Présentation au congrès du GERM 4-7 mai 2010, St Dié des Vosges

Signal, Bruit et Sensibilité

Marc-André Delsuc IGBMC - Strasbourg



<u>La sensibilité</u>

• Definitions



Paramètres importants

- Sonde
 - volume
 - diamètre / longueur de l'antenne
 - η : facteur de remplissage
 - Q : facteur de qualité
 - T : température de l'antenne / du préamplificateur
- Échantillon
 - concentration / masse / mole
 - force ionique
 - lock



Théorie - sensibilité de la mesure

- loi de Hoult
 - Q : facteur de qualité
 - η : facteur de remplissage

 $S/N \propto Q\eta M_O$





Théorie - sensibilité de la mesure

- loi de Lauterbur
 - taille de l'antenne
 - n : nombre de tour

- voir présentation de Marie Poirier-Quinot
- d h : diamètre, hauteur de l'antenne
- épaisseur du fil





MICROCOILS FOR NMR MICROSCOPY

 $S/N \propto rac{\omega_o^{7/2}}{d_{cont}}$



(a)

TL Peck and RL Magin and PC Lauterbur, Design and analysis of microcoils for NMR microscopy. *J Magn Reson B* (1995) **108** (2) pp. 114-24

(b)

• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •





TL Peck and RL Magin and PC Lauterbur, Design and analysis of microcoils for NMR microscopy. *J Magn Reson B* (1995) **108** (2) pp. 114-24

• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

Théorie - sensibilité de la mesure

loi de de Swiet

- Ts : température échantillon
- *Tc* : température de l'antenne
- Ta : température du préampli
- *Px* : puissance absorbée



$$S/N \propto \frac{M_0 B_1}{\sqrt{P_s (T_a + T_s) + P_c (T_a + T_c)}}$$





mardi 11 mai 2010

M-A Delsuc - GERM - mai 2010



- Échantillons limités
 - limités en concentration
 - solubilité
 - études d'interaction
 - limités en masse
 - substances naturelles
 - impuretés
- mesure de traces
 - problèmes de pollution par les solvants
- Limites de détection
 - L.O.D. *limit of detection*
 - en pratique S/N = 3
 - L.O.Q. *limit of quantification*



en pratique S/N = 10

 \Rightarrow augmentation du volume

 \Rightarrow diminution du volume

Différentes solutions

- tubes spéciaux
 - tubes restreints
 - Shigemi
 - tubes capillaires
 - capillaires simples
 - capillaires concentriques

- sondes spéciales
 - sondes cryogéniques
 - refroidissement de l'antenne
 - refroidissement du préamplificateur
 - sondes à diamètre restreint
 - microcoil
 - sondes en flux
 - diminution de la taille de l'antenne
 - solénoïde / selle de cheval
 - micro sondes
 - micro slot



Comparaison de Principe

type	facteur de qualité	facteur de remplissage	bruit	taille antenne
tubes restreints	variable	élevé	élevé	grande
tubes capillaires	élevé	faible	faible	grande
sondes capillaires	élevé	élevé	faible	petite



• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •



- tube de 5mm
 - volume : 500-600µl

- tube adaptés en susceptibilité
 - volume limité à la zone B_1
 - volume 150-300µl
 - un jeu par type de solvant
 - D₂O MeOH CDCL₃ DMSO
 - tube cher !





Sondes spéciales

sonde Bruker 1 mm









• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

Antennes solénoides

Bruker

- sondes couplage HP-LC
- Protasis
 - sondes capillaires
 - volumes de 5µl et 10µl



Performance of cryogenic probes as a function of ionic strength and sample tube geometry Voehler, Collier, Young, Stone, Germann *J Magn Reson* **183** (2006) 102– 109

 $S/N \propto \frac{M_o B_1}{\sqrt{R_s (T_a + T_s) + R_c (T_a + T_c)}}$

Solutions salines

Rs : résistance de l'échantillon :

- conductivité
- rayon du tube

$$R_s \propto \omega^2 \sigma r_s^4$$

$$S/N \propto \frac{1}{\sqrt{conc}}$$

$$S/N \propto \frac{1}{r_s^2}$$

séparation de B et de E



de Swiet. Optimal electric fields for different sample shapes in high resolution NMR spectroscopy. *J Magn Reson* (2005) 174 (2) 331-4

 $\overrightarrow{rot}\overrightarrow{E} = -\frac{\partial \overrightarrow{B}}{\partial t}$

• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

Performance of cryogenic probes as a function of ionic strength and sample tube geometry Voehler, Collier, Young, Stone, Germann *J Magn Reson* **183** (2006) 102–109





Solutions salines











Performance of cryogenic probes as a function of ionic strength and sample tube geometry Voehler, Collier, Young, Stone, Germann *J Magn Reson* **183** (2006) 102–109



diamètre du tube	concentration de NaCl	
5 mm	< 0.2 M	
4 mm	0.2 - 0.6 M	
3 mm	0.6 - 2.2 M	
2 mm	> 2.2 M	

- règle des 40%
 - changer de tube si P90 a augmenté de plus de 40%



M-A Delsuc - GERM - mai 2010

Bruker - système match

- modulaire
 - spinner grip capillaire
- diamètre variable
 - 1.0 1.7 2.0 2.5 3.0 4.0 5.0
- volume variable
 - 12µl 45µl 70µl 120µl 160µl









 système de ca volumes de 35µ
lock externe





sondes spéciales

- Bruker cryo-fit
 - adaptable sur les sondes cryo
- cryo sonde 3mm





M-A Delsuc - GERM - mai 2010

sucrose 10 mM - H₂O dans capillaire 120 μ l : **1.2 \mumoles 400 \mug** 4 scans - 400 MHz sonde HP-LC Bruker 6,5 4,5 5,5 3,5 2,5 *source : personelle* M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •





• sucrose 100 μ M -H₂O dans capillaire match 70 μ I : 7 nmoles 2.4 μ g





- sucrose 10 mM D₂O dans capillaire 5 μl : **50 nmoles 17.2 μg**
- 1 scan 600 MHz





• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

- tryptophane **1 μg 5 nmoles**
- 1 scans 600 MHz cryosonde 3mm





source : Bruker

• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

- sucrose 2 mM D₂O dans capillaire 30 μl : **60 nmoles 20 μg**
- 1 scans 600 MHz cryosonde





• sucrose 10 mM - D₂O dans capillaire 5 μl : **50 nmoles 17.2 μg**



ppm (72).

M-A Delsuc - GERM - mai 2010

- protéine LTP 200μM H₂O dans capillaire 50μl : 10 nmoles 70μg
- spectre HSQC 600MHz cryosonde 20 minutes



micro sonde 1mm Bruker

- protéine 8kD 1.4 mM 5 μl : **7.5 nmoles 60 μg**
- HCCH 27 heures 800 MHz





source : Bruker

• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

Antennes solénoides

- protéine PF1061 4 mM dans capillaire 1.7μM : 4.7 ηmoles 40 μg
- spectre HSQC et HNCO 750MHz -





Webb. Nuclear magnetic resonance of mass-limited samples using small RF coils. *Analytical and bioanalytical chemistry* (2007) **388** (3) pp. 525-8 _{M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •}





Published on Web 07/19/2005

Exploring Uncharted Terrain in Nature's Structure Space Using Capillary NMR Spectroscopy: 13 Steroids from 50 Fireflies

Matthew Gronquist,[†] Jerrold Meinwald,[‡] Thomas Eisner,[§] and Frank C. Schroeder^{*,‡}







Figure 2. Sections of HMBC spectra for **9** showing HMBC correlations, indicating the location of the two acetyl groups (600 MHz). (A) Corresponding part of the ¹H NMR spectrum; (B) HMBC obtained using a 5 mm HCN inverse-detection probe with Shigemi tube, cross-peaks are not discernible; (C) HMBC obtained using the CapNMR probe, clearly showing the expected cross-peaks. HMBC spectra were acquired under identical conditions (see Supporting Information for details).

dans la pratique

- quels besoins ?
 - impuretés / traces
 - produits rares
 - produits chers
- quels rythmes
 - besoins occasionnels
 - spectro/sonde dédié

- quels volumes ?
 - quelques échantillons / jour
 - centaines échantillons / jour
 - milliers échantillons / jour
- solutions alternatives
 - capillaires classique / sonde cryo



<u>cas extrèmes</u>

 Sakellariou et al. High-resolution, high-sensitivity NMR of nanolitre anisotropic samples by coil spinning. *Nature* (2007) vol. **447** (7145) pp. 694-7





mardi 11 mai 2010



300µg de tissus 300 nL

Figure 3 | **Proton NMR spectra of bovine muscle tissue. a**, The highresolution spectrum from \sim 365 mg of bovine muscle tissue using a full 7 mm rotor spinning at 3,000 Hz was acquired in 33 s (8 scans). Presaturation of the water resonance (4.7 p.p.m.) was achieved using a 2 s irradiation before the $\pi/2$ hard pulse. **b**, High-resolution spectrum from \sim 0.3 mg of bovine muscle tissue using the MACS insert under the same experimental conditions. The susceptibility broadening is distributed in spinning sidebands outside the range of the proton chemical shifts and the line width is of the order of 0.05 p.p.m. for all resonances (no deuterium lock was used). This width is mainly attributed to temperature gradients (temperature difference less than 3–4 °C). Partial assignments can be made on the basis of the literature²⁵ (see Supplementary Information). In the absence of sample spinning, the susceptibility broadening hides most of the isotropic chemical shift information, as seen from the spectrum (inset) of the static sample used in **a**. www.mym.

M-A Delsuc - GERM - mai 2010



Figure 1 Comparison of the designs and performances of conventional (saddle) and microslot waveguide NMR probes, indicating electric currents (blue), magnetic fields (red) and DC magnetic fields (green). The microslot ($100 \ \mu m \times 200 \ \mu m$) provides a highly homogeneous magnetic field. Also shown are two-dimensional spectra of the protein RNase-A obtained using conventional (saddle) and microslot probes. The spectrum from the microslot probe was generated using ~3,500 times less sample than that from the conventional probe with only a twofold increase in data-collection time. NMR spectra reproduced





<u>cas extrèmes</u>

Wang et al. An eight-coil high-frequency probehead design for high-throughput nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson* (2004) **170** (2) pp. 206-12



Top-down view

Side view

8 capillaires indépendants en parallèle

voir présentations de Denis Merlet - de Eriks Kupce



M-A Delsuc - GERM - mai 2010

stratégies d'acquisition

- changer de spin
 - ¹⁹F
 - DNP
 - hyperpolarisation
 - ...
- jouer avec la relaxation
 - T2~T1 : rien à faire
 - T2 << T1 : optimisation possible

voir présentations de Fabien Aussenac et Martial Piotto



M-A Delsuc - GERM - mai 2010

angle de Ernst



angle optimum

$$\cos(\theta) = \exp(-T_R/T_1)$$



M-A Delsuc - GERM - mai 2010

DEFT and UDEFT

- Driven Equilibirum Fourier Transform DEFT
 - Becker, Ferretti, Farrar. J Am Chem Soc (1969) 91 7784
- Uniform Driven Equilibirum Fourier Transform UDEFT
 - Piotto, Bourdonneau, Elbayed, Wieruszeski, Lippens Magn Reson Chem (2006) 44 943-947





T1 = 90 sec





Schanda and Brutscher. Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds. *J Am Chem Soc* (2005) **127** (22) 8014-5



• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •





domaine PDZ 1 de MAGI1 (124 aa) 9 μM 2.2 nmole 33 μg

4 heure 600 MHz cryoprobe



in-cell NMR





Inomata et al. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. Nature (2009) 457 (7234) 106-109

• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

Bruit et l'Erreur

• l'Erreur

- erreur de manipulation
- erreur systématique
- erreur aléatoire
- le Bruit
 - ce que je ne connais pas / ce que je ne veux pas
 - phénomènes non modélisés
 - bruit
 - additif
 - centré
 - gaussien

blanc

- $<\epsilon_e>=0$
 - ϵ_e suit une loi gaussienne
- ϵ_e présente une densité spectrale "plate"
 - ϵ_e statistique invariante avec le temps

M-A Delsuc - GERM - mai 2010



$$S_{e} = \hat{S} + \epsilon$$

Autres sources de bruit

Bruit Thermique

 $S_e = \hat{S} + \epsilon_e$

- Bruit de scintillation
- Bruit de spin
- Bruit de champs
- Bruit d'échantillonnage
- Bruit de calcul
- amplification par le bruit



Autres sources de bruit

- Bruit Thermique
- Bruit de scintillation
- Bruit de spin
- Bruit de champs
- Bruit d'échantillonnage
- Bruit de calcul
- amplification par le bruit

variation aléatoire des paramètres du signal

$$\hat{S}(t) = \sum_{k} (A_k e^{\phi_k} e^{(-i\omega_k + R_k)t})$$

 $\begin{array}{ll} A_k & \to & A_k + \epsilon_A \\ \phi_k & \to & \phi_k + \epsilon_\phi \\ \omega_k & \to & \omega_k + \epsilon_\omega \end{array}$



M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

Bruit de scintillation - t1-noise

• correction *a posteriori*

pics intenses dans HSQC

Brissac Malliavin Delsuc Use of the Cadzow procedure in 2D NMR for the reduction of t1-noise. *J Biomol NMR* (1995) **6** 361-363

• méthode de SVD-Cadzow (voir présentation de Pascal Man)



Bruit de scintillation - Sophora

- correction a priori
 - fluctuation lente de la température
 - lock D₂O





Bruit de scintillation - Sophora

en DOSY

Temperature regulation issues



Assemat, Coutouly, HAjajr, Delsuc Validation of molecular mass measurements by means of Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy; Application to Oligosaccharides. *CRChimie* (2009) 1-8



• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •



Heating due to strong gradient pulses











• M-A Delsuc - GERM - mai 2010 •

Autres sources de bruit

- Bruit Thermique
- Bruit de scintillation

Evolution du rapport signal sur bruit



Dans certaines conditions, accumuler le signal peut dégrader la qualité et le rapport signal à bruit du spectre !



Autres sources de bruit

- Bruit Thermique
- Bruit de scintillation
- Bruit de spin
- Bruit de champs
- Bruit d'échantillonnage
- Bruit de calcul
- amplification par le bruit



M-A Delsuc - GERM - mai 2010

bruit d'échantillonage



bruit de calcul



simple précision : ~7 chiffres significatifs double précision : ~14 chiffres significatifs



M-A Delsuc - GERM - mai 2010

Autres sources de bruit

- Bruit Thermique
- Bruit de scintillation
- Bruit de spin
- Bruit de champs
- Bruit d'échantillonnage
- Bruit de calcul
- amplification par le bruit



M-A Delsuc - GERM - mai 2010

amplification par le bruit

Simulation d'un signal continu échantilloné, avec un niveau de bruit variable



~ résonance stochastique



M-A Delsuc - GERM - mai 2010

<u>remerciements</u>

• financement







- collaborateurs
 - Bruno Kieffer
 - Francis Taulelle
 - Frédéric de Lamotte

- Matthieu Tanty
- Marie-Aude Coutouly
- Redouane Hajjar
- Olivier Assemat
- Marc Vitorino
- Émilie Markides

