



HAL
open science

**CONSTANTES DE COUPLAGE 13C-13C.
CONFORMATION DES ACIDES AMINÉS, DES
DIPEPTIDES ET TRIPEPTIDES**

Tran-Dinh Son, S. Femandjian

► **To cite this version:**

Tran-Dinh Son, S. Femandjian. CONSTANTES DE COUPLAGE 13C-13C. CONFORMATION DES ACIDES AMINÉS, DES DIPEPTIDES ET TRIPEPTIDES. Journal de Physique Colloques, 1973, 34 (C8), pp.C8-45-C8-48. 10.1051/jphyscol:1973816 . jpa-00215369

HAL Id: jpa-00215369

<https://hal.science/jpa-00215369>

Submitted on 4 Feb 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

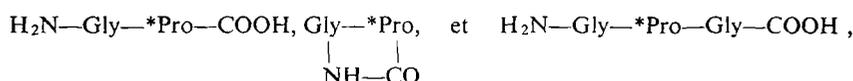
CONSTANTES DE COUPLAGE ¹³C-¹³C. CONFORMATION DES ACIDES AMINÉS, DES DIPEPTIDES ET TRIPEPTIDES

TRAN-DINH SON et S. FERMANDJIAN

Service de Biochimie, CEN Saclay, BP 2, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Résumé. — L'enrichissement à 85 % en carbone 13 de l'alanine, de la valine, de la leucine et de l'isoleucine a conduit à leur étude conformationnelle par la Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13. Dans ces conditions, les constantes de couplage ¹³C-¹³C ont pu être mesurées à différents pH. Elles rendent compte d'une part, des degrés d'ionisation et de protonation des groupements C-terminaux, et d'autre part mettent en évidence l'influence spatiale des groupements N et C-terminaux sur les chaînes latérales apolaires.

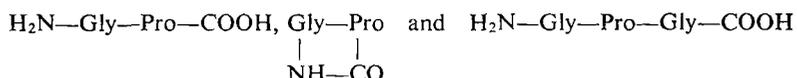
L'introduction d'un acide aminé enrichi dans les peptides peut servir à leur marquage. Ainsi l'étude de la série



par les mêmes techniques et méthodes met en évidence la présence du résidu prolyl sous ses deux formes *cis* et *trans* dans les peptides linéaires, alors que dans la dicétopiperazine seule la forme *cis* existe. Si l'influence du pH s'exerce sur les proportions des conformations *cis* et *trans* dans le cas du dipeptide linéaire, elle est faible dans le cas du tripeptide et nulle pour le dipeptide cyclique. Ces résultats ont été confirmés par ceux de la Résonance Magnétique du proton.

L'influence du pH a été également examinée sur les peptides Gly-^{*}Leu et Gly-^{*}Leu-Gly. Dans ces deux cas la présence de plusieurs conformères n'a pu être mise en évidence.

Abstract. — 85 % ¹³C-enriched alanine, valine, leucine, isoleucine and proline were studied with ¹³C-NMR technique in terms of conformation. The ¹³C-¹³C coupling constants were measured at several pH; these data were useful for, on one side to estimate the various degrees of ionisation or protonation of the C-terminal groupement, and on the other side to evidenced the spatial influence of the N- and C-terminal groups on the apolar side chains. The insertion of one ¹³C-enriched aminoacid in peptides such as



simplified their spectra and allowed us to determine the presence of two conformations (*cis* and *trans*) for the linear peptides, whereas in the case of the diketopiperazine only the *cis* form existed. Whether the pH effect modified the proportions of the prolyl *cis* and *trans* conformations in the case of the linear dipeptide, this effect is weak for the tripeptide and no for the cyclic dipeptide. All these results were confirmed with H-NMR technique. When the pH effect is examined on the Gly-^{*}Leu and Gly-^{*}Leu-Gly peptides, only one conformation was evidenced in the medium.

N. B. * signifie enrichissement en ¹³C.

1. Introduction. — Les travaux publiés ces dernières années ont montré l'utilité de la technique de Résonance Magnétique Nucléaire du ¹³C dans l'étude des molécules biologiques. En ce qui concerne les aminoacides, les principaux paramètres qui définissent les déplacements chimiques du ¹³C ont été établis par plusieurs auteurs [1]-[4], souvent en se basant sur les données de Grant *et al.* [5]. Toutefois les données relatives à la conformation des molécules en solution sont encore rares [4] bien que des travaux récents basés sur les déplacements chimiques [6], ont en particulier permis de détecter l'isomérisme *cis-*

trans de la proline dans une série de dipeptides [7]. Une étape supplémentaire sera franchie dans la connaissance de ce problème en utilisant des molécules renfermant comme marqueurs un ou plusieurs acides aminés enrichis en ¹³C. Toutefois une telle approche nécessite de bien connaître d'une part, les spectres des acides aminés enrichis en ¹³C et d'autre part leurs nouveaux paramètres physico-chimiques au sein de peptides modèles.

Dans ce papier nous reportons les résultats préliminaires d'une étude systématique menée sur les acides aminés enrichis à 85 % en ¹³C et sur les dipep-

tides et tripeptides sélectivement marqués à l'aide de ces acides aminés. Au taux d'enrichissement utilisé les constantes de couplage J_{C-C} qui n'apparaissent pas dans le cas des substances ^{13}C -abondance naturelle peuvent être mesurées à plusieurs niveaux des spectres soit de l'acide aminé libre soit du résidu aminoacyl enrichis en ^{13}C . Ces valeurs associées à celles des déplacements chimiques suivies en fonction du pH, sont discutées en termes de conformation dans les cas de la valine et du dipeptide Gly-Pro.

2. Résultats et discussion. — Constantes de couplage ^{13}C - ^{13}C dans les acides aminés enrichis en ^{13}C à 85 %.

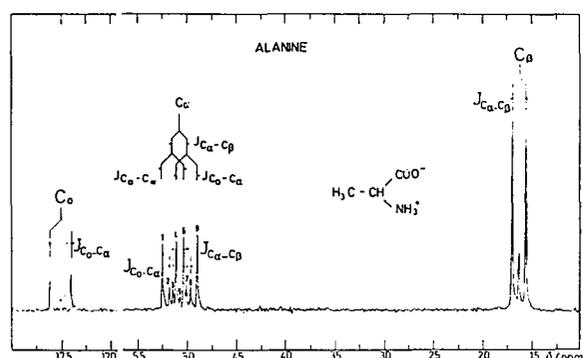


FIG. 1. — Spectre de RMN- ^{13}C de l'alanine enrichie à 85 % en ^{13}C obtenu à pH 7,6 à 30 °C.

Sur la figure 1 est représenté le spectre de RMN- ^{13}C de l'alanine obtenu à pH 7,6, à 30 °C. En première analyse le nombre de signaux relevé est plus grand que ce qui était prévisible. Ce phénomène en fait est à relier à la probabilité avec laquelle un ^{13}C regarde soit un ^{12}C soit un ^{13}C , celle-ci dépendant du taux d'enrichissement. En conséquence le spectre de l'alanine enrichie à 85 % en ^{13}C présente toutes les combinaisons possibles entre les différents sites ^{12}C et ^{13}C .

Sur le tableau sont montrées les constantes de couplage J_{C-C} des 4 acides aminés alanine, valine, leucine et isoleucine. On note que l'ordre de grandeur de $J_{C_0-C_\alpha}$ se situe entre 53 et 60 Hz alors que les autres constantes de couplage sont comprises entre 32 et 36 Hz. Lorsque le pH croît de 1 à 7, la valeur de $J_{C_0-C_\alpha}$ passe de 59,6 à 53,5 Hz ce qui est une variation semblable à celle constatée dans le cas de l'acide acétique [8] ; les autres constantes de couplage J_{C-C} varient peu (ex. : $\Delta J_{C_\alpha-C_\beta} \approx 1,2$ Hz). Enfin, le passage d'un acide aminé de l'état zwitterion à l'état anion se traduit par une faible variation de $J_{C_0-C_\alpha}$ (< 1 Hz).

3. Déplacements chimiques ^{13}C des acides aminés.

— Les déplacements chimiques des carbones de l'alanine et de la valine ont été suivis en fonction du pH. Les courbes obtenues sont représentées sur les figures 2 et 3. On constate d'une part que la courbe du δC_β de l'alanine reflète les deux pK (NH_3^+ et COO^-)

TABLEAU

Constantes de couplages J_{C-C} des acides aminés alanine, valine, leucine et isoleucine, relevées à plusieurs pH.

| Amino-acides | pH | $J_{C_0-C_\alpha}$ | $J_{C_\alpha-C_\beta}$ | $J_{C_\beta-C_{\gamma_1}}$ | $J_{C_\beta-C_{\gamma_2}}$ | $J_{C_\gamma-C_{\delta_1}}$ | $J_{C_\gamma-C_{\delta_2}}$ |
|--------------|------|--------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Alanine | 1,2 | 59,2 | 34,1 | | | | |
| | 6,4 | 54,1 | 34,9 | | | | |
| | 11,1 | 52,7 | 35,2 | | | | |
| Leucine | 1,1 | 59,5 | 32,9 | 31,7 | | 31,2 | 35,3 |
| | 6,5 | 53,6 | 34,3 | 31,3 | | 31,4 | 34,9 |
| | 11,2 | 52,6 | 34,6 | 31,7 | | 31,3 | 34,7 |
| Valine | 0,9 | 59,5 | 32,1 | 33,9 | | 34,6 | |
| | 6,9 | 53,5 | 33,2 | 33,2 | | 34,0 | |
| | 11,1 | 53,1 | 33,6 | 35,1 | | 35,2 | |
| Isoleucine | 1,0 | 59,0 | 32,5 | 34,5 | | 34,2 | |
| | 6,9 | 53,5 | 33,7 | 34,0 | | 34,4 | 35,2 |
| | 11,1 | 53,4 | 34,0 | 34,9 | | 34,1 | 35,1 |

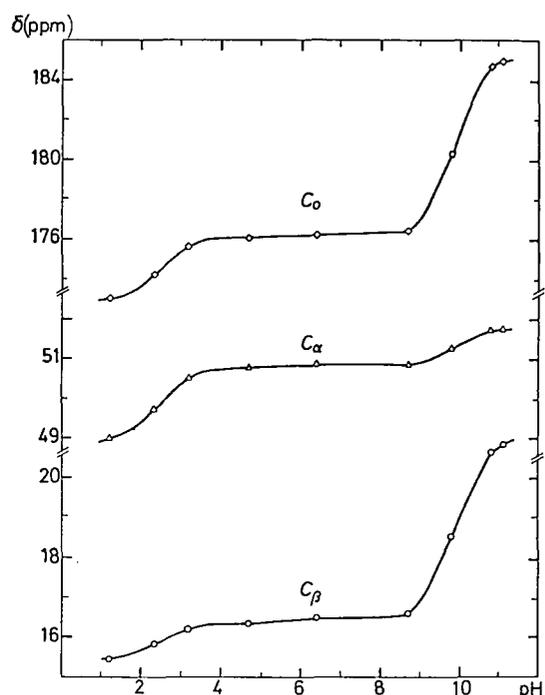


FIG. 2. — Courbes des déplacements chimiques ^{13}C des différents carbones de l'alanine en fonction du pH.

alors que celle du δC_β de la valine ne traduit que le pK du NH_3^+ . D'autre part, l'amplitude du déplacement chimique du C_β de l'alanine est supérieure à celle du δ du carbone correspondant de la valine. Enfin, lorsqu'on ajoute les courbes C_β et C_{γ_1} de ce dernier amino-

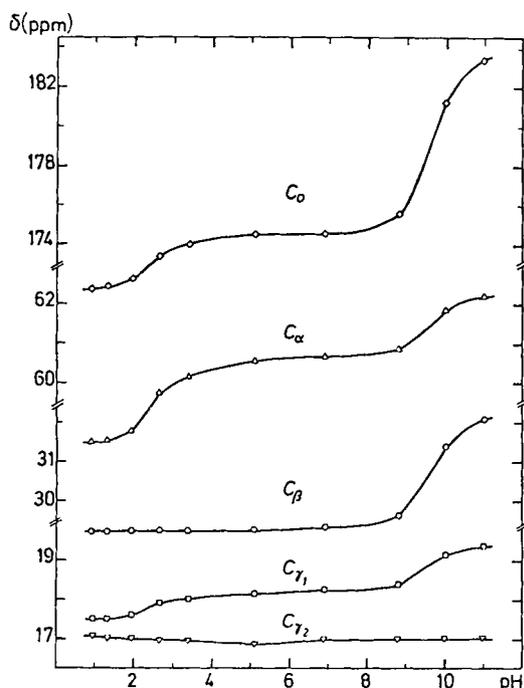
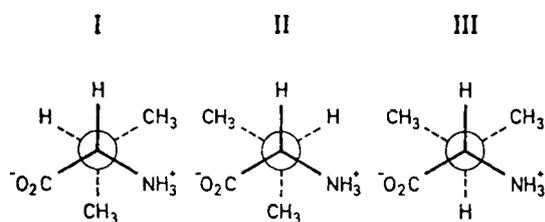


FIG. 3. — Courbes des déplacements chimiques ^{13}C des différents carbones de la valine en fonction du pH.

acide on retrouve la courbe C_β de l'alanine. Sur la figure 3 on peut également voir que le δC_{γ_1} de la valine décrit les pK des groupements NH_3^+ et COO^- , alors que celui du C_{γ_2} reste constant.

De l'ensemble de ces résultats on peut déduire que le groupement méthyle C_{γ_1} de la valine se situe spatialement dans la zone $\langle \text{NH}_3^+, \text{COO}^- \rangle$, comme l'indique les rotamères I et II.



4. Conformation du dipeptide L-Glycyl-L-Proline. — Parmi les peptides Gly-*Leu, Gly-*Leu-Gly, Gly-*Pro-Gly, Gly-Pro et Gly-*Pro qui ont été examinés nous avons choisi ce dernier pour illustrer l'intérêt du marquage à l'aide d'un acide aminé enrichi en ^{13}C . La figure 4 montre le spectre du résidu prolyl enrichi en ^{13}C constitutif du dipeptide Gly-Pro. Le principal phénomène observé est le dédoublement des signaux ^{13}C appartenant aux carbones de cet aminoacyl. La forme de ce spectre traduit donc l'existence de 2 conformations moléculaires dont les proportions dépendent de l'équilibre *cis-trans* du résidu prolyl. Quand le pH varie de 7 à 1, les modifications observées au niveau du spectre décrivent la conversion de l'une des formes moléculaires dans l'autre (les proportions évoluant de 40

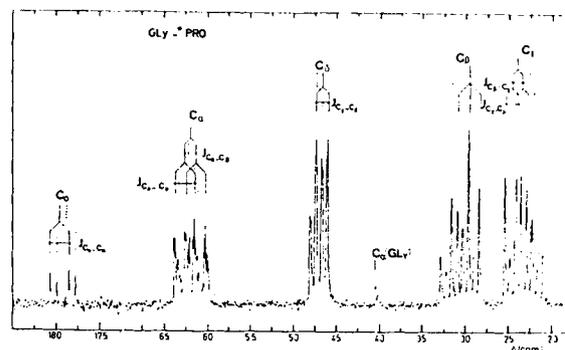


FIG. 4. — Spectre de RMN- ^{13}C du résidu prolyl enrichi à 85 % en ^{13}C dans le peptide L-Glycyl-L-proline, obtenu à pH neutre à 30 °C.

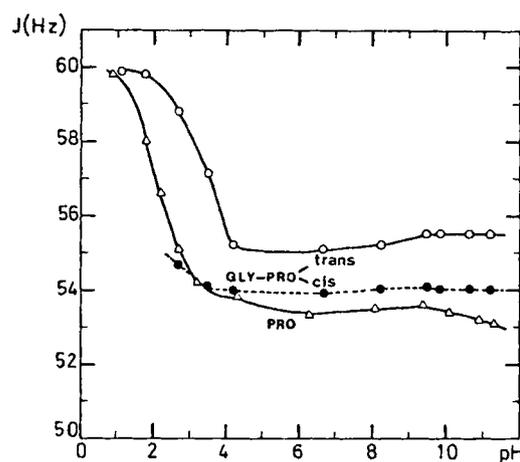


FIG. 5. — Constantes de couplage $J_{C_0-C_\alpha}$ de la L-*Proline et du résidu *prolyl dans le peptide L-Glycyl-L-Proline sous formes *trans* et *cis*, suivies en fonction du pH.

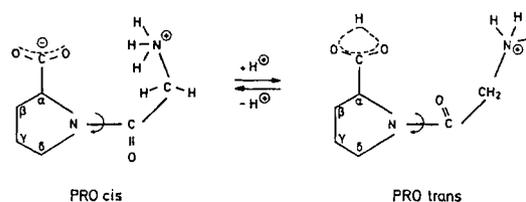


FIG. 6. — Conformères du dipeptide Gly-Pro.

à 15 % pour la première et consécutivement de 60 à 85 % pour la seconde). Parallèlement, on constate que $J_{C_0-C_\alpha}$ caractérisant la conformation dont la proportion croît varie en fonction du pH dans le même sens que $J_{C_0-C_\alpha}$ relevée dans le spectre de la proline, alors que $J_{C_0-C_\alpha}$ dans le cas de l'autre conformation reste pratiquement constant (Fig. 5). Cette différence de comportement met en évidence le rôle important de la protonation du groupe C-terminal dans le mécanisme de conversion. Ainsi lorsque le carboxylate de la forme « instable » capte un proton, sa transformation en groupe carboxylique induit le passage de l'ensemble de

la molécule vers la forme « *stable* ». Ceci explique la différence observée entre les $J_{C_0-C_\alpha}$ des deux espèces moléculaires, une seule reflétant la protonation du groupe C-terminal. Deux modèles moléculaires sont donc possibles dans le cas du dipeptide Gly—Pro, suivant que le résidu prolyl est sous forme *cis* (*instable*) ou sous forme *trans* (*stable*) (Fig. 6). L'existence de deux conformères pour Gly—Pro en solution est confirmée par les expériences de RMN du proton qui montrent que les 2 protons portés par le C_α du résidu

glycyl sont magnétiquement équivalents dans la forme *trans* et inéquivalents dans la forme *cis*.

5. **Remerciements.** — Les acides aminés enrichis en ^{13}C ont été obtenus par MM. Sala, Mermet et Cohen dans le Service de Biochimie de M. le Professeur Fromageot du CEN-Saclay. Nous les remercions ainsi que MM. Bricas et Savrda (Laboratoire des Peptides, Orsay) qui ont synthétisé les différents peptides examinés.

Bibliographie

- [1] HORSLEY, W. and STERNLICHT, H., *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968) 3738.
- [2] HORSLEY, W., STERNLICHT, H. and COHEN, J. S., *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 680.
- [3] GURD, F. R. N., LAWSON, P. J., COCHRAN, D. W. and WENKERT, E., *J. Biol. Chem.* **246** (1971) 3725.
- [4] CHRISTL, M. and ROBERTS, J. D., *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 4565.
- [5] GRANT, D. M. and PAUL, E. G., *J. Am. Chem. Soc.* **86** (1964) 2984.
- [6] OHNISHI, H., FEDARKO, M. C., BALDESWEILER, J. D. and JOHNSON, L. F., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46** (1972) 312.
- [7] THOMAS, W. A. and WILLIAMS, *Chem. Commun.* (1972) 994.
- [8] GRAY, G. A., ELLIS, P. D., TRAFICANTE, D. A. and MACIEL, G. E., *J. Magn. Resonance* **1** (1969) 41.