

Ecole RMN du GERM
Cargèse 2008
Atelier
Traitement de spectres multidimensionnels
Avec le logiciel nmrPipe

0. Introduction

L'objectif de cet atelier est de présenter une procédure de traitement d'un spectre RMN pas-à-pas, à partir des données en provenance du spectromètre afin **d'illustrer** les principes de base appliqués usuellement dans le traitement des expériences RMN et l'extraction de données quantitatives à partir des spectres. L'expérience considérée est un spectre de corrélation 1H-15N HSQC enregistré sur une petite protéine : l'ubiquitine.

1. Conversion des données

La conversion des données est assurée par la commande **bruk2pipe** (pour les données en provenance d'un spectromètre Bruker), ou **var2pipe** pour un spectromètre Varian. Ces commandes demandent un nombre important de paramètres sur les conditions d'acquisition. Les utilitaires Bruker et Varian permettent d'éditer de façon automatique les commandes bruk2pipe et var2pipe en lisant le contenu des fichiers de paramètres constructeurs.

1.1 Donnée Bruker

1.1.1 Préparation des données

En préalable au traitement des données, on recopie les données brutes en provenance du spectromètre, sous la forme de l'arborescence complète, dans son répertoire de travail.

```
morotai> cd NMR_DATA/1
morotai> ls
acqu          acqu          format.temp   scon
acqu2         cag_par       pdata         ser
acqu2s       cpdprg3       pulseprogram
```

De façon à séparer les données traitées par nmrPipe des données originales, on a pour habitude de créer deux répertoires distincts à l'aide des commandes unix suivantes :

```
mkdir brukdata
rm -r pdata
mv * brukdata
mkdir procdata
```

Les données traitées par xwinnmr sont effacées pour ne conserver que les données brutes dans un répertoire brukdata. Les traitements par nmrPipe se feront au sein du répertoire procdata.

1.1.2 Edition du script de conversion des données

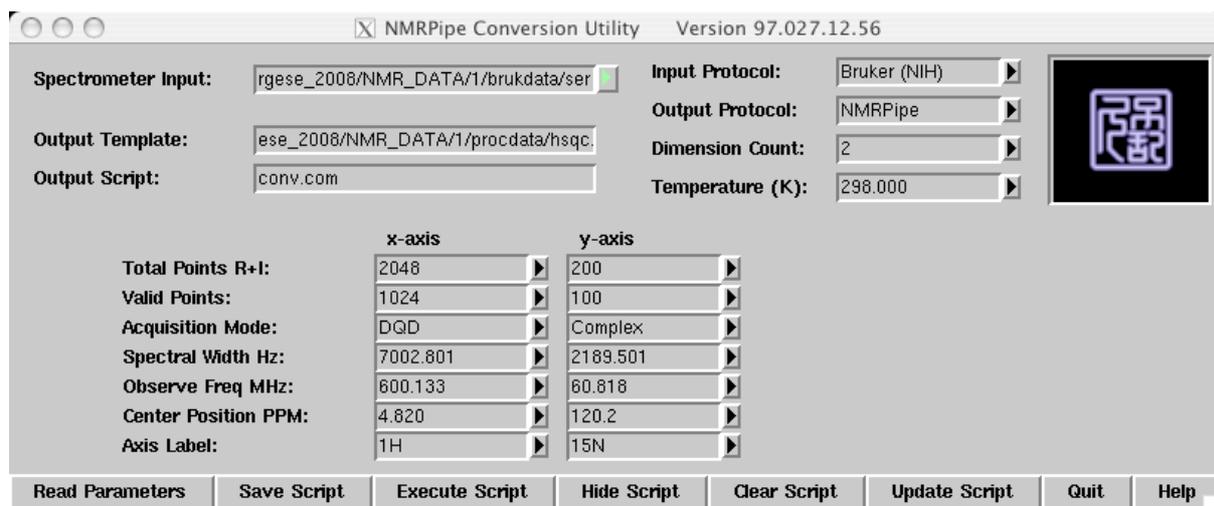
L'édition du script de conversion se fait facilement à l'aide de l'utilitaire **bruker**. Il s'agit d'une interface graphique qui permet de lire les données utiles pour la suite du traitement dans le fichier de paramètres *acqu*. La commande de conversion sera enregistrée sous la forme d'un script appelé *conv.com*. Les opérations se feront dans l'ordre suivant :

- Spécifier le répertoire dans lequel se trouvent les données brutes (dans "Spectrometer input"). Sélectionner le fichier `ser`.
- Spécifier le répertoire de sortie ("Output Template") et nommer le fichier converti, par exemple : `hsqc.fid`
- Appuyer sur le bouton "Read Parameter" : un certain nombre de champs voient leur contenu modifié.
- Il est nécessaire, à ce stade, de bien vérifier l'ensemble des paramètres.

Le logiciel de conversion ne prenant pas toujours en compte les valeurs correctes des paramètres, en particulier dans les dimensions indirectes, on peut utiliser des filtres textes comme celui indiqué ci-dessous (*getpar*) afin d'extraire les informations utiles des fichiers de paramètres :

```
morotai> more getpar
cat brukdata/acqu*s | grep DECI
cat brukdata/acqu*s | grep DSPFVS
cat brukdata/acqu*s | grep TD
cat brukdata/acqu*s | grep SW_h
cat brukdata/acqu*s | grep SFO1
cat brukdata/acqu*s | grep SFO2
cat brukdata/acqu*s | grep SFO3
```

```
morotai> sh getpar
##$DECIM= 1
##$DECIM= 24
##$DSPFVS= 0
##$DSPFVS= 12
##$TD= 200
##$TD= 2048
##$SW_h= 2189.50134106957
##$SW_h= 7002.80112044818
##$SFO1= 60.8178082529025
##$SFO1= 600.132821
##$SFO2= 360.13
##$SFO2= 150.9178392749
##$SFO3= 500.134750458673
##$SFO3= 60.8178082529025
```



Le script *getpar* nous permet de rentrer les valeurs correctes pour le nombre de points dans la dimension t1 (y-axis) qui est ici égal à 100 points complexes. Le paramètre "Acquisition Mode" dépend de la façon dont la quadrature a été reconstruite dans les dimensions indirectes.

Ici, le mode "Complex" ne préjuge pas de la suite du traitement et n'effectue aucune action particulière à part spécifier dans l'entête des données le caractère complexe des points.

1.1.3 Calibration de l'axe des fréquences

Parmi les paramètres importants, figure la fréquence de la porteuse en ppm. Cette donnée permet d'obtenir un axe de fréquence en ppm correct. Cette fréquence est généralement obtenue en ayant mesuré au préalable la fréquence d'une référence externe (DSS). La fréquence du DSS à la température de mesure est 600,129929 MHz, celle de la porteuse (lue dans le fichier *acqus* : 600,132821 MHz), la fréquence de la porteuse en ppm est donc 4,82 ppm. On procédera de même pour la porteuse de l'azote en sachant que la référence (0 ppm) pour l'azote est à 60,8105956 MHz.

1.1.4 Sauvegarde et exécution du script de conversion

Le bouton "Save Script" permet de créer le script *conv.com* dans le répertoire contenant les données brutes.

```
morotai> more conv.com
#!/bin/csh

bruk2pipe -in /Users/kieffer/Kieffer-serveur-190901/Teaching/RMN/Ecole_Cargese_2
008/NMR_DATA/1/brukdata/ser -bad 0.0 -noaswap -DMX -decim 24 -dspfv 12 \
  -xN 2048 -yN 200 \
  -xT 1024 -yT 100 \
  -xMODE DQD -yMODE Complex \
  -xSW 7002.801 -ySW 2189.501 \
  -xOBS 600.133 -yOBS 60.818 \
  -xCAR 4.820 -yCAR 117.925 \
  -xLAB 1H -yLAB 15N \
  -ndim 2 -aq2D States \
  -out /Users/kieffer/Kieffer-serveur-190901/Teaching/RMN/Ecole_Cargese_2008/NMR
_DATA/1/procdata/hsqc.fid -verb -ov

sleep 5
```

Le script est exécuté grâce à la commande **csh fid.com** :

```
morotai> csh conv.com

Bruker DMX --> NMRPipe Conversion.
Input File: /Users/kieffer/Kieffer-serveur-190901/Teaching/RMN/Ecole_Cargese_2008/NMR_DATA/1/brukdata/ser
Output File: /Users/kieffer/Kieffer-serveur-190901/Teaching/RMN/Ecole_Cargese_2008/NMR_DATA/1/procdata/hsqc.fid
2D Sizes: (1904 Real+Imag)(200 Real+Imag)
Byte Swap Mode: OFF

Slice 200 of 200
```

Le script crée un fichier *hsqc.fid* contenant l'interférogramme 2D dans le répertoire *procdata*. On notera que les dimensions de l'interférogramme 2D ont été modifiées dans la dimension t2, puisque celle-ci a été réduite à 1904 points au lieu de 2048. Ceci est dû à la correction liée au filtrage numérique.

2. Analyse de l'interférogramme 2D

Prise en main du logiciel de visualisation *nmrDraw*

Le contenu du fichier *hsqc.fid* peut être examiné par *nmrDraw*. Cette analyse des données brutes, rarement effectuée, est très utile pour apprécier la qualité des données, la

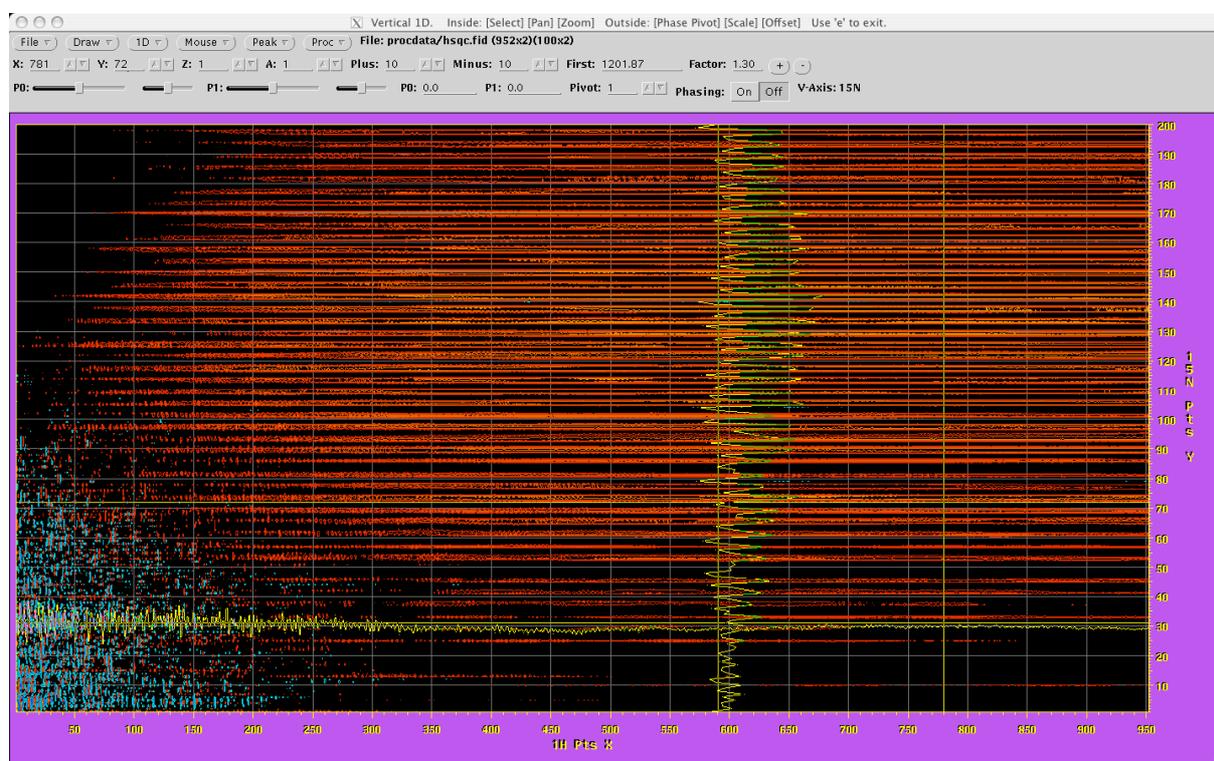
pertinence des paramètres utilisés pour l'échantillonnage en temps (t_1 max par exemple), la présence de certaines dérives en fonction du temps,...etc...

La commande *nmrDraw* doit faire apparaître la fenêtre ci-dessous. Il est possible d'accéder aux différents menus en cliquant sur le bouton droit de la souris. Les commandes sont également accessibles en utilisant un code à une lettre.

- Dans le menu "file", choisir *Select file (S)*, puis cliquer sur sur le bouton "Read/Draw".
- Le niveau du premier contour est choisi grâce aux boutons "+" et "-", puis taper la lettre "d" pour rafraîchir le contour.
- Les lettres "h" et "v" permettent de sélectionner des lignes ou des colonnes de la matrice, la position du curseur permet de spécifier l'indice de la ligne ou de la colonne à afficher. L'indice est affiché dans la barre des menus (X: Y: Z: A:).
- Lorsque la section 1D d'un spectre multidimensionnel est affichée, il est possible de zoomer sur une partie de la section en jouant avec les boutons du milieu et droit de la souris. Le positionnement de la section et son échelle verticale sont réglés en jouant sur la souris en dehors du cadre d'affichage de la matrice (partie violette).
- On peut appliquer à une section les commandes de traitement de *nmrPipe* en activant la fenêtre "NMRPipe Command" dans le menu "Proc" (commande "N").

On vérifiera ainsi, sur le premier fid, l'effet des commandes suivantes:

- * SOL
- * Cosine Bell
- * Zero Fill
- * FT



Le spectre obtenu peut être phasé en activant l'option "Phasing:" (On) et en jouant sur les glissières permettant de fixer les valeurs des phases d'ordre 0 (P0) et d'ordre 1 (P1). Ces tests

permettent d'apprécier l'effet du traitement qui sera ensuite appliqué à l'ensemble des lignes de la matrice.

3. Traitement dans la dimension t2

Le traitement dans cette dimension est obtenu à l'aide d'un script comme celui montré ci-dessous. Deux méthodes peuvent être utilisées pour la phase : soit on utilise la phase obtenue en traitant la première ligne de l'interférogramme 2D "manuellement", soit la phase est déterminée une fois la matrice entièrement traitée.

A l'aide de l'éditeur *nedit* (ou *vi*), on pourra éditer le script suivant :

```
nmrPipe -in procddata/hsqc.fid          \
| nmrPipe -fn SOL                       \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1 \
| nmrPipe -fn ZF -auto                   \
| nmrPipe -fn FT -verb                   \
| nmrPipe -fn PS -p0 -72 -p1 0           \
| nmrPipe -fn EXT -select -left -sw -di   \
| nmrPipe -fn POLY -auto -ord 1 -x1 12ppm -xn 6ppm \
| nmrPipe -ov -out procddata/hsqc.ft1
```

Le script applique sept étapes à chaque ligne de la matrice :

- 1/ Soustraction du signal du solvant (à fréquence nulle)
- 2/ Apodization par une fonction cosinus
- 3/ Ajout de zéros en fin de fid (pour ajuster la taille à 1024)
- 4/ Transformée de Fourier
- 5/ Correction de phase
- 6/ Extraction d'une sous-région correspondant aux seuls protons amides
- 7/ Correction de la ligne de base à l'aide d'une fonction polynomiale d'ordre 1

Les données sont écrites dans le fichier *procddata/hsqc.ft1* qui peut être examiné par *nmrDraw*.

A l'aide de l'éditeur de commande *nmrPipe* du menu "Proc" dans *nmrDraw*, essayer de traiter une colonne extraite de la matrice *procddata/hsqc.ft1*.

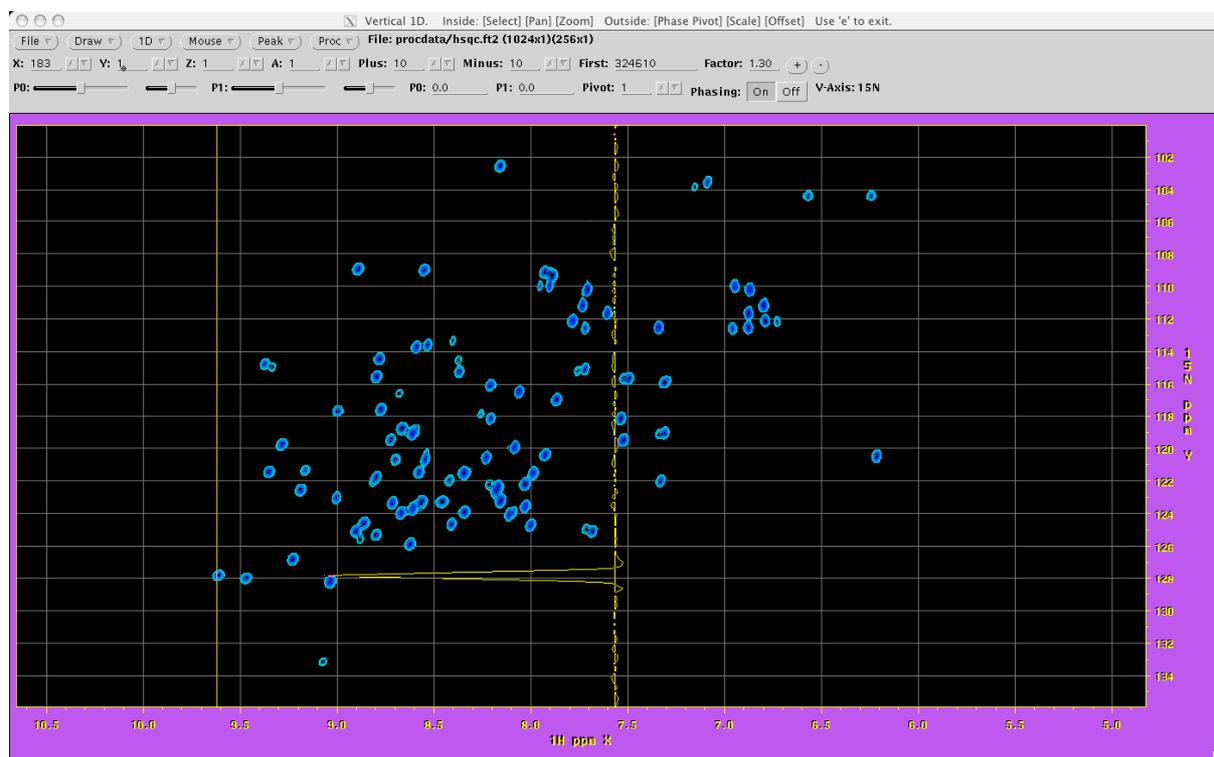
4. Traitement dans les dimensions t2 et t1

Les étapes du traitement étant similaires dans les deux dimensions, les deux dimensions sont habituellement traitées en un seul script. Entre les deux traitements, la matrice subit une transposition, ce qui permet à *nmrPipe* de traiter les colonnes. Les données sont une nouvelle fois transposées afin d'être écrites dans la matrice.

```
nmrPipe -in procddata/hsqc.fid          \
| nmrPipe -fn SOL                       \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1 \
| nmrPipe -fn ZF -auto                   \
| nmrPipe -fn FT -verb                   \
| nmrPipe -fn PS -p0 -72 -p1 0           \
| nmrPipe -fn EXT -select -left -sw -di   \
| nmrPipe -fn POLY -auto -ord 1 -x1 12ppm -xn 6ppm \
| nmrPipe -fn TP                         \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1 -c 0.5 \
| nmrPipe -fn ZF -auto                   \
| nmrPipe -fn FT -verb                   \
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di     \
| nmrPipe -fn POLY -auto -ord 1           \
| nmrPipe -fn TP                         \
| nmrPipe -ov -out procddata/hsqc.ft2
```

Le script ci-dessus conduit à un spectre 2D qui n'est pas phasé dans la dimension F1. La phase sera déterminée en utilisant *nmrDraw*. On procèdera de la façon suivante :

- 1/ Choisir une colonne contenant un pic de corrélation à une des extrémités du spectre, afficher cette colonne à l'aide de la commande "v".
- 2/ "Clique milieu" en dehors de la fenêtre (zone violette), à la hauteur du pic pour spécifier le point pivot
- 3/ Phaser le pic à l'aide de la phase d'ordre 0 (P0)
- 4/ Choisir une colonne contenant un pic de corrélation à l'autre extrémité du spectre
- 5/ Phaser ce nouveau pic en jouant sur la phase d'ordre 1.
- 6/ Introduire les valeurs obtenues dans le script *proct2t1.com* et relancer le traitement.



5. Traitement du signal

Le script utilisé dans le traitement ci-dessus utilise un certain nombre d'opérations de traitement du signal qui sont communément utilisées en RMN. L'objet des exercices ci-dessous consiste à explorer les effets et les règles d'utilisation d'un certain nombre d'entre eux.

5.1 Prolongement du domaine temporel ("zero filling").

Cette opération consiste à ajouter à la fin de l'enregistrement des zéros. Le plus souvent, l'objectif consiste à atteindre un nombre de points finals qui correspond à la puissance de deux la plus proche, une contrainte imposée par l'algorithme de la FFT. Les points supplémentaires se placent par interpolation entre les points qui auraient été obtenus sans extension. En général, on double la taille du signal enregistré ($2*N$) de façon à disposer de N points pour la visualisation de la seule partie réelle du spectre. Il est inutile d'augmenter la taille du *fid* par un facteur supérieur à 2.

5.2 Apodisation

Une des fonctions les plus importantes du traitement du signal RMN est la possibilité de modifier certaines caractéristiques du spectre en multipliant le signal temporel par une fonction. Cette opération conduit à une modification de la forme du pic de résonance et à une redistribution du bruit. L'ajout de zéros à la fin de l'interférogramme conduit à une discontinuité à la fin du temps d'acquisition (passage brutal à zéro). Après la FT, cette discontinuité se traduit par l'apparition de vaguelettes au pied des pics. Cet effet résulte de la convolution de la forme de raie avec la transformée de Fourier d'une fonction rectangle, c'est-à-dire une fonction sinus cardinal.

Deux autres effets peuvent être recherchés lors de l'utilisation de fenêtres d'apodisation. En donnant plus de poids sur les premiers points de l'interférogramme, on améliore le rapport signal/bruit. Ces fenêtres, qui peuvent être vues comme accélérant l'amortissement du signal, conduisent à un élargissement des raies. Au contraire, une fenêtre privilégiant les derniers points réduira artificiellement la largeur de raie et augmentera la résolution au détriment du rapport signal/bruit. Le rapport signal/bruit optimal est obtenu lorsque l'enveloppe de la fenêtre correspond à la décroissance du signal, on parle alors de filtrage adapté.

5.2 Quelques essais de fenêtres...

Les essais de fenêtres s'effectueront en modifiant les scripts de traitement du spectre HSQC. On effectuera les différents traitements dans la dimension d'acquisition dans un premier temps. L'effet sur le rapport signal/bruit pourra être mesuré à l'aide du logiciel *nmrDraw*, l'effet sur la résolution sera, quant à lui, apprécié à l'oeil.

Mesure du rapport S/B : dans le menu "Mouse", choisir "2D location". On peut alors accéder à l'intensité de n'importe quel pic sur la 2D. Le bruit sera obtenu à l'aide de la fonction "Estimate Noise" dans le menu "Draw".

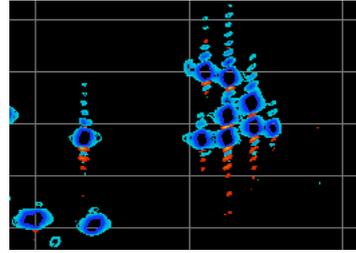
La forme des fenêtres peut être visualisée dans *nmrDraw*. Dans le menu "Mouse", sélectionner l'option "1D horizontal" pour afficher une coupe 1D à travers le spectre. Puis dans le menu "Proc" choisir "NMRPipe Command". On peut alors appliquer directement les commandes sur la section 1D :

```
SET -c 1.0          (met à 1 l'ensemble des points)
SP -off 0.5 -end 0.98
```

a) Effet de troncature

On visualisera l'effet de troncature en mettant la ligne de commande correspondant à l'application de la fenêtre en commentaire dans la dimension "reconstruite" (f_1) comme indiqué ci-dessous :

```
#| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1 -c 0.5 \
| nmrPipe -fn ZF -size 512 \
```



- ❖ On remarquera que certains pics sont plus affectés par l'absence de fenêtre. Pour quelle raison ?

b) La fenêtre sinus

La fenêtre sinus s'ajuste à l'aide de 2 paramètres, la phase qui agit sur la valeur à $t=0$, et la période, qui détermine à quel moment les points sont mis à zéro. On peut également utiliser une fonction sinus carré, dont la propriété est de ramener la fin du signal à zéro de façon "plus douce". L'expression de la fonction est donnée ci-dessous :

```
w[i] = sin( (PI*off + PI*(end-off)*i/(tSize-1) )^pow
```

- ❖ Essayer les paramètres suivants :

- nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1
- nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.6 -pow 2
- nmrPipe -fn SP -off 0.25 -end 0.98 -pow 1

c) La fenêtre exponentielle

Si le nombre de points acquis est suffisamment grand, on utilise généralement une fenêtre exponentielle dont le coefficient d'amortissement est égal à ceux des signaux que l'on veut observer (filtrage adapté). Dans *nmrDraw*, visualiser l'interférogramme 2D, en parcourant les différents fid qui composent le jeu de données, évaluer le coefficient d'amortissement du signal (on peut par exemple regarder à quel moment l'intensité a diminué d'un facteur 2). Retraiter la matrice avec une fonction exponentielle adaptée dans la dimension t_2 . Comparer le rapport signal/Bruit avec celui obtenu en appliquant les autres fenêtres.

```
nmrPipe -fn EM -lb 6.0 \
```

d) Convolution de la forme de raie par une gaussienne

Un des inconvénients de la forme de raie lorentzienne est la largeur importante du pic à la base (décroissance en $1/\omega^2$). Cette propriété peut être à l'origine d'erreurs d'intégration lorsque deux pics sont proches. L'utilisation d'une fenêtre gaussienne apporte une solution à ce problème en transformant la forme de la raie de résonance en gaussienne (décroissance en $\exp(-\omega^2)$). L'expression de la fenêtre s'écrit :

```
w[i] = exp( e - g*g ), avec e = PI*i*g1/sw et g = 0.6*PI*g2*(g3*(tSize-1) - i)/sw
```

La fenêtre combine une fonction exponentielle croissante, dont on peut régler le coefficient (paramètre g_1), avec une fonction gaussienne dont les paramètres sont g_2 , un coefficient d'amortissement en Hz, et g_3 la position du centre de la gaussienne (nombre entre 0.0 et 1.0).

❖ Essayer les paramètres suivants :

- `nmrPipe -fn GM -g1 8 -g2 12 -g3 0.0`
- `nmrPipe -fn GM -g1 8 -g2 12 -g3 0.2`

5.3 Le premier point ...

L'utilisation de la transformée de Fourier discrète peut introduire des déformations de la ligne de base. Afin d'éviter cet inconvénient, il est parfois nécessaire de diviser par 2 la valeur du premier point, avant d'effectuer la TF. Lorsque l'on remplace l'intégrale de la TF par une somme discrète, l'intensité d'un point doit être mesurée au milieu de l'intervalle de temps discret Δt . Si la première intensité est échantillonnée pour un temps $t=0$, elle ne correspondra qu'à une moitié de l'intervalle de temps Δt , puisque le signal est nul pour $t < 0$. L'intensité sera donc corrigée en multipliant la première intensité par $\frac{1}{2}$ sous peine d'introduire un décalage de la ligne de base proportionnel à la valeur de ce premier point. Cet effet est à l'origine de traînées t_1 dans certains spectres. Dans *nmrPipe*, la multiplication du premier point par une constante est accessible via une option (-c) de la plupart des fenêtres d'apodisation.

Exp : `nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1 -c 0.5`

Dans la dimension indirecte d'un spectre 2D, on a pour habitude de repousser la date d'acquisition du premier fid à $t=\Delta t/2$ (demi-dwell time). Cette technique introduit un décalage de phase d'ordre 1 de 180 degrés, mais correspond à une valeur correcte du premier point dans la dimension t_1 .

- ❖ Reprendre le traitement du spectre HSQC en éliminant la correction de la ligne de base en f_1 (mettre en commentaire la commande `nmrPipe -fn POLY -auto -ord 1`) et en appliquant les deux fenêtres suivantes :

- `nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1 -c 0.5`
- `nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 0.98 -pow 1`

- ❖ Comparer les lignes de base dans la dimension f_1 , expliquer pourquoi le deuxième traitement est mieux adapté.

5.4 Suppression du signal du solvant par filtrage numérique

Il est possible de supprimer le signal du solvant lors du traitement du signal (technique proposée par Dominique Marion et Ad Bax en 1989). La méthode consiste à appliquer au signal une fenêtre de convolution de façon à ne retenir que les basses fréquences (filtre passe-bas). Le fid obtenu est ensuite soustrait au fid original ce qui conduit à la disparition des pics autour de la fréquence nulle (solvant). Dans *nmrPipe*, cette opération est réalisée par la commande :

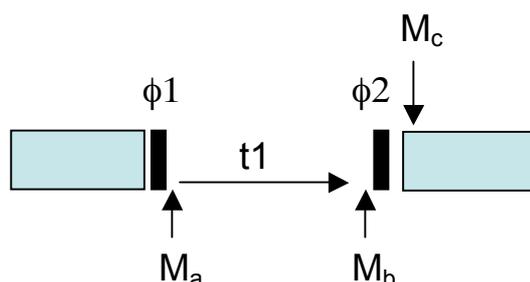
```
nmrPipe -fn SOL
```

- ❖ On pourra apprécier la sélectivité du filtre passe-bas en visualisant le signal qui est soustrait à chaque fid. Pour cela, on traitera une matrice dans la dimension t_2 , avec et sans l'application de la commande SOL. Les résultats des deux traitements seront stockés dans deux fichiers séparés (test1.tf2 et test2.tf2 par exemple). Le signal du solvant sera obtenu en réalisant la différence entre les deux matrices à l'aide de la commande :

```
addNMR -in1 procddata/test1.ft2 -in2 procddata/test2.ft2 -c2 -1.0 -out procddata/test3.ft2
```

6 Traitement de la quadrature dans les dimensions indirectes

La plupart des expériences multidimensionnelles actuelles est enregistrée "en mode phasé", une expression ambiguë qui est souvent source de confusion. Elle exprime le fait que l'on enregistre les différents fid permettant de reconstruire la dimension indirecte en préservant, ou en retrouvant après un traitement approprié les deux composantes perpendiculaires (M_x et M_y) de l'aimantation qui évoluent pendant le temps t_1 . La disponibilité de ces deux composantes permet, d'une part, de discriminer le sens de rotation de l'aimantation, et donc le signe de la fréquence (quadrature), d'autre part, d'obtenir, après les corrections de phase appropriées, des pics de corrélation en absorption dans les deux dimensions.



La figure ci-dessus représente une partie d'une séquence d'impulsion, pendant laquelle on laisse évoluer l'aimantation souhaitée dans le plan xy . En ne considérant que l'évolution liée à l'interaction avec le champ statique (déplacement chimique) et en partant d'une aimantation initiale alignée selon l'axe z , on peut calculer les expressions de M_a et M_b pour différents schémas d'acquisition. M_c représente l'aimantation qui est transmise par la suite du programme d'impulsion vers l'acquisition. Le signal final sera ainsi modulé par la valeur de M_c .

6.1 La méthode "STATES"

FID N°	ϕ_1	ϕ_2	t_1	M_a	M_b	M_c
1	x	x	t_0	$-M_y$	$-\cos(\omega t_0) M_y + \sin(\omega t_0) M_x$	$-\cos(\omega t_0)$
2	y	x	t_0	M_x	$\sin(\omega t_0) M_y + \cos(\omega t_0) M_x$	$\sin(\omega t_0)$
3	x	x	$t_0 + \Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_x$	$-\cos(\omega(t_0 + \Delta t_1))$
4	y	x	$t_0 + \Delta t_1$	M_x	$\sin(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_y + \cos(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_x$	$\sin(\omega(t_0 + \Delta t_1))$
5	x	x	$t_0 + 2\Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_x$	$-\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1))$
6	y	x	$t_0 + 2\Delta t_1$	M_x	$\sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_y + \cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_x$	$\sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1))$

Ce tableau montre que l'alternance de la phase de la première impulsion permet de reconstruire un signal complexe dans la dimension indirecte t_1 . On voit également que la valeur du premier délai t_0 introduit une phase d'ordre 1 dans cette dimension. Cette phase s'ajoute à celle qui résulte de la précession de l'aimantation transverse durant les impulsions de 90 degrés et qui vaut $2 P_{90}/\pi$ par impulsion (P_{90} est la durée de l'impulsion de 90 degrés).

Afin d'éviter de mesurer une phase a posteriori dans les dimensions indirectes, on utilise souvent un délai t_0 correspondant à un délai de précession total de $\Delta t_1/2$, soit, en tenant compte de la précession pendant les impulsions : $t_0 = \Delta t_1/2 - 4 P_{90}/\pi$. Ce réglage à l'acquisition correspond à une correction de phase d'ordre 1 de -180 degrés.

- ❖ Exercice : Démontrer la proposition précédente en se souvenant que $\Delta t_1 = SW/2$, SW est la largeur spectrale.

Le schéma d'acquisition présenté ci-dessus est connu sous le nom de STATES. Il correspond à une acquisition "simultanée" des deux composantes de l'aimantation qui précesse pendant le temps t_1 . Le spectre est obtenu en effectuant une transformée de Fourier complexe dans cette dimension : c'est le schéma d'acquisition qui a été utilisé dans la HSQC traitée jusqu'à présent. On peut noter que le même résultat peut être obtenu en cyclant la phase de la deuxième impulsion.

FID N°	ϕ_1	ϕ_2	t_1	M_a	M_b	M_c
1	x	x	t_0	$-M_y$	$-\cos(\omega t_0) M_y + \sin(\omega t_0) M_x$	$-\cos(\omega t_0)$
2	x	y	t_0	$-M_y$	$-\cos(\omega t_0) M_y + \sin(\omega t_0) M_x$	$-\sin(\omega t_0)$
3	x	x	$t_0 + \Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_x$	$-\cos(\omega(t_0 + \Delta t_1))$
4	x	y	$t_0 + \Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_x$	$-\sin(\omega(t_0 + \Delta t_1))$
5	x	x	$t_0 + 2\Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_x$	$-\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1))$
6	x	y	$t_0 + 2\Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_x$	$-\sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1))$

On notera cependant que dans le cas du cyclage de phase de la deuxième impulsion on change le signe des "points imaginaires" (modulés en sinus), ce qui conduit à un axe de fréquence inversé par rapport à celui obtenu pour le premier tableau. Cet effet peut être corrigé en inversant l'axe des fréquences ou bien en changeant le signe de la partie imaginaire avant d'effectuer la TF.

6.2 La méthode "TPPI" (Time Proportional Phase Increment)

Dans le schéma TPPI, chaque fid de la dimension reconstruite est obtenu pour un incrément du délai t_1 différent. Le vecteur représentant les points enregistrés dans la dimension reconstruite est donc un vecteur de points réels. La phase de la première (ou de la deuxième) impulsion est incrémentée de 90 degrés pour chaque fid successif. Le tableau ci-dessous montre le cas du cyclage de la deuxième impulsion :

FID N°	ϕ_1	ϕ_2	t_1	M_a	M_b	M_c
1	x	x	t_0	$-M_y$	$-\cos(\omega t_0) M_y + \sin(\omega t_0) M_x$	$-\cos(\omega t_0)$
2	x	y	$t_0 + \Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_x$	$-\sin(\omega(t_0 + \Delta t_1))$
3	x	-x	$t_0 + 2\Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_x$	$\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1))$
4	x	-y	$t_0 + 3\Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + 3\Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + 3\Delta t_1)) M_x$	$\sin(\omega(t_0 + 3\Delta t_1))$
5	x	x	$t_0 + 4\Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + 4\Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + 4\Delta t_1)) M_x$	$-\cos(\omega(t_0 + 4\Delta t_1))$

6	x	y	$t_0 + 5\Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0+5\Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0+5\Delta t_1)) M_x$	$-\sin(\omega(t_0+5\Delta t_1))$
---	---	---	---------------------	--------	--	----------------------------------

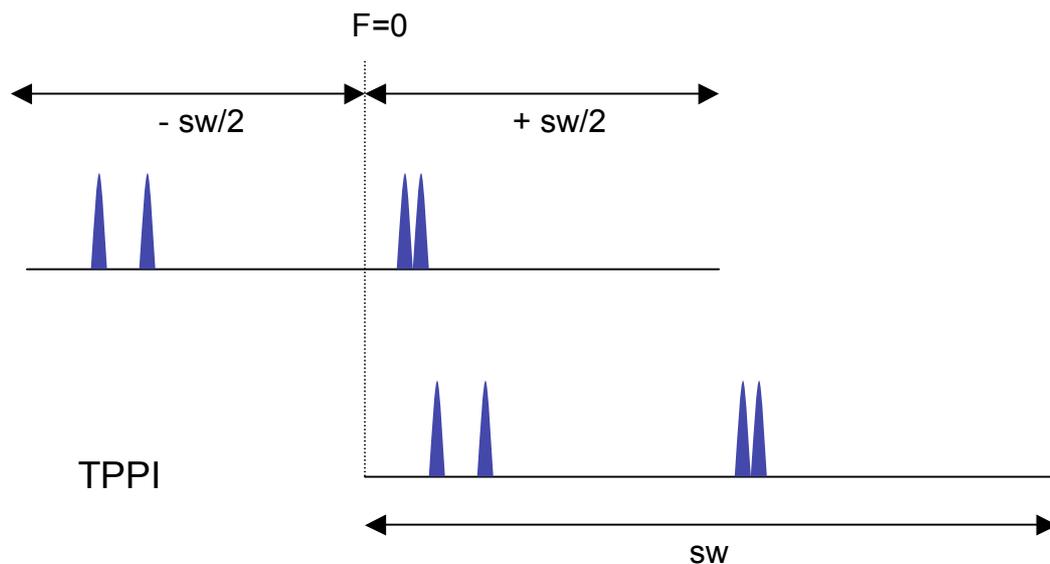
L'analyse du tableau ci-dessus montre que la rotation de phase conduit à un changement de signe d'une paire de points sur deux. Ce changement de signe peut être vu comme un décalage d'une demi-largeur spectrale, en effet, si le signal est de la forme :

$$S(k) = \cos(\omega k \Delta t_1)$$

l'incrément de phase pour chaque valeur de k conduit à ($\Delta t_1 = 1/2SW$) :

$$S(k) = \cos(\omega k \Delta t_1 + k \frac{\pi}{2} \Delta t_1) = \cos\left(\left[\omega + 2\pi \frac{SW}{2}\right] k \Delta t_1\right)$$

Le décalage en fréquence introduit par le cyclage de phase permet de placer la fréquence nulle à une extrémité du spectre, de sorte que l'ensemble des signaux possède des fréquences positives. Il faut également noter que la vitesse d'échantillonnage $1/\Delta t_1$ doit être doublée par rapport à celle utilisée dans la méthode STATES (autrement dit : $\Delta t_1^{\text{TPPI}} = \Delta t_1^{\text{STATES}}/2$)



❖ Exercice : le jeu de données NMR_DATA/2 contient un spectre HSQC de l'ubiquitine acquis selon le schéma TPPI.

- On utilisera le même script de conversion que celui utilisé pour le jeu de données précédant (NMR_DATA/1) après avoir modifié la nature de la dimension y qui est cette fois-ci réelle.

```
-xMODE          DQD  -yMODE          Real  \
```

- Modifier le script de traitement *proct2t1.com* afin d'introduire une transformée de Fourier réelle (il suffit d'ajouter l'option "-real") dans la dimension $t1$.
- Quelle est la correction de phase à appliquer dans la dimension f_1 ? Donner une explication à la valeur trouvée.

6.3 La méthode "STATE-TPPI"

La méthode est une combinaison des deux précédentes. Elle permet d'obtenir des points complexes dans la dimension indirecte comme dans la méthode STATES, mais conserve le principe de rotation de la phase d'une des deux impulsions (excitation ou sélection). L'avantage de ce schéma est que certains artéfacts conduisant à des pics à fréquence nulle sont déplacés aux extrémités du spectre en f_1 . C'est le cas par exemple des pics axiaux dans un spectre NOESY. Le tableau des phases est le suivant :

FID N°	ϕ_1	ϕ_2	t_1	M_a	M_b	M_c
1	x	x	t_0	$-M_y$	$-\cos(\omega t_0) M_y + \sin(\omega t_0) M_x$	$-\cos(\omega t_0)$
2	y	x	t_0	M_x	$\sin(\omega t_0) M_y + \cos(\omega t_0) M_x$	$\sin(\omega t_0)$
3	-x	x	$t_0 + \Delta t_1$	M_y	$\cos(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_y - \sin(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_x$	$\cos(\omega(t_0 + \Delta t_1))$
4	-y	x	$t_0 + \Delta t_1$	M_x	$-\sin(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_y - \cos(\omega(t_0 + \Delta t_1)) M_x$	$-\sin(\omega(t_0 + \Delta t_1))$
5	x	x	$t_0 + 2\Delta t_1$	$-M_y$	$-\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_y + \sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_x$	$-\cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1))$
6	y	x	$t_0 + 2\Delta t_1$	M_x	$\sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_y + \cos(\omega(t_0 + 2\Delta t_1)) M_x$	$\sin(\omega(t_0 + 2\Delta t_1))$

On retrouve l'alternance de signe qui affecte un point complexe sur deux et qui se traduit par une permutation circulaire d'une demi-largeur spectrale dans la dimension indirecte. Cet effet peut être corrigé, soit en changeant le signe d'une paire de points sur deux dans le domaine temporel, soit en réalisant une permutation circulaire des points dans le domaine des fréquences.

- ❖ Exercice : le jeu de données NMR_DATA/3 contient un spectre HSQC de l'ubiquitine acquis selon le schéma STATES-TPPI.
 - On utilisera le même script de conversion que celui utilisé pour le jeu de données NMR_DATA/1. Analyser la matrice après le traitement, que se passe-t-il ?
 - En utilisant l'aide de *nmrPipe*, trouver l'option de la commande FT qui permet de changer le signe des paires de points successifs.

6.4 La méthode des gradients (ECHO-ANTIECHO)

La méthode des gradients consiste à introduire un gradient dans le temps d'évolution t_1 . Ce gradient introduit une phase qui dépend de la nature de l'opérateur qui est actif pendant la période t_1 :

$$\varphi^1(z) = -g_z^1 z p \gamma \tau_g^1$$

g_z^1 est l'intensité du gradient en gauss.cm⁻¹, z la position de la tranche d'échantillon considérée (dans le cas où le gradient est orienté selon l'axe z), p , l'ordre de cohérence, γ le rapport gyromagnétique et τ_g^1 le temps d'application du gradient. La sélection d'un chemin de cohérence particulier consiste à appliquer un second gradient (de sélection) de façon à annuler la phase introduite par le premier gradient (d'encodage). Une seconde propriété du gradient de

sélection est d'accentuer le déphasage des signaux correspondant à un chemin de cohérence différent de celui que l'on cherche à sélectionner. La condition de sélection est donnée par :

$$\varphi^1(z) + \varphi^2(z) = 0 \Leftrightarrow g_z^2 \tau_g^2 = -g_z^1 \tau_g^1$$

On note que l'expression ci-dessus est valable dans le cas où l'ordre de cohérence et la nature du noyau ne changent pas au cours de l'expérience. Dans le cas d'une expérience hétéronucléaire, le gradient de sélection permet également de sélectionner une cohérence transférée d'un noyau i vers j , et la condition de sélection s'écrit alors :

$$g_z^2 \tau_g^2 p_i \gamma_i = -g_z^1 \tau_g^1 p_j \gamma_j$$

Les expressions ci-dessus indiquent que la sélection par les gradients est sensible au signe de la fréquence qui évolue pendant le temps t_1 . Si on note M^+ et M^- les vecteurs aimantation correspondant à un ordre de cohérence positif ou négatif respectivement, on peut écrire les relations linéaires suivantes :

$$M^+ = M^0 \exp(i\omega t) = M^0 \cos(\omega t) + iM^0 \sin(\omega t) = M_x + iM_y$$

$$M^- = M^0 \exp(-i\omega t) = M^0 \cos(\omega t) - iM^0 \sin(\omega t) = M_x - iM_y$$

On remarque que les composantes perpendiculaires de l'aimantation évoluant pendant le délai t_1 peuvent être retrouvées en calculant la somme et la différence de deux interférogrammes enregistrés de façon à sélectionner les chemins de cohérence de signes opposés :

$$\begin{cases} 2M_x = M^+ + M^- \\ 2iM_y = M^+ - M^- \end{cases}$$

En principe, la sélection d'un des deux chemins de cohérence pendant le temps d'évolution induit une perte de signal et conduit à une diminution d'un facteur 2 du rapport signal/bruit. Cet inconvénient est largement compensé par une meilleure qualité des spectres utilisant les gradients (absence de bruit t_1). Mark Rance et Lewis Kay ont proposé il y a quelques années une modification de l'expérience HSQC qui permet de conserver et d'enregistrer simultanément le signal provenant des deux chemins de cohérence. Dans cette expérience, le signal correspondant aux cohérences M^+ et M^- évoluant pendant t_1 module deux opérateurs protons perpendiculaires (I_x et I_y) qui évoluent en même temps pendant le temps d'acquisition t_2 . Un signal complexe sera retrouvé en calculant la somme et la différence de deux interférogrammes consécutifs, et en appliquant une correction de phase de 90 degrés sur la partie imaginaire.

- ❖ Exercice : le jeu de données NMR_DATA/4 contient un spectre HSQC de l'ubiquitine acquis selon le schéma ECHO-ANTI ECHO proposé par Rance et Kay.
 - On utilisera le même script de conversion que celui utilisé pour le jeu de données NMR_DATA/1.
 - Afin de traiter la matrice, il est nécessaire d'effectuer la somme et la différence entre chaque paire de fid. On utilise pour cela les possibilités offertes par la présence d'un langage de macro-commandes au sein de *nmrPipe*.

Le début du fichier de commandes *nmrPipe* sera modifié de la façon suivante :

```
nmrPipe -in procddata/hsqc.fid \
| nmrPipe -fn MAC -macro ranceY.M -noRd -noWr \
| nmrPipe -fn SOL \
.....
```

Le fichier *ranceY.M* contient les opérations d'addition et de soustraction :

```

/*****
/* ranceY.M: Rance-mode gradient shuffling for Y-Axis.          */
/*****

/* Process only every pair of complex rows, one real, one imag: */

if (!(sliceCode % 2))
{
    exit( 0 );
};

float sumR[size], sumI[size], difR[size], difI[size];

(void) dReadB( inUnit, rdata, wordLen*size );
(void) dReadB( inUnit, idata, wordLen*size );
(void) dReadB( inUnit, difR, wordLen*size );
(void) dReadB( inUnit, difI, wordLen*size );

(void) vvCopy( sumR, rdata, size );
(void) vvCopy( sumI, idata, size );

(void) vvAdd( sumR, difR, size );
(void) vvAdd( sumI, difI, size );
(void) vvSub( difR, rdata, size );
(void) vvSub( difI, idata, size );

/* (void) phase( difR, difI, size, 90, 0 ); */
/* Neg Imag, Swap Real/Imag = 90 degree phase. */

(void) vNeg( difI, size );

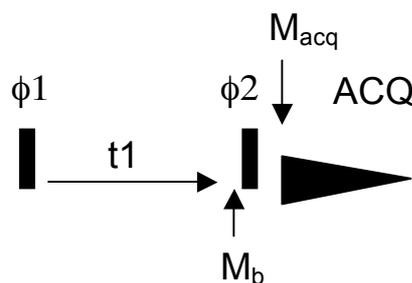
(void) dWrite( outUnit, sumR, wordLen*size );
(void) dWrite( outUnit, sumI, wordLen*size );
(void) dWrite( outUnit, difI, wordLen*size );
(void) dWrite( outUnit, difR, wordLen*size );

```

- Traiter la matrice de façon à obtenir une carte qui soit comparable aux autres versions de la HSQC vues précédemment.
- Modifier ce script de façon à obtenir un axe de fréquence conforme dans la dimension f_1 .

6.5 Acquisition et traitement de spectres en mode non-phasé

Dans certaines expériences, il est possible d'utiliser un cycle de phase qui retient les contributions provenant des deux composantes perpendiculaires de l'aimantation évoluant pendant le temps t_1 . C'est le cas par exemple de l'expérience COSY homonucléaire dont le cycle de phase est décrit dans la figure ci-dessous :



scan	ϕ_1	ϕ_2	ACQ	M_b	M_{acq}
1	x	x	+	$-\cos(\omega t_1) M_y + \sin(\omega t_1) M_x$	$\sin(\omega t_1) M_x$
2	x	y	-	$-\cos(\omega t_1) M_y + \sin(\omega t_1) M_x$	$\cos(\omega t_1) M_y$
3	x	-x	+	$-\cos(\omega t_1) M_y + \sin(\omega t_1) M_x$	$\sin(\omega t_1) M_x$
4	x	-y	-	$-\cos(\omega t_1) M_y + \sin(\omega t_1) M_x$	$\cos(\omega t_1) M_y$

La somme des signaux conduit à : $S(t_1) = \cos(\omega t_1) M_y + \sin(\omega t_1) M_x$

Pendant l'acquisition (t_2), l'aimantation précesse sous l'effet du champ B_0 , ce qui conduit à :

$$\begin{aligned}
 S(t_1, t_2) &= \sin(\omega t_1) \cos(\omega t_2) M_x + \sin(\omega t_1) \sin(\omega t_2) M_y \\
 &\quad + \cos(\omega t_1) \cos(\omega t_2) M_y - \cos(\omega t_1) \sin(\omega t_2) M_x \\
 &= i \exp(-i \omega t_1) \exp(i \omega t_2) = i \exp(i(\omega t_2 - \omega t_1))
 \end{aligned}$$

Le signe de la fréquence en f1 peut être déterminé. En revanche, le mélange des modulations en sinus et cosinus conduit à un mélange des formes de raies en absorption et en dispersion, à l'origine de formes de raies en papillon ("phase twisted"). L'intensité du signal est obtenue en prenant le module des points complexes après la TF.

- ❖ Exercice : le jeu de données NMR_DATA/5 contient un spectre COSY enregistré en mode non-phasé. Le traitement sera réalisé avec le script suivant, après avoir converti les données bruker à l'aide de la commande bruker.

```

nmrPipe -in procddata/cosy.fid \
| nmrPipe -fn SP -verb \
| nmrPipe -fn ZF -auto \
| nmrPipe -fn FT -auto \
| nmrPipe -fn TP \
| nmrPipe -fn SP -verb \
| nmrPipe -fn ZF -auto \
| nmrPipe -fn FT -neg \
| nmrPipe -fn MC \
-out procddata/cosy.ft2 -verb -ov

```

7. Traitement d'un spectre 3D, HNCA

L'acquisition de spectres de dimensionnalité supérieure à 2 met en oeuvre exactement les mêmes techniques d'acquisition en mode phasé que celles décrites ci-dessus. L'ensemble des interférogrammes 1D est stocké dans un fichier unique. Il est nécessaire de connaître l'ordre dans lequel les différentes dimensions sont échantillonnées avant de commencer le traitement. Dans le cas de l'expérience ci-dessous (NMR_DATA/6), la dimension azote a été échantillonnée en utilisant le mode ECHO-ANTIECHO avec préservation des chemins de cohérence (méthode Kay-Rance). Le prétraitement consistant à additionner et à soustraire les paires de fid successifs est réalisé dans le script de conversion suivant :

```
#!/bin/csh
```

```

bruk2pipe -verb -in brukdata/ser -bad 0.0 -DMX -decim 24 -dspfvs 12 -noswap
\
-xN          2048      -yN          46      -zN          64      \
-xT          1024      -yT          23      -zT          32      \
-xMODE      Complex   -yMODE      Complex   -zMODE      Complex   \
-xSW        7002.801   -ySW        1804.891   -zSW        3923.492   \
-xOBS      600.13281345 -yOBS      60.8177474422395 -zOBS      150.910746845697 \
-xCAR        4.688     -yCAR        116.500   -zCAR        53.000   \
-xLAB        H         -yLAB        15N      -zLAB        13C      \
-ndim        3         -aq2D        States   \
| nmrPipe -fn MAC -macro ranceY.M -noRd -noWr \
| pipe2xyz -ov -out procddata/hnca%03d.fid -x

```

On introduit ici une nouvelle commande de *nmrPipe*, *pipe2xyz*, qui permet de stocker les différents plans de la matrice 3D sous la forme de plusieurs fichiers contenant chacun un plan 2D. Cette organisation des données facilite la visualisation des données et leur traitement ultérieur éventuel. Dans la suite du traitement, les différents plans sont lus par une instruction de type *xyz2pipe*. La macro-commande permettant de traiter l'ensemble du spectre est donnée ci-dessous :

```

#!/bin/csh

xyz2pipe -in procddata/hnca%03d.fid -x \
| nmrPipe -fn POLY -time \
| nmrPipe -fn GMB -lb -20.0 -gb 0.1 -size 952 \
| nmrPipe -fn ZF -size 1024 \
| nmrPipe -fn FT -verb \
| nmrPipe -fn PS -p0 80.0 -p1 29.0 \
| nmrPipe -fn EXT -select -left -sw -di \
| nmrPipe -fn POLY -auto -ord 1 \
| pipe2xyz -ov -out procddata/hnca%03d.ft1 -x

xyz2pipe -in procddata/hnca%03d.ft1 -y \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.0 -pow 2.0 \
| nmrPipe -fn ZF -size 128 \
| nmrPipe -fn FT -verb \
| nmrPipe -fn REV \
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di \
| nmrPipe -fn POLY -auto -ord 1 \
| pipe2xyz -ov -out procddata/hnca%03d.ft2 -y

xyz2pipe -in procddata/hnca%03d.ft2 -z \
| nmrPipe -fn LP -auto \
| nmrPipe -fn SP -off 0.5 -end 1.0 -pow 2.0 \
| nmrPipe -fn ZF -size 128 \
| nmrPipe -fn FT -alt -verb \
| nmrPipe -fn PS -p0 0.0 -p1 0.0 -di \
| nmrPipe -fn POLY -auto -ord 1 \
| pipe2xyz -ov -out procddata/hncaLP%03d.ft3 -y

```

Figure : Représentation du plan proton / carbone 72. Les corrélations intra- et inter-résidus (HNCA(i) et HNCA(i-1)) impliquant cinq protons amides différents sont clairement visibles.

- ❖ Dans quelle dimension se trouve le spectre carbone ? (x, y, z)
- ❖ Comment pourrait-on obtenir une carte de type HSQC 1H-15N ?

