A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2009**, 50, p. 602.
- [21] Viel S., Mazarin M., Giordanengo R., Phan T.N.T., Charles L., Caldarelli S., Bertin D., *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 654, p. 45.
- [22] Carrara C., Viel S., Delaurent C., Ziarelli F., Excoffier G., Caldarelli S., *J. Magn. Reson.*, **2008**, 194, p. 303.
- [23] Sun B., Dunn K., *Magn. Reson. Imag.*, **2005**, 23, p. 159.
- [24] Godefroy S., Callaghan P.T., *Magn. Reson. Imag.*, **2003**, 21, p. 381.
- [25] Blümich B., *NMR Imaging of Materials*, Oxford Science Publications, Clarendon Press, **2000**.
- [26] Kuntz J.-F., Palmas P., Level V., Canet D., *J. Magn. Reson.*, **2008**, 191, p. 239.
- [27] Callaghan P.T., *Principle of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy*, Oxford Science Publications, **1991**.
- [28] Kuntz J.-F., Palmas P., Canet D., *J. Magn. Reson.*, **2007**, 188, p. 322.
- [29] Kuntz J.-F., Palmas P., Trausch G., Mutzenhardt P., Canet D., *J. Chem. Phys.*, **2007**, 126, p. 134904.



D. Canet

### Daniel Canet

(auteur correspondant)

est professeur à la Faculté des Sciences et Technologies, Vandœuvre-lès-Nancy\*.

### Pascal Palmas

est chercheur au centre du Commissariat à l'Énergie Atomique du Ripault à Monts\*\*.



P. Palmas

\* Méthodologie RMN (CRM<sup>2</sup>, UMR 7036, UHP-CNRS), Université Henri Poincaré, Faculté des Sciences et Technologies, BP 239, F-7054506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex.

Courriel : Daniel.Canet@crm2.uhp-nancy.fr

\*\* CEA, DAM, Le Ripault, F-37260 Monts.

Courriel : pascal.palmas@cea.fr

# L'IRM s'aventure hors des sentiers du monde médical

François Mariette, Stéphane Rodts, Paméla Faure, Pascal Moucheront, Maja Musse, Armel Davenel, Guylaine Collewet et Tiphaine Lucas

- Résumé** L'agroalimentaire et le génie civil constituent deux domaines d'applications très particuliers pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Essentiellement axées sur les problèmes d'élaboration, de conditionnement et d'évolution de produits et de matériaux en contexte industriel, les études doivent souvent être menées sur des échantillons massifs. Elles mettent en œuvre des imageurs de grande taille et réclament le développement de méthodologies spécifiques par rapport aux applications médicales. Des systèmes originaux d'instrumentation et de sollicitation in situ des matériaux ont pu être conçus dans ce cadre, nourris par des collaborations étroites entre différents corps de métiers. Deux laboratoires, l'Unité Technologie des équipements agroalimentaires de l'Irstea et le Laboratoire Navier de l'Université Paris-Est, livrent leur témoignage, fruit de plusieurs années d'expertise.
- Mots-clés** **IRM, génie des procédés, transfert de matière, transfert de chaleur, matière grasse, muscle, tissus végétaux, porosité, flux, écoulement, milieux poreux, matériaux cimentaires.**
- Abstract** **MRI ventures into non-medical world**  
Food-processing and civil engineering are very particular application fields for magnetic resonance imaging (MRI). Studies mainly focus on preparation, packaging, and further evolution of products and materials in industry. They are often carried out on massive samples. They involve the use of large MRI facilities, and require the development of specific methodology as compared with routine medical studies. Stimulating close collaborations between various technical specialties, they saw the raise of original experimental setups for in situ measurements and sample solicitations. Two French laboratories, the « Technologie des équipements agroalimentaires » Unity at Irstea and « Laboratoire Navier » at Paris-Est University, report on their long standing expertise.
- Keywords** **MRI, process engineering, mater transfer, heat transfer, fat, muscle, plant tissue, porosity, flux, flow, porous media, cement based materials.**

L'agroalimentaire et le génie civil sont rarement cités spontanément lorsqu'on évoque les champs d'utilisation de la RMN et de l'IRM. Dans l'ombre de la chimie et du biomédical, ces deux domaines se sont pourtant imposés dans le paysage scientifique au cours des quinze dernières années. Il existe aujourd'hui une véritable communauté internationale qui rassemble des acteurs du monde du ciment, de la prospection pétrolière, du génie des procédés, de l'agroalimentaire et de l'agronomie autour de questions communes.

Bien qu'il soit présomptueux de vouloir décrire les contours exacts des problématiques abordées, on peut néanmoins citer la quantification de la structure de milieux microtexturés (milieux poreux, mélanges, produits biologiques), la quantification de la répartition spatiale d'un ou de plusieurs fluides dans ces mêmes milieux (selon les applications : eau, huiles), et la caractérisation des phénomènes de transport ou d'évolutions dont ils sont le siège (transfert de matière, de chaleur, déformations, écoulements). Le développement d'appareillages permettant de soumettre les échantillons à des contraintes thermiques, hydriques ou mécaniques à l'intérieur des IRM est une forte spécificité de cette communauté scientifique qui ouvre ainsi de nouveaux domaines d'applications à ces techniques en constant renouvellement.

L'imagerie par résonance magnétique est une technique non destructive et non invasive qui permet d'acquérir des images à deux, voire trois dimensions de produits biologiques, ou de produits industriels et naturels à forte teneur en eau ou en huiles (minérales, organiques ou sous forme de lipides). Le signal de chaque voxel<sup>(1)</sup> dépend des propriétés physiques de l'échantillon, comme la densité de proton, les temps de relaxation, la température, les flux de matière diffusifs ou convectifs, et des différences locales de la susceptibilité magnétique, propriétés parfois directement héritées de la microstructure du milieu. Les informations dans les images peuvent alors être manipulées et utilisées pour visualiser de manière sélective chacune de ces propriétés. Les applications de l'IRM quantitative peuvent être divisées en deux groupes. Le premier implique des applications dans lesquelles l'extraction d'une caractéristique morphologique (par exemple le volume et la surface) est le but principal ; ces mesures se basent sur le contraste dans les images. Ce type d'application n'oblige pas une connaissance détaillée des mécanismes impliqués dans le contraste.

Le deuxième groupe d'applications rassemble celles qui exploitent l'intensité du niveau de gris dans les voxels. Ces applications exigent une compréhension des mécanismes impliqués dans les changements des paramètres RMN. Par exemple, quand le temps de relaxation RMN est utilisé pour

mesurer la teneur en eau et la teneur en matière grasse, ou pour l'extraction d'informations liées aux changements de la microstructure, ou encore quand la phase du signal est utilisée pour des mesures de flux ou de la température. Un des avantages principal de l'IRM est sa capacité à être utilisée pour examiner les transferts de chaleur et de matière dans des matériaux, ce qui représente l'un des défis majeurs pour les ingénieurs en génie des procédés qui développent des outils de simulation.

## IRM et agroalimentaire

Les activités de recherche de l'équipe IRM-Food de l'Irstea à Rennes s'inscrivent dans une démarche générale dont l'objectif est d'accroître les connaissances de la structure des produits agroalimentaires, et ceci à différentes échelles et en condition de transformation. Cette démarche générale a motivé plusieurs laboratoires à mettre en place des méthodes d'imagerie, en majorité optique, pour visualiser la structure d'une matrice sous contrainte physique ou chimique et d'intégrer la dynamique des mécanismes dans une approche de modélisation. Dans ce contexte, l'Irstea a décidé d'investir fortement dans les techniques d'IRM car elles sont actuellement les seules permettant d'accéder à des informations de nature différente (chimique et physique) et à des échelles différentes (macro et méso). Toutefois, l'exploitation de ces techniques dans le domaine de l'agroalimentaire et plus généralement de l'agronomie oblige la poursuite de travaux méthodologiques en RMN et IRM afin d'identifier les paramètres RMN les plus pertinents pour sonder la structure et la composition des produits biologiques et de mettre en place les démarches permettant une mesure quantitative de ces paramètres en IRM. Ces développements méthodologiques fournissent les outils pour une étude multi-échelle des structures et des transports des produits agroalimentaires. La résolution macroscopique (entre 100  $\mu\text{m}$  et quelques millimètres) est accessible via des mesures par IRM, l'échelle microscopique (quelques microns) est accessible via des mesures de coefficients de diffusion ou de paramètres de relaxation RMN, et enfin l'échelle moléculaire est atteinte avec des mesures de paramètres de relaxation [1]. L'information contenue dans un voxel IRM est donc intrinsèquement multi-échelle.

Enrichie par le caractère non invasif des techniques, l'IRM permet par ailleurs de prendre en compte des dynamiques de transformation. En effet, l'équipe IRM-Food a mis en œuvre des dispositifs pilotes de transformation des aliments qui sont directement installés dans le tunnel de deux scanners IRM corps entier à 1,5 et 0,2 tesla. Il est ainsi possible de réaliser des mesures IRM directement au cours de la congélation/décongélation, de la cuisson, de procédé de séchage/réhydratation, et enfin de procédés biologiques tels que la fermentation. Les domaines d'applications à ce jour intéressent différentes filières industrielles agroalimentaires comme celles des fruits et légumes, des produits laitiers, des produits carnés et des produits céréaliers. Nous présentons ci-après quelques exemples de travaux RMN et IRM de chacune de ces filières.

### Application aux produits végétaux

L'IRM est une technique remarquable pour étudier et quantifier la structure des végétaux [2]. Différents travaux ont ainsi été réalisés pour l'étude du brunissement interne, du comportement au cours de la croissance, des évolutions au

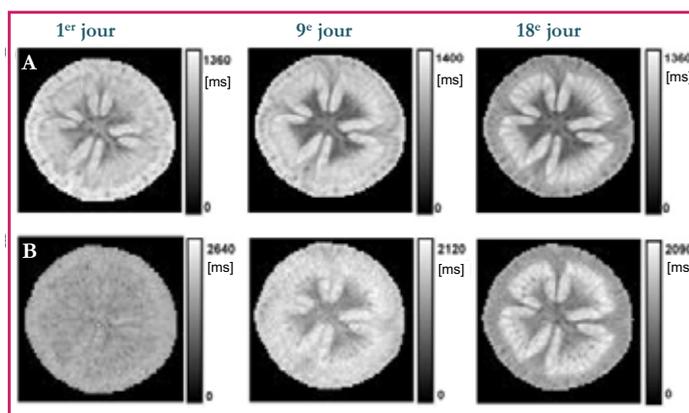


Figure 1 - Cartographie  $T_2$  et  $T_1$  de tomates au cours de la maturation après récolte (d'après [3]).

cours de la maturation ou des effets des stress hydrique et thermique. Si de nombreuses études ont été publiées dans ce domaine, l'interprétation des modifications des niveaux de gris dans les images est souvent peu validée, ce qui reste une des limites actuelles de cette approche. Toutefois, plusieurs démarches ont récemment été entreprises dans cette voie [3-4]. Ainsi, une étude au cours de la maturation des tomates a montré que le temps de relaxation de l'eau était dépendant de la taille des vacuoles de la cellule, de la composition des cellules, de la porosité intercellulaire et des caractéristiques de perméabilité des membranes cellulaires (figure 1). Le suivi au cours de la maturation a montré des trajectoires spécifiques de certains tissus en fonction du temps. Les variations du signal IRM seraient expliquées par des variations de la perméabilité membranaire et de la composition du compartiment hydrique. Par ailleurs, un protocole de la mesure de la porosité locale, qui correspond à la fraction de gaz au sein d'un voxel, a été proposé [4]. Cette méthode exploite des cartographies du temps de relaxation  $T_2$  et du temps de relaxation  $T_2^*$ . Ainsi des cartographies 2D de porosité sont accessibles directement par IRM pour des produits tels que les pommes et les tomates (figure 2). L'IRM offre de remarquables potentialités pour la quantification de la répartition des zones enrichies en gaz et l'étude des échanges gazeux au cours de la maturation ou du stockage.

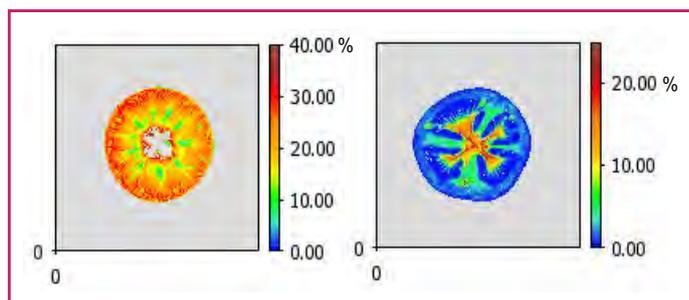


Figure 2 - Cartographie de porosité dans une pomme (à droite) et une tomate (à gauche).

L'échelle en couleur est directement exprimée en porosité (volume de gaz/volume du voxel) (d'après [4]).

### Applications aux produits carnés

Les premiers exemples de l'IRM dans le domaine des produits carnés concernent la quantification du ratio entre la matière grasse et le muscle. Les travaux ont été développés pour l'étude de la distribution des tissus adipeux dans des

carcasses de porc, mouton, volaille ou des animaux vivants. L'approche utilisée reste très comparable aux méthodes appliquées dans le domaine médical, sauf dans le cas des carcasses où les protocoles ont été adaptés afin de prendre en compte le changement de contraste entre le muscle et les tissus adipeux du fait de la température plus basse. Par la suite, les méthodes ont été étendues afin de pouvoir distinguer les tissus adipeux sous-cutanés et intermusculaires, puis pour mesurer la quantité de gras intramusculaire [5]. Enfin, soulignons les méthodes permettant d'obtenir des cartographies de la teneur en lipide développées pour des darnes de poissons [6-7]. Ces méthodes supposent des corrections d'images afin de réduire le bruit et les inhomogénéités issues des antennes en émission ou des antennes en réception. Ce type de méthode ouvre des perspectives remarquables d'utilisation de l'IRM à « haut débit ». En effet, il est possible de faire des mesures de façon simultanée sur plusieurs échantillons et les cadences alors atteintes permettent des mesures sur 500 échantillons par jour [8]. Ce type de cadence répond à des demandes dans le domaine de la génétique qui nécessitent des mesures sur de grands nombres d'échantillons, avec des coûts d'analyse identiques aux méthodes chimiques standards.

### Applications aux procédés agroalimentaires

Les procédés de transformation rencontrés dans l'industrie alimentaire ont fait l'objet de nombreuses études en IRM. Ces démarches obligent à relever plusieurs défis. Le premier d'entre eux suppose de pouvoir disposer au sein de la zone de mesure IRM de dispositifs permettant de reproduire l'opération de transformation. C'est pourquoi au niveau de l'équipe IRM-Food nous avons développé différents dispositifs. Le premier permet de réguler la température autour du produit entre - 30 et + 60 °C ou 80 °C suivant les options. Il est dédié à l'étude des procédés de congélation/décongélation, des transformations par fermentation et des opérations de maturation physique qui imposent un contrôle de la température. Un deuxième dispositif permet la réalisation d'opération de cuisson, en particulier pour les produits céréaliers. Il permet d'atteindre des températures supérieures à 200 °C et son design a été optimisé pour garantir une maîtrise des flux thermiques. Un troisième dispositif permet en plus de la gestion de la température un contrôle de la pression autour du produit. Il offre l'opportunité d'étudier conjointement les effets de la température et de la pression sur les produits. Enfin, d'autres équipements spécifiques à l'étude des mécanismes de déshydratation et de réhydratation sont disponibles. Une fois la mise en œuvre de ces dispositifs et de leur qualification, le deuxième défi est la mise en place d'un protocole IRM. En effet, les procédés sont souvent à l'origine de modifications locales et parallèles de la température, de la quantité de matière et de la structure qui compliquent de façon importante la mise en place de protocoles IRM. Or les paramètres RMN qui sont à l'origine du contraste en IRM sont sensibles à ces trois types de gradients ; la mise en place d'un protocole IRM de mesure de la teneur en eau devra ainsi intégrer les effets de la température et/ou de la structure pour éviter des biais métrologiques. La situation la plus simple est observée pour des procédés qui n'entraînent le changement que d'une seule de ces variables, par exemple dans le cas de l'égouttage de caillé de fromagerie en condition isotherme, pour lequel un protocole IRM basé sur la réalisation de cartographie de temps de relaxation a pu être développé [9]. Il permet la

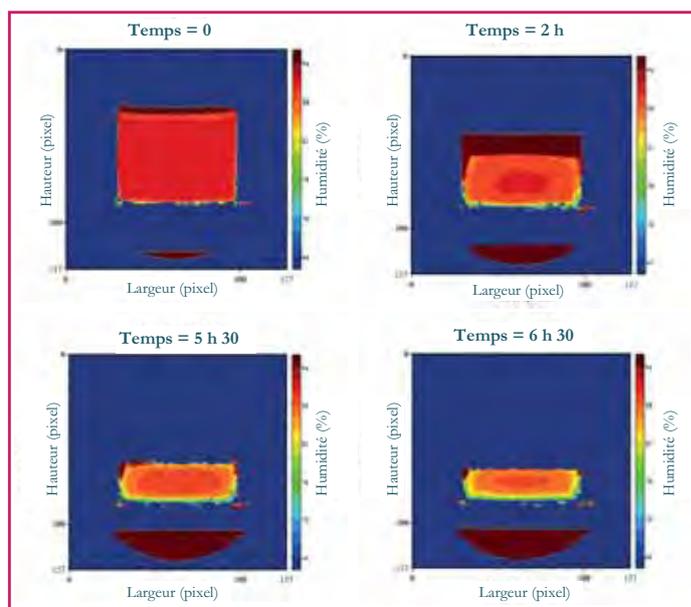


Figure 3 - Cartographie de la teneur en eau au cours de l'égouttage de caillé de fromagerie (d'après [9]).

mesure des gradients de teneur en eau avec une résolution de quelques  $\text{mm}^3$  (figure 3). Ce protocole est limité à un égouttage conduit en absence de gradient de température.

D'autres exemples concernent la mesure de la température par IRM sur la base du déplacement chimique de l'eau comme traceur [10]. Cette méthode est possible pour des produits ne présentant aucun développement de la porosité ou de formation de bulles. La présence des bulles entraînent alors des modifications locales de la susceptibilité magnétique qui vont dégrader la justesse de la mesure de température. Toutefois, dans la situation où il n'est pas possible de s'affranchir de l'action combinée de plusieurs gradients, différentes stratégies ont été élaborées. Par exemple, un protocole IRM de mesure de la quantité de glace au cours de la congélation ou de la décongélation de la pâte à pain a été élaboré malgré la présence d'un gradient de température [11]. Les auteurs ont en effet validé que l'effet de la teneur en glace sur le signal RMN était dominant sur l'effet de la température (figure 4). De même, dans le cas de la fermentation de la pâte à pain, un protocole de mesure de la porosité locale a été proposé (figure 5). Ce protocole exploite la dépendance du signal RMN à la fraction de gaz qui est corrigée de la variation locale de la température mesurée par IRM [12]. Enfin, dans le cas de la cuisson du pain, l'addition de microcapsules a été une alternative pour quantifier l'expansion locale du pain en s'affranchissant à la fois du gradient de structure et du gradient thermique [13].

### IRM et génie civil

À l'instar de l'agroalimentaire, le génie civil connaît ses propres problèmes en matière de formulation et de mise en œuvre de matériaux. Ces derniers ne se résument pas, loin s'en faut, au seul béton. Les boues de forage, les liants hydrauliques dans leur grand ensemble (ciments, plâtre, chaux), les pierres, les briques, le bois, ou même les sols naturels sont autant de matières présentes sur un chantier dont les particularités doivent être prises en compte, soit au moment d'une construction, soit au long de la vie d'un ouvrage soumis à la pollution et aux caprices

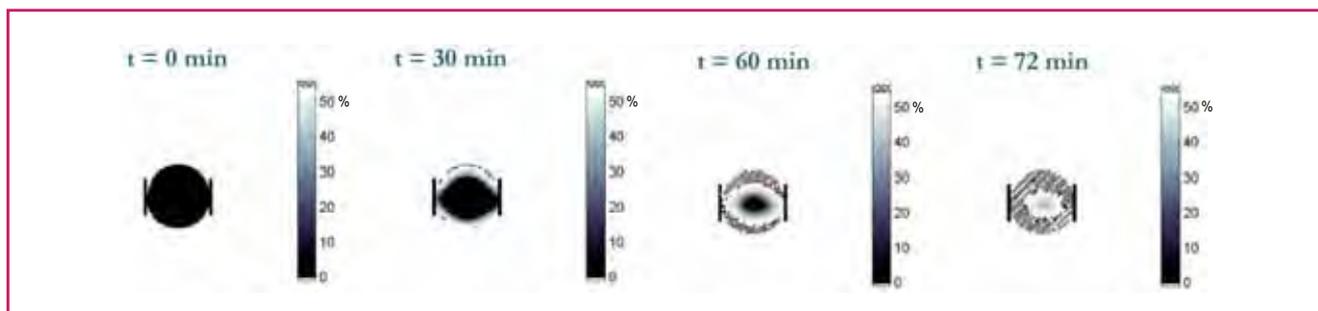


Figure 4 - Cartographie de la quantité de glace dans une pâte à pain durant la congélation (d'après [11]).

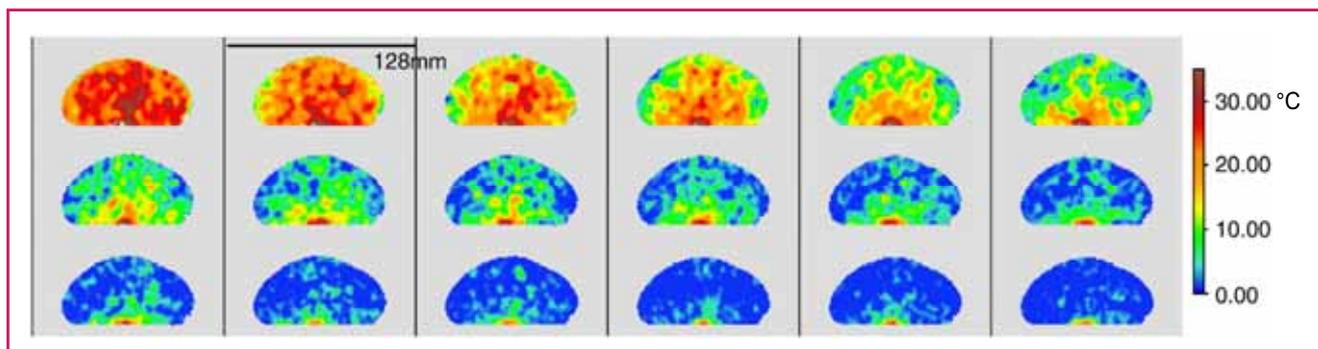


Figure 5 - Cartographie de température par IRM durant le refroidissement de pâte à pain pré-fermentée (d'après [12]).

météorologiques. Très difficiles d'étude au plan expérimental, ces milieux partagent cependant la caractéristique commune de stocker de l'eau. Qu'elle soit source de cohésion ou au contraire de dommages irréversibles, cette eau révèle également la microstructure et les évolutions internes. En permettant d'observer l'eau là où beaucoup d'autres techniques échouent, l'IRM du proton est un outil de choix pour étudier la formulation, la mise en place et la vie de ces systèmes. Équipé depuis 1999 d'un IRM bas champ de grande taille spécialement choisi pour l'étude d'échantillons fortement hétérogènes, le laboratoire Navier mène des études fondamentales et appliquées associant l'imagerie quantitative à des modélisations physiques, chimiques et mécaniques des systèmes étudiés.

### Comprendre les fluides du génie civil : la rhéologie par IRM

Les liquides rencontrés en génie civil, comme les bétons et les boues de forage, sont loin d'avoir des lois d'écoulement simples [14]. Certains, dits « rhéofluidifiants », deviennent d'autant plus fluides qu'ils sont sollicités avec énergie. D'autres, au contraire, bloquent leur écoulement sous l'effet de contraintes trop rapides. À cela s'ajoutent des effets de seuil, qui empêchent le matériau de s'écouler s'il n'est pas soumis à un effort suffisant, et des effets mémoires, qui modifient les propriétés d'écoulement en fonction des sollicitations antérieures. La caractérisation de ces propriétés, par ailleurs partagées par un grand nombre de produits industriels et agroalimentaires, est un enjeu non seulement pour caractériser la qualité des produits (obtention de bétons très liquides pour le ragréage ou le coulage de dalles, boues capables de prendre en gel pour éviter les effondrements de forage...), mais également pour optimiser les dispositifs

industriels (malaxeurs, pompes, extrudeurs...) destinés à les manipuler.

Les moyens traditionnels de rhéologie sont souvent mis à mal devant des comportements trop complexes. Le recours à des méthodes de tomographie permettant de mesurer les champs de vitesse au sein des écoulements a révolutionné les pratiques expérimentales : les principales sont certainement la vélocimétrie par imagerie de particules (PIV), la vélocimétrie ultrasonore, et l'IRM [15]. Particulièrement bien adaptée aux mélanges à base d'eau ou d'huile, l'IRM du proton peut travailler sur les systèmes opaques, et à l'inverse des méthodes ultrasonores, est peu gênée par les milieux très hétérogènes. C'est notamment la seule technique à ce jour permettant des mesures dans un ciment frais. En observant le détail des champs de vitesse à l'intérieur des cellules rhéologiques, les rhéologues sondent au mieux toutes les anomalies dans les écoulements et peuvent, avec un petit nombre d'expériences, recueillir sur chaque fluide une information d'une extraordinaire richesse, qui permet de déterminer un comportement sur de larges plages de sollicitations, ou directement de retoucher les modèles théoriques qui servent aux analyses [16-17].

L'IRM du laboratoire Navier est équipée de plusieurs machines d'essais permettant de créer des écoulements au sein de l'aimant. Elles proposent les géométries traditionnelles « Couette » et cône plan, bien connues des rhéologues, qui cisailent un fluide entre deux surfaces en mouvement (figure 6), mais également d'autres moins courantes telles que la seringue d'extrusion, en passe d'acquiescer grâce aux mesures par IRM, le statut de nouveau moyen de caractérisation [18] (figure 7). Une particularité du laboratoire est la taille des cellules de rhéométrie et des géométries d'écoulement, de plusieurs centimètres, qui autorise l'étude d'épaisse couches de fluides contenant de grosses particules solides ou même des matériaux en grains.

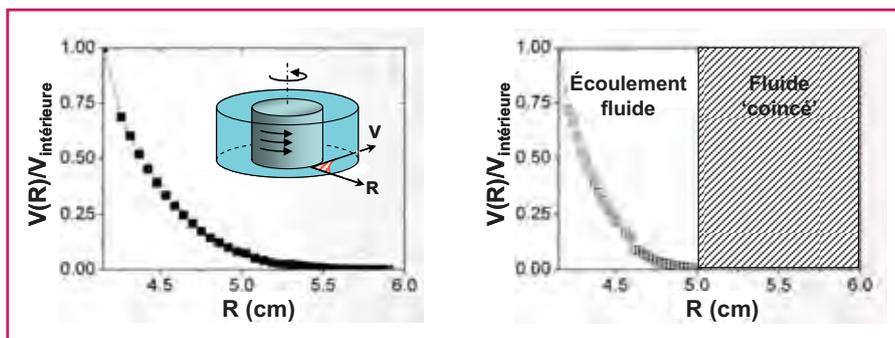


Figure 6 - Rhéométrie par IRM d'un fluide cisailé entre deux surfaces cylindriques (géométrie Couette).

À gauche : profil d'écoulement dans un liquide complètement cisailé. À droite : le cas du fluide à seuil, dont toute une zone refuse de s'écouler (Laboratoire Navier, DR).

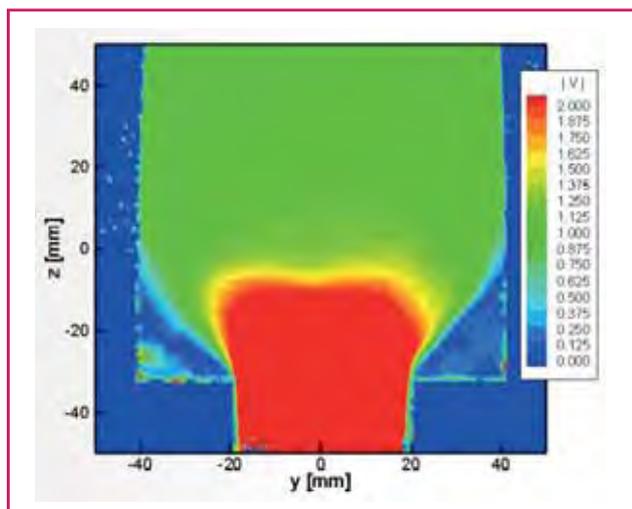


Figure 7 - Écoulement d'un fluide à seuil entrant dans une filière d'extrusion (vitesses en  $\mu\text{m/s}$ ) (Laboratoire Navier, DR).

La configuration standard des IRM (en termes d'aimant, d'antennes et de bobines de gradients) suffit à pratiquer des mesures de vitesse ou de l'imagerie sur des fluides en mouvements. Certaines mesures sont même aujourd'hui praticables en routine par des personnes non spécialistes en RMN. Il n'en reste pas moins que la mise en place de ce type d'expérience requiert une collaboration de longue haleine entre plusieurs spécialités :

- Tout d'abord, la conception en bureau d'étude et la réalisation en atelier de ces appareils, qui doivent garantir la précision géométrique, la rigidité et la résistance mécanique indispensables à la qualité des essais, sans sacrifier aux contraintes de compatibilité électromagnétique.
- La définition du protocole IRM ensuite, et le traitement de données pour la reconstruction des champs de vitesse, qui doit souvent être redéfini pour chaque famille d'échantillons et constitue un terrain permanent d'innovations. Les progrès à ce niveau ont été très significatifs, avec l'obtention en quelques années d'un gain en sensibilité d'un facteur 100 et une gamme de vitesse aujourd'hui mesurables allant de la dizaine de microns à plusieurs centimètres par seconde [19].
- Enfin, le long apprentissage de ce nouvel outil par les utilisateurs : c'est en effet toute une nouvelle culture expérimentale que les rhéologues doivent développer, depuis la manière d'envisager les essais jusqu'à la définition des méthodes d'analyse de données.

## Dosage et répartition de l'eau dans les matériaux poreux

Comme le sol et les pâtes cimentaires, les matériaux du génie civil sont poreux (gamme poreuse étendue sur plusieurs décades) et leurs propriétés dépendent à la fois de la quantité d'eau qu'ils contiennent, de sa répartition spatiale, mais également de sa distribution au sein des pores de la microstructure, et ce dans un échantillon « statique » ou bien dans lequel le fluide est en mouvement. L'information recherchée va de la teneur en eau au transfert de fluide, en passant par la physico-chimie de la phase liquide, ou encore la microstructure et la distribution de tailles de pores. Cela demande des méthodologies adaptées à chaque couple échantillon-investigation.

L'un des atouts d'une IRM est la possibilité de combiner l'imagerie (localisation, quantité d'eau) et la spectroscopie (physico-chimie du milieu). Toutes les caractéristiques de ces matériaux entraînent des difficultés qui sont essentiellement liées justement à la nature poreuse amenant l'alternance d'interface eau/air/matériau, à la teneur en eau parfois très faible et enfin à la présence d'espèces paramagnétiques... Les temps de relaxation RMN sont alors très courts, rendant inadaptées les méthodes d'imagerie classiques utilisées pour le biomédical. Les matériaux cimentaires et le sol réclament ainsi des méthodes spécifiques dont l'objectif général est d'adapter les protocoles d'acquisition à la relaxation rapide de ce type de matériaux.

La plupart des phénomènes étudiés (imbibition, séchage, injection...) sont unidirectionnels. Les sources de contraste dans ces matériaux sont davantage liées à ce gradient unidirectionnel car ces matériaux présentent peu de sources de contraste naturel. L'imagerie 2D ou 3D permet une appréciation qualitative des échantillons (voir figures 8 et 9). L'imagerie 1D est souvent retenue car elle permet de réduire le temps total d'une mesure (quelques secondes à la dizaine de minutes suivant les besoins) et de minimiser la perte de signal par les effets de la relaxation, améliorant nettement la quantité des mesures de teneur en eau. Le paramétrage est essentiellement un compromis à trouver entre la résolution, la sensibilité (le rapport signal sur bruit), la durée acceptable de l'expérience et la cinétique du phénomène à observer.

Une autre méthode concerne l'exploitation de la relaxation. À l'inverse des milieux homogènes dont le signal

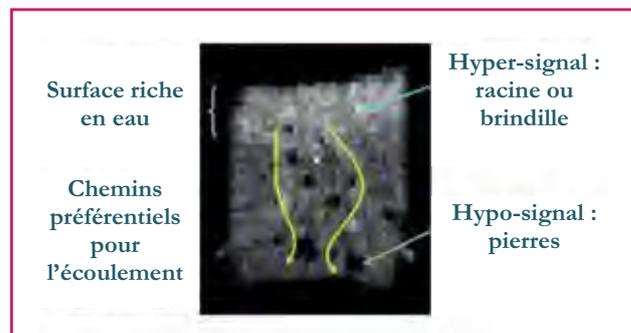


Figure 8 - Échantillon de sol massif, prélevé en plein champ. Plus la nuance de gris est claire, plus le matériau est riche en eau (Laboratoire Navier, DR).

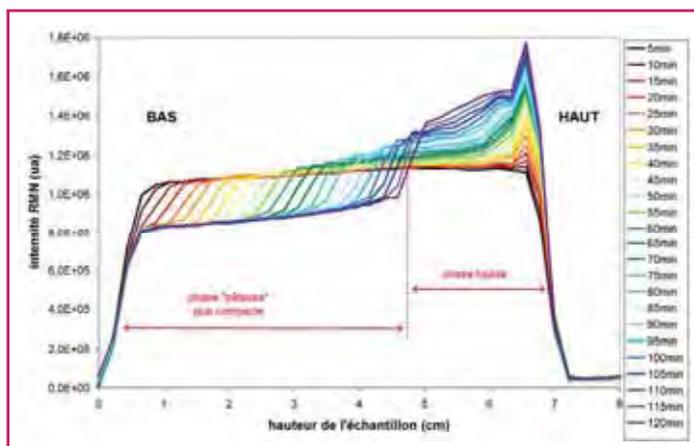


Figure 9 - Échantillon de pâte de ciment gris avant prise.

L'IRM met ici en évidence une sédimentation due à un excès de superplastifiant, ainsi que le ressuage<sup>(2)</sup> d'une mince couche d'eau claire à la face supérieure de l'échantillon (petit pic tout à droite). Les profils sont acquis avec un intervalle de cinq minutes et une résolution de 1 mm (Laboratoire Navier, DR).

relaxe souvent de manière mono-exponentielle, nombre de milieux poreux exhibent une relaxation multi-exponentielle, fruit de la superposition de plusieurs composantes. La distribution des temps de relaxation, extraite par traitement numérique des données, peut être reliée à la distribution de tailles de pores (ou plus précisément au rapport surface/volume local à l'échelle microscopique du matériau). Elle constitue un moyen non destructif pour suivre la structuration de milieux poreux (matériaux cimentaires, sol).

Dans les matériaux cimentaires, l'eau est un élément essentiel, nécessaire aux réactions d'hydratation et plus généralement à l'ensemble du processus de prise. La RMN de l'eau permet dès l'étape du gâchage de surveiller les déstabilisations dues à d'éventuelles erreurs de formulation (figure 9), ou de mettre en évidence l'organisation microscopique immédiate du produit (figure 10), en relation avec les additifs utilisés. Elle se révèle ensuite un indicateur sensible des étapes successives du processus de prise (figure 11) [20]. Elle caractérise enfin la texture poreuse très dispersée du matériau pris (du nm au mm) [21]. Ces pores contiendront ou non de l'eau suivant leur taille. La teneur en eau et la taille des pores ont un impact sur la résistance des matériaux. Elles ont également un impact sur les propriétés de durabilité car les pores et l'eau qu'ils contiennent sont les vecteurs des

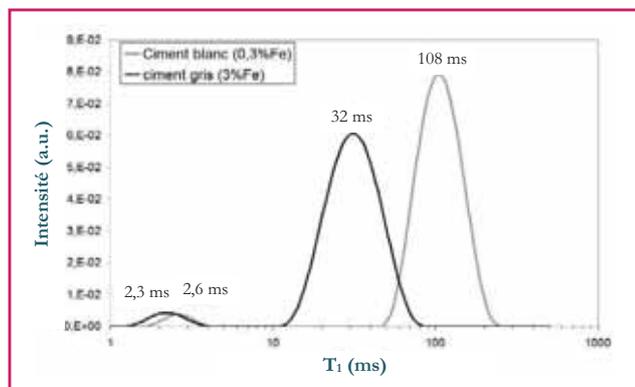


Figure 10 - Structuration interne de pâtes de ciment avant prise.

Les distributions des temps de relaxation  $T_1$  présentent deux composantes : une de temps élevé et une de valeur plus faible correspondant respectivement à l'eau libre et à l'eau piégée dans les floccs de particules cimentaires (Laboratoire Navier, DR).

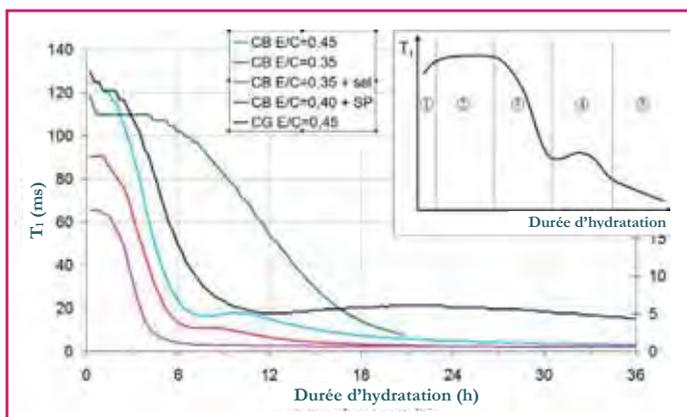


Figure 11 - Suivi de la prise grâce à l'évolution de  $T_1$  pour des pâtes de ciment blanc (CB) ou gris (CG) avec différents rapports eau sur ciment (E/C) et avec l'ajout de sel ou de superplastifiant (SP).

On peut identifier les différentes phases de la prise : 1. Préinduction. Formation d'ettringite. 2. Induction. Hydratation ralentie. 3. Accélération. Prise. 4. Décélération. Réaction d'hydratation contrôlée par la diffusion. 5. Diffusion lente. Hydratation lente (Laboratoire Navier, DR).

éléments dégradants (carbonatation du béton, attaque des chlorures...). La RMN est un moyen pratique de bien appréhender ces aspects.

Des problématiques similaires se retrouvent aujourd'hui dans l'étude des sols. Le sol est un milieu poreux avec des pores de différentes tailles (du nm au mm). Caractériser les pores remplis d'eau pour différents états de saturation [22], étudier le séchage [23] et identifier les pores responsables du transfert d'eau est essentiel pour l'étude des transferts de polluants (métaux ou bactéries) (figures 8 et 12). La méthodologie développée pour le ciment trouve dans ces systèmes un nouveau terrain d'applications.

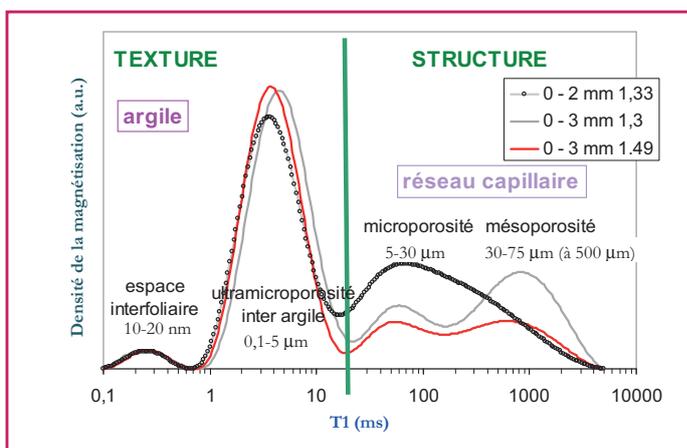


Figure 12 - Distribution de  $T_1$  d'un sol prélevé et restructuré (tamisage 0-2 mm ou 0-3 mm) et tassé avec différentes densités (de 1,3 à 1,49).

Les échantillons sont quasiment saturés d'eau, ce qui permet de distinguer deux domaines : la texture et la structure du sol (Laboratoire Navier, DR).

## Notes et références

- (1) Le voxel (contraction de « volumetric pixel ») est un pixel en 3D. Il est utilisé pour la représentation d'espaces 3D, en physique ou en imagerie médicale 3D, par traitement numérique de coupes 2D issues des machines d'investigation (scanner, IRM ...).
  - (2) Ressuage : remontée d'eau à la surface d'un coulis de ciment, d'un mortier ou d'un béton après la mise en place et le compactage.
- [1] Mariette F., Investigations of food colloids by NMR and MRI, Curr. Op. in Colloid & Interface Science, **2009**, 14(3), p. 203.

- [2] Van As H., Scheenen T., Vergeldt F.J., MRI of intact plants, *Photosynthesis Research*, **2009**, 102(2-3), p. 213.
- [3] Musse M., Quellec S., Cambert M., Devaux M.-F., Lahaye M., Mariette F., Monitoring the postharvest ripening of tomato fruit using quantitative MRI and NMR relaxometry, *Postharvest Biol. Technol.*, **2009**, 53(1-2), p. 22.
- [4] Musse M., De Guio F., Quellec S., Cambert M., Challos S., Davenel A., Quantification of microporosity in fruit by MRI at various magnetic fields: comparison with X-ray microtomography, *Magnetic Resonance Imaging*, **2010**, 28(10), p. 1525.
- [5] Monziols M., Collewet G., Bonneau M., Mariette F., Davenel A., Kouba M., Quantification of muscle, subcutaneous fat and intermuscular fat in pig carcasses and cuts by magnetic resonance imaging, *Meat Science*, **2006**, 72(1), p. 146.
- [6] Collewet G., Idier J., Compensation of MRI T1-weighted spin-echo images for radio-frequency inhomogeneities, *EUSIPCO*, Florence (Italie), *EURASIP*, **2006**.
- [7] Collewet G., Quellec S., Cambert M., Davenel A., Measurement of lipid content in fish: effect of freezing-thawing and of the images inhomogeneities correction, 10<sup>th</sup> Int. Conf. on the applications of magnetic resonance in food science, Clermont Ferrand, **2010**.
- [8] Davenel A., Bazin C., Quellec S., Challos S., Gispert M., Mercat M.-J., High throughput determination of intramuscular fat content by magnetic resonance imaging, *Journées recherche Porcine*, **2012**, 44, p. 2.
- [9] Mariette F., NMR imaging of dairy products, *Modern Magnetic Resonance, Part 3: Applications in Materials Science and Food Science*, G. Webb (ed), Springer, **2006**, p. 1801.
- [10] Nott K.P., Hall L.D., Bows J.R., Hale M., Patrick M.L., Three-dimensional MRI mapping of microwave induced heating patterns, *Int. J. of Food Science and Technology*, **1999**, 34(4), p. 305.
- [11] Lucas T., Grenier A., Collewet G., Davenel A., NMR imaging of dough, *Modern Magnetic Resonance, Part 3: Applications in Materials Science and Food Science*, G. Webb (ed), Springer, **2006**, p. 1807.
- [12] Lucas T., Musse M., Bornert M., Davenel A., Quellec S., Temperature mapping in bread dough using SE and GE two-point MRI methods: experimental and theoretical estimation of uncertainty, *Magnetic Resonance Imaging*, **2012**, 30(3), p. 431.
- [13] Wagner M., Quellec S., Trystram G., Lucas T., MRI evaluation of local expansion in bread crumb during baking, *Journal of Cereal Science*, **2008**, 48(1), p. 213.
- [14] Coussot P., *Rheometry of pastes, suspensions, and granular materials*, Wiley, **2005**.
- [15] Callaghan P.T., Rheo-NMR: nuclear magnetic resonance and the rheology of complex fluids, *Rep. Prog. Phys.*, **1999**, 62, p. 599.
- [16] Ovarlez G., Rodts S., Chateau X., Coussot P., Phenomenology and physical origin of shear localization and shear banding in complex fluids, *Rheol. Acta*, **2009**, 48, p. 831.
- [17] Bonn D., Rodts S., Groenink M., Rafai S., Shahzadeh-Bonn N., Coussot P., Some applications of magnetic resonance imaging in fluid mechanics: Complex flows and complex fluids, *Annual Review of Fluid Mechanics*, **2008**, 40, p. 209.
- [18] Rodts S., Boujlel J., Rabideau B.D., Ovarlez G., Roussel N., Moucheron P., Lanos C., Bertrand F., Coussot P., Solid-liquid transition and rejuvenation similarities in complex flows of thixotropic materials studied by NMR and MRI, *Phys. Review E*, **2010**, 81, p. 021402.
- [19] Rodts S., Bertrand F., Jarny S., Poullain P., Moucheron P., Développements récents dans l'application de l'IRM à la rhéologie et à la mécanique des fluides, *C.R. Acad. Sci. Chimie*, **2004**, 7, p. 275.
- [20] Faure P.F., Rodts S., Proton NMR relaxation as a probe for setting cement pastes, *Magnetic Resonance Imaging*, **2008**, 26, p. 1183.
- [21] Faure P.F., Caré S., Magat J., Chaussadent T., Drying effect on cement paste porosity at early age, observed by NMR methods, *Construction and Building Materials*, **2012**, p. 496.
- [22] Faure P.F., Michel E., Sammartino S., Doussan C., Magnetic resonance imaging and relaxometry as tools to investigate water distribution in soils, *MRPM 10*, AIP 1330, **2011**.
- [23] Faure P.F., Coussot P., Drying of a model soil, *Phys. Rev. E*, **2010**, 82, p. 036303.



F. Mariette



A. Davenel



M. Musse



G. Collewet



T. Lucas



S. Rodts



P. Faure



P. Moucheron

**François Mariette** (auteur correspondant) et **Armel Davenel** sont directeurs de recherche, **Maja Musse**, chargée de recherche, **Guylaine Collewet**, ingénieure de recherche, **Tiphaine Lucas**, ingénieur en chef des Ponts, Eaux et Forêts, à l'Irstea, Université européenne de Bretagne\*.

**Stéphane Rodts** est ingénieur en chef des Ponts, Eaux et Forêts, **Paméla Faure** et **Pascal Moucheron** sont chargés de recherche, au Laboratoire Navier, Champs-sur-Marne\*\*.

\* Irstea, UR TERE, 17 avenue de Cucillé, CS 64427, Université européenne de Bretagne, F-35044 Rennes.

Courriel : francois.mariette@irstea.fr

\*\* Laboratoire Navier, UMR 8205 IFSTTAR-EPPT-CNRS, 2 allée Kepler, F-77420 Champs-sur-Marne.

Courriels : stephane.rodts@ifsttar.fr, pamelaf.aure@ifsttar.fr, pascal.moucheron@ifsttar.fr

**Ressources nationales de chimie**  
[www.educnet.education.fr/rnchimie](http://www.educnet.education.fr/rnchimie)

Illustration : Xavier Bobail

RNChimie (Ressources nationales de chimie) est un site destiné aux enseignants des lycées généraux et technologiques, des BTS et des CPGE. Vous y trouverez plus de 600 protocoles de travaux pratiques, des recommandations pédagogiques, des cours, des exercices, des présentations sous forme de diaporamas téléchargeables, des fiches techniques de TP, des informations relatives à la sécurité mais aussi de l'histoire des sciences, des informations et des données sur les techniques spectroscopiques et chromatographiques dont des données expérimentales directement utilisables. Vous y trouverez également des cours, TD et applications sur les plans d'expérience (mathématiques), des cours et exercices de génie chimique, des exemples de TP basés sur la démarche d'investigation.

**RNChimie, c'est 600 pages web,  
 700 fichiers doc/zip, 930 documents pdf  
 et des dizaines de diaporamas à votre disposition !**

# Polarisation dynamique nucléaire à haut champ magnétique et résonance paramagnétique électronique

Gaël De Paëpe et Serge Gambarelli

## Résumé

Cet article met en lumière deux méthodes de spectroscopie magnétique qui se sont fortement développées récemment. Elles ont en commun d'utiliser le moment magnétique associé au spin électronique qui est significativement plus grand que ceux associés aux spins nucléaires. Ainsi, à température et champ magnétique donnés, la polarisation des électrons est bien plus grande que celles des noyaux. Cette propriété est utilisée en polarisation dynamique nucléaire (DNP) pour augmenter de plusieurs ordres de grandeur la sensibilité de détection des spins nucléaires. Dans cet article est décrit notamment comment le développement récent de sources micro-ondes haute fréquence et haute puissance et de sondes DNP compatibles avec la rotation pneumatique de l'échantillon (« à l'angle magique ») ont permis d'étendre cette technique d'hyperpolarisation jusqu'aux champs magnétiques les plus intenses actuellement accessibles. Puis est montré comment l'utilisation d'un moment magnétique électronique important permet aussi de mesurer des distances longues dans des systèmes désordonnés par résonance paramagnétique électronique impulsionnelle, ce principe consistant à mesurer l'interaction dipolaire entre deux spins électroniques grâce à une séquence appelée DEER. Il est ainsi possible de mesurer des distances allant jusqu'à 80 Å dans des systèmes désordonnés. Les applications sont nombreuses en chimie et biologie.

## Mots-clés

**Polarisation dynamique nucléaire, RMN, résonance paramagnétique électronique, rotation à l'angle magique, mesure de distance.**

## Abstract

### High field dynamic nuclear polarization and electron paramagnetic resonance

This article relates two recently developed magnetic spectroscopy methods. Both methods use the electron magnetic moment, which is significantly more intense than the more commonly used nuclear magnetic moment. This is because, at a given temperature and magnetic field, electrons are much more strongly polarised than nuclei. This property is used in dynamic nuclear polarisation (DNP) to increase the sensitivity of nuclear spin detection by several orders of magnitude. This article first describes how the recent development of high-frequency microwave sources and DNP probes compatible with pneumatic rotation of the sample ("magic angle spinning") have extended this hyperpolarisation technique to the most intense magnetic fields currently available (> 10 tesla). The second part shows how a strong electron magnetic moment allows to measure long distances in disordered systems by pulsed electron paramagnetic resonance. By measuring the dipolar interaction between two electron spins, using a sequence known as DEER, it becomes possible to measure distances up to 80 Å in disordered systems. This technique has many applications in chemistry and biology.

## Keywords

**Dynamic nuclear polarisation, NMR, electron paramagnetic resonance, magic-angle spinning, distance measurement.**

Cet article présente les avancées récentes de deux sous-domaines de la résonance magnétique : la polarisation dynamique nucléaire (DNP) et la mesure de distance par résonance paramagnétique électronique (RPE). Ces deux domaines ont en commun d'utiliser les propriétés du spin de l'électron et des systèmes paramagnétiques pour réaliser des expériences performantes.

Ces techniques reposent sur l'utilisation du moment magnétique associé au spin électronique (rapport gyromagnétique) significativement plus grand que ceux associés aux spins nucléaires. Il est instructif à cet égard de comparer quelques grandeurs dans le cas d'un électron et d'un proton ( $\gamma_e = 660 \gamma_H$ ). L'énergie Zeeman (interaction entre un champ magnétique et un spin) qui est proportionnelle au rapport gyromagnétique est 660 fois plus grande pour un spin électronique que pour le spin du proton. En conséquence, la polarisation (différence de population à température finie entre les niveaux) sera, à température et champ magnétique

statique donnés, plus importante en RPE qu'en RMN. C'est cet effet qui est utilisé en DNP pour augmenter la sensibilité d'une expérience de RMN.

L'interaction dipolaire entre deux spins électroniques dépend, quant à elle, du carré du rapport gyromagnétique. Toute chose égale par ailleurs, cette interaction sera donc  $(660)^2 = 436\,000$  fois plus intense que pour deux protons. Elle pourra donc être mesurée à plus longue distance : c'est l'effet exploité dans la mesure des longues distances en RPE.

## La polarisation dynamique nucléaire (DNP)

Le phénomène de DNP est loin d'être nouveau puisqu'il fut mis en évidence au début des années 1950 à des champs magnétiques de l'ordre de 0,03 tesla (T) [1-3]. Malgré plusieurs décennies de développements méthodologiques visant à améliorer la description et la compréhension du

phénomène [4-6], la technique de DNP ne s'est cependant pas naturellement imposée comme un outil de choix pour le chimiste ou le biologiste. De multiples raisons l'expliquent : l'accès à des champs magnétiques de plus en plus intenses (5-23 T), le développement de la RMN impulsionnelle multidimensionnelle par transformée de Fourier, la réduction du bruit thermique de mesure, etc. ont permis de gagner plusieurs ordres de grandeur en sensibilité et d'accéder à une résolution suffisante pour accompagner de nombreux développements dans le domaine de la chimie et de la biologie. L'efficacité de la DNP est, quant à elle, approximativement inversement proportionnelle au champ magnétique appliqué et donc potentiellement inadaptée au champ magnétique intense. Son application à des champs magnétiques compatibles avec des expériences RMN haute résolution (*i.e.* > 5 T) était donc loin d'être évidente, et comme nous le verrons par la suite, a nécessité de nombreux développements conceptuels et instrumentaux [7-9].

### Principes généraux

En 1953, Overhauser proposa pour la première fois de saturer les transitions de spins électroniques dans les métaux afin d'augmenter la polarisation des spins nucléaires [2]. Cette idée fut rapidement vérifiée par Carver and Slichter (1953) sur du lithium métallique dans un champ magnétique de 0,03 T [1]. L'augmentation de polarisation observée correspond à un transfert d'aimantation entre les spins électroniques et les spins nucléaires. Ces travaux constituent le fondement de la DNP. Ils furent rapidement étendus aux diélectriques solides par Abragam *et coll.*, avec l'introduction de « l'effet solide » en 1959 [6]. Dans les années 1960, plusieurs groupes décrivent le phénomène de DNP pour des systèmes constitués de deux spins électroniques couplés et un spin nucléaire (« cross effect »). Par la suite, Goldman *et coll.* étendent la théorie de la DNP à des systèmes contenant plusieurs spins électroniques et nucléaires couplés en introduisant le concept de « température de spin ». Plus tard, dans les années 80,

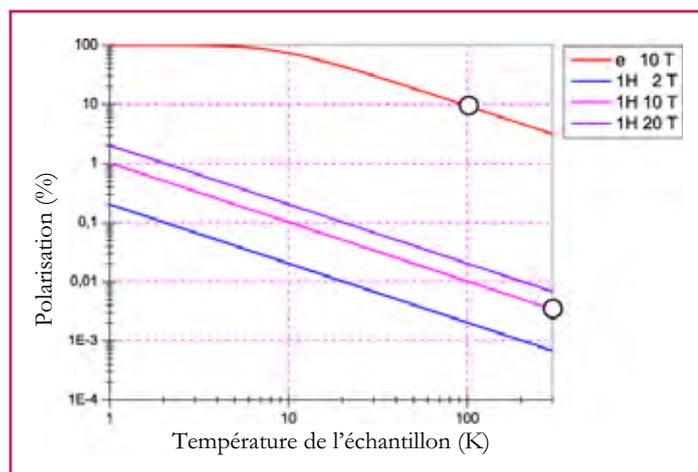


Figure 1 - Diagramme montrant la polarisation électronique et nucléaire en fonction de la température pour différentes valeurs de champs magnétiques.

Pour des températures supérieures à 1 K, la polarisation est proportionnelle au champ magnétique appliqué, au rapport gyromagnétique du spin considéré ( $\gamma_e = 660 \gamma_n$ ), et inversement proportionnelle à la température. La polarisation nucléaire disponible pour réaliser une expérience RMN est typiquement de l'ordre de  $10^{-5}$  à température ambiante, même aux champs magnétiques les plus intenses couramment accessibles (*i.e.* 23 T). La polarisation électronique est quant à elle largement supérieure, typiquement de trois ordres de grandeur.

Wind, Yannoni, Schaeffer *et coll.* réalisèrent les premières expériences de DNP (à 1,4 T) en phase solide avec rotation de l'échantillon à l'angle magique, dans le but de minimiser les largeurs de raies à mi-hauteur. À la même période, la DNP en phase liquide (basée sur l'effet Overhauser) fut étudiée en détail pour un champ magnétique inférieur à 1 T. Le résultat principal est que l'efficacité de la DNP décroît quand la fréquence d'irradiation micro-onde est supérieure à l'inverse du temps de corrélation de rotation ou de translation.

L'utilisation de la DNP à des champs magnétiques plus intenses (compatibles avec les champs magnétiques couramment utilisés de nos jours) s'est révélée difficile en raison de l'absence de source micro-ondes capable de réaliser une irradiation *in situ* de l'échantillon à des fréquences supérieures à 100 GHz, ou de mécanismes DNP efficaces dans ce régime.

La première solution à ce problème, développée par Dorn *et coll.*, a consisté à polariser les échantillons à bas champ magnétique (< 1 T), puis à transférer l'échantillon à haut champ magnétique pour réaliser l'expérience RMN. Ce principe de DNP à champ variable a été optimisé au cours de la dernière décennie en minimisant les pertes pendant le transfert : des dispositifs de transfert de plus en plus efficaces ont été développés, ainsi que des aimants à deux centres pour minimiser le trajet à parcourir. La valeur du champ magnétique résiduel pendant le transfert est aussi mieux contrôlée. Plus généralement, ce type d'expérience DNP est désormais appelé « DNP par dissolution » puisque la plupart des implémentations consistent à polariser l'échantillon à ultra basse température, puis à enregistrer les données par RMN liquide à plus haut champ magnétique.

La deuxième approche, basée sur une irradiation *in situ* de l'échantillon à haut champ magnétique, a nécessité le développement de sources micro-ondes haute fréquence et haute puissance et de sondes DNP avec rotation pneumatique de l'échantillon (« à l'angle magique », MAS) capables d'assurer une température cryogénique (*i.e.* ~ 90-100 K) sur l'ensemble de l'échantillon mesuré [7-9].

### La DNP à l'état solide *in situ* : la renaissance

#### Défis instrumentaux majeurs

Le développement de la DNP à haut champ magnétique a nécessité de relever plusieurs défis instrumentaux majeurs comme le développement de sources micro-ondes haute fréquence (~ 100-500 GHz) et haute puissance (1-50 W) et de sondes RMN capables de réaliser une irradiation *in situ* de l'échantillon aux fréquences de Larmor des électrons et des noyaux, tout en préservant la rotation pneumatique de l'échantillon à des fréquences de l'ordre de la dizaine de kHz. Le champ radiofréquence est généralement généré à l'aide d'une bobine solénoïde dont la géométrie est directement compatible avec la rotation pneumatique de l'échantillon (voir figure 2). Cependant, la bobine (1 à 5 mm de diamètre) et les paliers pour la rotation MAS ont jusqu'à présent limité la conception de cavité résonante pour les micro-ondes. Ceci contraste avec les cavités utilisées en RPE qui atteignent typiquement des facteurs Q de l'ordre de 1 000, alors qu'on considère qu'une sonde DNP sans cavité résonante a un facteur Q proche de l'unité. Sachant que le champ  $B_1$  créé et la puissance de la source sont reliés par

$B_1 \sim \sqrt{PQ}$ , il est alors facile de comprendre que si les spectromètres RPE peuvent fonctionner avec des sources micro-ondes basse puissance (de l'ordre d'une dizaine

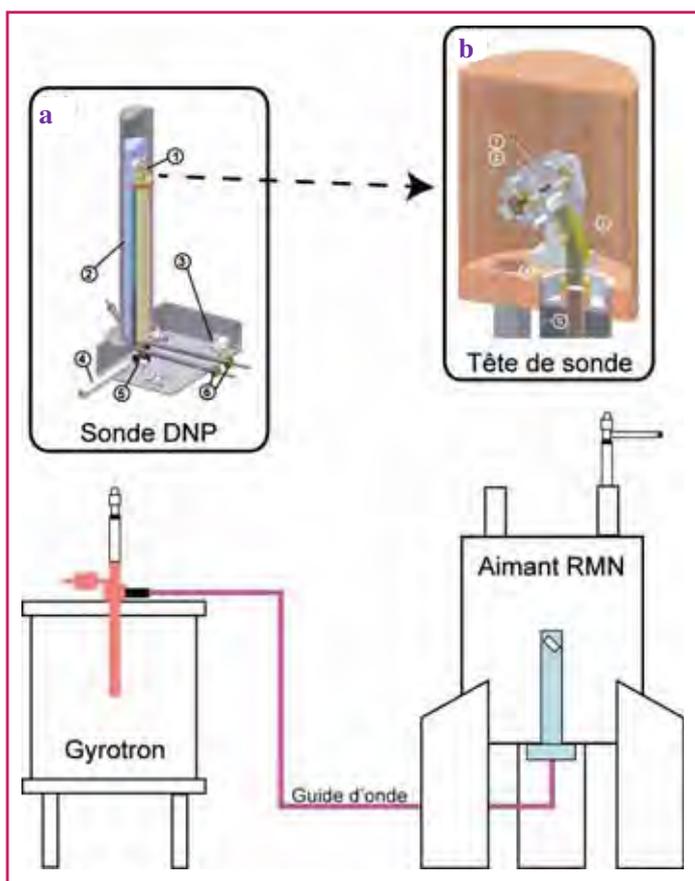


Figure 2 - Schéma de principe d'une expérience de polarisation dynamique nucléaire à haut champ magnétique comprenant un aimant haute résolution, une source micro-ondes haute fréquence et haute puissance.

(a) Sonde RMN-DNP cryogénique : 1. tête de sonde ; 2. section du Dewar sous vide ; 3. capacités radiofréquences (RF) d'accord positionnées dans le bas de la sonde ; 4. guide d'onde corrugué provenant du gyrotron ; 5. miroirs plans et concaves permettant de diriger les micro-ondes dans le guide d'onde vertical ; 6. lignes de transferts sous vide pour les voies de fluides cryogéniques (« bearing » et « drive »). (b) Tête de sonde pour rotors de 4 mm de diamètre : 1. ensemble stator ; 2. porte-échantillon (rotor) à l'intérieur de la bobine RF inclinée à l'angle magique ; 3. miroir en métal ; 4. le conducteur interne de la ligne à transmission est corrugué à l'intérieur et est utilisé comme guide d'onde ; 5. le conducteur extérieur de la ligne à transmission est en acier inoxydable pour l'isolation thermique mais est plaqué avec de l'argent et de l'or pour permettre une bonne conductivité thermique. D'après [8] avec permission.

de mW), les sondes DNP développées au Massachusetts Institute of Technology (MIT) – et désormais disponibles commercialement – nécessitent quant à elles le développement de sources micro-ondes haute puissance.

Avant l'utilisation des gyrotrons, il manquait une source haute puissance capable d'opérer entre 100 et 600 GHz, et c'est ce qui a limité le développement de la DNP aux champs magnétiques supérieurs à 5 T. Dans un gyrotron, un faisceau d'électrons est lancé d'une cathode annulaire et accéléré vers une anode en présence d'un champ magnétique intense. Le profil du champ magnétique est conçu pour comprimer le faisceau lors de son passage dans le tube à vide en direction de la cavité résonante qui convertit l'énergie cinétique transverse du mouvement hélicoïdal des électrons en micro-ondes. Les gyrotrons sont appropriés pour la polarisation dynamique nucléaire à haut champ magnétique puisque leur fonctionnement repose sur l'utilisation de structures millimétriques à onde rapide.

Les gyrotrons emploient un résonateur qui peut avoir des dimensions bien plus importantes que la longueur d'onde concernée, permettant de produire une onde haute puissance sur une grande durée. Des gyrotrons capables de générer une irradiation continue à 140, 250 et 460 GHz ont été construits pour équiper des spectromètres DNP. Ces sources, aujourd'hui accessibles, permettent de réaliser des expériences de DNP *in situ* à haut champ magnétique. Dans les expériences de DNP, les micro-ondes sont introduites soit selon l'axe de rotation du rotor, soit selon un axe perpendiculaire (voir figure 2).

### Transfert d'aimantation par DNP et diffusion de spin nucléaire

**Principe général :** le but d'une expérience de DNP solide est d'hyperpolariser les spins nucléaires d'un système moléculaire afin de l'étudier grâce aux outils classiques de RMN du solide. Les expériences de DNP décrites ici reposent essentiellement sur un transfert d'aimantation entre les électrons non appariés introduits dans l'échantillon (*i.e.* agents polarisants) et les noyaux voisins environnants (*e.g.* protons), le tout relayé par de la « diffusion de spin nucléaire » afin de polariser le système d'intérêt. L'efficacité DNP est d'autant plus grande que la répartition en agents polarisants est uniforme et correspond typiquement à une concentration de l'ordre de 10-30 mM. Puisque la plupart des expériences de DNP sont effectuées à températures cryogéniques, on utilise couramment des cryoprotectants (glycérol, etc.) afin d'éviter la formation de cristaux (H<sub>2</sub>O par exemple) et de favoriser l'obtention de solution gelée type « verre ».

Dans la plupart des études rapportées, on utilise une matrice composée de H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O, de glycérol, dopée à 10-20 mM avec agents polarisants type « TEMPO » (voir figures 3 et 5a p. 115). En fonction du type d'agents polarisants utilisés et du type de noyaux à polariser par DNP, on doit ajuster la fréquence d'irradiation micro-onde par rapport à la fréquence de Larmor électronique au champ magnétique utilisé. On obtient des profils d'excitation DNP (définie comme le rapport du signal sur bruit avec et sans irradiation micro-onde) tel celui rapporté à la figure 3a, constitué d'une partie à gain DNP positif et d'une autre à gain DNP négatif. La figure 3b présente la dépendance du gain

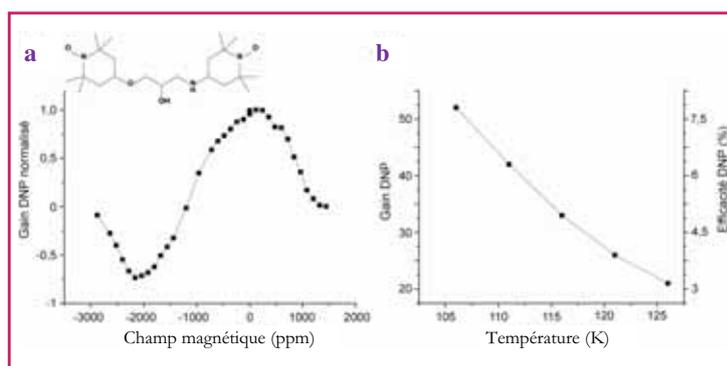


Figure 3 - (a) Profil de gain DNP en fonction du champ magnétique appliqué pour une irradiation micro-onde constante à 263 GHz utilisant 15 mM d'agent polarisant TOTAPOL. Données enregistrées à l'INAC avec un équipement DNP Bruker (opérant à ~ 10 T) sur une solution gelée de <sup>13</sup>C-urée (2 M) dans une matrice DNP composée de H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O/d<sub>3</sub>-glycérol. (b) Dépendance du gain DNP et de l'efficacité DNP correspondante (comparée au gain maximum théorique) en fonction de la température de l'échantillon.

DNP en fonction de la température de l'échantillon. La plupart des expériences de DNP actuelles permettent d'atteindre une température de l'échantillon (en rotation à l'angle magique) entre 90 et 105 K et de réaliser des gains DNP compris entre 15 et 60 correspondant à seulement quelques pourcents du gain théoriquement accessible. Compte tenu de la très forte dépendance en température, l'accès à des températures largement inférieures à 100 K semble donc être une solution pertinente pour augmenter significativement l'efficacité de l'expérience. Ceci nécessite de relever de nombreux défis technologiques dont la maîtrise de la rotation à l'angle magique en utilisant de l'hélium pré-refroidi comme gaz alimentant la turbine et assurant une régulation en température à l'échantillon. Des travaux dans cette direction sont en cours dans plusieurs laboratoires et notamment au CEA Grenoble.

### Conception de nouveaux agents polarisants

L'une des avancées importantes du groupe du professeur Griffin au MIT pour la DNP solide à haut champ magnétique est que l'effet croisé (« cross effect »), obtenu à l'aide de biradicaux comme agents polarisants permet d'avoir un meilleur transfert de polarisation que l'effet solide ou le mélange thermique. L'efficacité des expériences de DNP basées sur l'effet croisé est inversement proportionnelle au champ magnétique appliqué, mais les gains DNP rapportés jusqu'à présent sont suffisamment importants pour permettre des expériences jusqu'alors impossibles à réaliser. Le design d'agents polarisants pour la DNP est actuellement un champ de recherche très actif, notamment dans le groupe du professeur Tordo à Marseille.

### Applications

La polarisation dynamique nucléaire à l'état solide à haut champ magnétique développée par le groupe de Griffin a pu être appliquée efficacement sur un nombre grandissant de systèmes tels que des virus et lipides, des peptides amyloïdogéniques, de larges protéines membranaires, etc. [8] (figure 4).

Les multiples développements instrumentaux, méthodologiques et conceptuels réalisés au cours des deux dernières décennies au MIT ont entraîné un regain d'intérêt majeur pour l'utilisation de la DNP pour les études par RMN du solide en rotation à l'angle magique. De plus, l'introduction d'une expérience commerciale par le constructeur Bruker a permis à d'autres groupes de démontrer la pertinence de l'approche sur de nouveaux systèmes et notamment pour la caractérisation de surfaces [10-11].

La technique de la DNP, inventée dans les premières heures de la RMN et maintenant compatible avec les très hauts champs couramment accessibles, est en passe de révolutionner la RMN du solide.

## La résonance paramagnétique électronique (RPE)

Le grand moment magnétique associé au spin électronique est aussi exploité en RPE. En particulier s'est développée depuis une dizaine d'années une méthode pour mesurer des grandes distances entre spins électroniques : il s'agit de la séquence DEER pour « double electron electron resonance ». Elle permet de mesurer de manière efficace et fiable des distances allant jusqu'à 80 Å. Le principe est simple, bien connu et utilisé régulièrement en RMN : il s'agit de mesurer l'interaction dipolaire à travers l'espace de deux

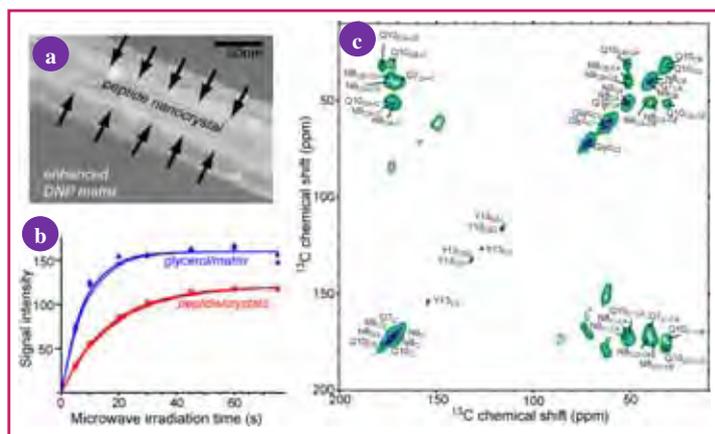


Figure 4 - Expériences de DNP sur des nanocristaux de [20 % U-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-GNNQ]QNY dans une matrice composée de glycérol-d<sub>8</sub>/D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (60/30/10) avec 10 mM de TOTAPOL.

(a) Illustration du caractère hétérogène d'un échantillon DNP constitué d'un peptide cristallin et de la matrice DNP, basée sur des données TEM de cristaux de GNNQQNY. Les flèches indiquent la diffusion de l'hyperpolarisation nucléaire depuis la matrice DNP vers les cristaux. (b) Courbe de polarisation DNP comparant les signaux <sup>13</sup>C des peptides et de la matrice DNP. Les intensités des signaux sont normalisées par rapport à l'équilibre sans irradiation micro-onde. (c) Expériences de corrélation 2D <sup>13</sup>C-<sup>13</sup>C DNP-DARR sur le même échantillon. Reproduit avec permission d'après Van der Wel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, p. 10840.

spins électroniques. Cette interaction est à la fois simple à modéliser (elle découle naturellement des équations de Maxwell) et ne dépend essentiellement que de l'intensité des moments magnétiques impliqués et de leur disposition dans l'espace (distance, orientation relative).

Puisque le moment magnétique associé à l'électron est au moins de trois ordres de grandeur plus grand que ceux associés aux noyaux, cela signifie que l'interaction dipolaire électron-électron sera plus intense que celle impliquant des noyaux et donc visible « de plus loin ». Il est donc facile de comprendre pourquoi les mesures de distances longues sont beaucoup plus faciles en RPE qu'en RMN. Cette mesure à longue distance est très intéressante car elle permet d'obtenir et d'utiliser des contraintes géométriques entre des points éloignés d'un système complexe. Elle est donc idéalement complémentaire avec des expériences de RMN où les distances obtenues sont plutôt inférieures à 10 Å.

### Spécificités : marquage de spin et basse température

L'une des propriétés fondamentales de l'interaction dipolaire est d'être moyennée par l'agitation des molécules en phase liquide. En conséquence, une expérience de DEER s'effectue à des températures cryogéniques (entre 4 et 77 K) pour réduire au maximum les mouvements moléculaires. Un avantage annexe est l'augmentation de sensibilité qui découle de ce refroidissement (loi de Curie).

Un problème majeur subsiste en pratique. Les systèmes où existent naturellement des spins électroniques non appariés sont très rares en chimie et en biologie. De plus, même s'ils sont présents, on peut désirer mesurer la distance entre deux points précis d'une molécule ou d'un système plus complexe dans lesquels des spins électroniques sont mal positionnés. C'est pourquoi on utilise en général la méthode du marquage de spins. Il s'agit de greffer de manière contrôlée une petite molécule paramagnétique (radical libre stable) dans des positions bien

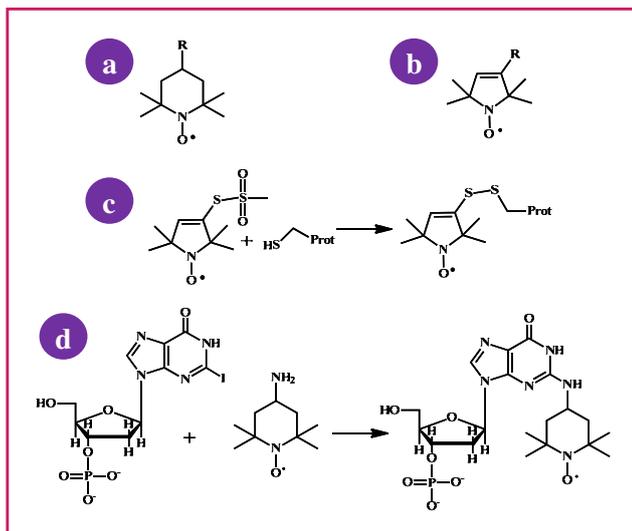


Figure 5 - Quelques molécules paramagnétiques stables employées comme marqueurs de spins et leurs utilisations en biochimie.

Il s'agit essentiellement de nitroxydes basés sur des cycles à 6 (a) ou 5 (b) atomes. c) Exemple de marquage d'une protéine sur un résidu cystéine ; d) exemple de marquage d'une base de l'ADN (guanine).

précises. On utilise en général des nitroxydes car ils sont faciles à synthétiser, stables dans de nombreuses conditions chimiques et de très petite taille (figure 5). Au cours des années s'est développé tout un ensemble de molécules et de procédures permettant de marquer dans des conditions douces non seulement les grandes fonctions chimiques (alcools, cétones acides, amines...), mais aussi certains acides aminés et certaines bases nucléiques dans des systèmes biologiques (protéines, ADN, ARN) (figure 5) [12].

Par rapport à la RMN, le fait de devoir marquer une molécule avant de l'étudier est à la fois une limite et un avantage. En effet, même simple, le marquage est une étape qui peut être délicate et qui entraîne des manipulations chimiques sur des systèmes parfois très fragiles. D'un autre côté, le spectre d'interaction dipolaire en RPE est très simple puisqu'on observe exclusivement les sondes introduites en nombre limité et non pas l'ensemble des noyaux présents dans une molécule. Cela permet de pouvoir travailler dans des systèmes complexes où de nombreuses molécules sont en interaction en gardant une bonne résolution.

### En pratique

Les premières réalisations d'une expérience de DEER à trois impulsions datent de plus de trente ans [13]. Elles ont montré tout l'intérêt de cette méthode mais également ses limites. À cause de problèmes expérimentaux, une partie du signal était impossible à acquérir, rendant l'analyse mathématique difficile. Ce n'est qu'en 1999 qu'est apparue la séquence de DEER à quatre impulsions (figure 6) [14]. Au prix d'une légère baisse de sensibilité, elle permet d'acquérir l'ensemble de l'évolution dipolaire sans temps mort et d'obtenir ainsi des distances de manière précise et fiable grâce à des traitements du signal performants (régularisation de Tikhonov en particulier). Cette méthode permet d'obtenir une distribution de distance à partir du signal avec seulement une contrainte de régularité (le résultat doit être lisse). C'est l'apparition de cette variante, et son implémentation sur des spectromètres commerciaux, qui a marqué le véritable développement de cette méthode [15].

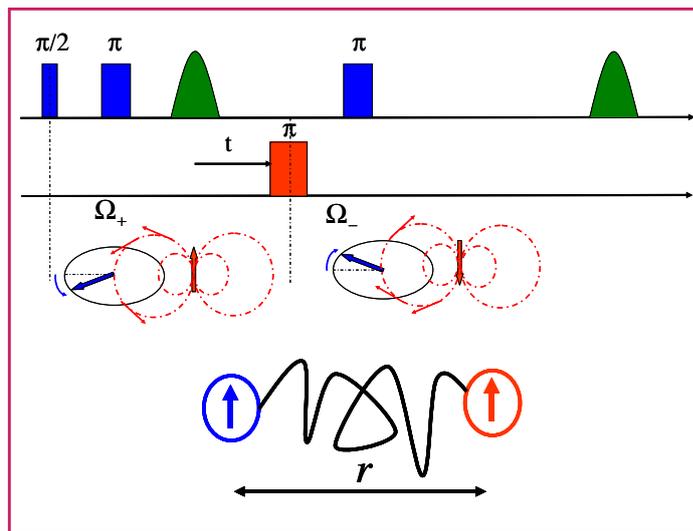


Figure 6 - Principe de la séquence DEER à quatre impulsions.

Elle est basée sur l'observation de la fréquence de résonance d'un spin « bleu » pendant la manipulation d'un spin « rouge ». La séquence étant réalisée à basse température et en phase solide, l'utilisation d'écho est nécessaire.

Une expérience simple permet de bien mettre en évidence la puissance d'une expérience de DEER à quatre impulsions (figure 7). Si on mesure un échantillon contenant une molécule simple bimarquée (ici un diacide), on observe après acquisition une distance de 19,2 Å. La même expérience peut se réaliser avec un autre diacide marqué à chaîne carbonée plus longue et qui va donc donner une distance plus longue (ici 23,8 Å). Supposons maintenant que nous mélangions les deux molécules en proportions égales. Le traitement de l'expérience de DEER donnera alors une distribution de distance bimodale (en noir) où l'on retrouve les deux distances précédentes en proportions égales. En résumé, nous sommes capables de connaître non seulement la distance moyenne entre les spins électroniques dans un échantillon, mais aussi la courbe de distribution de cette distance de manière quantitative et fiable.

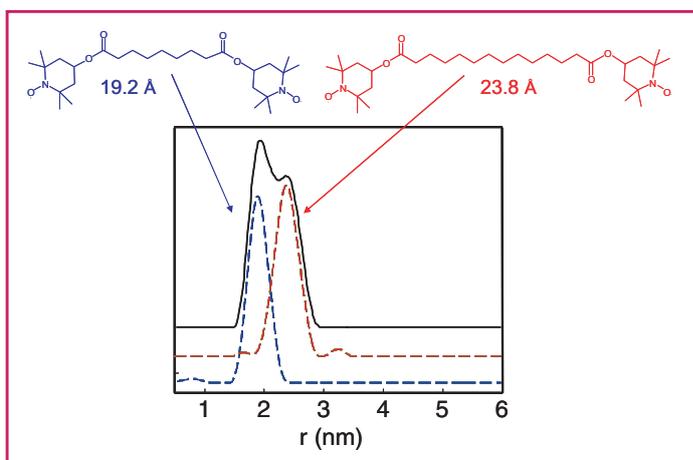
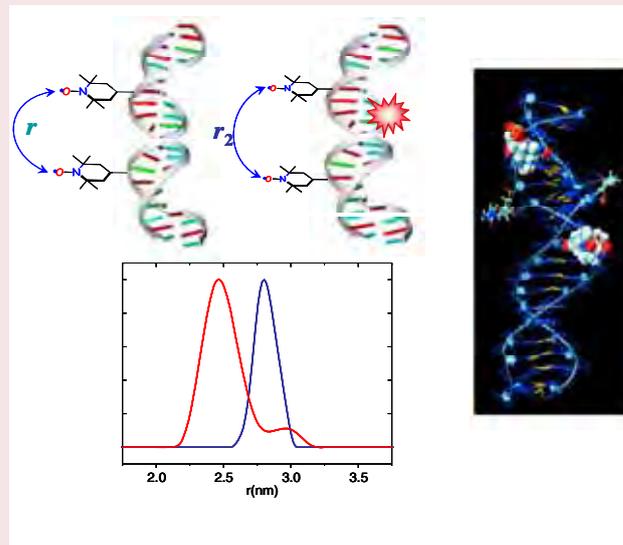


Figure 7 - Exemple d'expérience de DEER à quatre impulsions.

Si une molécule flexible est marquée à ses extrémités par des sondes nitroxyle, on peut facilement mesurer la distance correspondante (19,2 et 23,8 Å pour deux diacides à chaînes de 9 et 14 atomes de carbone respectivement). Si on mélange maintenant les molécules, on retrouve bien une distribution de distance composée de deux pics.

## Exemple de mesure de distance sur un système d'intérêt biologique : le changement de conformation d'un brin d'ADN induit par une lésion

Les lésions de l'ADN induisent de nombreuses modifications conformationnelles qui peuvent être importantes pour le recrutement des systèmes de réparation dans la cellule. Une stratégie pour mesurer de manière efficace ces changements peut être développée grâce à des expériences de DEER. À cet effet, on peut marquer doublement avec des sondes nitroxydes un brin d'oligonucléotide en des positions spécifiques, puis introduire éventuellement une lésion à étudier. Il suffit alors de mesurer la distance entre les marqueurs de spins dans les deux états du système (ici non lésé et lésé) : tout changement de distance traduit un changement de conformation. Cette stratégie est classique lors de l'étude d'un système d'intérêt biologique par DEER. Elle doit être complétée par des études de modélisation moléculaire afin de traduire ces contraintes de distance en géométrie globale de la molécule. Par exemple, dans le cas où un site abasique est introduit dans l'ADN, on observe très nettement une diminution de la distance d'environ 3 Å (courbe rouge) par rapport au même système non lésé (courbe bleue). Après analyses par dynamique moléculaire, on peut attribuer ce changement de distance au fait que la base en position complémentaire se positionne en dehors de la double hélice. On obtient alors un « tassement » de l'ADN correspondant à l'épaisseur d'une paire de base, soit environ... 3 Å ! [21].



### Applications et derniers développements

On peut concevoir que l'application de cette méthode à des systèmes chimiques et biochimiques n'est limitée que par l'imagination et la capacité à greffer des sondes radicalaires de manière efficace. De très nombreux systèmes ont ainsi été étudiés. Dans les objets d'intérêt biologique, c'est l'étude des conformations des protéines et des fragments d'ADN et d'ARN qui s'est le plus développée [12]. Mais des polymères, des micelles, des défauts dans les solides ont aussi été étudiés par cette méthode [16-17]. Actuellement, on assiste à l'étude de systèmes de plus en plus complexes où plusieurs molécules sont en interaction (protéines/lipides, protéines/ADN, canaux ioniques...) [18-19]. Des schémas de mesures faisant intervenir plus de deux marqueurs de spins se développent (triangulation, assemblée polymère). Enfin, les premières mesures de distance dans des cellules vivantes sont apparues très récemment, ce qui permet d'imaginer le développement de cette méthode dans des conditions « *in vivo* » [20] (voir encadré).

### Références

- [1] Carver T.R., Slichter C.P., *Phys. Rev.*, **1953**, 92, p. 212.
- [2] Overhauser A.W., *Phys. Rev.*, **1953**, 92, p. 411.
- [3] Carver T.P., Slichter C.P., *Phys. Rev.*, **1956**, 102, p. 975.
- [4] Slichter C.P., *Principles of Magnetic Resonance*, Springer-Verlag, **1978**.
- [5] Abragam A., *The Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford University Press, **1961**.
- [6] Abragam A., Proctor W.G., *C.R. Acad. Sci.*, **1959**, 246, p. 2253.
- [7] Hall D.A., Maus D.C., Gerfen G.J., Inati S.J., Becerra L.R., Dahlquist F.W., Griffin R.G., *Science*, **1997**, 276, p. 930.
- [8] Hu K.-N., Yu H.-H., Swager T.M., Griffin R.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, p. 10844.
- [9] Barnes A.B., De Paëpe G., van der Wel P.C.A., Hu K.N., Joo C.G., Bajaj V.S., Mak-Jurkauskas M.L., Sirigiri J.R., Herzfeld J., Temkin R.J., Griffin R.G., *Appl. Magn. Reson.*, **2008**, 34, p. 237.

- [10] Lesage A., Lelli M., Gajan D., Caporini M.A., Vitzthum V., Mieville P., Alauzun J., Roussey A., Thieuleux C., Mehdi A., Bodenhausen G., Copéret C., Emsley L., *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, p. 15459.
- [11] Lafon O., Rosay M., Aussenac F., Lu X.Y., Trebosc J., Cristini O., Kinowski C., Touati N., Vezin H., Amoureux J.P., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, p. 8367.
- [12] Schiemann O., Prisner T.F., *Quarterly Reviews of Biophysics*, **2007**, 40, p. 1.
- [13] Milov A.D., Salikhov K.M., Shirov M.D., *Fizika Tverdogo Tela*, **1981**, 23, p. 975.
- [14] Pannier M., Veit S., Godt A., Jeschke G., Spiess H.W., *J. Magn. Reson.*, **2000**, 142, p. 331.
- [15] Jeschke G., *ChemPhysChem*, **2002**, 3, p. 927.
- [16] Bode B.E., Dastvan R., Prisner T.F., *J. Magn. Reson.*, **2011**, 211, p. 11.
- [17] Kurzbach D., Kattinig D.R., B.Z. Zhang, Schluter A.D., Hinderberger D., *J. Phys. Chem. Lett.*, **2011**, 2, p. 1583.
- [18] Endeward B., Butterwick J.A., MacKinnon R., Prisner T.F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, p. 15246.
- [19] Junk M.J.N., Spiess H.W., Hinderberger D., *J. Magn. Reson.*, **2011**, 210, p. 210.
- [20] Krstic I., Hansel R., Romainczyk O., Engels J.W., Dotsch V., Prisner T.F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, 50, p. 5070.
- [21] Sicoli G., Mathis G., Aci-Seche S., Saint-Pierre C., Boulard Y., Gasparutto D., Gambarelli S., *Nucleic Acids Research*, **2009**, 37, p. 3165.



G. De Paëpe

Gaël De Paëpe et Serge Gambarelli sont chercheurs à l'Institut Nanosciences et Cryogénie au CEA Grenoble\*, où ils développent de nouvelles applications des spectroscopies magnétiques (RMN, RPE, DNP).



S. Gambarelli

\* Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologique, UMR-E3 (CEA/UJF), CEA-Grenoble/DSM/INAC/SCIB/LRM, F-38054 Grenoble.

Courriel : serge.gambarelli@cea.fr

# L'instrumentation en RMN : une affaire de haute sensibilité

Dimitrios Sakellariou

- Résumé** Quelques 66 ans après sa découverte, la résonance magnétique mérite le qualificatif de technique mature. Cet article présente l'état de l'art de l'instrumentation en RMN et en IRM. Les aimants supraconducteurs sont au cœur des appareils de RMN et leurs performances vers les hauts champs magnétiques ciblent des applications à haute résolution et précision. D'autre part, des systèmes miniaturisés pourraient répondre à des questions qui ne sont pas posées aujourd'hui, comme l'analyse en dehors du laboratoire et sur le terrain, l'analyse microfluidique, l'imagerie IRM dédiée. Sont présentées ici des approches de miniaturisation utilisant des aimants permanents et des détecteurs spécialisés, des approches d'augmentation du signal par hyperpolarisation montrant le potentiel du couplage pour l'obtention d'informations à haute sensibilité, et enfin quelques applications qui pourraient avoir un intérêt en biomédecine du cancer.
- Mots-clés** **RMN, instrumentation, miniaturisation, RMN portable, IRM portable, microfluidique, ingénierie en résonance magnétique.**
- Abstract** **Instrumentation in nuclear magnetic resonance: a highly sensitivity case**  
Sixty six years after its discovery, magnetic resonance deserves the qualification of a mature technique. This paper presents the state of the art of the instrumentation in NMR and MRI. Superconducting magnets are at the heart of the NMR instruments and their performances towards high magnetic fields target high resolution and high precision applications. On the other hand, miniature systems could answer to questions that are not currently answered like the analysis outside the laboratory and in the field, chemical analysis on microfluidic chips, or systems for dedicated organ imaging. Here are presented the use of permanent magnets and specialized detectors as novel paths towards miniaturization, signal enhancement methods by hyperpolarization in order to show their potential towards coupled applications offering high sensitivity information, and finally, innovative applications that could have interest in cancer biomedicine.
- Keywords** **NMR, instrumentation, miniaturization, table-top NMR, portable MRI, microfluidics, magnetic resonance engineering.**

Des antennes en rotation à des millions de tours par minute aux effets quantiques d'hyperpolarisation de spins, des systèmes de RMN et IRM portables haute résolution aux détecteurs mécaniques nanométriques, les chercheurs en résonance magnétique ne cessent d'innover et de la redécouvrir. Les idées foisonnent, et seuls ceux qui osent arrivent à des résultats qui dépassent l'imagination et touchent des domaines variés tels que la computation quantique, les nanomatériaux, l'imagerie 3D et la biomédecine.

La résonance magnétique mérite le qualificatif de technique mature, quelques 66 ans après sa découverte. Son utilité dans le domaine de la chimie analytique, de la caractérisation moléculaire et même de la médecine, a été très importante puisqu'elle a souvent transformé la façon de pratiquer ces disciplines. Ainsi, mesurer et manipuler le magnétisme nucléaire est devenu une affaire quotidienne pour les scientifiques et les chercheurs dans le but de découvrir la structure et la dynamique moléculaires. L'instrumentation associée est devenue alors un domaine de plus en plus contrôlé par des entreprises capables de concevoir et fabriquer des systèmes complets de plus en plus performants. Le signal utile étant plus ou moins proportionnel au champ magnétique, l'effort majeur s'est concentré sur l'obtention de champs magnétiques forts et homogènes. L'arrivée en France du premier système de spectroscopie

RMN fonctionnant à 23,5 teslas (T) et le projet IRM corps entier à 11,75 T (voir *figure 1*) témoignent de la course aux hauts champs magnétiques, à la fois comme outil d'augmentation de sensibilité et comme source d'informations jamais obtenues auparavant.

Cependant, courir après le champ n'est pas toujours suffisant pour remédier à la faiblesse majeure de la RMN qui est sa sensibilité. Le fait est qu'un seul spin nucléaire sur un ensemble d'à peu près un million est détectable à température ambiante en utilisant des détecteurs ordinaires, et ceci à condition de disposer d'un aimant très fort et extrêmement homogène, qui coûte souvent plusieurs millions, quelle que soit la devise. La faiblesse de la RMN, due à son manque de sensibilité, est une limitation qui se manifeste de différentes façons : faible résolution spatiale, faible spécificité, fort coût d'investissement, non-(trans)portabilité, etc. Autant dire que la plupart des études sont effectuées au laboratoire ou à l'hôpital lorsque l'échantillon est humain. Il existe cependant de nombreuses situations où l'échantillon, objet ou sujet, ne peut pas être transporté et placé à l'intérieur d'un aimant puissant, et où la portabilité serait primordiale, d'où l'idée de développer des instruments et des méthodes dédiés et optimisés, sur mesure.

L'instrumentation en résonance magnétique a connu un grand développement ces dix dernières années, et cela ne va probablement pas ralentir avec l'essor technologique



Figure 1 - Deux très grandes infrastructures pour la résonance magnétique en France, qui sont uniques au monde.

À gauche : le spectromètre RMN à 1 GHz (aimant de 23,5 T), déjà installé à Lyon et utilisé par la communauté française et internationale. Un aimant de 12 t, haut de 4,5 m, pour étudier des échantillons millimétriques à l'aide de détecteurs cryogéniques, l'instrumentation est spectaculaire, mais les enjeux aussi. À droite : maquette de l'aimant IRM ISEULT qui sera installé en 2013 à Neurospin, pour des études fonctionnelles du cerveau humain. Avec son accès libre de 90 cm, ses 4 m de diamètre et longueur, ses 1 000 ampères de courant, une cryogénie refroidie à 1,8 K, un liquéfacteur d'hélium dédié et ses 150 t, cet aimant est un exploit en instrumentation qui se porte à la hauteur de la tâche : explorer le cerveau humain (© CRMN et CEA).

généralisé. Les avancées en sciences des matériaux ont permis de fabriquer des matériaux nouveaux, qui peuvent être utilisés pour produire des aimants de RMN et d'IRM soit plus forts, soit plus compacts et potentiellement transportables. Le développement de supraconducteurs à haute température et leur utilisation pour la fabrication de détecteurs ultrasensibles refroidis ont ouvert la voie vers des applications encore plus pointues, par exemple en biologie structurale, ou même dans le domaine de la magnétométrie en absence de champ magnétique, couramment utilisée en magnéto-encéphalographie. Des méthodes alternatives à la détection inductive (Faraday) du signal de résonance magnétique ont vu le jour ces dernières années, comme la détection par levier mécanique, qui, à leur tour, ont lancé la course vers la miniaturisation, avec comme limite la détection d'un spin nucléaire unique. L'augmentation de la polarisation nucléaire de plusieurs ordres de grandeurs (souvent appelée hyperpolarisation), grâce à des moyens non traditionnels, a aussi largement bénéficié des développements instrumentaux dans les hyperfréquences, du pompage optique des gaz inertes, ou même des développements dans la synthèse des catalyseurs pour effectuer un échange réversible de molécules isotopomériquement actives, comme le para-hydrogène.

Entre les instrumentations de plus en plus spécialisées et optimisées et les approches générales, la part des choses doit être faite, afin que les non-professionnels puissent bénéficier non seulement d'idées géniales difficilement praticables, mais surtout d'innovations technologiques appliquées à une grande variété d'études.

## Les bases de l'instrumentation en résonance magnétique

On observe par résonance magnétique les transitions entre les états de spin nucléaire des atomes. En absence de champ magnétique, ces états ont la même énergie. Pour induire ces transitions, les spins doivent être placés à

l'intérieur d'un aimant fort qui crée un champ magnétique homogène. Des irradiations résonantes sont ensuite appliquées dans le domaine des radiofréquences, à l'aide d'une antenne<sup>(1)</sup>. Cette même antenne reçoit souvent la réponse des spins lorsqu'ils retournent vers leur état d'équilibre ; elle permet de détecter les informations importantes, suite à des traitements du signal plus ou moins sophistiqués. Un dessin simplifié de l'instrumentation pour un système de spectroscopie de RMN est montré sur la *figure 2*. Les systèmes d'imagerie sont très similaires, la plus grande différence étant l'orientation horizontale pour le tunnel de l'aimant, afin d'avoir une position plus confortable pour les sujets vivants (animaux, patients).

L'intensité du champ magnétique joue un rôle très important car elle est responsable de la polarisation nucléaire, c'est-à-dire de la différence de population entre les différents

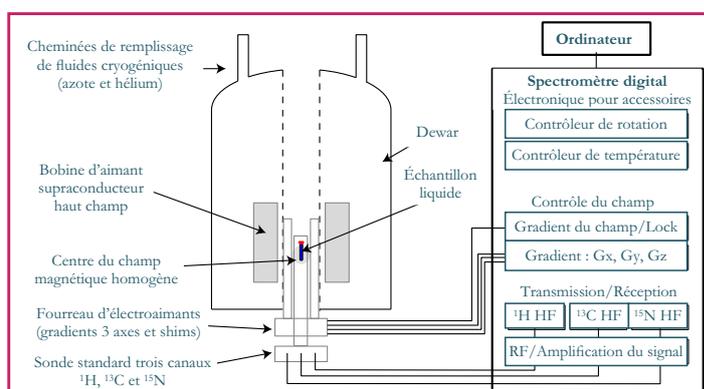


Figure 2 - Diagramme schématique simplifié de l'instrumentation standard d'un spectromètre de RMN pour des échantillons liquides.

Le trou libre de l'aimant est vertical et de diamètre 52 mm. La rotation lente de l'échantillon (1 à 10 Hz) autour de l'axe z est possible afin de moyenner l'inhomogénéité et d'améliorer la largeur des raies sur les spectres. Pour les échantillons solides, une rotation rapide autour d'un axe incliné est nécessaire ainsi que l'utilisation de radiofréquences très puissantes, d'où la nécessité d'utiliser souvent des aimants ayant un tunnel plus large (diamètre standard de 89 mm).

niveaux d'énergie ; elle est responsable en conséquence de l'intensité du signal avant détection. Dans l'histoire de la RMN, nous avons commencé dans les années 1950 avec des aimants permanents et des électroaimants refroidis à l'eau produisant quelque 0,1 à 2 T ; à partir des années 1970, les électroaimants supraconducteurs ont pris la relève, produisant progressivement des champs de plus en plus forts, de 2,35 T au début à 23,5 T aujourd'hui. L'intensité du champ est aussi importante pendant la détection, si celle-ci se fait de manière inductive, ce qui est la façon standard : l'aimantation en précession pendant son retour à l'équilibre induit un flux oscillant à travers l'antenne qui conduit à une tension alternative présente à ses bornes. L'amplitude de ce signal électrique est proportionnelle à la fréquence de l'oscillation, ainsi qu'au champ magnétique pendant la détection. Ainsi pour la RMN standard, l'amplitude du signal est proportionnelle au carré du champ magnétique à cause de la polarisation et de la détection qui ont lieu dans le même champ<sup>(2)</sup>.

La particularité de la RM au regard d'autres techniques physiques utilisant des champs magnétiques intenses se trouve dans la finesse des interactions mesurées (comme le déplacement chimique, les couplages scalaires, dipolaires, etc.), ce qui se traduit par un besoin de résolution spectrale extrêmement exigeant. Ainsi la détection du signal doit avoir lieu en présence de champ ayant souvent une homogénéité (uniformité de champ dans l'espace) de l'ordre de quelques parties par millions (ppm) pour l'imagerie, à l'intérieur de la zone d'intérêt (volume d'échantillon ou sujet), et de quelques parties par billion (ppb) pour la spectroscopie ! Ces spécifications sont difficiles à atteindre et malgré le développement d'aimants supraconducteurs ultra-homogènes, des systèmes supplémentaires de correction du champ (appelés « shims ») sont nécessaires. Ces systèmes sont à la fois refroidis et résidant dans l'aimant, et à la fois à température ambiante et résidant dans le tunnel de l'aimant. D'autre part, le besoin de coder l'espace 3D en fréquence a conduit à l'utilisation d'électroaimants pulsés qui créent un champ magnétique linéaire le long des trois directions de l'espace 3D. Ces bobines, dites de gradients, sont utilisées pendant l'excitation et la détection afin d'associer une fréquence bien spécifique à tout point de l'échantillon et d'obtenir des images. Leur linéarité spatiale ainsi que l'intensité du champ qu'ils produisent sont des facteurs cruciaux pour la qualité et la résolution des images obtenues et constituent toujours un défi pour les ingénieurs.

La détection standard utilise la loi de Faraday afin de transformer l'oscillation de l'aimantation nucléaire pendant son retour à l'équilibre vers une tension aux bornes d'une antenne. Cette antenne est un circuit résonant à plusieurs fréquences à la fois et permettant une réception optimale du signal. Différents types d'antennes existent en fonction de l'échantillon que l'on souhaite mesurer. Pour les échantillons solides où une grande efficacité est nécessaire, les bobines simples solénoïdales sont très couramment utilisées, alors que pour les liquides, on utilise des bobines en forme de selles de cheval. Pour l'imagerie, où l'homogénéité du champ de radiofréquence est un facteur très important, on utilise souvent des antennes en cage d'oiseau ou des réseaux d'antennes en phase. Chaque expérience en résonance magnétique peut avoir une antenne optimisée en fonction des exigences souhaitées, ainsi que du rapport signal sur bruit ciblé. On verra par la suite que des détecteurs hautement sophistiqués cryogéniques sont aussi couramment utilisés.

Le spectromètre comporte une partie génération de séquences, c'est-à-dire de fabrication d'événements courts, comme des impulsions de radiofréquences, des délais temporels et des impulsions de gradients du champ, ainsi qu'une partie réception, conditionnement et traitement du signal. Il est important de comprendre que les spectromètres modernes peuvent être ultra-rapides (temps d'événements inférieur à 20 ns) et gérer plusieurs canaux de radiofréquences à la fois afin d'exciter et détecter plusieurs noyaux simultanément. Il est évident que cette puissante électronique peut être complétée par des accessoires pour conditionner l'échantillon, comme contrôler sa température, sa fréquence de rotation lorsqu'il tourne, ou même la synchronisation de l'acquisition avec des événements extérieurs comme la respiration pendant des études d'imagerie *in vivo*.

## Aimants innovants pour la RMN et l'IRM

Le développement des matériaux nouveaux pour les supraconducteurs à haute température est elle-même une saga [1], et nous avons choisi de présenter ici quelques avancées sur les aimants supraconducteurs sans fluides cryogéniques, à haute température critique, ainsi que sur les aimants permanents et leur utilisation vers une RMN miniaturisée, dite de « paillasse », ou une IRM transportable compacte et dédiée.

### Aimants supraconducteurs innovants

Certains matériaux perdent leur résistance en dessous d'une certaine température (dite « température critique »  $T_c$ ) et sous certaines conditions (« champ magnétique critique », « densité de courant critique », etc.). Ces matériaux appelés supraconducteurs peuvent alors être utilisés pour fabriquer des électroaimants persistants qui ne nécessitent pas une arrivée de courant électrique (« mode persistant »). La plupart des aimants classiques pour la RMN et l'IRM utilisent des fils de NbTi qui sont à l'état supraconducteur en dessous de la température de - 263,95 °C (9,2 K) et en présence de champ magnétique plus faible que ~ 15 T (souvent nommé « champ critique »). Des filaments de Nb<sub>3</sub>Sn sont aussi très utilisés pour fabriquer des aimants plus forts. Leur champ critique est de ~ 30 T, mais leur densité de courant critique les limite à générer des champs plus faibles. Les bobines baignent dans de l'hélium liquide à 4,2 K, mais des systèmes qui travaillent à 2 K sont commercialement disponibles afin d'augmenter la valeur de la densité de courant critique et générer des champs de plus en plus importants. Ainsi aujourd'hui le champ magnétique maximum obtenu en mode persistant est de 23,5 T (~ un demi-million de fois le champ terrestre) pour l'aimant du Centre de RMN à Lyon (figure 1).

En IRM humaine, les défis à relever sont le grand volume homogène de l'aimant ainsi que le champ projeté loin de l'aimant (appelé souvent « champ de fuite »). L'énergie stockée dans l'aimant est proportionnelle au rayon et au carré du nombre d'ampères-tours, ce qui rend les aimants forts très volumineux, chers et difficiles à concevoir et à construire. Cependant, de plus en plus de systèmes 7 T corps entier commerciaux sont vendus dans le monde et des projets visant des champs encore plus importants voient le jour. En France, le projet ISEULT a pour objectif la construction d'un aimant IRM corps entier de 11, 7 T pour des études en neurosciences (figure 1). Cet aimant est basé sur une technologie d'aimant à doubles galettes et fonctionnera en mode non persistant. Si aucune précaution n'avait été prise lors de sa conception,

le champ de fuite pour un tel aimant créerait un champ supérieur à 0,5 mT (dix fois le champ terrestre) dans une surface d'un terrain de foot. Afin de diminuer l'extension du champ de fuite, des techniques avancées de conception d'aimant ont permis ces dernières années de fabriquer des systèmes dits « activement blindés » qui peuvent maintenant occuper l'espace de manière optimisée sans risque de gêner l'instrumentation et la logistique environnante. Ainsi l'aimant corps entier de 11,7 T sera installé à côté d'autres aimants d'IRM, dans une des salles (arches) d'expérimentation de Neurospin au CEA-Saclay.

D'autre part, la découverte de nouveaux matériaux supraconducteurs, et en particulier à haute température, offre de nouvelles opportunités d'innovation en résonance magnétique. Le composé  $MgB_2$  par exemple a une température critique de 39 K et un champ critique potentiel de 60 T et il est disponible depuis peu sous forme de fil. Le composé cristallin  $YBa_2Cu_3O_7$  est aussi connu pour sa température critique de 93 K, supérieure à celle de l'azote liquide (77 K) ; ce matériau est disponible commercialement sous forme de rubans. Quelques essais prometteurs de fabrication d'aimant de RMN à base de matériaux supraconducteurs à haute  $T_c$  viennent de paraître [2-3] et constituent une direction pour les années à venir.

Par ailleurs, comme le prix de l'hélium liquide ne cesse de grimper, ce type de développement sur les matériaux à haute  $T_c$  combinés aux technologies de refroidissement offre de nouvelles possibilités potentiellement favorables industriellement. Ainsi des technologies « sèches » ont été introduites récemment (technologies de refroidissement [4] sans cryogène liquide évaporé) et des systèmes d'aimants supraconducteurs à faible consommation d'hélium liquide viennent de faire leur apparition. Leur compatibilité avec les études RMN de haute résolution qui nécessitent un très faible bruit reste un défi pour ce type de systèmes, mais les premiers résultats sont encourageants.

### Aimants permanents pour liquides et solides

Le succès des aimants permanents dans les applications de RMN et IRM portables est dû à leur propriété unique : la préservation de l'intensité et de l'homogénéité du champ lorsque toutes leurs dimensions sont réduites de la même manière (transformation isomorphe). En plus, le faible coût de production et de maintenance de ces systèmes en fait de parfaits candidats pour des applications mobiles. Les matériaux magnétiques modernes pour fabriquer des aimants permanents sont des alliages de terres rares et les compositions les plus communément utilisées sont  $Nd_2Fe_{14}B$ ,  $SmCo_5$  et  $Sm_2Co_{17}$ . Les propriétés physiques importantes pour fabriquer des aimants pour la résonance magnétique sont leur rémanence ( $B_r$ ) et leur coercivité ( $H_c$ ), qui renseignent sur l'intensité du champ produit et la résilience du matériau à la désaimantation. Ainsi les aimants à terres rares, comparés aux matériaux magnétiques conventionnels comme les alliages  $AlNiCo$  ou les ferrites dures, ont des propriétés tellement meilleures qu'ils permettent, sans perte de performance en intensité de champ magnétique, une réduction du volume du matériau d'à peu près deux ordres de grandeur !

Les aimants permanents ont été utilisés très tôt en résonance magnétique, non seulement pour l'analyse haute résolution, mais aussi pour l'analyse sur le terrain de ce qui fut la première application de RMN portable [5]. Les explorations pétrolières utilisent toujours des outils complexes contenant

des aimants permanents assez peu homogènes, mais qui sont capables d'informer sur les temps de relaxation  $T_1$  et  $T_2$ , ainsi que sur la diffusion des composantes fluides dans la roche. Avec ces informations, des modèles sur la porosité et la perméabilité sont établis, ce qui permet une meilleure prise de décision. D'autre part, comme les aimants permanents n'ont pas besoin de cryogènes, ils représentent une solution à faible coût pour des applications d'imagerie dédiées, qui n'étaient pas forcément économiquement rentables lorsque des aimants supraconducteurs corps entier étaient utilisés. Des systèmes d'IRM vétérinaires, interventionnels ou dédiés pour les extrémités, sont actuellement disponibles commercialement. Ces dernières années ont témoigné d'un effort significatif vers la miniaturisation extrême des aimants permanents, le but étant de fabriquer des systèmes de paillasse ou même des systèmes dédiés à certaines applications de laboratoire.

Les systèmes miniaturisés à aimant permanent ont été proposés en 1996 avec la construction de la NMR MOUSE [6], un aimant unilatéral présentant une faible homogénéité et ayant le mérite de détecter rapidement les couches proches protonées des surfaces des matériaux. La particularité de cet aimant réside aussi dans le fait que la région du champ magnétique utile se trouve à une distance de la surface de l'aimant, contrairement aux aimants classiques (« fermés ») où la région d'intérêt se situe au centre (voir figure 3). Divers modèles d'aimants dont le poids varie entre une et quelques dizaines de kg ont vu le jour et une multitude d'applications (peintures, monuments historiques, bétons et ciments, tissus biologiques de surface, aliments, etc.) ont permis à ce type d'appareil de devenir un grand classique dans le domaine de la RMN portable.

Ces cinq dernières années, quelques groupes de chercheurs, dont le nôtre à Saclay, ont revisité l'ingénierie des aimants permanents en termes de conception d'aimants fermés et ouverts à l'aide de concepts robustes de magnétostatique, déjà développés pour les aimants supraconducteurs. Un nombre important de développements récents a permis d'établir une approche générale [7-8] basée en magnétostatique 3D pour concevoir, fabriquer et corriger des aimants permanents sur mesure, par exemple des aimants unilatéraux à gradient fort ultra-uniforme [9], des aimants unilatéraux homogènes [10] ou même des aimants cylindriques « fermés » ultra-homogènes [11]. Ces aimants permettront l'analyse spectroscopique à haute résolution d'échantillons liquides comme dans les aimants supraconducteurs, bien sûr avec une réduction en signal, mais avec la possibilité de faire l'analyse là où nous en avons le plus besoin, c'est-à-dire directement sur le terrain (voir figure 4).

Cependant, la RMN des échantillons solides est contrainte à des spécificités liées à l'anisotropie de la matière et nécessite une instrumentation particulière afin d'effectuer la rotation ultra-rapide de l'échantillon à l'angle magique (voir l'article de Copéret *et coll.* p. 82). La fréquence de rotation de l'échantillon nécessaire dépend de la largeur de raie que l'on souhaite moyenner, mais le record actuel se situe à  $\sim 0,1$  MHz, c'est-à-dire à plus de **6 millions de tours par minute** ! Bien évidemment, les porte-échantillons, appelés rotors, sont en matériaux spéciaux (zircone, nitrure de silicium, saphir) afin de résister aux efforts dus à la rotation rapide, sans donner de signaux RMN parasites. Ces porte-échantillons doivent être très équilibrés, maintenus et propulsés par des gaz en forte pression afin d'éliminer au mieux leur friction avec les autres parties mécaniques statiques (stator).

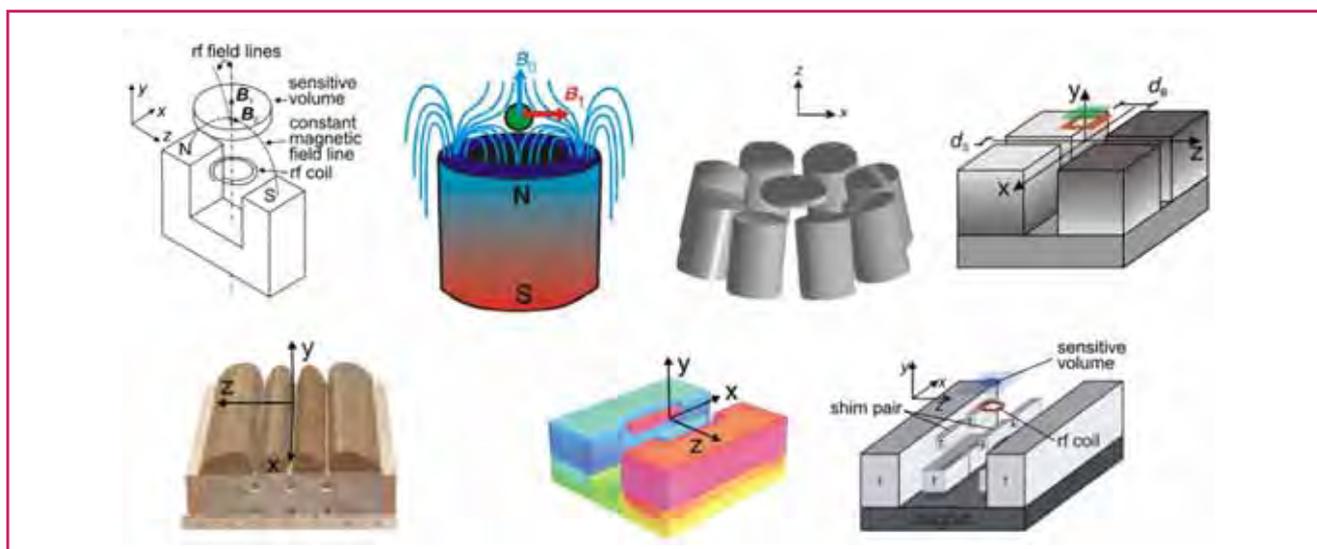


Figure 3 - Systèmes d'aimants permanents unilatéraux portables (d'après [6]).

Plusieurs conceptions sont possibles, produisant un champ magnétique qui est projeté à une distance de la surface de l'aimant et peut être soit uniforme, soit à gradient constant. L'orientation du champ peut aussi être choisie parallèle ou perpendiculaire à la surface de l'aimant, ce qui conditionne les bobines radiofréquences de surface.

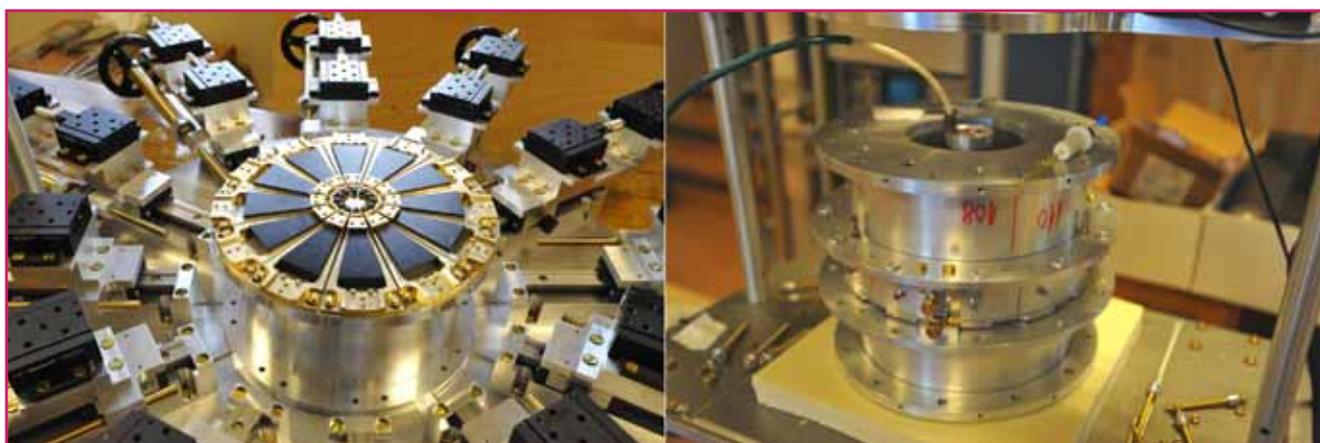


Figure 4 - Aimants permanents portables développés par notre groupe au CEA-Saclay.

L'aimant de gauche est unilatéral et produit un champ perpendiculaire à sa surface ayant une intensité de 0,33 T et un gradient uniforme de 3,3 T/m. Son application sera focalisée sur l'imagerie en couches le long de l'axe z (tomographie), où il a déjà effectué des images ayant une résolution de 15  $\mu\text{m}$  [9], ainsi que sur les mesures de diffusion moléculaire. L'aimant de droite est un aimant fermé, qui produit 0,9 T en son centre. Son homogénéité (0,06 ppm pour un tube RMN de diamètre 5 mm) est comparable avec celle des aimants supraconducteurs. Il pourrait être utilisé pour des analyses de paillasse en milieu industriel, des études d'imagerie et des études spectroscopiques en milieux confinés (hôtes de laboratoire, etc.), ou même pour l'enseignement (© D. Sakellariou/CEA).

Il existe souvent des cas où la rotation de l'échantillon n'est pas souhaitée ou permise (par exemple lors des études d'IRM *in vivo* de petits animaux, ou l'analyse d'échantillons fragiles à la centrifugation). La solution dans ce cas pourrait venir de la rotation du champ à l'angle magique autour d'échantillons statiques, une idée proposée par R. Andrew en 1962, mais jamais implémentée avec succès. Notre méthodologie de fabrication d'aimants homogènes et compacts permet la conception et la réalisation d'aimants spéciaux qui produisent un champ magnétique incliné [12]. La rotation de ce type d'aimant permettrait, en principe, celle du champ à l'angle magique autour d'échantillons statiques et induirait l'augmentation supplémentaire de la résolution spectrale dans les spectres et images par résonance magnétique. La première IRM tournante ? Ce défi instrumental est de taille. En effet, toute l'instrumentation devra être repensée et adaptée pour permettre à l'aimant

de tourner à quelques milliers de tours par minute tout en garantissant l'homogénéité du champ, la sensibilité du signal et l'intégrité de l'aimant...

Bien sûr, le développement d'aimants miniaturisés est une condition nécessaire mais pas suffisante pour avoir un système portable. L'utilisation de circuits logiques programmables (FPGA), de cartes d'acquisition ultra-rapides et de séquenceurs modulables a permis une réduction de volume très importante au niveau de la console de pilotage du spectromètre, rendant l'électronique de pilotage aussi portable et compacte. Pour les applications où peu de puissance radiofréquence est nécessaire (RMN des liquides), toute l'électronique prend très peu de place et peut aujourd'hui être combinée avec l'aimant dans un appareil de paillasse. Pour les applications où la haute puissance est nécessaire, des amplificateurs accordés classe D sont disponibles et ont déjà démontré leur utilité sur les outils de forage pétrolier. D'autre

part, l'utilisation des réseaux d'antennes en IRM a stimulé le développement de consoles de spectroscopie RMN à plusieurs cartes de réception simultanée, ce qui à son tour a conduit au développement des séquences et analyses de données uniques.

## Les techniques d'hyperpolarisation

### Gaz hyperpolarisés

Depuis Kastler, qui a été le premier à augmenter par plusieurs ordres de grandeur la polarisation électronique d'atomes d'alcalins à l'état gazeux [13], des techniques de transfert de moment angulaire des photons vers les spins nucléaires de gaz rares (hélium-3, xénon-129) sont apparues et le développement des gaz rares hyperpolarisés pour la résonance magnétique a connu un essor majeur. Des gaz inertes comme l'hélium, le xénon, ou même le krypton ont été hyperpolarisés par différentes méthodes dont le dénominateur commun est le transfert de la polarisation lumineuse vers les noyaux. Ici, l'instrumentation comporte des faisceaux lasers et des cellules de pompage optique (voir figure 5), des électroaimants utilisés pour préserver la polarisation nucléaire. Le transfert du gaz hyperpolarisé vers l'objet ou la solution des molécules à étudier se fait par le biais de tubes ou de transport physique du gaz vers l'endroit de la détection, ce qui n'est pas standard. Le temps de dépolarisation (relaxation) du gaz doit rester très long pour permettre un transport efficace sans perte de polarisation.



Figure 5 - Hyperpolariseur de xénon par pompage optique.

La cellule contient un mélange de vapeurs de Rb, N<sub>2</sub> et Xe-129 et elle est soumise à une irradiation par un faisceau laser en présence d'un champ magnétique créé par l'électroaimant (anneaux noirs sur la photo). Une fois le gaz polarisé, il est condensé par un piège à azote liquide et transporté au lieu de son utilisation (© P. Stroppa/CEA).

Aujourd'hui, les chercheurs arrivent à obtenir des polarisations utilisables approchant les 0,5, soit 75 000 fois la polarisation thermique à 7 T, ce qui diminue incroyablement la limite de détection. Les applications utilisant les gaz rares hyperpolarisés seuls sont focalisées en imagerie, par exemple pour l'étude d'organes peu denses (poumons [14]), de polymères, de matériaux poreux (zéolites), de poches hydrophobes dans les protéines, etc. La fonctionnalisation des gaz rares par des molécules complexantes a permis récemment de fabriquer des biosenseurs qui seraient potentiellement utilisables dans l'imagerie moléculaire par résonance magnétique, comme des agents de contraste spécifiques ou des détecteurs moléculaires ultrasensibles [15].

### DNP liquide et solide

Les électrons ont aussi un spin  $\frac{1}{2}$  qui peut être polarisé en présence de champ magnétique beaucoup plus facilement que le spin des noyaux, car leur rapport gyromagnétique est quelques centaines de fois supérieur<sup>(3)</sup>. Il est donc possible d'obtenir des polarisations électroniques approchant l'unité à basse température pour un champ magnétique modéré de quelques teslas. Dans le passé, plusieurs mécanismes de transfert de polarisation entre les électrons et les noyaux ont été explorés, comme l'effet Overhauser, l'effet solide ou la polarisation croisée, aux fins de compréhension de la physique du spin en solide. Cette augmentation du signal nucléaire par transfert de la polarisation électronique est connue sous le nom de « polarisation dynamique nucléaire » ou « dynamic nuclear polarization » (DNP).

Depuis, l'ingénierie des sources d'hyperfréquences, nécessaires pour exciter et manipuler le spin électronique, a connu beaucoup de développements cruciaux qui ont permis aujourd'hui la fabrication d'ondes proches du 0,5 THz, avec une puissance de plusieurs kW. D'autre part, la synthèse chimique des molécules comportant des radicaux (électrons libres localisés) optimisés pour le transfert de polarisation permet actuellement l'amélioration continue des facteurs d'augmentation du signal de la RMN. La DNP a été utilisée récemment pour l'augmentation du signal à l'état liquide [16] par un mécanisme de pré-polarisation à l'état solide à faible champ et dissolution rapide et détection à haut champ [17]. À l'état solide, la DNP peut être appliquée en présence du champ magnétique de détection à basse température, et pour effectuer ceci, la sonde de détection doit comporter un guide d'onde pour les hyperfréquences souvent générées par un gyrotron [18]. Comme les échantillons solides nécessitent la rotation rapide à l'angle magique, l'instrumentation associée devient assez complexe et lourde. Les efforts longs et persistants vers l'amélioration de la DNP en solide du groupe de R. Griffin (MIT) en particulier ont permis aujourd'hui d'obtenir des gains significatifs en polarisation nucléaire et des informations uniques sur la structure moléculaire des biomatériaux.

Depuis trois ans, des systèmes commerciaux de DNP par dissolution ont vu le jour, mais leur utilité reste à démontrer (voir l'article de De Paëpe et Gambarelli p. 111). Ce type d'appareils est actuellement disponible commercialement et les premières applications chimiques sur les surfaces des matériaux solides semblent être très prometteuses. Il convient de garder à l'esprit que, pour le moment, la DNP a besoin de molécules ayant des radicaux libres et qui sont introduits dans l'échantillon. De plus, elle utilise des hyperfréquences qui peuvent chauffer très rapidement l'échantillon. Des précautions doivent donc être prises quant à la généralité de la méthode, qui restera certainement un domaine très actif de recherche pour les années à venir.

### Autres approches d'hyperpolarisation

D'autres techniques d'hyperpolarisation existent et commencent à gagner du terrain dans la quête pour augmenter le signal de la RM. Celle qui paraît peut-être la plus prometteuse est l'utilisation du para-hydrogène comme source de polarisation nucléaire. Cette approche est basée sur la réaction d'hydrogénation avec de l'hydrogène enrichi en isomère para, qui conduit à un produit dont le signal est augmenté de plusieurs ordres de grandeur. Le phénomène avait été prédit en 1986 et observé en 1987 par Bowers et

Weitekamp [19]. L'instrumentation est relativement simple car elle nécessite un moyen pour enrichir l'isomère para de l'hydrogène moléculaire. Ceci est fait de manière naturelle à basse température (< 20 K) et peut être accéléré en présence de catalyseur (charbon) de manière à obtenir 100 % de para-hydrogène. La réaction d'hydrogénation étant une restriction sévère pour l'application de la technique, des approches de transfert d'aimantation par échange réversible [20] (SABRE) commencent à avoir un succès très important. Ici un catalyseur forme un complexe de manière réversible entre le para-hydrogène et le substrat et permet l'amplification du signal sans avoir besoin de réaction d'hydrogénation. Les applications en imagerie et en spectroscopie sont en cours.

## Détecteurs spécialisés

La détection du phénomène de la résonance magnétique se fait de manière standard par induction Faraday. Une antenne (bobine) reçoit le flux magnétique oscillant pendant le processus de relaxation de l'aimantation nucléaire vers son état d'équilibre thermodynamique. Ceci se traduit par une force électromotrice sur les terminaux de l'antenne qui correspond au signal de précession libre, donnant le spectre ou l'image RMN une fois traité par transformation de Fourier. Même si l'origine physique de l'interaction entre la bobine et le magnétisme nucléaire de l'objet reste un sujet de discussion [21], des formules très robustes nous donnent le signal de RMN en fonction de l'efficacité du détecteur [22]. Le signal est proportionnel à la polarisation et à la fréquence de précession et de la sensibilité intrinsèque de l'antenne par le biais du rapport  $B_1/l$ . De même, le bruit dépend de l'échantillon et de la température de la chaîne de détection.

## Micro-antennes

Lorsque l'échantillon est petit, la meilleure façon de le détecter est d'utiliser un détecteur adapté à sa taille, placé au plus près. L'utilisation de micro-antennes en résonance magnétique n'est pas nouvelle, mais ce n'est que récemment que les chercheurs ont pu enregistrer des spectres hautement résolus [23]. La raison de ce paradoxe se trouve dans la perturbation de l'homogénéité du champ due au magnétisme de l'antenne elle-même, c'est-à-dire dans les différences de susceptibilité magnétique. L'idée de plonger le détecteur en cuivre dans un liquide perfluoré ayant une susceptibilité magnétique proche de celle du métal a permis l'homogénéisation du champ localement et l'obtention de spectres hautement résolus à partir de volumes de liquides de l'ordre du nanolitre. L'impact en chimie a été très important car ce développement a conduit à la combinaison de la RMN avec les techniques chromatographiques analytiques. Plus récemment, l'introduction des micro-antennes planes et fabriquées par microlithographie a permis la détection du signal de résonance magnétique pour faire de la magnétométrie ultrasensible [24], ou même l'enregistrement de spectres RMN dans des dispositifs de microfluidique [25], couramment appelés « lab on a chip ».

La situation est bien sûr plus compliquée lorsque l'on souhaite faire tourner l'échantillon, ce qui est souvent le cas pour la rotation à l'angle magique des solides. Ici, l'option de miniaturiser l'échantillon tournant n'est pas facilement compatible avec un détecteur miniaturisé statique, même si on peut y arriver [26]. La situation est d'autant plus compliquée que l'implémentation des liquides perfluorés pour accorder la susceptibilité et obtenir de la haute résolution n'est pas

possible. En 2007, notre groupe a introduit l'idée des micro-antennes tournantes qui sont implantées à l'intérieur du rotor et tournent avec l'échantillon à l'angle magique [27]. Ce sont probablement les antennes les plus rapides du monde, car nous arrivons à les faire tourner à des millions de tours par minute, grâce à un système d'alignement et à un système de rotation pneumatique ! (voir figure 6).

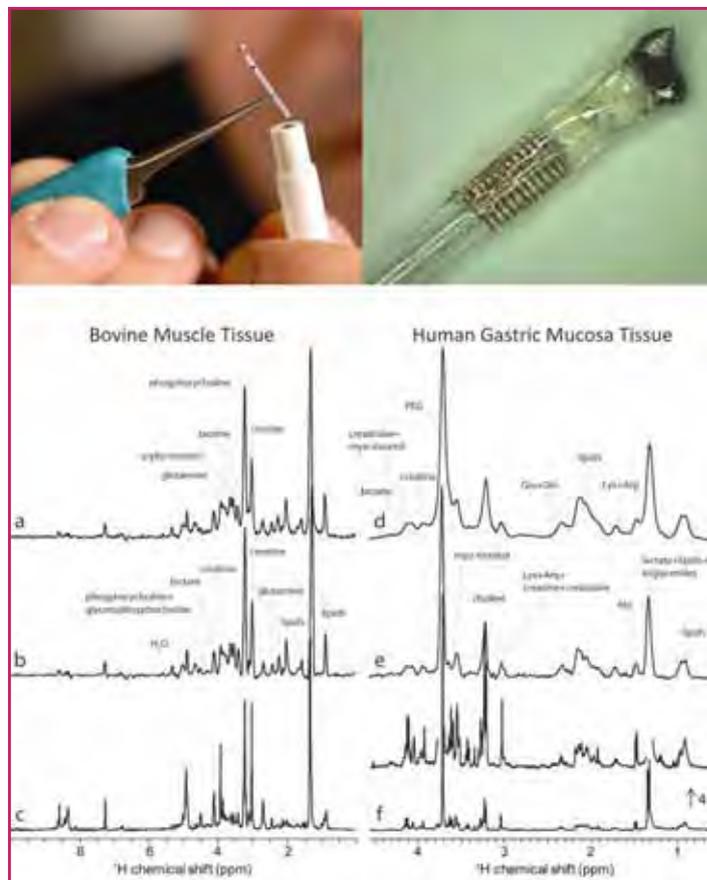


Figure 6 - Les microdétecteurs tournants sont des dispositifs miniaturisés (résonateurs) qui peuvent être couplés avec le reste de la chaîne de détection par un couplage sans fil. Ceci leur permet d'être implantés à l'intérieur du porte-échantillon et d'être au plus près du signal (photo en haut à gauche, © P. Stroppa/CEA). Ils peuvent être faits en deux dimensions, comme des bobines de surface, mais sont fabriqués d'habitude en forme solénoïdale pour entourer l'échantillon qui réside dans un capillaire (photo en haut à droite, © D. Sakellariou/CEA).

Plusieurs applications ont déjà été implémentées dans des situations où très peu d'échantillon est disponible (molécules isotopiquement enrichies ou radioactives, échantillons très précieux ou difficiles à obtenir). Notre but se focalise sur l'étude du métabolisme à partir de microbiopsies ou de petits ensembles de cellules. Les spectres de RMN des noyaux de  $^1\text{H}$ , obtenus en rotation à l'angle magique (figure du bas) permettent d'avoir des signatures métaboliques cellulaires et à l'aide de nos dispositifs ultra-sensibles, cette analyse deviendrait plus rapide et plus précise. Ces spectres ont été obtenus à partir de quantités de tissus microscopiques de quelques centaines de nanolitres (d'après [29]).

La connexion avec le reste de la chaîne de détection se fait sans fil et la transmission des signaux RMN a lieu de manière optimale [28]. Le grand avantage de cette approche est l'élimination de la susceptibilité car l'effet du magnétisme du détecteur est moyenné par sa rotation rapide, et à la clef se trouvent des spectres ultra-sensibles et très haute résolution. Un nombre d'études pilotes en RMN des solides, semi-solides (biopsies) et liquides [29] a permis de valider cette approche. Il s'agit bien d'une méthode générale qui peut s'appliquer à tout échantillon susceptible d'être étudié par RMN, permettant un gain de sensibilité d'un facteur proche

de 5 à 10 typiquement, par rapport à un détecteur macroscopique standard.

Les microdétecteurs tournants à l'angle magique peuvent être utilisés avec l'instrumentation commerciale existante. De plus, l'augmentation du signal vient avec une augmentation en amplitude de radiofréquence, ce qui est une propriété commune aux micro-antennes. Ainsi des spectres peuvent être excités facilement et des séquences de la RMN du solide, comme le découplage dipolaire, la création des cohérences à multiples quanta, etc. peuvent *a priori* en bénéficier grandement.

### Détecteurs froids

Une façon d'augmenter la sensibilité d'une méthode, c'est-à-dire le rapport signal sur bruit [30], est de diminuer le bruit. Le bruit en RMN provient majoritairement du mouvement électronique dans la bobine (et plus généralement la chaîne) de détection ainsi que du bruit lié à l'échantillon. Pour chacune des deux contributions, nous pouvons associer un bruit blanc et une résistance  $R_b$  et  $R_e$ , comme le montre la formule du rapport signal sur bruit (S/N), où la température du détecteur  $T_b$  joue un rôle primordial lorsque qu'elle est le facteur limitant la sensibilité :

$$\frac{S}{N} \approx \frac{b}{\sqrt{R_b T_b + R_e T_e}}$$

$b$  étant le champ de radiofréquence produit par l'antenne par unité de courant. Des antennes supraconductrices [31] à basse ou haute températures critiques ont été fabriquées et les résultats ont souvent transformé la façon de faire la RMN : aujourd'hui, pour les applications en biologie structurale, avoir une telle « cryosonde » n'est pas un luxe, mais plutôt un outil de travail. Nous n'avons encore vu que le début très prometteur de ce type d'instrumentation en solide [32], où la rotation de l'échantillon accentue les problèmes d'isolation et de mécanique. Il serait cependant souhaitable de développer ce type de détecteur pour les applications en biomédecine

où les exigences en termes de vitesse de rotation ne sont pas difficiles à satisfaire.

### Détections alternatives – détection mécanique

La détection inductive par RM est standard, mais elle a aussi ses propres faiblesses. Par exemple, détecter le signal provenant de quantités nanoscopiques n'est pas une chose facile à cause de la faible sensibilité. Ainsi d'autres possibilités de détection alternatives sont récemment apparues pour essayer de remédier à ce problème ou même offrir d'autres alternatives, comme la détection optique par la rotation Faraday, qui ne sera pas présentée ici.

En 1991, J. Sidles a proposé une détection non inductive de la résonance magnétique, basée sur des effets mécaniques induits par le magnétisme nucléaire sur des leviers oscillants. La limite de détection théorique de ce type de détection serait le spin nucléaire unique et l'application majeure pourrait être une imagerie par résonance magnétique au niveau de la molécule, où la position de chaque noyau serait codée dans l'espace 3D. Depuis cette proposition, beaucoup de développements instrumentaux ont conduit à des oscillateurs nanométriques ayant des facteurs de qualité très importants, et à des séquences adaptées pour ce type d'expériences, où c'est surtout le bruit quantique de spin [33] qui est la quantité détectée. L'équipe de D. Rugar (IBM) a pu effectuer et perfectionner la détection mécanique de la résonance magnétique à plusieurs reprises, et en 2004, ils ont annoncé la détection de la résonance magnétique d'un spin électronique unique ! Les conditions expérimentales de ce type d'expériences sont très exigeantes pour minimiser les bruits (par ex., les forces détectées sont inférieures à 1 attoNewton, la température est inférieure à 1 K et l'expérience a lieu en présence de vide). Très récemment, la première application de ce type de détection ultra-sensible à l'IRM nanométrique a été publiée [34]. L'obtention d'images 3D de particules virales avec des résolutions spatiales nanométriques fut très spectaculaire, et encourageant pour le devenir de cette méthode (voir *figure 7*).

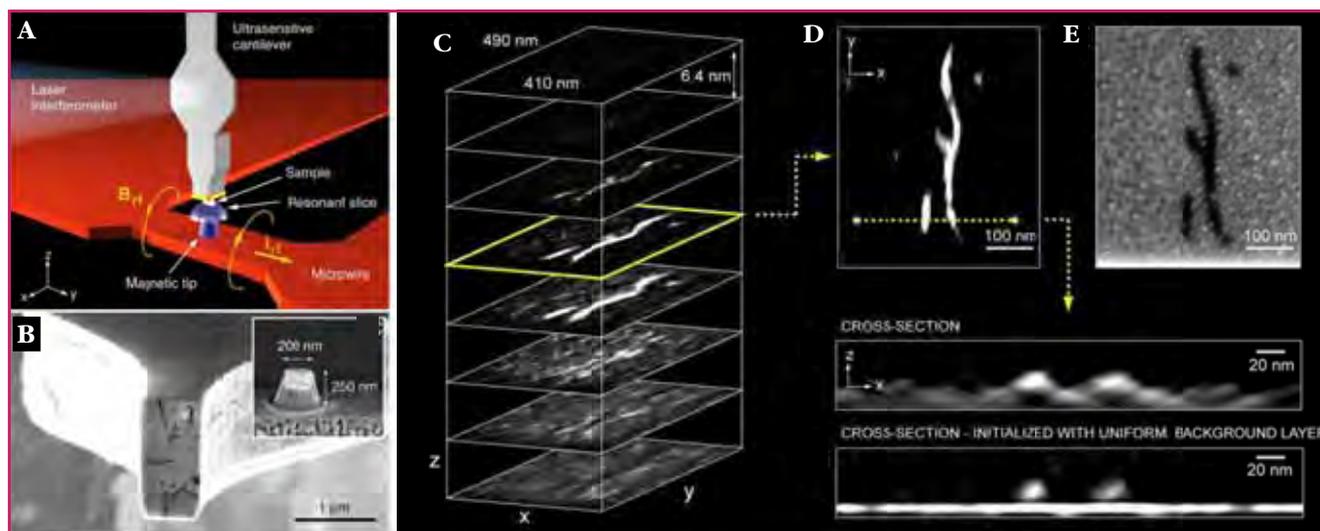


Figure 7 - Détection mécanique de la résonance magnétique et nano-imagerie.

(A) Un levier ultra-sensible oscille dans le plan xz et porte l'échantillon (en jaune) à son bout. L'échantillon est un ensemble de particules virales de la mosaïque du tabac. Un aimant permanent (en mauve) est placé sous l'échantillon afin de créer un gradient de champ magnétique très important qui définit la zone résonante (coquille violette). Le champ de radiofréquence  $B_{rf}$  est envoyé ici par un microfil (en rouge), et un champ extérieur uniforme de 2,6 T est appliqué. Les changements de l'oscillation qui sont dus à la résonance magnétique sont détectés de manière optique, par interférométrie. (B) Image des particules du virus enregistrée par microscopie électronique de balayage. (C) Nano-IRM 3D effectuée par détection mécanique. (D) Image 2D extraite de l'image 3D où l'on distingue la densité des protons associée aux particules virales, à comparer avec l'image du microscope électronique à balayage (E) (d'après [34]).

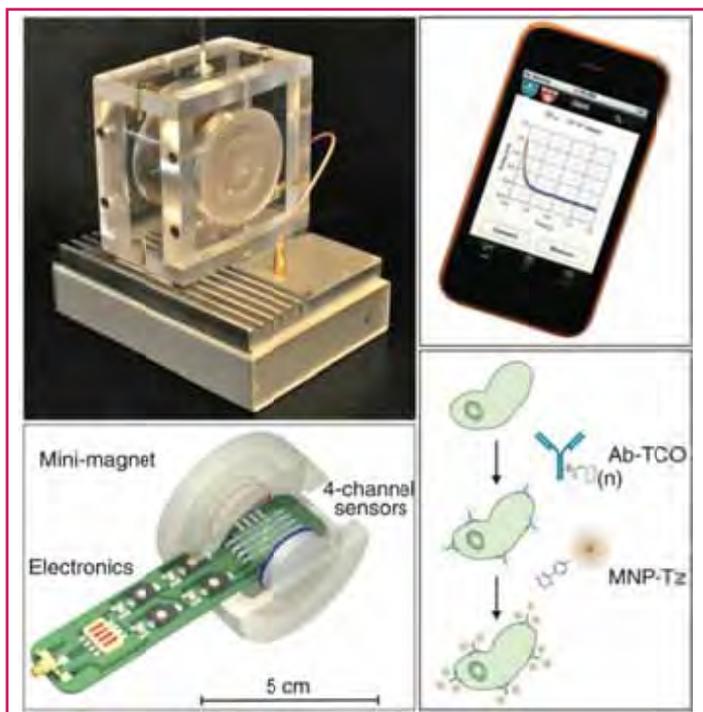


Figure 8 - Système de résonance magnétique miniaturisé pour la détection et l'analyse de cellules tumorales à l'aide de dispositifs microfluidiques à partir de microbiopsies (d'après [35]).

En haut à droite, on voit l'électro-aimant miniaturisé dans lequel le système microfluidique (présenté en bas à gauche) effectue l'analyse des courbes de relaxation  $T_2$  (montrées en haut à droite). L'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées permet la détection parallèle de leur complexation avec des protéines cibles par un changement radical du temps de relaxation  $T_2$  (présenté schématiquement en bas à droite). Ces changements peuvent être très facilement détectés à l'aide d'une instrumentation miniaturisée et adaptée à ce type d'étude.

## Des applications prometteuses

Comme les techniques de la RMN et de l'IRM sont déjà matures, la plupart de ces avancées instrumentales visent souvent des applications spécifiques. Depuis plusieurs années, les industries pétrolière et agroalimentaire profitent de l'instrumentation miniaturisée pour étudier des carottes de roches et des produits domestiques (graines, farines, huiles, etc.), et les grands constructeurs commerciaux proposent des systèmes complets dans ce cadre. Le domaine de la biomédecine a également bénéficié des développements sur les aimants miniaturisés. L'utilisation de simples aimants (électroaimants ou aimants permanents [35], voir figure 8) et de spectromètres de paillasse et leur combinaison avec des systèmes de microfluidique, afin de détecter le changement du temps de relaxation des cellules cancéreuses par des nanoparticules fonctionnalisées, a suscité beaucoup d'intérêt, notamment industriel. D'ailleurs, un certain nombre de nouvelles sociétés proposent déjà des systèmes miniaturisés pour l'enseignement et des systèmes portables à haute résolution ne devraient pas tarder à arriver sur le marché.

Un des domaines médicaux d'application de la DNP du carbone-13 par dissolution est l'étude du métabolisme, et plus particulièrement son application aux tumeurs cancéreuses [36] et au métabolisme cérébral. Récemment, la DNP a eu l'autorisation d'être utilisée en milieu clinique, ce qui démontre le fort potentiel de l'approche vers des applications réelles à fort impact sociétal.

## Conclusion

L'explosion des nouvelles technologies comme la microfabrication, les nanosciences et la biomédecine ouvre des perspectives et alimente en nombreux défis la discipline instrumentale de la résonance magnétique. On voit aussi de manière visible comment les développements instrumentaux permettent les nouveaux développements méthodologiques, la meilleure compréhension des phénomènes physico-chimiques et leur utilisation pour répondre à des questions à la fois fondamentales et pratiques. La preuve est que soixante six ans après sa découverte et l'attribution de quatre prix Nobel, elle continue de se développer rapidement et de produire des résultats uniques et souvent très étonnants. Pour conclure, une phrase simple me semble parfaitement décrire l'avenir de la résonance magnétique : « elle n'est pas prête d'arrêter de nous surprendre... »

L'auteur remercie Patrick Berthault, Thierry Schild et Paul-Christophe Varoutas pour une lecture critique du manuscrit, l'European Research Council pour le financement du projet R-EvoluoNMR, Starting Grant # 205119, l'ANR pour le financement des projets NMR2GO et DYN-IDP et C-Nano IdF pour le financement du projet NanoMACS.

## Notes et références

- [1] Ou de plusieurs antennes dans le cas de l'IRM, où des réseaux d'antennes peuvent être utilisés afin de couvrir une grande partie du corps.
- [2] Le facteur qui est souvent plus pertinent est le rapport signal sur bruit, qui peut avoir une dépendance plus compliquée à cause des effets de peau et du bruit provenant du circuit électrique et de l'échantillon (voir [30]).
- [3] 657 4 166 fois entre l'électron et le proton (noyau d'hydrogène).
- [1] Voir le site dédié au centenaire de la supraconductivité : [www.supraconductivite.fr/fr/index.php](http://www.supraconductivite.fr/fr/index.php).
- [2] Saho N., Nishijima N., Tanaka H., Sasaki A., Development of portable superconducting bulk magnet system, *Physica C: Superconductivity*, **2009**, 469, p. 1286.
- [3] Ogawa K., Nakamura T., Terada Y., Kose K., Haishi T., Development of a magnetic resonance microscope using a high  $T_c$  bulk superconducting magnet, *Appl. Phys. Lett.*, **2011**, 98, p. 234101.
- [4] Kirichek O., Carr P., Johnson C., Atrey M., Nuclear magnetic resonance magnet actively cooled by pulse tube refrigerator, *Rev. Sci. Instrum.*, **2005**, 76, p. 55104.
- [5] Kleinberg R.L., Jackson J.A., An introduction to the history of NMR well logging, *Concept Magnetic Reson.*, **2001**, 13, p. 340.
- [6] Eidmann G., Savelsberg R., Blümmler P., Blümich B., The NMR MOUSE, a mobile universal surface explorer, *J. Magn. Reson. A*, **1996**, 122, p. 104 ; Blümich B., Perlo J., Casanova F., Mobile single-sided NMR, *Prog. NMR Spectrosc.*, **2008**, 52, p. 197.
- [7] Marble A.E., Mastikhin I.V., Colpitts B.G., Balcom B.J., An analytical methodology for magnetic field control in unilateral NMR, *J. Magn. Reson.*, **2005**, 174, p. 78 ; Marble A., Mastikhin I.V., Colpitts B.G., Balcom B.J., Designing static fields for unilateral magnetic resonance with the scalar potential approach, *IEEE Transactions on Magnetics*, **2007**, 43, p. 1903.
- [8] Hugon C., D'Amico F., Aubert G., Sakellariou D., Design of arbitrarily homogeneous permanent magnet systems for NMR and MRI: theory and experimental developments of a simple portable magnet, *J. Magn. Reson.*, **2010**, 205, p. 75.
- [9] Hugon C., Aubert G., Sakellariou D., A systematic approach to the design, fabrication and testing of permanent magnets applied to single-sided NMR, *AIP Conf. Proc.*, **2011**, 1330, p. 105.
- [10] Perlo J., Casanova F., Blümich B., *Ex-situ* NMR in highly homogeneous fields:  $^1\text{H}$  spectroscopy, *Science*, **2007**, 315, p. 1110.
- [11] Danielli E., Perlo J., Blümich B., Casanova F., Small magnets for portable NMR spectrometers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, p. 4133.
- [12] Sakellariou D. *et al.*, Permanent magnet assembly producing a strong tilted homogeneous magnetic field: Towards magic angle field spinning NMR and MRI, *Magn. Reson. Chem.*, **2010**, 48, p. 903.
- [13] Kastler A., *J. Phys. Rad.*, **1950**, 11, p. 255 ; Kastler A., *Proc. Phys. Soc. London Section A*, **1954**, 67, p. 853.
- [14] Ebert M. *et al.*, Nuclear magnetic resonance imaging on humans using hyperpolarized  $^3\text{He}$ , *Lancet*, **1996**, 347, p. 1297 ; Bachert P. *et al.*, Nuclear magnetic resonance of airways in humans with use of hyperpolarized  $^3\text{He}$ , *Magn. Reson. Med.*, **1996**, 36, p. 192 ; MacFall J.R. *et al.*, Human lung air spaces: potential for MR imaging with hyperpolarized  $^3\text{He}$ , *Radiology*, **1996**, 200, p. 553.

- [15] Berthault P. *et al.*, Biosensing using laser-polarized xenon NMR/MRI, *Prog. NMR Spectrosc.*, **2009**, *55*, p. 35 ; Berthault P., Petits, mais sensibles ?, *Pour la Science*, **2009**, 378.
- [16] Ardenkjaer-Larsen J.H., Fridlund B., Gram A., Hansson G., Hansson L., Lerche M.H., Servin R., Thaning M., Golman K., Increase in signal-to-noise ratio of >10,000 times in liquid-state NMR, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, p. 10158.
- [17] Joo C.G., Hu K.N., Bryant J.A., Griffin R.G., *In situ* temperature jump high-frequency dynamic nuclear polarization experiments: enhanced sensitivity in liquid-state NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, p. 9428.
- [18] Maly T. *et al.*, Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields, *J. Chem. Phys.*, **2008**, *128*, p. 052211.
- [19] Bowers C.R., Weitekamp D.P., Transformation of symmetrization order to nuclear-spin magnetization by chemical reaction and nuclear magnetic resonance, *Phys. Rev. Lett.*, **1986**, *57*, p. 2645 ; Bowers C.R., Weitekamp D.P., Parahydrogen and synthesis allow dramatically enhanced nuclear alignment, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, p. 5541.
- [20] Adams R.W., Aguilar J.A., Atkinson K.D., Cowley M.J., Williamson D.C., Reversible interactions with para-hydrogen enhance NMR sensitivity by polarization transfer, *Science*, **2009**, *323*, p. 1708.
- [21] Hoult D.I., Ginsberg N.S., The quantum origins of the free induction decay signal and spin noise, *J. Magn. Reson.*, **2001**, *148*, p. 182.
- [22] Hoult D.I., Richards R.E., The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment, *J. Magn. Reson.*, **1976**, *24*, p. 71.
- [23] Olson D.L., Peck T.L., Webb A.G., Magin R.L., Sweedler J.V., High-resolution microcoil <sup>1</sup>H-NMR for mass-limited, nanoliter-volume samples, *Science*, **1995**, *270*, p. 1967.
- [24] Boero G., Frounchi J., Furrer B., Besse P.A., Popovic R.S., Fully integrated probe for proton nuclear magnetic resonance magnetometry, *Rev. Sci. Instrum.*, **2001**, *72*, p. 2764.
- [25] Massin C. *et al.*, Planar microcoil-based microfluidic NMR probes, *J. Magn. Reson.*, **2003**, *164*, p. 242 ; Bart J. *et al.*, A microfluidic high-resolution NMR flow probe, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, p. 5014.
- [26] Yamauchi K., Asakura T., Development of microMAS NMR probehead for mass-limited solid-state samples, *Chem. Lett.*, **2006**, *35*, p. 426 ; Janssen H., Brinkmann A., van Eck E.R.H., van Bentum J.M., Kentgens A.P.M., Microcoil high-resolution magic angle spinning NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, p. 8722.
- [27] Sakellariou D., Le Goff G., Jacquinet J.-F., High resolution, high sensitivity NMR of nanoliter anisotropic samples by coil spinning, *Nature*, **2007**, *447*, p. 694.
- [28] Jacquinet J.-F., Sakellariou D., Microdétecteurs rotatifs en résonance magnétique nucléaire, *Techniques de l'Ingénieur*, **2008**, *85*, p. 1 ; Jacquinet J.-F., Sakellariou D., NMR signal detection using inductive coupling: applications to rotating micro-coils, *Conc. Magnet. Reson.*, **2011**, *38A*, p. 33.
- [29] Wong A., Aguiar P.M., Sakellariou D., Slow magic-angle coil spinning: A high-sensitivity and high-resolution NMR strategy for microscopic biological specimens, *Magn. Reson. Med.*, **2010**, *63*, p. 269 ; Wong A. *et al.*, Evaluation of high resolution magic-angle coil spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of nanoliter tissue biopsies, *Anal. Chem.*, **2012**, *84*, p. 3843 ; Wong A., Aguiar P., Charpentier T., Sakellariou D., A low-cost strategy for <sup>43</sup>Ca solid-state NMR spectroscopy, *Chem. Sci.*, **2011**, *2*, p. 815 ; Aguiar P.M., Jacquinet J.-F., Sakellariou D., A convenient, high-sensitivity approach to multiple-resonance NMR at nanolitre volume with inductively-coupled micro-coils, *Chem. Comm.*, **2011**, *47*, p. 2119.
- [30] Hoult D.I., Richards R.E., The signal-to-noise ratio of the nuclear magnetic resonance experiment, *J. Magn. Reson.*, **1976**, *24*, p. 71.
- [31] Ginefri J.-C., Darrasse L., Crozat P., High-temperature superconducting surface coil for *in vivo* microimaging of the human skin, *Magn. Reson. Med.*, **2001**, *45*, p. 376.
- [32] Mizuno T., Hioka K., Fujioka K., Takegoshi T., Development of a magic-angle spinning nuclear magnetic resonance probe with a cryogenic detection system for sensitivity enhancement, *Rev. Sci. Instrum.*, **2008**, *79*, p. 044706.
- [33] Sleator T., Hahn E.L., Hilbert C., Clarke J., Nuclear-spin noise, *Phys. Rev. Lett.*, **1985**, *55*, p. 1742 ; Degen C.L., Poggio M., Mamin H.J., Rugar D., Role of spin noise in the detection of nanoscale ensembles of nuclear spins, *Phys. Rev. Lett.*, **2007**, *99*, p. 250601.
- [34] Degen C.L., Poggio M., Mamin H.J., Rettner C.T., Rugar D., Nanoscale magnetic resonance imaging, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2009**, *106*, p. 1313.
- [35] Lee H., Sun E., Weissleder R., Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells, *Nat. Medicine*, **2008**, *14*, p. 869 ; Lee H. *et al.*, Rapid detection and profiling of cancer cells in fine-needle aspirates, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **2009**, *106*, p. 12459.
- [36] Golman K. *et al.*, Molecular imaging with endogenous substances, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, p. 10435 ; Day S.E. *et al.*, Detecting tumour response to treatment using hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance imaging and spectroscopy, *Nat. Med.*, **2007**, *13*, p. 1382 ; Gallagher F.A. *et al.*, Magnetic resonance imaging of pH *in vivo* using hyperpolarized <sup>13</sup>C-labeled bicarbonate, *Nature*, **2008**, *453*, p. 940 ; Gabellieri C., Reynolds S., Lavie A., Payne G.S., Leach M.O., Eykyn T.R., Therapeutic target metabolism observed using hyperpolarized <sup>15</sup>N choline, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, p. 4598.



### Dimitrios Sakellariou

est chercheur à l'IRAMIS, Laboratoire Structure et Dynamique par Résonance Magnétique, CEA Gif-sur-Yvette\*.

\* CEA Saclay, DSM, IRAMIS, UMR CEA/CNRS 3299 – SIS2M, Laboratoire Structure et Dynamique par Résonance Magnétique, F-91191 Gif-sur-Yvette Cedex.  
Courriel : dsakellariou@cea.fr



www.lactualitechimique.org

Connaissez-vous bien le site de l'AC ?

**Vous y trouverez :**

- le sommaire et l'éditorial du dernier numéro
- des actualités
- un moteur de recherche

**Et aussi :**

- les articles en ligne (certains accessibles gratuitement, d'autres au prix de 4€)
- les archives des numéros thématiques (depuis 1999) ou à rubriques (depuis 2000)

**Sans oublier que vous pouvez également :**

- acheter un numéro en pdf
- vous abonner à la version électronique

Alors vite, à votre souris !

## Nominations et distinctions

## Les Médailles 2012 du CNRS

## Médailles d'argent



• **Bernadette Charleux**, directrice de l'UMR 5265 (Chimie, Catalyse, Polymères et Procédés, C2P2, CPE Lyon) et responsable de l'équipe « Chimie et procédés de polymérisation », pour ses travaux sur la polymérisation radicalaire contrôlée (PRC). L'originalité de son approche a été de mettre au point les conditions de synthèse permettant le contrôle de la polymérisation radicalaire des grandes familles de monomères en dispersion ou émulsion aqueuse : monomères styréniques, acryliques et méthacryliques en émulsion par la voie nitroxyde conduisant à développer une large gamme de latex fonctionnels et de copolymères amphiphiles. Elle a ensuite élargi son expertise à toutes les méthodes de contrôle en PRC et a brillamment mis au point la synthèse de copolymères amphiphiles capables de s'auto-assembler *in situ* pour former divers nano-objets fonctionnels ou stimulables. Elle s'est également investie dans la synthèse de matériaux/systèmes hybrides nanométriques alliant croissance inorganique et polymérisation contrôlée, par greffage de silices mésoporeuses. Son expertise scientifique est donc particulièrement riche, couvrant à la fois des concepts mécanistiques en synthèse macromoléculaire et l'ingénierie de systèmes polymères fonctionnels très bien définis.

Ses travaux l'ont conduite à collaborer avec les plus grands noms de l'industrie (Arkema, Essilor, BASF, Eliokem, L'Oréal, Coatex, Saint-Gobain, Solvin, Lafarge...) et au dépôt de 18 brevets témoignant de sa volonté de valorisation. Médaille de bronze du CNRS en 1997, Bernadette Charleux a reçu en 2000 le prix de la division SFC Matériaux Polymères et en 2011 le Prix Grammaticakis-Neuman de l'Académie des sciences.



• **Ivan Huc**, directeur de recherche à l'Institut européen de chimie et biologie de Bordeaux, laboratoire Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets (UMR 5248-CBMN, Université Bordeaux 1). Après avoir été à l'origine de la chimie combinatoire dynamique pendant sa période strasbourgeoise (J.-M. Lehn, Laboratoire de Chimie supramoléculaire), Ivan Huc

a développé un ensemble d'activités extrêmement originales basées sur l'auto-assemblage de nano-objets moléculaires et sur la mise en œuvre de dispositifs tirant parti de leurs propriétés. Ses recherches actuelles sont associées au domaine des foldamères basés sur des oligo-amides, dont il est l'un des créateurs. Il s'intéresse plus particulièrement à la classe des foldamères oligoamides aromatiques en tant que mimes de biomolécules, ce qui l'a conduit à la publication d'articles retentissants. Ses recherches peuvent être divisées en trois axes majeurs : méthodologie de synthèse de foldamères dont la taille et la complexité s'accroissent et peuvent se comparer à de petites protéines (protéomimes), structure et étude du phénomène de repliement et des comportements physiques et chimiques de ces nano-objets, étude de leurs propriétés biologiques (encapsulation). Il étudie en outre avec succès la chiralité moléculaire à l'échelle supramoléculaire.

Ses travaux lui ont valu de nombreuses distinctions : Médaille de bronze du

CNRS en 1999, Médaille d'argent de la Société d'Encouragement au Progrès en 2001, Prix Acros (division de Chimie organique, SFC) en 2003, Prix Jecker de l'Académie des sciences en 2008.



• **Paolo Samorì**, directeur de l'Institut de science et d'ingénierie supramoléculaires (UMR 7006, ISIS, Université de Strasbourg), pour ses travaux sur le contrôle d'architecture dans des matériaux supramoléculaires complexes et multicomposants, ouvrant la voie à la fabrication de nano-dispositifs supramoléculaires fonctionnant sur surfaces, ainsi qu'au développement de matériaux et dispositifs nanostructurés multifonctionnels présentant de nouvelles fonctionnalités à l'échelle nanométrique.

C'est après des études en chimie industrielle à Bologne et son doctorat en chimie-physique à l'Université Humboldt de Berlin que Paolo Samorì, de retour à Bologne fin 2001 comme chercheur au Consiglio Nazionale delle Ricerche, a commencé à travailler sur



### Ludwik Leibler, Grand Prix 2012 de la Fondation de la Maison de la Chimie

Suivant les recommandations du jury international, Bernard Bigot, président de la Fondation de la Maison de la Chimie, a décerné le Grand Prix 2012 à **Ludwik Leibler**, directeur de recherche de classe exceptionnelle au CNRS et professeur associé à l'École Supérieure de Physique et de Chimie de la Ville de Paris, directeur de l'Unité mixte CNRS/ESPCI « Matière Molle et Chimie », **pour sa contribution exceptionnelle dans le domaine de la physico-chimie des polymères.**

Ce chercheur français d'origine polonaise a combiné un travail théorique de très grande qualité à des développements applicatifs non moins remarquables. Il a notamment travaillé sur la thermodynamique et la rhéologie des polymères et copolymères et sur les systèmes supramoléculaires auto-assemblants. Une de ces dernières découvertes marquantes concerne la capacité de certains matériaux élastiques de pouvoir s'auto-réparer, par simple contact entre les parties, suite à une déchirure ou coupure complète, et ainsi de retrouver leur propriété élastique initiale [1]. Une autre découverte récente concerne une nouvelle classe de matériaux organiques qu'il a appelés des vitrimères. Il s'agit de matériaux polymères inédits, à base de polyesters, qui comme le verre sont solubles et façonnables à volonté. Selon la composition choisie, ces matériaux peuvent être soit durs, soit souples et élastiques. Ils présentent dans les deux cas les mêmes qualités de légèreté, de résistance et d'insolubilité que les résines thermodures ou les caoutchoucs, mais par rapport à ces derniers, ils offrent l'avantage d'être réparables et recyclables sous la simple action de la chaleur ou du froid qui, comme un verre, les fait passer de l'état solide à l'état visqueux, et réciproquement [2]. Auteur ou co-auteur de plus de 170 publications, inventeur ou co-inventeur de 56 brevets, Ludwik Leibler s'est déjà vu décerner notamment la Médaille d'argent du CNRS en 1989 et le Prix Pierre Süe, Grand Prix de la Société Chimique de France, en 2009.

*Le Grand Prix est destiné à récompenser une œuvre originale concernant la chimie au bénéfice de l'homme, de la vie, de la société ou de la nature. Le prix, d'un montant de 35 000 €, accompagné d'une médaille en argent, sera remis lors d'une séance solennelle qui se tiendra à la Maison de la Chimie (Paris 7<sup>e</sup>) le 14 novembre prochain, à l'occasion du colloque « Chimie et enjeux énergétiques » [3].*

• Source : Fondation de la Maison de la Chimie, 29/05/12.

[1] Voir Montarnal D., Tournilhac F., Hidalgo M., Leibler L., L'oléochimie rencontre la chimie supramoléculaire, *L'Act. Chim.*, 2011, 348-349, p. 49 ([www.lactualitechimique.org/larevue\\_article.php?cle=2471](http://www.lactualitechimique.org/larevue_article.php?cle=2471), téléchargement libre).

[2] Voir En bref, *L'Act. Chim.*, 2011, p. 53 ; Montarnal D., Capelot M., Tournilhac F., Leibler L., Silica-like malleable materials from permanent organic networks, *Science*, 2011, 334(6058), p. 965.

[3] <http://actions.maisondelachimie.com/index-p-colloque-i-25.html>

l'utilisation des microscopies en champ proche pour étudier les propriétés physico-chimiques des nanomatériaux moléculaires. Poursuivant ses travaux à l'ISIS à partir de 2003, il a développé une palette de nanomatériaux et nano-dispositifs intelligents, comme les nano-transistors. Ses découvertes ouvrent la voie à de nombreuses applications dans le domaine de l'opto-électronique supramoléculaire, en particulier pour la fabrication de dispositifs flexibles et multifonctionnels tels que papiers électroniques flexibles, circuits intégrés, capteurs, mémoires pour stockage de l'information.

Partenaire et porteur de plusieurs projets européens, ses travaux ont été récompensés par de nombreux prix internationaux dont l'European Research Council (ERC) Starting Grant 2010 et le Prix « Guy Ourisson » du Cercle Gutenberg 2010.

### Médailles de bronze

• **Manouk Abkarian**, chargé de recherche au Laboratoire Charles Coulomb (L2C, Université Montpellier 2), pour ses travaux sur les aspects physiques des écoulements sanguins (microfluidique pour l'étude des écoulements de globules rouges) et sur certaines pathologies du sang (anémie falciforme, paludisme), un domaine en pleine expansion et très concurrentiel.

Après sa thèse où il a étudié les vésicules puis les globules rouges, suivie d'un post-doctorat dans le groupe de H.A. Stone à Harvard (E.-U.), il met ses connaissances sur le globule rouge à profit au L2C pour s'attaquer avec succès à la description des processus d'infection par le parasite de la malaria. En parallèle, il a poursuivi sa collaboration avec Stone et obtenu des résultats sur les déformations de membranes élastiques.

• **Nicolas Blanchard**, chargé de recherche à l'Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse (LRC 7228, Université de Haute-Alsace), pour ses travaux en synthèse organique. L'axe principal de ses recherches, en collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris, concerne la synthèse totale à l'interface de l'immunologie et de la biologie cellulaire. Il étudie le rôle de macrolides polycétidiques complexes, les mycolactones A/B, premiers déterminants de virulence connus d'un pathogène bactérien humain, *Mycobacterium ulcerans*, dont les toxines sont responsables de l'ulcère de Buruli, une maladie nécrotique de la peau très invalidante et répertoriée dans plus de trente pays. Des analogues de ces

toxines ont été synthétisés et leurs effets cytopathiques évalués, permettant d'établir la première relation structure/activité, un premier pas important vers la compréhension du mécanisme d'action des mycolactones. Il étudie également les transformations métallo-ou métalloïdo-induites.

• **Nicolas Clavier**, chargé de recherche à l'Institut de Chimie Séparative de Marcoule (UMR 5257), pour ses travaux en radiochimie, en particulier sur l'altération des matériaux nucléaires (céramiques), et l'originalité de son approche pour comprendre le devenir d'un matériau qui repose sur l'étude de son passé physico-chimique (synthèse originelle, mise en forme, traitements). Cette approche permet l'étude de matériaux d'intérêt tout au long du cycle électronucléaire – altération et thermodynamique des minerais uranifères ou thorifères, synthèse des pré-curseurs et frittage, retraitement et stockage – et ouvre des perspectives d'applications à tous types de matériaux. L'autre aspect original, conséquence de cette démarche innovante, est d'avoir développé des techniques de caractérisation et d'observation *in situ* qui ont abouti à la première observation directe du frittage de l'oxyde de cérium à 1 400 °C, ou au développement d'une méthodologie inédite d'évaluation de la surface réactive d'une céramique en cours de dissolution.

• **Sylvain Deville**, chargé de recherche au Laboratoire de Synthèse et Fonctionnalisation des Céramiques (UMR 3080, LSFC, CNRS/Saint-Gobain, Cavaillon), où il anime l'équipe « Nouvelles architectures céramiques », pour ses travaux sur la solidification contrôlée (congélation) de suspensions colloïdales et son utilisation dans l'élaboration de matériaux poreux texturés pour des applications biomédicales (hausse de la valeur de la résistance en compression de biomatériaux de 400 % par rapport aux solutions actuelles). Cette approche pluridisciplinaire, à la frontière de la biologie et de la science des matériaux, est particulièrement prometteuse et lui a permis de devenir rapidement un spécialiste reconnu dans ce domaine (ERC Starting Grant 2011).

• **Nicolas Floquet**, chargé de recherche à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM, CNRS UMR 5247, Université Montpellier 1 & 2) pour ses travaux qui vont de la biochimie à la mécanique moléculaire. Après s'être intéressé aux constituants de la matrice

### Le blog de Maurice Leroy, président de la FFC

« Ciel du furane dans mon café ! » ou « Pourquoi le collier du président de la République est-il en or ? », voilà quelques-uns des billets de Maurice Leroy, le président de la Fédération Française des sciences pour la Chimie (FFC), à découvrir sur son blog sur le site français du Huffington Post. Et d'avis aussi de non-chimistes, c'est intéressant et bien écrit !

• [www.huffingtonpost.fr/maurice-leroy](http://www.huffingtonpost.fr/maurice-leroy)

extracellulaire (élastine, collagène), à la glucosamine-6-phosphate synthase (cible d'intérêt dans les complications liées au diabète de type II), au rôle de la thrombospondine-1 dans les processus de résistance aux médicaments utilisés en chimiothérapie, il s'est spécialisé à l'IBMM dans la mécanique moléculaire des récepteurs couplés aux protéines G et de leurs partenaires.

• **Christelle Hureau**, chargée de recherche au Laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse (UPR 8241), où elle étudie l'interaction entre le peptide amyloïde- $\beta$  et les ions  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Antérieurement, son doctorat et ses trois post-doctorats (Paris-Sud Orsay ; Laboratoire de Géophysique interne et Tectonophysique, Université J. Fourier Grenoble ; Laboratoire de Biophysique des Stress oxydants, SBE CEA Saclay ; Laboratoire d'Électrochimie moléculaire, Paris) l'avaient conduit à étudier : la modélisation du centre de dégagement du dioxygène des plantes et les synthèses chimiques et électrochimiques de complexes du manganèse ; la coordination de l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  en fonction du pH par le 5<sup>e</sup> site à cuivre de la protéine du prion et l'étude par spectroscopie RPE de l'intercalation des complexes dans de l'argile synthétique ; l'étude par RPE à champs intenses du site de fixation du métal dans la superoxyde dismutase à manganèse ; les caractérisations cinétique et thermodynamique d'une laccase par voie électrochimique.

*La Médaille d'argent distingue un chercheur pour l'originalité, la qualité et l'importance de ses travaux, reconnus sur le plan national et international ; la Médaille de bronze récompense le premier travail d'un chercheur, qui fait de lui un spécialiste de talent dans son domaine, et représente un encouragement du CNRS à poursuivre des recherches bien engagées et déjà fécondes.*

D'autres brèves vous attendent sur le site de la revue ([lactualitechimique.org](http://lactualitechimique.org), page liée au sommaire de ce numéro).

## Industrie

## Un nouveau président pour l'UIC



Le 26 avril dernier, l'Assemblée générale de l'UIC (Union des Industries Chimiques) a élu à l'unanimité son nouveau président pour un mandat de

deux ans.

**Philippe Goebel**, directeur général adjoint de Total Petrochemicals France, succède ainsi à Olivier Homolle (président de BASF France), dont le mandat était arrivé à échéance.

Diplômé de l'École supérieure de physique et de chimie industrielles (ESPCI Paris) et de Sciences-Po, administrateur de l'UIC depuis fin 2008 où il a exercé la présidence du SCOB (Syndicat de la chimie organique de base) jusqu'en mars dernier, le nouveau président souhaite continuer à rassembler tous les acteurs de la chimie et de ses applications, quelle que soit leur taille, autour d'une ambition forte : dessiner l'industrie chimique durable de demain, compétitive, attractive et innovante, faire une industrie « plus forte, fédératrice, reconnue comme promoteur de croissance durable en France. »

À son programme : la lutte pour la compétitivité ; la poursuite des actions des comités stratégiques de filière – Chimie et matériaux en particulier, « une filière structurante pour notre pays » – et des pôles de rassemblement (biotech, chimie verte, recyclage) ; la place des jeunes au sein de l'économie.

## Recherche et développement

## Prédire l'efficacité des particules magnétiques comme agents de contraste en IRM

Chaque année, des dizaines d'articles scientifiques décrivent de nouveaux systèmes de nanoparticules injectables pouvant modifier le contraste des tissus biologiques en IRM, qui est devenue indispensable dans les hôpitaux pour réaliser des images anatomiques en trois dimensions des organes « mous » (abdomen, muscles, cerveau...). En particulier, les cancers peuvent être diagnostiqués grâce à des agents de contraste : en ciblant des cellules d'intérêt par des mécanismes passifs (perméabilité et rétention

accrues) ou actifs (ciblage d'un récepteur), ces particules permettent de différencier plus aisément sur l'image les tumeurs des régions saines. Dans son principe, l'IRM consiste à exciter sélectivement le moment magnétique des protons de l'eau par des impulsions radiofréquences et à observer leur retour à l'équilibre. Celui-ci est caractérisé par des temps de relaxation qui influent sur le contraste de l'image finale. Les agents de contraste se comportent comme de petits aimants qui interagissent avec les protons et accélèrent leur retour à l'équilibre, ce qui modifie le contraste de l'image. L'efficacité de ces agents est mesurée par la valeur de leur « relaxivité », qui est inversement proportionnelle au temps de relaxation des protons et rapportée à la concentration des ions magnétiques, le plus souvent les ions ferriques.

Des physico-chimistes du CNRS, des universités de Bordeaux et de Paris 6 et 7<sup>(1)</sup> viennent de publier, en collaboration avec des physiciens de l'Université de Mons en Belgique, un modèle universel pour prédire l'efficacité des nanoparticules magnétiques en tant qu'agents de contraste pour l'IRM<sup>(2)</sup>. La nouveauté est d'avoir décrit précisément comment les agents dits « de contraste négatif » (ceux dont la présence sur l'image IRM est attestée par une zone plus sombre) doivent être comparés entre eux, en normalisant la relaxivité par la fraction volumique du matériau magnétique à l'intérieur

de la nanoparticule<sup>(3)</sup>, l'aimantation et le diamètre externe de l'objet. Les auteurs ont pu prédire de manière analytique la relaxivité maximale que l'on peut atteindre pour différents matériaux (oxyde de fer pur, particule hybride, particule à noyau de fer métallique et couche d'oxyde, oxyde mixte de fer, de zinc et de manganèse). Selon les cas, ce maximum peut prendre des valeurs 8 à 19 fois plus élevées qu'avec les agents de contraste commerciaux actuels. Cependant, pour être réellement introduits sur le marché, de tels agents devraient présenter non seulement une efficacité vraiment supérieure aux agents actuels, mais aussi une totale innocuité.

Désormais les chimistes disposent d'une boîte à outils utilisable en pratique (car basée sur de simples lois de puissances) pour viser les meilleures caractéristiques de leurs particules magnétiques, et ce avant même d'entamer la synthèse !

• Source : CNRS, 09/05/12.

(1) Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (CNRS/Université de Bordeaux 1), Physicochimie, Colloïdes et Sciences Analytiques (CNRS/UPMC/ESPCI ParisTech), Laboratoire de Matière et Systèmes Complexes (CNRS/Université Paris Diderot).

(2) Vuong Q.L., Berret J.-F., Fresnais J., Gosuain Y., Sandre O., Universal scaling law to predict the efficiency of magnetic nanoparticles as MRI T<sub>2</sub>-contrast agents, *Advanced Healthcare Materials*, 2012, doi : 10.1002/adhm.201200078.

(3) Celle-ci peut en effet avoir une structure interne complexe, telle qu'une écorce de silice ou une couronne de polymères pour améliorer sa furtivité dans le sang.

## Deux nouveaux venus dans le tableau périodique

Le 31 mai dernier, l'IUPAC a officiellement donné le nom de **flerovium (Fl)** à l'élément de numéro atomique 114 et de **livermorium (Lv)** à l'élément 116. La découverte de ces éléments résulte d'une collaboration entre l'Institut unifié des recherches nucléaires de Dubna (Russie) et le Laboratoire national Lawrence Livermore (Livermore, E.-U.), qui ont proposé les noms adoptés.

Ces deux éléments ont été baptisés en l'honneur du physicien russe Georgiy N. Flerov (1913-1990) – à qui on doit la découverte de la fission spontanée de l'uranium (1940, avec Konstantin A. Petrzhak), qui fut un pionnier de la physique des ions lourds et le fondateur, au sein de l'Institut commun pour la recherche nucléaire, du Laboratoire des réactions nucléaires (1957) –, et du Laboratoire national Lawrence Livermore, avec son pôle de compétence en matière de production d'ions super-lourds.

Pour produire ces éléments, les chimistes ont procédé par fusion nucléaire, et bombardé respectivement d'ions calcium des atomes de curium pour créer le livermorium et de plutonium pour obtenir le flerovium. Ils ont noté que le livermorium se dégradait rapidement en flerovium. Les chercheurs ont déjà obtenu six éléments super-lourds, de numéros atomiques 113, 114, 115, 116, 117 et 118, et espèrent atteindre une « zone de stabilité » dans le tableau périodique des éléments dans laquelle les éléments lourds obtenus auraient suffisamment de stabilité pour être utilisés dans des applications technologiques. Un comité joint IUPAC/IUPAP se penche à présent sur la confirmation de la priorité de la découverte des éléments 113, 115, 117 et 118.

## Livres



### Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes

F. Rusconi

640 p. et CD logiciel massXpert, 129 €  
Lavoisier, Tec & Doc, 2011

Nul doute que ces dernières années, la spectrométrie de masse s'est grandement développée et diversifiée. Elle rend désormais d'incalculables services à de multiples disciplines scientifiques, dont la biochimie. Historiquement, elle fut conçue et utilisée par des physiciens. Plus tard, les chimistes organiciens l'adoptèrent et utilisèrent leur langage, leur écriture des mécanismes réactionnels et leurs concepts moléculaires pour interpréter et prévoir les résultats expérimentaux. Souvent au laboratoire ou sur les bancs de l'université, la spectrométrie de masse obtenue sous ionisation électronique ou chimique fut enseignée « à la manière de la chimie organique ». Aujourd'hui, beaucoup de laboratoires de biochimie s'équipent de spectromètres de masse pour caractériser les biopolymères : protéines, acides nucléiques, glucides, etc., souvent après avoir effectué un couplage chromatographique à un spectromètre de masse (LC/MS) en mode d'ionisation électrospray (ESI), ou des pré-séparations permettant de déposer ensuite un échantillon sur une cible ionisée en mode MALDI (« matrix assisted laser desorption ionisation »). Beaucoup de biochimistes découvrent ainsi la spectrométrie de masse, sans être longuement passés au préalable par la case « chimie organique », même si, comme l'avait élégamment exprimé Pierre Potier, « *la chimie organique est à la biochimie ce que le solfège est à la musique.* » Dans ce contexte, cet ouvrage, dédié spécifiquement à un lectorat de biochimistes, intervient à point nommé. Bien sûr, les ouvrages de spectrométrie de masse rédigés en français sont rares, mais de plus, concernant la manière d'aborder et de traiter le sujet sous cet angle de la seule biochimie, les équivalents en anglais le sont tout autant, et ce sont donc au moins deux raisons pour s'attarder et commenter ce livre.

Partant pour exprimer une opinion en raison de ce qui précède, la tâche s'avère par la suite plus délicate, surtout en quelques lignes, car l'ouvrage ne laisse jamais le lecteur indifférent, ce qui est déjà une qualité. Mais il peut y avoir

matière à critique, et parfois à agacement. C'est un travail d'orfèvre, ciselé et conçu dans sa totalité par Filippo Rusconi, puis livré tel quel à l'éditeur, sans que ce dernier n'ait eu le droit d'y retoucher, ce qui n'est pas fréquent. La plupart des schémas de montage et les figures de mécanismes sont des originaux dessinés avec soin, le plan est rigoureusement suivi, et le souci de viser la perfection semble se dégager. On se dit qu'à parler en plus de ses qualités évidentes, de quelques aspects plus critiquables, c'est courir le risque de s'attirer les foudres indignées de l'auteur. Allons-y néanmoins.

Résumer l'ouvrage est relativement aisé, car l'auteur, qui tient fermement la main de son lecteur de la première à la dernière page, s'est chargé de le faire dans son avant-propos, là où ailleurs il est habituel de céder la place à un collègue ou à un auteur de renom pour apporter un témoignage et une présentation. Il suffit de condenser encore ces deux pages pour s'acquitter du résumé d'un texte en trois parties claires et logiques. La première pour l'instrumentation, en 90 pages environ (bases, sources, analyseurs, détecteurs). Une importante deuxième partie de près de 400 pages – le cœur de l'ouvrage – couvrant les méthodes séparatives et de préparation d'échantillons en amont de la spectrométrie de masse, et les applications aux trois grandes classes de biopolymères : protéines, acides nucléiques et glucides. Tout est très complet, bien présenté, et il faut ici souligner un trait remarquable, qui souvent manque dans d'autres textes ou est mal explicité : la description des méthodes et des applications de la spectrométrie de masse à des fins quantitatives en analyse protéomique. La troisième et dernière partie décrit en une centaine de pages le logiciel massXpert et ses applications utilitaires incluses dans le CD-Rom accompagnant le livre, s'installant aisément sur toute plateforme informatique (Linux, Apple ou MS-Windows). Un site Internet animé par l'auteur<sup>(1)</sup> permet d'y obtenir un manuel plus complet en anglais ainsi que la version la plus récente, les mises à jour semblant fréquentes, y compris depuis celle disponible sur le CD-Rom inclus dans l'ouvrage.

Le contenu est donc totalement conforme à l'objectif de présenter la technique et ses applications à des biochimistes souhaitant la connaître et l'utiliser. L'ouvrage est agréable à lire et bien présenté. Un mot du style quand même, parfois déroutant tant il est inhabituel, comparé à ce qui est lui habituellement, car c'est un pur français où ne subsiste rigoureusement aucun anglicisme, et donc conforme aux recommandations de la Délégation générale à la langue française et aux langues de France (DGLFL), d'habitude si rarement suivies. De même, chaque abréviation et

acronyme anglo-saxon sont développés et traduits dans trois pages en tête d'ouvrage, mais se trouvent aussi souvent répétés dans le texte, ce qui n'était pas nécessaire, aurait réduit le nombre de lignes et facilité la lecture. On se trouve ainsi surpris de lire, ce qui est fondamentalement correct, les questions de « fouilles » des données (data mining), ou de « coiffes » pour dénommer les extrémités terminales des protéines.

L'auteur fait fréquemment l'apologie des logiciels libres sur Internet et cite des logiciels permettant de réaliser diverses tâches bureautiques. Néanmoins, était-il si utile de consacrer tout un chapitre à reproduire en fin d'ouvrage le manifeste en anglais de la communauté de leurs créateurs ? Ces douze pages en annexe n'apportent pas grand-chose au sujet principal du livre : en faire l'économie aurait probablement allégé son coût final et rendu l'ouvrage plus abordable au lecteur souhaitant l'acquérir à titre individuel. Pour ce qui concerne le contenu du CD-Rom inclus dans l'ouvrage, il n'est pas possible de rendre compte en détail du logiciel massXpert et de ses quatre utilitaires intégrés, modestement qualifié par F. Rusconi de « *puissant logiciel largement répandu dans le monde entier.* » Notons que c'est une pratique fréquente pour des équipes de biochimistes de mettre à disposition gratuitement sur Internet des utilitaires pour la spectrométrie de masse. F. Rusconi a choisi d'ignorer ses confrères, qui sans doute ne le citeront pas en retour. Mais nous dirons donc pour lui que massXpert est plutôt bien fait, est disponible en français, contrairement à ce que l'on trouve d'habitude sur le net, sera utile au laboratoire et remplacera avantageusement ceux que l'on pourrait trouver, par exemple sur le site du Pacific Northwest National Laboratory<sup>(2)</sup> ou sur le site d'outils libres pour la spectrométrie de masse<sup>(3)</sup>.

À bien des égards, cet ouvrage mérite que l'on s'y attache, et il est vivement recommandé de se le procurer si l'on s'intéresse à la spectrométrie de masse, même en dehors de la seule communauté des biochimistes.

Patrick Arpino

(1) [www.massxpert.org](http://www.massxpert.org) ; (2) [www.pnnl.gov](http://www.pnnl.gov) ;  
(3) [www.mmass.org](http://www.mmass.org)

#### À signaler en RMN

**NMR in organometallic chemistry**  
P.S. Pregosin  
458 p., 59 €  
Wiley-VCH, 2012

**NMR methods for the investigation of structure and transport**  
E.H. Hardy  
210 p., 106,95 €  
Springer, 2012



### Solides et matériaux carbonés

P. Delhaes

Hermes Science, Lavoisier, 2009

**Vol. 1 : Phases carbonées et analogues**

221 p., 65 €

**Vol. 2 : Propriétés de volume**

286 p., 65 €

**Vol. 3 : Phénomènes de surface et applications**

254 p., 65 €

### Carbon-based solids and materials

P. Delhaes

640 p., 200 \$

ISTE, Wiley, 2011

Aucun matériau n'est aussi versatile que le carbone et il reste encore de nos jours un matériau très attractif, capable de répondre aux enjeux des nouveaux défis scientifiques et technologiques du XXI<sup>e</sup> siècle dans des domaines d'applications stratégiques (énergie, automobile, électronique, aérospatial, aéronautique...). Il y a un siècle, les premières phases carbonées ont été décrites dans l'ouvrage de Henry Le Chatelier. Depuis, ce matériau n'a cessé de faire l'objet de travaux pluridisciplinaires dans les laboratoires du monde entier, avec des découvertes récentes couronnées par l'attribution d'un prix Nobel.

C'est dans cet esprit d'intégration des nouvelles découvertes dans le contexte historique de travaux plus anciens que l'auteur, Pierre Delhaes, directeur de recherche émérite au Centre de recherche Paul Pascal et ancien président du Groupe Français d'Étude des Carbones (GFEC), a conçu cet ouvrage en trois volumes.

Le premier décrit les différentes variétés de carbones (témoins de l'évolution de la Terre et de l'Univers ou nouvelles phases récemment découvertes), leurs précurseurs et composés voisins. Le deuxième s'intéresse aux propriétés intrinsèques de ces variétés, qu'il s'agisse des propriétés de structure ou des propriétés électroniques, magnétiques, de transport, optiques, vibrationnelles. Le troisième volume est plus particulièrement consacré aux matériaux et multimatériaux carbonés (carbones filamenteux, composites, matériaux poreux, biomatériaux...), avec une attention particulière pour le rôle physico-chimique des surfaces et interfaces en liaison avec l'environnement extérieur. L'identification et la quantification de ces interactions sont en effet cruciales pour prédire les performances finales du matériau et *in fine* permettre l'optimisation des

## Bulletin de l'Union des professeurs de physique et de chimie (« Le Bup »)

La rédaction de L'Actualité Chimique a sélectionné pour vous quelques articles.



### N° 944 (mai 2012)

- Incompréhension et désarroi, par le Bureau national.
- La nanovectorisation des médicaments, par M.-T. Lehoucq.
- « Les carottes sont cuites ! », par E. Ramel.
- Dosage spectrofluorimétrique de la quinine dans le Schweppes®, par A. Escalle-Lewis, J. Piard.



### N° 945 (juin 2012)

- Unidirectionnalité du mouvement en chimie : de l'échelle microscopique à l'échelle macroscopique, par L.-L. Chapellet, A. Martinez.
- « Lab safety » : un exemple d'activités en co-enseignement anglais-sciences physiques en première STL, par B. Boullil, L. Suco-King.
- Prix Nobel de chimie 2011, par A. Mathis.

Sommaires complets, résumés des articles et modalités d'achat sur [www.udppc.asso.fr](http://www.udppc.asso.fr)

matériaux dans les conditions d'applications industrielles. Ce dernier volume se termine par quelques exemples d'utilisation des matériaux carbonés dans les domaines de l'énergie, de l'information, du transport et du biomédical. Des informations sur les techniques de caractérisation des matériaux pourront également être trouvées dans ces trois volumes, regroupés au sein d'une édition anglaise plus récente.

Cet ouvrage met également en lumière la science des matériaux carbonés est le témoin de l'évolution de la société et de son économie, incluant le développement actuel des nanosciences et des nanotechnologies. Très pédagogique, cet ouvrage de référence est à recommander fortement pour la formation dans le domaine des matériaux carbonés. Pour tout étudiant en thèse, il permettra d'acquérir les fondamentaux des carbones. Il est donc fortement conseillé de l'avoir dans les laboratoires travaillant sur les carbones.

**Cathie Vix**



### Cellulose science and technology

J.-L. Wertz, O. Bédoué, J.P. Mercier

364 p., 94 €

EPFL Press, 2010

La valorisation de la biomasse végétale est une source majeure de matériaux et d'énergie que l'homme exploite depuis des millénaires. Face à la demande croissante de matières premières et d'énergie liée aux problèmes environnementaux, l'exploitation raisonnée de la biomasse végétale apparaît comme une des solutions possibles. Il est évident qu'une bonne connaissance de la structure et des propriétés du matériau est indispensable pour en tirer le meilleur parti et concevoir

des procédés industriels efficaces. C'est l'objectif que se sont fixé les auteurs de cet ouvrage, en neuf chapitres.

Le premier présente les connaissances indispensables à la compréhension des propriétés chimiques et de la structure de la cellulose. C'est une vue synthétique qui décrit simplement les concepts de base. La bibliographie courte contient l'essentiel des connaissances. Le chapitre 2, appuyé sur une bibliographie rigoureuse, est une présentation claire de la biosynthèse de la cellulose et de sa mise en place dans la cellule. La structure et les propriétés de la cellulose sont décrites au chapitre 3. Les problématiques concernant la structure supramoléculaire sont largement développées. Les auteurs s'appuyant sur des définitions claires et rigoureuses guident le lecteur dans le maquis des polymorphes et lui permettent de remonter de la structure moléculaire à la morphologie de la fibre. Au chapitre 4 est une description pertinente du comportement du matériau, du gonflement et de la dissolution de la cellulose, qui sont des éléments déterminant la réactivité des systèmes. Le chapitre suivant est une mise au point claire et raisonnée des connaissances concernant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. Après avoir présenté les cellulases, les auteurs nous fournissent une analyse détaillée de la bibliographie qui met bien en évidence les résultats essentiels. Les chapitres 6 et 7 s'intéressent d'une part à la dégradation non biologique et d'autre part à la modification chimique du matériau et, avec le chapitre précédent, servent d'introduction au chapitre 8 qui aborde la préparation des carburants et des matières premières pour la chimie issue de la biomasse cellulosique.

Le dernier chapitre traite des perspectives, mettant en évidence les atouts majeurs dont dispose la biomasse cellulosique issue des plantes non alimentaires.

Un glossaire bien construit est proposé ; c'est un élément important qui éclaire des points qui pourraient être obscurs pour le non-spécialiste.

En résumé, cet ouvrage recouvre un vaste domaine et vise des publics ayant des origines différentes. Il est servi par une construction rigoureuse et très pédagogique. Il faut noter que les nombreuses figures facilitent la compréhension. Si malgré tout quelques erreurs subsistent (figure 6-1 par exemple), la qualité de l'analyse scientifique soutenue par une présentation agréable et didactique fait de ce livre un document incontournable à mettre entre toutes les mains.

**Bernard de Jéso**



### Drôle de chimie !

P. Laszlo

403 p., 25 €

Éditions Le Pommier, 2011

Le grand public, lecteur de journaux, auditeur d'émissions radiophoniques ou téléspectateur, se voit présenter tant de controverses autour de la chimie qu'il en est perdu : les additifs chimiques corrompent son alimentation, mais permettent sa conservation et abaissent son coût ; les médicaments soignent, mais peuvent aussi détruire la santé ; elle est responsable de l'hyperconsommation, mais nous offre des objets toujours renouvelés qui améliorent notre vie. C'est à n'y plus rien comprendre : au secours ! Que penser ? La réponse : ouvrir le dernier livre de Pierre Laszlo, qui est là pour cela : éclairer les questionnements sociétaux à partir des concepts et raisonnements de la chimie moderne.

En 19 chapitres d'une quinzaine de pages en moyenne, le livre traite « de tout ». Qu'on en juge par les titres : Nourrir l'humanité ; Vêtir l'humanité ; Médicament et mental ; Pour une économie de l'hydrogène ; La chimie organique ; La chimie inorganique ; L'industrie chimique ; Les polymères ; Omniprésence des formulations ; La nanotechnoscience ; Cosmétiques et chimie ; La gastronomie moléculaire ; L'aventure spatiale et la chimie ; Développement durable et chimie ; Le réchauffement climatique ; Le pétrole et notre quotidien ; Comprendre ce que l'on fait ; Le risque chimique ; Le dopage. La liste des thèmes recouvre bien celle des polémiques qui viennent régulièrement déranger les concitoyens, rien ne manque ou presque : si les déchets, la pollution n'apparaissent pas explicitement, la problématique « chimie et environnement » est souvent invoquée. L'auteur lit beaucoup et le livre s'appuie sur un vaste terreau de références qui inclut bien les tendances scientifiques

modernes. Défilent ainsi devant le lecteur les concepts de photochimie solaire (la pile de Graetzel), d'éponges à hydrogène, de spécificité des propriétés des agrégats de métaux nobles, de chimie bio-inspirée, de dendrimères, d'auto-assemblage, de nanotubes de carbone et de graphène, de molécules interstellaires de grande taille... liste non exhaustive. L'idée passe ainsi que la chimie est une science vivante et en mouvement ; indirectement on comprend qu'elle est capable de s'écarter de mauvaises orientations éventuellement engagées.

Pierre Laszlo est un praticien de la vulgarisation et il connaît les moyens de garder son lecteur. Le texte est émaillé d'histoires et anecdotes : l'histoire de l'invention des textiles « polaires » par Feuerstein ou du tissu Gore-Tex®, des essais et erreurs qui ont conduit Edison à adopter le tungstène comme matériau de filament de lampes à incandescence, la disparition puis le retour en Angleterre du papillon « Robert le diable » auquel le mathématicien Laurent Schwartz a indirectement sensibilisé notre auteur, etc. Il aère de la sorte les développements plus techniques mais sait se donner des limites, renonçant même, lorsqu'il utilise le mot « luddites », à évoquer John Ludd que sa révolte contre les machines à tricoter a associé aux peurs technologiques.

S'il présente scientifiquement les différentes questions traitées et en fournit des explications scientifiques, l'auteur exprime partout des « opinions » et hérit même un ton provocateur en affirmant vouloir « prendre le contrepied d'un certain nombre d'idées reçues » – digne propos, certes, mais scabreux. On note ainsi une diatribe sur la mode du « régime sans sel », sur l'abus du « sucre » dans l'alimentation, sur la campagne anti-cholestérol, bien sûr une « énorme escroquerie enracinée dans une entourloupe intellectuelle », une vive diatribe contre la communauté des chimistes organiciens parmi lesquels fleuriraient « *ayatollahs, mollahs et moutons de Panurge* » qui éloignent cette chimie de l'aventure scientifique et renoncent à ouvrir de nouvelles voies, des critiques sur la recherche industrielle que, trop souvent, « *déserte l'intelligence* ».

Exprimer des opinions est une marque de sincérité et apporte une note personnelle qui peut être attachante. Attention cependant au glissement vers la leçon de morale ou le prophétisme. L'auteur le sait et veut y résister en faisant souvent appel à des arguments économiques – mais ceux-ci restent inéluctablement non professionnels. Si sa dénonciation des « *chimistes marrons* » dans le chapitre qui traite du dopage est bienvenue, son évocation des solutions futuristes pour l'avenir de la société ou ses remarques sur la nature ou l'organisation de la recherche oscillent entre banalités et café du commerce. Il convient de les prendre davantage comme

des digressions introduites pour alléger le discours technique qu'au premier degré. Qui peut être intéressé par cet ouvrage ? Le public curieux de saisir l'état du jour en ce qui concerne les relations « science et société », une question qu'il est particulièrement fécond d'aborder par la chimie. Il y trouvera beaucoup d'éléments d'information apportés par un auteur qui connaît bien la chimie et ses domaines frontières ; pour apprécier les choses, il lui faudra toutefois un minimum de connaissances scientifiques – un bon niveau de terminale scientifique par exemple. En résumé, voilà un livre qui fera progresser le niveau scientifique de nos concitoyens : un beau compliment.

**Paul Rigny**

### À signaler



### Développons les nanomatériaux !

S. Carencu

68 p., 7,50 €

Éditions Rue d'Ulm, 2012

Les nanomatériaux : pour quels usages et avec quels risques pour la santé et l'environnement ? Du laboratoire de recherche à la vie quotidienne en passant par l'industrie, les défis de fabrication et les bénéfices espérés doivent être évalués avec rigueur pour mieux les maîtriser.



### Mémo

### Labo Chimie

A. Tessier

68 p., 15,50 €

De Boeck, 2012

Le carnet de bord indispensable du chimiste (étudiant, enseignant, chercheur) : trente fiches synthétiques regroupent tous les documents de référence de la chimie (générale, organique et analytique) pour un usage quotidien en laboratoire (classification périodique, préparation de solutions acido-basiques, valeurs de pKa, propriétés des solvants, caractéristiques analytiques, etc.).

### Chemical physics: electrons and excitations

S. Larsson

529 p., 76,99 £

CRC Press, 2012

### Chemical thermodynamics An introduction

E. Keszei

354 p., 52,70 €

Springer, 2012

### Solid state chemistry An introduction (4<sup>th</sup> ed.)

L.E. Smart, E.A. Moore

494 p., 29,99 £

CRC Press, 2012

22-27 juillet 2012

## *Green chemistry*

*Gordon research conference*

Lucca (Barga) (Italie)

- [www.grc.org/programs.aspx?year=2012&program=greenchem](http://www.grc.org/programs.aspx?year=2012&program=greenchem)

22-27 juillet 2012

## *Solid state chemistry*

*Gordon research conference*

New London (NH, États-Unis)

- [www.grc.org/programs.aspx?year=2012&program=solidstate](http://www.grc.org/programs.aspx?year=2012&program=solidstate)

5-10 août 2012

## *EuChem 2012*

*Molten salts and ionic liquids XXIV*

Newport (Royaume-Uni)

- [www.euchem2012.org](http://www.euchem2012.org)

12-17 août 2012

## *IMRC 2012*

*XXI International materials congress*

Cancun (Mexique)

- [www.mrs-mexico.org.mx/imrc2012/index.php](http://www.mrs-mexico.org.mx/imrc2012/index.php)

19-24 août 2012

## *XXV<sup>th</sup> ICMRBS*

*International conference on magnetic resonance in biological systems*

Lyon

- [www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/ICMRBS](http://www.pasteur.fr/infosci/conf/sb/ICMRBS)

26-30 août 2012



## *4<sup>th</sup> EuCheMS chemistry congress*

Prague (Rép. Tchèque)

- [www.euchems-prague2012.cz](http://www.euchems-prague2012.cz)

27-31 août 2012

## *JMC 13*

*13<sup>e</sup> Journées de la matière condensée*

Montpellier

- <http://jmc13.univ-montp2.fr>

31 août-3 septembre 2012

## *ISACS9*

*Challenges in nanosciences*

Xiamen (Chine)

- [www.rsc.org/ConferencesAndEvents/ISACS/ISACS9/index.asp](http://www.rsc.org/ConferencesAndEvents/ISACS/ISACS9/index.asp)

2-6 septembre 2012

## *EFMC-ISMIC 2012*

*22<sup>nd</sup> International symposium on medicinal chemistry*

Berlin (Allemagne)

- [www.ldorganisation.com/produits.php?langue=english&cle\\_menus=1238915417](http://www.ldorganisation.com/produits.php?langue=english&cle_menus=1238915417)

2-6 septembre 2012



## *ICEC 2012*

*7<sup>th</sup> International conference on environmental catalysis*

Lyon

- [www.icec2012.fr](http://www.icec2012.fr)

2-7 septembre 2012

## *ICOMC 2012*

*25<sup>th</sup> International conference on organometallic chemistry*

Lisbonne (Portugal)

- <http://cqe.ist.utl.pt/events/icomc25>

4-7 septembre 2012

## *4<sup>e</sup> Journées Hubert Curien*

*Colloque international de culture scientifique et technique*

Nancy

- <http://culturesdessciences.u-strasbg.fr/?p=1160>

8 septembre 2012



## *2<sup>e</sup> Colloque « De la recherche à l'enseignement »*

Paris

(voir p. 2)

- [www.societechimiquedefrance.fr/fr/breve/colloque-de-la-recherche-a-l-enseignement.html](http://www.societechimiquedefrance.fr/fr/breve/colloque-de-la-recherche-a-l-enseignement.html)

9-13 septembre 2012

## *ICCC 40*

*40<sup>th</sup> International conference on coordination chemistry*

Valence (Espagne)

- <http://iccc40.com>

9-13 septembre 2012

## *ICPOC 21*

*21<sup>st</sup> IUPAC International conference on physical organic chemistry*

Durham (Royaume-Uni)

- [www.rsc.org/ConferencesAndEvents/RSCConferences/icpoc21/index.asp](http://www.rsc.org/ConferencesAndEvents/RSCConferences/icpoc21/index.asp)

12-15 septembre 2012



## *JCO 2012*

*5<sup>e</sup> Journées de chimie organique*

Hammamet (Tunisie)

- [www.sctunisie.org/JCO\\_2012/index.html](http://www.sctunisie.org/JCO_2012/index.html)

13-15 septembre 2012

## *14<sup>th</sup> Ruzicka days*

*Today science - tomorrow industry*

Vukovar (Croatie)

- [www.ptfos.hr/ruzicka](http://www.ptfos.hr/ruzicka)

15-20 septembre 2012

## *ICCOS 2012*

*International conference on catalysis in organic synthesis*

Moscou (Russie)

- [www.ioc.ac.ru/iccoc-2012](http://www.ioc.ac.ru/iccoc-2012)

16-19 septembre 2012

## *11<sup>th</sup> Food chemistry meeting*

Bragança (Portugal)

- [www.spq.pt/eventos/11eqa](http://www.spq.pt/eventos/11eqa)

16-20 septembre 2012

## *Centenary of the Maillard reaction discovery*

Nancy

- [https://roquefort.nancy-universite.fr/CONGRES/maillard-nancy\\_en.php](https://roquefort.nancy-universite.fr/CONGRES/maillard-nancy_en.php)

17-20 septembre 2012

## *JFSM 2012*

*29<sup>e</sup> Journées françaises de spectrométrie de masse*

Orléans

- <http://jfsm2012.sciencesconf.org>

18-19 septembre 2012

## *Colloque Chimie durable*

Lyon

- [www.agence-nationale-recherche.fr/Colloques/CD2012](http://www.agence-nationale-recherche.fr/Colloques/CD2012)

30 septembre-3 octobre 2012

## *SPICA 2012*

*14<sup>th</sup> International symposium on preparative and industrial chromatography*

Bruxelles (Belgique)

- [www.SPICA2012.org](http://www.SPICA2012.org)

30 septembre-4 octobre 2012



## *Journées André Collet de la chiralité*

Dinard

- [www.jacc.univ-rennes1.fr](http://www.jacc.univ-rennes1.fr)

3-5 octobre 2012

## *ICES 2012*

*International conference on enhanced spectroscopy*

Porquerolles

- [www.im2np.fr/ICES2012/index.html](http://www.im2np.fr/ICES2012/index.html)

14-19 octobre 2012

## *NMS VIII*

*8<sup>th</sup> International conference on novel materials and their synthesis*

Xian (Chine)

- [www.nms-iupac.org/present/index.asp](http://www.nms-iupac.org/present/index.asp)

Vous trouverez de nombreuses autres manifestations sur le site de la SCF : [www.societechimiquedefrance.fr](http://www.societechimiquedefrance.fr), rubrique **Manifestations**.

## Prix des divisions 2012

### Catalyse



#### • Emmanuelle Guillon

Ingénieure diplômée de l'INSA de Rennes (spécialité physique du solide), titulaire d'un DEA de chimie inorganique du solide (Université de Rennes) et d'un DEA de sciences pétrolières (Université Paris 6),

Emmanuelle Guillon a effectué une thèse à IFPEN (IFP Énergies Nouvelles, Rueil-Malmaison) sur la thiorésistance des catalyseurs bimétalliques à base de platine appliquée à l'hydrogénation des aromatiques (1996-1999), suivie d'un stage post-doctoral à l'Institut de Chimie Appliquée de Berlin (ACA) dans le domaine de l'expérimentation à haut débit en catalyse, avant de rejoindre IFPEN en 2000 comme ingénieure de recherche au sein de la Direction Catalyse et Séparation.

Depuis, le champ d'investigation de ses recherches en catalyse a concerné tout particulièrement la catalyse hétérogène : catalyse acide par les zéolithes, catalyse bifonctionnelle pour les transformations d'aromatiques et procédés d'hydroisomérisation des paraffines/hydrocraquage des paraffines longues ou des distillats sous vide. En parallèle, elle a démarré depuis 2007 de nouveaux sujets de recherche concernant la catalyse hétérogène appliquée à la transformation de la biomasse lignocellulosique.



#### • Arnaud Travert

Maître de conférences à l'Université de Caen Basse-Normandie, Arnaud Travert effectue ses recherches au Laboratoire Catalyse et Spectrochimie (UMR ENSICAen/CNRS, Université de Caen).

Il a réalisé ses travaux de thèse portant sur la caractérisation de l'acidité de catalyseurs sulfures par spectroscopie IR dans ce même laboratoire sous la direction de Françoise Maugé (1996-2000), puis a rejoint le groupe de Rutger van Santen (TU Eindhoven, Pays-Bas) pour un séjour post-doctoral durant lequel il a en particulier modélisé l'activation de l'hydrogène par les phases sulfures utilisées conventionnellement en hydrotraitement. De retour à Caen, il a poursuivi ses recherches dans les domaines de l'hydrotraitement et de la désulfuration en FCC, notamment lors d'un congé pour recherches au Centre de Recherche Grace Davison (Columbia, MD, États-Unis) en 2009.

Ses travaux actuels portent sur la valorisation de la biomasse et la production de biocarburants de seconde génération. Dans ce but, il développe notamment des méthodologies IR operando visant à quantifier et déterminer la thermodynamique de réactifs ou de sondes adsorbées en conditions de réaction.

### Notre président honoré



© Bruno Paget/BASF.

Le 20 avril dernier, **Olivier Homolle**, président de BASF France et de la SCF, a reçu des mains de Bernard Bigot, administrateur général du CEA et président de la Fondation de la Maison de la Chimie, les insignes de chevalier dans l'ordre de la Légion d'honneur, au cours d'une cérémonie conviviale et très touchante où famille, amis et collègues étaient venus pour l'applaudir et le féliciter.

## Journée de remise des Grands Prix SCF 2011



De gauche à droite : L. Christ, G. Hutchings, M. Drillon (Pdt div. Chimie du solide), S. Mann, M. Fontecave, P. Sautet, J.-M. Tarascon, J.-R. Hamon (Pdt div. Chimie de coordination), M. Taillefer (Pdt div. Chimie organique), M. Peruzzini, D. Duprez (Pdt div. Catalyse), B. Andrioletti, J.-C. Bernier, D. Luneau, O. Homolle, S. Cosnier, A. Quadrelli, C. Descorme.  
Photo : S. Bléneau-Serdel/SCF, DR.

Le 8 juin dernier, la SCF a remis les Prix nationaux et binationaux 2011 au cours d'une séance solennelle qui s'est tenue sur le Campus scientifique de l'Université Claude Bernard-Lyon 1. La journée a été ouverte par Olivier Homolle, président de la SCF, et Hélène Parrot, directrice du département de chimie et de biochimie de la Faculté des sciences et technologies de l'UCBL. Elle a rappelé que la chimie est très présente à Lyon, en formation, en recherche et dans l'industrie, et que deux prix Nobel, Victor Grignard et Yves Chauvin, ont été chercheurs à CPE Lyon. Après une présentation de la section Rhône-Alpes, 2<sup>e</sup> en nombre d'adhérents après la section Île-de-France, par son président Serge Cosnier (qui a annoncé la naissance d'un nouveau Club des jeunes sociétaires !), la matinée s'est poursuivie par une conférence de Philippe Sautet sur la chimie théorique au service de la catalyse hétérogène. Venaient ensuite les présentations des lauréats (hormis K. Matyjaszewski qui a reçu le Prix franco-polonais en avril dernier), introduites par les présidents des divisions qui avaient proposé leurs dossiers au jury coordonné par J.-C. Bernier.

Le **Prix Achille-Joseph Le Bel** récompensait **Marc Fontecave**, Collège de France (Paris), pour ses travaux sur les métalloenzymes, débouchant notamment sur des hydrogénases artificielles pouvant conduire à la mise au point de biopiles à combustible. Le **Prix Pierre Süe** consacrait les travaux de **Jean-Marie Tarascon**, Université de Picardie-Jules Verne (Amiens), associés au développement de batteries Li-ion à hautes performances.

Le **Prix binational franco-italien** honorait **Maurizio Peruzzini**, CNR-ICCOM (Florence), pour ses travaux en chimie de coordination avec le développement de nouveaux ligands phosphorés qui l'on conduit à avoir de nombreuses relations scientifiques en Europe, et plus particulièrement avec plusieurs groupes français. Last but not least, le **Prix binational franco-britannique** a été partagé entre **Graham J. Hutchings**, FRS, Université de Cardiff (Pays de Galles), pour ses travaux en catalyse hétérogène, notamment sa contribution séminale dans l'emploi de catalyseurs à base d'or, et **Stefen Mann**, FRS, Université de Bristol (Angleterre), pour son travail pionnier dans la biominéralisation et la chimie bioinspirée.

Le Bureau de la SCF remercie vivement la section régionale Rhône-Alpes qui a organisé cette manifestation, et plus particulièrement D. Luneau, S. Cosnier, B. Andrioletti, L. Christ, C. Descorme et A. Quadrelli.

### Nous reviendrons dans un prochain numéro sur les prix des divisions 2012 :

#### Enseignement-Formation : Jean-Louis Vignes

##### Chimie organique

- Prix de la division : **Jacques Maddaluno**
- Prix Acros : **Fabien Gagosz**
- Prix enseignant-chercheur : **Vincent Gandon**
- Prix de thèse : **Marie-Hélène Larraufie**
- Prix de thèse Dina Surdin : **Anne-Caroline Chany**
- Prix industriel : **Pierre Deprez**

##### Chimie physique

- Prix de thèse : **Aude Bouchet, Guillaume Stirnemann**
- Prix jeune chercheur : **Damien Laage, Olivier Sandre**

# Les fluides supercritiques à votre service

L'intérêt croissant porté ces dernières années aux questions environnementales a permis l'émergence de solutions innovantes s'engageant dans un développement durable. Ainsi les technologies respectant les douze principes fondateurs de la chimie « verte » ont connu un remarquable essor ces vingt dernières années. Les fluides supercritiques en sont l'exemple idéal, illustré par de nombreux apports dans notre vie quotidienne.

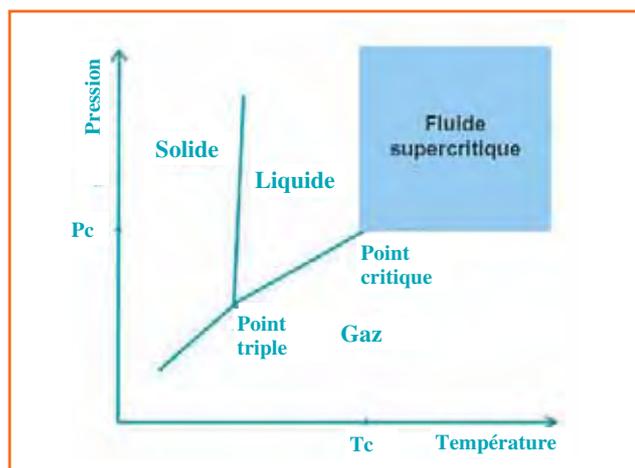


Figure 1 - Diagramme de phases d'un corps pur.

## Mais d'abord, qu'est-ce qu'un fluide supercritique ?

Au-delà d'une pression et d'une température dites critiques, un fluide se trouve dans l'état « supercritique » (figure 1). Il présente alors un comportement intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux, ce qui lui confère des propriétés particulières : une masse volumique élevée comparable à celle des liquides, un coefficient de diffusivité intermédiaire à celui des liquides et des gaz, et une faible viscosité proche de celle des gaz. Le dioxyde de carbone est le fluide supercritique le plus utilisé ( $\text{CO}_2$  sc) car il présente des avantages notables : non toxique, non polluant, non inflammable, largement disponible à haute pureté et à des coûts modérés. De plus, ses coordonnées critiques sont modérées ( $T_c = 31^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 73,8$  bars), ce qui en fait un solvant « vert » ayant des applications industrielles tout à fait innovantes.

Les premiers développements industriels utilisant des fluides supercritiques apparaissent au début des années 1970. Le principe de l'extraction de solides utilisant le  $\text{CO}_2$  sc repose sur la forte variation du pouvoir solvant du  $\text{CO}_2$  en fonction des conditions opératoires (température et pression), ce qui permet d'extraire sélectivement les molécules selon leur nature chimique. Très faiblement polaire, le  $\text{CO}_2$  se révèle être un excellent solvant des molécules apolaires ou peu polaires dans les conditions supercritiques. Partant de ce principe, une fois le composé désiré dissous dans le milieu  $\text{CO}_2$  sc, il sera aisé d'obtenir l'extrait pur par une simple dépressurisation qui entraîne alors la séparation du  $\text{CO}_2$ , redevenu gazeux, et de l'extrait, récupéré sous forme liquide ou solide. Les procédés supercritiques s'acquittent des opérations d'élimination des résidus de solvant (extraction, imprégnation, formulation), opérations indispensables lorsque ce solvant est un composé organique. D'autre part, les faibles températures utilisées (en général  $40$  à  $60^\circ\text{C}$ ) permettent de conserver l'intégrité chimique

des molécules thermolabiles. Enfin, la faible viscosité du  $\text{CO}_2$  sc lui permet de diffuser au cœur des matrices solides et d'extraire ces solides à cœur.

## Dans l'agroalimentaire

L'utilisation de  $\text{CO}_2$  sc comme solvant d'extraction de produits naturels est le procédé le plus ancien et le plus développé à l'échelle industrielle, notamment dans le secteur agroalimentaire (figure 2).



Figure 2 - Pilote d'extraction par  $\text{CO}_2$  sc de substances naturelles à l'IFS (photo Chapuis, DR).

Pour la décaféination du café, du  $\text{CO}_2$  sc est introduit dans l'extracteur contenant les grains de café. La caféine, soluble dans le  $\text{CO}_2$  sc, est alors extraite et récupérée « pure » en sortie de l'extracteur suite à l'évaporation du  $\text{CO}_2$  à température ambiante. Le café décaféiné obtenu préserve tous ses arômes (du fait des faibles températures mises en œuvre et de l'absence de solvant organique). La caféine extraite est revendue aux industries pharmaceutiques. Il n'y a donc aucun déchet formé à l'issue de ce procédé, le rendant économiquement et écologiquement viable. Actuellement, le retour à une demande des consommateurs de produits naturels en lieu et place des additifs de synthèse offre de nouvelles possibilités. Ainsi, l'extraction d'arômes à partir de produits naturels (vanille, thym, épices) s'avère particulièrement intéressante. En effet, l'arôme obtenu par extraction au  $\text{CO}_2$  sc peut être qualifié de « pur » dans la mesure où il est dépourvu de solvant organique et où les conditions d'extraction permettent de maîtriser sa composition.

De la même façon, l'extraction par fluides supercritiques permet d'éliminer de façon sélective des produits nocifs comme les pesticides organophosphorés ou organochlorés dans les produits agricoles contaminés. Le ginseng est notamment traité à l'échelle industrielle afin de ramener sa teneur en pesticides organophosphorés à des valeurs admises par les pharmacopées.

Sur le même principe d'élimination des composés indésirables, le  $\text{CO}_2$  sc s'avère un allié de la diététique, par exemple lorsqu'il s'agit de retirer les lipides des jaunes d'œufs ou pour obtenir des fractions de matière grasse du lait sans cholestérol.

En marge de ce domaine, n'oublions pas de citer la trichloroisole, largement détestée des amateurs de vin. En effet, cette molécule contenue dans le liège constituant le bouchon des bouteilles contamine le vin et détruit ses propriétés organoleptiques dès lors que  $5\text{ ng/g}$  y sont présents, menant inévitablement à ce que l'on appelle « le goût de bouchon ». La



Figure 3 - Unités d'extraction par CO<sub>2</sub> sc d'Oneo Bouchage.

société française Oneo Bouchage, qui extrait cette molécule du liège grâce à l'utilisation du CO<sub>2</sub> sc, produit déjà un milliard de bouchons par an (figure 3).

## Médicaments et cosmétiques

Les applications en cosmétique peuvent être nombreuses si l'on suit le désir du consommateur de produits labellisés « bio ». Ce point est fondamental car la certification bio des produits, admise lorsque les ingrédients sont extraits par CO<sub>2</sub> sc, représente un atout du procédé. Ainsi les molécules antioxydantes telles que les polyphénols (notamment présents dans les extraits de romarin) ou encore les caroténoïdes (bêta-carotène dans la carotte, lycopène dans la tomate...) peuvent être extraites par CO<sub>2</sub> sc. Par ailleurs, les textures mêmes des extraits obtenus, comme cela a été démontré sur des extraits de thym, de romarin ou encore de camomille, correspondent mieux aux exigences des formulations cosmétiques que les procédés dits « conventionnels ».

Dans le domaine pharmaceutique, le CO<sub>2</sub> sc peut également intervenir, comme solvant ou anti-solvant, pour l'élaboration de poudres, en particulier pour la formulation de principes actifs. Le recours aux procédés supercritiques permet en particulier de contourner les problèmes liés à l'utilisation de solvants, de limiter les effets secondaires, mais également de limiter les rejets en milieu naturel de molécules actives qui entraînent aujourd'hui les problèmes de micropolluants dans les milieux naturels. Ainsi, le groupe Pierre Fabre, qui développe l'élaboration de poudres par CO<sub>2</sub> sc, a reçu le prix Pierre Potier 2009 de « L'innovation en chimie en faveur du développement durable » pour son procédé Formulplex®, qui utilise entre autres du CO<sub>2</sub> sc pour augmenter la biodisponibilité des principes actifs.

## Techniques d'imprégnation

Le principe consiste en un balayage d'un matériau solide poreux (polymères, bois...) par du CO<sub>2</sub> sc dans lequel la substance à imprégner est dissoute. Cette étape est suivie d'une détente qui provoque le passage du CO<sub>2</sub> à l'état gazeux, laissant le matériau « cible » imprégné de la substance active. Ainsi, imprégner une matrice solide avec un composé actif est aisé en utilisant une technologie basée sur des fluides supercritiques. La société danoise Superwood traite du bois de manière industrielle afin de l'imprégner à l'aide de fongicides dissous dans le CO<sub>2</sub> sc. L'utilisation du fluide supercritique comme vecteur d'imprégnation permet ici d'imprégner le bois à cœur, garantissant ainsi une absence de moisissure et évitant les longs bains ou badigeonnages, économisant aussi des quantités non négligeables de fongicides de par la capacité du CO<sub>2</sub> sc à rendre sa répartition homogène.

Dans le même ordre d'idées, notons le tannage des peaux par CO<sub>2</sub> sc qui permet d'éviter l'utilisation de grandes quantités

de solutions aqueuses souvent difficiles à traiter. Les sels de chrome, voire des tanins naturels, peuvent imprégner une peau à cœur lors de l'étape qui la transformera en cuir.

Dans l'industrie du textile, l'opération de teinture donne lieu à de grandes quantités d'effluents aqueux. Ce problème écologique et économique est contourné lorsque le CO<sub>2</sub> sc est utilisé comme solvant de teinture. En effet, la possibilité de recycler la teinture par séparation aisée avec le CO<sub>2</sub> et l'absence d'opération de séchage (très énergivore lorsqu'on utilise un solvant aqueux) sont autant de caractéristiques favorables. D'autre part, la faible viscosité et la grande diffusivité du CO<sub>2</sub> sc permettent une diffusion rapide et à cœur de la teinture, avec un gain de productivité, tout en utilisant des quantités plus faibles de teintures. La société hollandaise FeyeCon est une industrie dont le succès dans le domaine de la teinture par CO<sub>2</sub> sc (DyeCoo) n'a cessé de croître depuis sa création il y a déjà vingt ans.

## Des polymères résistants aux polymères biodégradables et biocompatibles

Dans le domaine des plastiques, la diffusion du CO<sub>2</sub> sc dans les matériaux polymères permet d'entraîner un gonflement de ces matériaux ainsi qu'une modification de leurs propriétés physico-chimiques ; c'est en particulier un bon agent plastifiant car il diminue la température de transition vitreuse. Les fluides supercritiques sont également efficacement adaptés à l'imprégnation de prothèses de hanche ou de genou, qui les rend plus résistantes. De plus, les fluides supercritiques, et en particulier le CO<sub>2</sub> sc, sont étudiés depuis de nombreuses années pour permettre la polymérisation à partir de monomères solubles dans le CO<sub>2</sub> sc. Ainsi, il peut être cité à titre d'exemple la capacité des fluides supercritiques à moduler la taille des chaînes carbonées (le polymère précipitant lorsqu'il atteint une certaine taille) et la composition finale de certains copolymères (éthylène/acétate de vinyle), améliorant ainsi les propriétés (résistance, stabilité thermique, pureté) de ces matériaux. Critical Pharmaceuticals (Royaume-Uni) propose depuis peu des matériaux polymères biocompatibles et biodégradables synthétisés en milieu CO<sub>2</sub> sc pour des applications médicales et pharmaceutiques.

## Conclusions

Les technologies faisant intervenir le CO<sub>2</sub> sc présentent des applications très variées et en plein développement dans de nombreuses filières industrielles telles que la cosmétique, la pharmacie, les matériaux, la chimie ou l'énergie. D'autres domaines se développent : l'obtention de biofuels à partir de micro-algues, le nettoyage de pièces mécaniques ou la préparation des surfaces en micro-électronique, le nettoyage à sec de textiles... D'autre part, l'eau, qui présente des coordonnées critiques plus élevées (T<sub>c</sub> = 374 °C, P<sub>c</sub> = 221 bars), est néanmoins beaucoup étudiée comme milieu réactionnel, trouvant des applications en développement durable, principalement pour la valorisation et le traitement des déchets.

### Pour en savoir plus

- Anastas P.T., Warner J., *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, **1998**.
- Sarrade S., *La chimie d'une planète durable*, Éditions Le Pommier, **2011**.
- IFS (Innovation Fluides Supercritiques) : [www.supercriticalfluid.org](http://www.supercriticalfluid.org)

Cette fiche a été préparée par **Karima Benaïssi**, responsable technique de l'IFS (Innovation Fluides Supercritiques), 1 rue Marc Seguin, F-26958 Valence Cedex (contact@supercriticalfluid.org).

Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par un comité éditorial mené par Jean-Pierre Foulon, Véronique Nardello-Rataj et Michel Quarton (contact : [bleneau@lactualitechimique.org](mailto:bleneau@lactualitechimique.org)).

## Abonnement 2012 (numéros spéciaux inclus)

Cochez la case qui correspond à l'abonnement auquel vous voulez souscrire :

	Abonnement papier + électronique*		Abonnement électronique seul*		Abonnement multiple**	
	France	Étranger	France / Étranger		France / Étranger	
Particuliers	<input type="checkbox"/> 95 €	<input type="checkbox"/> 100 €	<input type="checkbox"/> 55 €		(pour les lycées et les institutions)	
Lycées	<input type="checkbox"/> 110 €	<input type="checkbox"/> 130 €	<input type="checkbox"/> 70 €		<input type="checkbox"/> 400 €	
Institutions	<input type="checkbox"/> 195 €	<input type="checkbox"/> 205 €	<input type="checkbox"/> 155 €		<input type="checkbox"/> 400 €	

\* Courriel obligatoire \*\* Adresse IP obligatoire (cet abonnement correspond à un abonnement papier + dix abonnements électroniques + l'accès aux archives de la revue)

## Complétez votre collection

Les sommaires de tous les numéros peuvent être consultés sur notre site [www.lactualitechimique.org](http://www.lactualitechimique.org)

**Numéros spéciaux** également disponibles en **version électronique** sur le site à un tarif préférentiel

- Danses avec les spins. La résonance magnétique nucléaire en chimie (juin-juil.-août 2012) : 32 €
- Fibres et textiles chimiques : matériaux du XXI<sup>e</sup> siècle (fév.-mars 2012) : 32 €
- Le rayonnement synchrotron, une lumière pour comprendre la chimie (oct.-nov. 2011) : 32 €
- Chimie et société : construire un dialogue (sept. 2011) : 24 €
- La chimie prépare notre avenir, vol. 2 (juin-juil.-août 2011) : 32 €
- La chimie prépare notre avenir, vol. 1 (janv.-fév. 2011) : 32 €
- La chimie mène l'enquête (juin-juil.-août 2010) : 32 €
- Chimie et développement durable. L'engagement des écoles de la Fédération Gay-Lussac (fév.-mars 2010) : 32 €
- Adolphe Pacault, un acteur majeur dans la renaissance de la chimie physique en France (déc. 2009) : 15 €
- Electrochimie & Art, Environnement, Santé, Nanosciences... (fév.-mars 2009) : 15 €
- Les cosmétiques. La science au service de la beauté (oct.-nov. 2008) : 15 €
- Chimie organique physique. Hommage à Jacques-Émile Dubois (juin-juil. 2008) : 15 €
- Chimie et patrimoine culturel, vol. II (avril 2008) : 15 €
- La photochimie pour transformer la matière (mars 2008) : 15 €
- Chimie et patrimoine culturel, vol. I (oct.-nov. 2007) : 15 €
- La photochimie pour mieux vivre (mai-juin 2007) : 15 €
- Fluor et produits fluorés à l'aube du XXI<sup>e</sup> siècle (oct.-nov. 2006) : 15 €
- Les matériaux carbonés (mars-avril 2006) : 15 €
- Chimie moléculaire et nanosciences (oct.-nov. 2005) : 15 €
- Sciences chimiques et déchets radioactifs (avril-mai 2005) : 15 €

Liste complète des numéros thématiques sur [www.lactualitechimique.org/tarifs.php#numero](http://www.lactualitechimique.org/tarifs.php#numero)

### Achat à l'unité hors numéros spéciaux

11 € pour les numéros avant 2011 ; 20 € à partir de 2011  
(à partir de 2005, ces numéros sont également disponibles en version électronique sur le site)

Numéro(s) souhaité(s) :

### Hors-séries "L'Actualité Chimique - Livres", co-édités et diffusés par EDP Sciences

- La chimie et l'habitat (oct. 2011) : 24 €
- La chimie et le sport (janv. 2011) : 24 €
- La chimie et l'alimentation (oct. 2010) : 24 €
- La chimie et l'art (juin 2010) : 24 €
- La chimie et la santé (janv. 2010) : 19 €
- La chimie et la mer (sept. 2009) : 24 €
- Radiation chemistry (mai 2008) : 59 €

À commander  
chez votre libraire  
ou directement sur  
[www.edition-sciences.com](http://www.edition-sciences.com)



## Bon de commande

Nom ..... Prénom .....

Adresse (pour les particuliers, préciser l'adresse personnelle) .....

Code Postal ..... Ville ..... Pays .....

Tél ..... Fax ..... Courriel .....

Adresse IP (pour l'abonnement multiple) .....

**Montant total de la commande (frais de port inclus) :**

### Mode de règlement

- sur facturation (joindre obligatoirement le bon de commande)
- par chèque bancaire ou postal libellé à l'ordre de la SCF
- par virement bancaire ou postal
- souhaite recevoir une facture acquittée

France Société Générale Paris Seine Amont, 03081/00037265820/87 CCP Paris 30041 Compte 070786U020/90

Étranger IBAN FR7630003030810003726582087 Swift.Sogefrpp

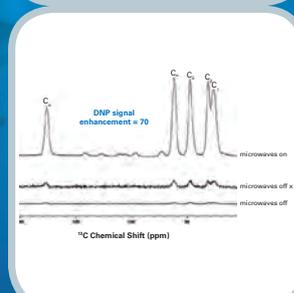
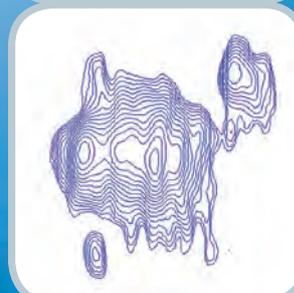
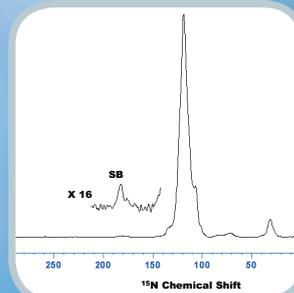
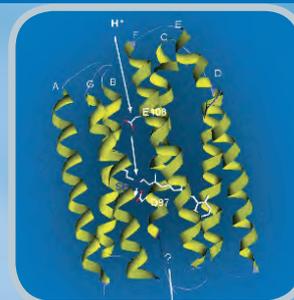
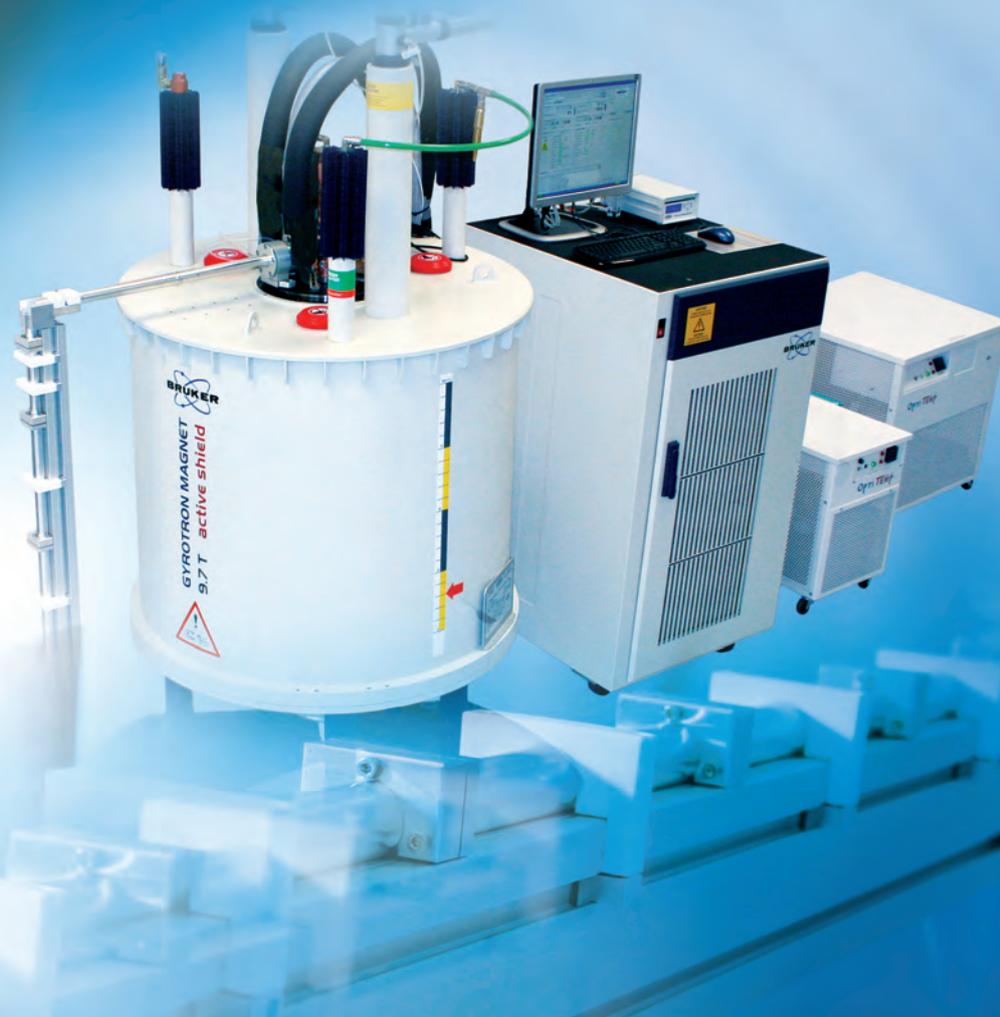
par carte bancaire (Visa, Eurocard Mastercard)   Validité /

Cryptogramme visuel (les trois derniers chiffres du numéro imprimé au dos)

### L'Actualité Chimique

SCF, Service Abonnement, 250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris. Tél. : 01 40 46 71 66 - Fax : 01 40 46 71 61.  
adhesion@societechimiquedefrance.fr - [www.lactualitechimique.org](http://www.lactualitechimique.org)

## Bruker, votre partenaire idéal en DNP (Dynamic Nuclear Polarization)



### Gagner en sensibilité en choisissant Bruker pour votre recherche par DNP :

- Système clé en main pour la recherche par DNP en RMN du solide
- Augmentation de la sensibilité jusqu'à un facteur 80
- Source micro-ondes haute fréquence à 263 GHz ( puissance 25 W )
- Nouvelle sonde MAS basse température 3,2mm ( échantillon refroidi à 100 K )
- AVANCE™ III HD 400 WB

Pour plus d'informations, rendez-vous sur notre site : [www.bruker.com/dnp](http://www.bruker.com/dnp)