

THESE DE DOCTORAT

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 596

Matière, Molécules, Matériaux et Géosciences

Spécialité : *Chimie Physique, Chimie Théorique*

Par

Clément PRAUD

Development and assessment of UF 2D NMR methods for the analysis of metabolic mixtures hyperpolarized by d-DNP and at thermal equilibrium.

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 14 Décembre 2023

Unité de recherche : Laboratoire CEISAM UMR CNRS 6230

Rapporteurs avant soutenance :

Stéphane Viel Professeur, Université d'Aix-Marseille, France
Philippe Pelupessy Ingénieur de Recherche CNRS, HDR, Sorbonne Université, Paris, France

Composition du Jury :

Président : Prénom Nom Fonction et établissement d'exercice (*à préciser après la soutenance*)
Examineurs : **Sabine Hediger** Directrice de Recherche CNRS, CEA Grenoble, France
Stéphane Viel Professeur, Aix-Marseille Université, France
Philippe Pelupessy Ingénieur de Recherche CNRS, HDR, Sorbonne Université, Paris, France

Dir. de thèse : **Patrick Giraudeau** Professeur, Nantes Université, France
Co-dir. de thèse : **Jean-Nicolas Dumez** Directeur de Recherche CNRS, Nantes Université, France

Titre : Développement et évaluation de méthodes de RMN 2D ultrarapides pour l'analyse de mélanges métaboliques hyperpolarisés par PDN et à l'équilibre thermique

Mots clés : Spectroscopie RMN liquide, séquences d'impulsions, Polarisation Dynamique Nucléaire, analyse de mélanges, métabolites, évaluation de méthodes

Résumé : La spectroscopie RMN hyperpolarisée du ^{13}C en abondance naturelle, basée sur la polarisation dynamique nucléaire (PDN) par dissolution, fournit des spectres riches, sensibles et répétables de mélanges complexes. Néanmoins, le gain de sensibilité RMN s'accompagne de nouveaux défis, comme le chevauchement des pics et la difficulté d'attribuer les signaux ^{13}C hyperpolarisés. La RMN 2D ultrarapide (UF) offre un moyen unique d'acquérir des cartes de corrélations 2D d'échantillons hyperpolarisés, en un seul scan et en moins de 100 ms. Une séquence d'impulsions « UF long-rang HETCOR » a été soigneusement optimisée afin d'enregistrer des informations de corrélation reliant des carbones quaternaires à des protons via des couplages scalaires longue distance,

offrant des informations structurales et une aide à l'attribution des signaux. Dans le cadre de l'analyse de mélanges de métabolites, nous avons montré qu'il était possible d'acquérir les signaux de molécules en abondance naturelle et hyperpolarisée par PDN. Les limites de quantification de la méthode ont été obtenues entre 1 et 50 mM, avant dissolution, ainsi qu'une répétabilité de 10% et une bonne linéarité ($R^2 \geq 0.90$). La comparaison de deux solvants utilisés en PDN par dissolution est réalisée et les perspectives de la méthode sont discutées. En parallèle, les performances d'une séquence UF COSY sur plusieurs spectromètres du CEISAM sont investiguées et les limites de quantification de ces expériences sont rapportées.

Title: Development and assessment of UF 2D NMR methods for the analysis of metabolic mixtures hyperpolarized by d-DNP and at thermal equilibrium.

Keywords: NMR spectroscopy of liquid, pulse sequences, Dynamic Nuclear Polarization, mixture analysis, metabolites, method assessment

Abstract: Hyperpolarized ^{13}C NMR at natural abundance, relying on dissolution dynamic nuclear polarization (d-DNP), provides rich, sensitive and repeatable ^{13}C NMR fingerprints of complex mixtures. Nevertheless, the increase of the NMR sensitivity comes with challenges, such as peak overlap and the difficulty to assign hyperpolarized ^{13}C signals. Ultrafast (UF) 2D NMR spectroscopy offers a unique way to record heteronuclear 2D correlation maps, in a single scan and in less than 100 ms, of d-DNP hyperpolarized samples. A UF long-range HETCOR pulse sequence has been developed and optimised to record 2D correlation peaks, that links quaternary carbons and protons through long-range scalar couplings, offering useful assignment and structural information.

In the case of metabolite mixture analysis, we showed that it was possible to record good quality spectra of natural abundance molecules, polarized by d-DNP. Limits of quantification of the method are reported in the range of 1-50 mM in the sample cup, prior to dissolution, as well as a method repeatability close to 10% and a very good linearity with $R^2 \geq 0.90$. The detailed comparison of two dissolution solvents, D_2O and MeOD is provided, and the perspectives of such technique for complex mixture analysis are addressed. In parallel, the analytical performance of a UF COSY pulse sequence is studied on 3 different spectrometer systems of the CEISAM NMR platform, and limit of quantifications of the method are reported.