

**CONTRIBUTION DE LA SPECTROSCOPIE RMN ANISOTROPE DU DEUTÉRIUM EN ABONDANCE NATURELLE (RMN DANA) À L'ÉLUCIDATION STRUCTURALE : APPLICATION À L'ANALYSE DE PRODUITS NATURELS**

**CONTRIBUTION OF THE ANISOTROPIC NMR OF DEUTERIUM IN NATURAL ABUNDANCE (ANAD NMR) IN STRUCTURAL ELUCIDATION: APPLICATION TO THE ANALYSIS OF NATURAL PRODUCTS**

Établissement **Université Paris-Sud**

École doctorale **Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux, Instrumentation et Biosystèmes**

Spécialité **chimie**

Unité de recherche **Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay**

Directeur de la thèse **Philippe LESOT**

Financement **du 01-10-2019 au 31-10-2022 origine Financement publique Employeur MESRI**

Début de la thèse le **1 octobre 2019**

Date limite de candidature **26 avril 2019**

## Mots clés - Keywords

RMN 1D/2D anisotrope, Elucidation structurale, Deutérium (abondance naturelle), Stéréochimie, Cristaux Liquides (Chiraux), Produits naturels

Anisotropic 1D/2D NMR, Structural elucidation, Deuterium (natural abundance), Stereochemistry, (Chiral) liquid crystals, Natural products

## Profil et compétences recherchées - Profile and skills required

Ce sujet de Thèse s'adresse à un(e) diplômé(e) d'un Master 2 (P or R) en chimie (spécialité chimie / spectroscopie) et/ou d'un diplôme d'ingénieur chimiste. Le (la) candidat(e) devra être motivé(e) par la méthodologie RMN, la stéréochimie et les applications analytiques associées. Le/la doctorant(e) recruté(e) sera en charge de l'ensemble des développements expérimentaux en RMN et de la validation analytique des méthodes développées sur des molécules cibles d'intérêt.

This topic is intended for a graduate student from a Master 2 (P or R) in chemistry (molecular chemistry or spectroscopy specialty) and / or a degree in chemical engineering. The candidate should be motivated by NMR methodology, stereochemistry and associated analytical applications. The PhD student enrolled will be in charge of all experimental developments in NMR and analytical validation of methods developed on target molecules of interest.

## Description de la problématique de recherche - Project description

Version française :

La discrimination énantiomérique et élucidation structurale de molécules organiques (chirales) sont des défis permanents tant en chimie organique qu'en chimie analytique. C'est aussi un enjeu de société majeur, compte tenu de la différence de bioactivités de deux isomères optiques. Les outils classiques de discriminations (optique, HPLC/GC, RMN liquide, ...) ne sont pas toujours efficaces, et ne sont pas des méthodes universelles. En revanche, la RMN dans les cristaux liquides chiraux (CLC) est devenue depuis deux décennies une alternative de choix pour l'analyse de la chiralité, notamment lorsque les approches classiques sont inefficaces. Cette méthode met en œuvre des outils variés comme la RMN 1D/2D du H-1, F-19, C-13 ou H-2 en abondance naturelle (RMN DAN).

Le travail de Thèse proposé porte sur le développement de la RMN dite « anisotrope » et la promotion de cette approche analytique originale auprès de la communauté des chimistes. En exploitant la richesse analytique des solvants orientés tels que les CLCs lyotropes, l'idée directrice est de concevoir et d'utiliser de nouveaux outils RMN pour analyser de « petites » molécules en chimie organique ou des

produits naturels, plus complexes, et répondre ainsi aux problématiques structurales rencontrées par les chimistes. En effet, et contrairement à la RMN « liquide », la RMN en milieu orienté permet d'accéder à des interactions RMN dites anisotropes résiduelles spécifiques comme l'anisotropie de déplacement chimique résiduelle (RCSA), le couplage dipolaire résiduel (RDC) et le couplage quadrupolaire résiduel (RQC), qui sont en moyenne nulles dans un environnement isotrope, et par conséquent inaccessibles directement sur les spectres de RMN classiques. Le projet se focalise sur le développement d'une méthodologie novatrice dans l'analyse structurale de composés organiques basée sur l'utilisation des RQCs observés pour des noyaux de spin  $I > \frac{1}{2}$  comme le deutérium (en abondance naturelle).

Les spectroscopies RX sont des techniques redoutables lorsque le produit à analyser est cristallisable. Dans le cas contraire, des solutions alternatives doivent être adoptées. Ainsi, les méthodes d'élucidation structurale par RMN dans les solvants isotropes sont généralement basées sur l'analyse combinée des couplages scalaires homo- et hétéronucléaires,  $J$ , et des effets  $nOe$  (expérience NOESY). Quoique très utilisés, ces paramètres ne permettent pas toujours de discriminer entre deux structures. Dans ce cas, un changement de solvant s'impose!

Dans les cristaux liquides, il existe une relation univoque entre les observables RMN anisotropes résiduelles (RCSA, RDC ou RQC), les paramètres d'ordre orientationnel (définissant l'ordre d'un analyte) et la géométrie moléculaire. Les RDCs(C-13 - H-1) puis plus récemment les RCSAs(13C) ont été utilisés dans le cadre de la détermination structurale, parfois couplés avec les données de type  $nOe$ . En 2001, puis en 2009, nous avons montré que les données RQC(H-2) extraits des spectres 2D DAN anisotropes (DANA) pouvaient être utilisées pour analyser la structure 3D et le comportement orientationnel de petites molécules (chirales / prochirales). Cependant, le protocole appliqué utilisait des tableaux « Excel » peu pratiques et générateurs d'erreurs, ainsi qu'une modélisation des structures de type semi-empirique (AM1, PM2).

Pour contourner ces problèmes, nous avons mis au point en 2017, en collaboration avec l'Université de Récife, (Brésil) un protocole informatique intégré (le programme « MSpin-RQC » dérivé du programme MSpin-RDC/RSCA, MestReLabResearch), qui repose notamment sur la détermination ab-initio de la géométrie moléculaire (DFT) et des constantes de couplages quadrupolaires deutérium (QCC(H-2)) utilisant la fonctionnelle de densité « B3LYP » avec une base relativement étendue « 6-31G(df,3p) ». Le programme permet de visualiser les axes propres d'orientation ( $S_x$ ,  $S_y$ ,  $S_z$ ) et d'inertie ( $I_x$ ,  $I_y$ ,  $I_z$ ) d'une molécule. La validité de la structure (en accord avec l'attribution des RQC(H-2)) est évaluée en comparant les valeurs expérimentales des RQCs (RQC(H-2)exp) et recalculées (RQC(H-2)calc) à partir du tenseur d'alignement en calculant le facteur de qualité de Cornilescu,  $Q$ , l'accord parfait correspondant à une valeur de  $Q$  minimale. La représentation graphique des tenseurs d'alignement principaux et d'inertie, ainsi que la détermination des angles ' $5D$ ' inter-tenseurs permet de quantifier l'importance des interactions stériques (phénomène de reconnaissance de forme) dans le processus d'orientation et de discrimination.

Jusqu'à présent, seuls les RCSAs(C-13) et les-RDC(13C - 1H ou H-1 - H-1) ont été utilisés dans le cadre de l'élucidation structurale de composés naturels complexes et leur détermination configurationnelle. L'un des derniers challenges analytiques dans le domaine de l'analyse structurale de molécules naturelles est l'utilisation des RQCs(H-2), sans enrichissement en deutérium. Cette approche offre l'avantage de données RMN associées aux RQCs(H-2) dont l'amplitude est de un à deux (voir trois) ordres de grandeur supérieurs aux magnitudes des valeurs des RDCs(C-13 - H-1) et des RCSAs(C-13), respectivement. L'intérêt majeur d'exploiter les RQCs(H-2) réside donc dans l'amplitude des valeurs (en Hz) des RQCs et la précision des mesures associées à cette observable, notamment au niveau des groupements CH<sub>2</sub> (système de spin ABX).

Dans ce travail de Thèse, nous étudierons le cas de molécules polycycliques complexes cibles dont la configuration des centres stéréogènes est déjà connue. Nous envisageons, ainsi, l'étude de la Strychnine, la Brucine, l'Artémisinine et la DHEA, par exemple pour tester la validité et la robustesse de la méthode. Les premiers spectres 2D DAN anisotropes de la Strychnine (70 mg) dans PBLG sont très encourageants. Les données expérimentales seront traitées avec le programme MSpin-RQC présenté précédemment. L'attribution de la configuration relative des centres stéréogènes sera réalisée en appliquant le protocole mis au point, l'idée étant de générer des structures dont la configuration reste plausible (énergétiquement parlant) et de confronter les différents stéréoisomères aux données anisotropes RQC(H-2) mesurées dans un ou plusieurs systèmes orientants. Dans une seconde étape, d'autres produits naturels moins classiques dont la configuration n'est pas encore établie seront étudiés, ainsi que le cas plus complexe de molécules flexibles.

Ce sujet de Thèse s'adresse à un(e) diplômé(e) d'un Master 2 (P ou R) en chimie (spécialité chimie / spectroscopie) et/ou d'un diplôme d'ingénieur chimiste, mais toute candidature (raisonnable) est ma bienvenue. Le (la) candidat(e) devra, avant tout, être motivé(e) par la méthodologie RMN, la stéréochimie et les applications analytiques associées. Le/la doctorant(e) recruté(e) sera en charge de l'ensemble des développements expérimentaux en RMN et de la validation analytique des méthodes développées sur des molécules cibles d'intérêt. English version:

Enantiodiscrimination and structural elucidation of organic (chiral) molecules are two continuous challenges in both organic and analytical chemistry. It is also a major societal challenge, given the difference in bioactivity of two optical isomers. Conventional discrimination tools (optical, HPLC/GC, liquid NMR, ...) are not always effective and are not universal methods. On the other hand, NMR in chiral liquid crystals (CLC) has become over the past two decades a robust alternative for chirality analysis, especially when conventional approaches are ineffective. This method uses various tools such as H-1, F-19, C-13 or H-2 1D/2D NMR in natural abundance (DAN NMR).

This thesis work focuses on the development of the so-called 'anisotropic' NMR and the promotion of this original analytical approach

among the chemistry community. By exploiting the analytical wealth of oriented solvents such as lyotropic CLCs, the guiding idea is to design and use new NMR tools to analyze 'small' molecules in organic chemistry or more complex natural products, thus responding to the structural problems encountered by chemists. Indeed, and unlike 'liquid' NMR, oriented NMR provides access to specific residual anisotropic NMR interactions such as residual chemical displacement anisotropy (RCSA), residual dipolar coupling (RDC) and residual quadrupolar coupling (RQC), which are on average equal to zero in an isotropic environment, and therefore inaccessible directly on conventional NMR spectra.

The project proposes the development of an innovative methodology for the structural analysis of organic compounds based on the use of RQCs observed for spin  $I > \frac{1}{2}$  nuclei such as deuterium (at natural abundance level).

RX spectroscopy is a formidable technique when the to be analyzed is crystallizable. Otherwise, alternative solutions must be adopted. Thus, NMR structural elucidation methods in isotropic solvents are generally based on the combined analysis of homo- and heteronuclear scalar couplings, J, and nOe effects (e.g. NOESY experiment). Although widely used, these parameters do not always make it possible to discriminate between two structures. In this case, a change of solvent is required!

In liquid crystals, there is a unique relationship between residual anisotropic NMR observables (RCSA, RDC or RQC), orientation parameters (defining the orientational order of an analyte) and its molecular geometry. The RDCs (C-13 - H-1) and more recently the RCSAs (C-13) have been exploited for structural determination, sometimes coupled with nOe data. In 2001 and again in 2009, we showed that RQC(H-2) data from anisotropic 2D spectra could be used to analyze the 3D structure and orientational behaviour of small molecules (chiral / prochiral). However, the protocol applied used impractical and error generating 'Excel' tables, as well as a modeling of semi-empirical structures (AM1, PM2).

To overcome these problems, we developed in 2017, in collaboration with the University of Recife, Brazil, an integrated computer protocol (the 'MSpin-RQC' program derived from the MSpin-RDC/RCSA program, MestReLabResearch), which is based in particular on the ab-initio determination of molecular geometry (DFT) and deuterium quadrupolar coupling constants (QCC(H-2)) using the density functional (DFT) 'B3LYP' with a relatively large base '6-31G(df,3p)'. The program allows to visualize the specific axes of orientation (Sx', Sy', Sz') and inertia (Ix', Iy', Iz') of a molecule. The validity of the structure (in accordance with the assignment of RQC(H-2)) is assessed by comparing the experimental values of RQCs (RQC(H-2)exp) and back-calculated (RQC(H-2)calc) from the alignment tensor by evaluating the Cornilescu quality factor, Q; the perfect agreement corresponding to a minimum Q value. The graphical representation of the main alignment and inertia tensors, as well as the determination of the '5D' angles between sensors, makes it possible to quantify the importance of steric interactions (shape recognition phenomenon) in the orientation and discrimination process.

To date, only RDCs(C-13 - H-1) and RCSAs(C-13) have been used in the structural elucidation of complex natural compounds and their configurational determination. One of the last analytical challenges in the field of structural analysis of natural molecules is the use of RQCs(H-2), without deuterium isotopic enrichment. The main interest to exploit the RQC(2H)s therefore lies in the amplitude of the values (in Hz) of the RQCs and the accuracy of the measurements associated with this observable, especially at the level of the CH<sub>2</sub> groups (ABX spin system).

In this thesis work, we will study the case of complex target polycyclic molecules whose configuration of stereogenic centers is already known. We are therefore considering the study of Strychnine, Brucine, Artemisinin and DHEA, for example to test the validity and robustness of the method. The first anisotropic NAD 2D spectra of Strychnine (70 mg) in PBLG are very encouraging. The experimental data will be processed with the MSpin-RQC program presented above. The relative configuration of the stereogenic centers will be assigned by applying the developed protocol, the idea being to generate structures whose configuration remains plausible (energetically speaking) and to compare the different stereoisomers with the anisotropic RQC(H-2) data measured in one or more orientating systems. In a second step, other natural products whose configuration has not yet been established will be studied, as well as the more complex case of small flexible molecules.

This thesis topic is intended for a graduate of a Master 2 (P or R) in chemistry (chemistry / spectroscopy) and/or a diploma in chemical engineering, but any (reasonable) application is welcome. The candidate should, above all, be motivated by NMR methodology, stereochemistry and related analytical applications. The recruited doctoral student will be in charge of all experimental developments in NMR and the analytical validation of methods developed on target molecules of interest.

## Thématique / Domaine / Contexte

---

Les cristaux liquides sont des milieux orientés fluides, dont les propriétés physico-chimiques sont particulièrement intéressantes en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). En effet, nous bénéficions à la fois de la fluidité des liquides et le potentiel analytique des observables anisotropes. En milieu orienté, un soluté acquiert un ordre orientationnel en moyenne. D'un point de vue mathématique, ses propriétés d'alignement par rapport à l'axe du champ magnétique  $B_0$  sont décrites à l'aide d'un tenseur de rang 2, appelé matrice d'ordre de Saupe, S. Dans ces conditions, il devient possible d'observer la partie anisotrope des interactions magnétiques comme les couplages dipolaires résiduels (RDCs), les couplages quadrupolaires résiduels (RQCs) pour les spins  $I > 1/2$  et l'anisotropie de déplacement chimique (RCSAs). De fait, les spectres de RMN obtenus dans un environnement orienté sont beaucoup plus informatifs (informations structurales, stéréochimiques, analyse de la chiralité, rapports isotopiques, ...) que les spectres RMN traditionnels

enregistrés en milieu isotrope (isotropes) qui, par définition, ne montrent aucune observable anisotrope (nulle en moyenne compte tenu du mouvement Brownien).

Si la présence de nouvelles observables RMN est un avantage majeur en termes d'information spectral, il n'en demeure pas moins que la richesse de la RMN anisotrope présente un « coût », notamment en termes d'analyse spectrale. Pour promouvoir cette RMN originale auprès de la communauté de tous les chimistes (bio/géo/chimistes), il est nécessaire de développer de nombreux/nouveaux outils spectroscopiques capables de mettre en valeur son potentiel analytique. Cet objectif est au coeur des activités de l'équipe LRMN de l'ICMMO.

\* Spectroscopie RMN multinucléaire / multidimensionnelle - Analyse et élucidation structurale moléculaire - Chiralité et stéréochimie - Comportement orientationnel

La détermination de la pureté énantiomérique (excès énantiomérique) est un défi permanent, tant en synthèse asymétrique qu'en chimie analytique. C'est aussi un enjeu de société majeur, compte tenu de la différence de bioactivités de deux isomères optiques et les conséquences sur la santé humaine. A cet enjeu est associé l'analyse structurale moléculaire.

Les développements à Orsay seront réalisés sur la plateforme RMN du laboratoire ICMMO, équipée de 6 spectromètres (dont un spectromètre 600 MHz équipé d'une cryosonde cryogénique deutérium (5 mm) sélective, unique au monde).

## Objectifs

---

Le but de cette Thèse (3 ans), à l'interface entre méthodologie RMN et chimie analytique, est de concevoir, développer et appliquer de nouveaux outils/protocoles de RMN (notamment en milieu orienté) utilisables dans l'analyse structurale de molécules d'intérêt (petite molécules chirales et produits naturels chiraux).

## Méthode

---

Les méthodes utilisées seront:

- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN H-1/ C-13/ H-2),
- Utilisation de phases cristal-liquides chirales lyotropes (hélicoïdales),
- RMN du deutérium en abondance naturelle anisotrope (DANA),
- Développements méthodologiques (acquisition/processing) et RMN multi-dimensionnelle,
- Applications/analyse de molécules cibles (substances chirales d'intérêts économiques ou pharmacologiques).

## Résultats attendus - Expected results

---

Les principaux résultats attendus sont :

- Nouvelle méthodes d'acquisition en RMN du deutérium anisotrope,
- Approches pour améliorer la sensibilité de la RMN DAN,
- Nouveaux outils innovants (informatique) dans l'élucidation structurale,
- Analyse / détermination structurale de produits naturels,
- Optimisation de différents mésophases lyotropes chirales de type hélicoïdal.

## Précisions sur l'encadrement - Details on the thesis supervision

---

Ce projet de recherche sera réalisé au sein du Laboratoire de Résonance Magnétique Nucléaire en Milieu Orienté (LRMN à l'ICMMO, UMR CNRS 8182, Bâtiment 410) à Orsay (Paris-Sud/Paris Saclay). Il sera dirigé par le Dr. Philippe Lesot (DR CNRS, INC) en collaboration avec les autres membres de l'équipe du LRMN. L'activité du doctorant au cours de la thèse sera suivie/évaluée au sein d'un comité de Thèse (CST) mandaté par l'ED 2MIB de Paris-Saclay.

## Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

---

Accès aux spectromètres RMN et autres appareillages analytiques (Masse, HPLC, GC, ...) de la plateforme instrumentale de l'ICMMO (UMR 8182).

Mise en oeuvre des conditions pour :

- la compréhension, l'appropriation du projet et la potentielle évolution du sujet,
- la maîtrise des outils et méthodes qu'il/elle devra s'approprier,
- le bien-être matériel et intellectuel,
- la préparation à la soutenance de thèse.

## Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...

---

Le travail de recherche du doctorant sera valorisé sous différentes formes :

- publications scientifiques dans des journaux internationaux à comité de lecture (peer review),
- communications par affiche ou par oral, et participation à des workshops, congrès, colloques, journée de l'école doctorale (JED), ....

Au cours des trois ans, le doctorat sera amené à encadrer des étudiants de Master.

Le sujet ne présentant pas de caractère confidentiel, les résultats pourront être publiés rapidement.

## Collaborations envisagées

---

Des collaborations à l'intérieur de l'institut (ICMMO) seront aussi envisagées, en fonction de l'état d'avancement du sujet et des opportunités de recherche (interdisciplinarité / axes transversaux).

## Ouverture Internationale

---

Plusieurs collaborations à l'international (déjà existantes) sont envisagées :

- Université de Darmstadt, Allemagne : Prof. M. Reggelin,
- Université de Carnegie Mellon, USA : Prof. R. Gil,
- Université de Recife, Brésil : Dr. A. Navarro-Vazquez.

## Références bibliographiques

---

\*Theoretical and Experimental Aspects of Enantiomeric Differentiation using Natural Abundance Multinuclear NMR Spectroscopy in Polypeptide Liquid Crystals

M. SARFATI, P. LESOT\*, D. MERLET, J. COURTIEU  
Chem. Commun., 2069-2081, (2000). (Feature article)  
DOI: 10.1039/B006244H

\*Natural Abundance Deuterium NMR Spectroscopy in Polypeptide Liquid Crystals as a New and Incisive Means for Enantiodifferentiation of Chiral Hydrocarbons

P. LESOT\*, M. SARFATI, J. COURTIEU  
Chem. Eur. J., 9, 1724-1745, (2003).  
DOI: 10.1002/chem.20039019

\*Empirical Determination of the absolute Configuration of Small Chiral Molecules using Natural Abundance <sup>2</sup>H NMR in Chiral Liquid Crystals

L. ZIANI, P. LESOT\*, A. MEDDOUR, J. COURTIEU  
Chem. Commun., 4737-4739, (2007).  
DOI: 10.1039/b711493a

\* Natural Abundance Deuterium NMR Spectroscopy: Developments and Analytical Applications in Liquids, Liquid Crystals and Solid Phases

P. LESOT, J. COURTIEU  
Prog. Nucl. Magn. Reson Spectrosc., 55, 128-159, (2009).  
DOI: 10.1016/j.pnmrs.2009.01.001

\* Experimental Detection of Achiral and Chiral Naturally Abundant <sup>13</sup>C-<sup>2</sup>H Isotopomers by 2D-NMR in Liquids and Chiral Oriented Solvents

P. LESOT\*, O. LAFON,  
Anal. Chem., 84, 4569-4573, (2012).  
DOI: dx.doi.org/10.1021/ac300667n

\* Enantiotopic Discrimination in the NMR Spectrum of Prochiral Solutes in Chiral Liquid Crystals

P. LESOT\*, C. AROULANDA, H. ZIMMERMANN, Z. LUZ  
Chem. Soc. Rev., 44, 230-275, (2015).  
DOI: 10.1039/c4cs00260a

\* Contribution of NAD 2D-NMR in Liquid Crystals to the Determination of Hydrogen isotope Profile of Methyl Groups in Miliacin

P. BERDAGUE, P. LESOT\*, J. JACOB, V.-J. TERWILLIGER, C. LE MILBEAU  
Geochim. Cosmochim. Acta, 173, 337-351, (2016).

DOI: 10.1016/j.gca.2015.10.004

\* Analytical Contribution of Deuterium 2D-NMR in Oriented Solvents to 2H/1H Isotopic Characterization: the Case of Vanillin  
T. TEXIER-BONNIOT, P. BERDAGUE, R. ROBINS, G. REMAUD, P. LESOT\*  
Flavour and Fragrance Journal, 34, 217-229, (2018).  
(Numéro spécial "Authentication of natural products")  
DOI:10.1002/ffj.3441

\* Integrated Computational Protocol for Analyzing Quadrupolar  
Splittings from Natural Abundance Deuterium NMR Spectra  
in (Chiral) Oriented Media  
A. NAVARRO-VAZQUEZ, P. BERDAGUE, P. LESOT\*  
Article, ChemPhysChem., 18, 1252-1266, (2017). (VIP paper)  
DOI: 10.1002/cphc.201601423

\* 2H and 13C NMR-based Enantiodetection using Polyacetylene versus Polypeptide Aligning Media: Versatile and Complementary Tools  
for Chemists  
P. LESOT\*, P. BERDAGUÉ, A. MEDDOUR, A. KREITER, M. NOLL, M. REGGELIN\*  
Article : ChemPluschem, 84, 144-153, (2019). (VIP paper)  
DOI : 10.1002/cplu.201800493.

## Complément sur le sujet

---

<https://www.icmmo.u-psud.fr/fr/perso/philippe-lesot/> (<https://www.icmmo.u-psud.fr/fr/perso/philippe-lesot/>)

Dernière mise à jour le 16 février 2019