

UTILISATION DE L'EFFET OVERHAUSER, DES MESURES DE RELAXATION EN RMN ¹H ET DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES EN RMN ¹³C DANS L'ETUDE DE LA CONFORMATION DES AMIDES—II

APPLICATION A L'ETUDE CONFORMATIONNELLE D'AMIDES ALICYCLIQUES: ACYL-PROLINES

B. P. ROQUES*

Département de chimie, Ecole Polytechnique, 17, rue Descartes, 75230 Paris Cedex 05, France

S. COMBRISON*

Laboratoire de Recherches Organiques E.S.P.C.I. 10, rue Vauquelin, Paris V, France

et

R. WASYLISHEN†

Laboratory of Physical Biology, National Institute of Health, Bethesda, MD 20014, U.S.A.

(Received in France 15 July 1975; Received in the UK for publication 15 December 1975)

Resume—Les déplacements chimiques ¹H et ¹³C dans les deux rotamères décaoalésés de l'ester deutérométhyle de la N-acétyl-L-proline sont établis par utilisation de l'effet Overhauser et des mesures de relaxation. Ceci nécessite la détermination préalable de la barrière d'activation ΔG_‡ et des temps de relaxation T₁ du proton H_α dans les deux conformères. Les résultats obtenus permettent de confirmer de façon certaine les déterminations conformationnelles effectuées par RMN ¹³C dans une série de L-prolines et L-hydroxyprolines. L'introduction d'un groupement acylé n'affecte pas de façon identique les différents carbones du cycle dans les deux rotamères. Les différences de déplacements chimiques entre les formes cis et trans d'acylprolines sont considérablement diminuées sur les carbones α et δ par introduction d'un hétéroatome dans le groupement acyle. Le déplacement du groupement amino terminal de la position α (CO-CH₂-NH₂) à δ [CO-(CH₂)₂-NH₂], dans une série de dipeptides X-Pro a conduit à interpréter les différences de déplacements chimiques en termes d'effet de champ électrique.

Abstract—¹H and ¹³C chemical shifts in the two decoalesced rotamers of the deuteromethyl ester of N-acetyl-L-proline are established by use of NOE and relaxation measurements. This requires the previous determination of the rotational barrier ΔG_‡ and the measurement of the relaxation times T₁ of the α-proton in the two conformers. The observed results reinforce the previous structural conclusions inferred from ¹³C studies on several acyl L-prolines and hydroxy L-prolines. The introduction of an acyl group in the prolines does not affect the different carbon atoms of the cycle in the two rotamers in the same way. These results can be interpreted in terms of electric field effects by the examination of X-Pro dipeptides with the N-terminal amino group shifted from α (COCH₂NH₂) to δ position (COCH₂)₂NH₂.

Du fait de leur nature cyclique, la proline (L-Pro) et l'hydroxyproline (L-Hydro) occupent une place particulièrement importante parmi les aminoacides biologiques. On les retrouve en effet, aussi bien dans le collagène, dans les petits peptides hormonaux que dans les transporteurs d'ions (Gramicidine).

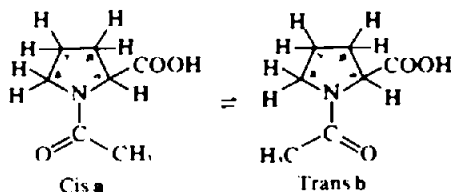
L'isomérisie cis⇌trans rencontrée dans les dérivés des L-Pro et L-Hydro a été longuement étudiée ces dernières années par RMN ¹H et ¹³C.¹

La barrière de rotation dans ces composés est suffisamment élevée pour permettre l'examen à température ordinaire des signaux décaoalésés correspondant aux rotamères cis et trans.

La N-acétyl proline (Ac-L-Pro) est un modèle d'amide cyclique saturé, permettant de tester les critères d'attribution des conformères dans ce type de composés.

A ce propos, il est nécessaire de rappeler que toutes les études conformationnelles en ¹³C^{2,3} sont basées sur des attributions effectuées en RMN ¹H. Celles-ci reposent sur l'hypothèse que le proton H_α est déblindé dans la forme cis, par rapport à sa position dans la forme trans.⁴

Nous avons montré précédemment⁴ qu'il n'existait pas de règle absolue dans l'utilisation des effets de champ du carbonyle, ce qui est confirmé expérimentalement par l'étude de la N-acyl L-proline dans différents solvants:⁵ ainsi, dans CDCl₃ à température ordinaire, on trouve pour tous les dérivés, deux signaux distincts correspondant à H_α, situés respectivement à 4.37 ppm (25%) et 4.50 ppm (75%), alors que dans le DMSO d₆, les mêmes protons H_α



* Adresse actuelle: Dept. of Chemistry, University of Winnipeg, Winnipeg, Canada R3B 2E9.

résonnent à 4.43 ppm (25%) et 4.15 ppm (75%)! De même, en RMN ^{13}C , la distinction entre les rotamères *cis* et *trans* des dérivés de la proline n'est pas toujours dépourvue d'ambiguïté, particulièrement sur les carbones C_α et C_β .

Nous avons donc étudié comme précédemment l'ester deutérométhyle de la N-acétyl L-proline en utilisant l'effet Overhauser afin d'établir la structure des conformères minoritaire et majoritaire et pouvoir discuter ensuite des résultats des spectres de protons et carbone 13 d'une série de L-Pro et L-Hydro acylées.

Ceci nous conduira à proposer une explication en termes d'effet de champ électrique des écarts observés dans les glissements chimiques internes $\Delta\delta'$ sur les carbones C_α et C_β entre les formes *cis* et *trans* d'acyl-prolines.

Resultats de l'étude des spectres RMN ^1H

Le spectre de l'ester deutérométhyle de la N-acétyl L-proline dans l'acétone d_6 , à température ordinaire montre que les signaux correspondant au proton H_α et au groupement acétyle, dans les deux rotamères, sont bien séparés. Toutefois, le pic du méthyle majoritaire se superpose au massif des $\text{CH}_2-\beta$ et γ .

Détermination des barrières de rotation, des temps de vie des conformères et des temps de relaxation. Les températures de coalescence t_c et les enthalpies libres d'activation ΔG_c^\ddagger ont été déterminées dans deux solvants (D_2O et $\text{DMSO } d_6$), par étude de la variation des largeurs de raie du méthyle majoritaire ($\Delta\nu = F(t)$). Dans D_2O , le passage à l'équilibre rapide s'effectue à une température supérieure à 100°C et la valeur de t_c a été extrapolée à partir de la courbe $\Delta\nu = F(t)$. Les températures de coalescence et les enthalpies libres d'activation dans le $\text{DMSO } d_6$ et D_2O ont respectivement: $t_c = 85^\circ\text{C}$ et 108°C , $\Delta G_c^\ddagger = 19.2$ et 20.6 kcal/mole.

Les temps de relaxation longitudinale T_1 des protons H_α , dans les deux conformères, ont été mesurés à 220 MHz par la méthode d'inversion retour, à trois températures. Les temps de vie moyen τ ont été calculés à partir de l'équation d'Eyring aux mêmes températures, en utilisant ΔG_c^\ddagger mesuré dans le DMSO , solvant proche de l'acétone (Tableau 1).

Tableau 1. Effet Overhauser observé sur les signaux H_α par irradiation des signaux du CH_3 , temps de vie moyen τ des rotamères (en sec) et temps de relaxation longitudinale T_1 du proton H_α (en sec).

Signal obs.	t°	Signal irradié		τ	T_1
		CH_3 , min.	CH_3 , Maj.		
H_α min.	+30	17%	15%	18	18
H_α min.	-3	11%	6%	485	10
H_α min.	-20	14%	0%	13 10'	7.5
H_α Maj.	+30	10%	12%	18	23
H_α Maj.	-3	0%	9%	485	15
H_α Maj.	-20%	0%	7%	13 10'	10

Mesures d'effet Overhauser. Les résultats des mesures d'effet Overhauser, aux trois températures choisies précédemment, sont répertoriés dans le Tableau 1. A chaque température on a mesuré l'augmentation des signaux de H_α dans les deux formes *a* et *b*, résultant de l'irradiation de chacun des méthyles. Comme nous l'avons déjà signalé, le pic de CH_3 majoritaire se superpose au massif des $\text{CH}_2-\beta$ et γ . Nous avons utilisé la puissance minimum nécessaire pour saturer par irradiation ce CH_3 . On ne peut, toutefois, pas exclure totalement une légère saturation du $\text{CH}_2-\beta$ qui peut contribuer, mais pour une faible part, à l'augmentation Overhauser mesurée sur les signaux de H_α .

Résultat des études ^{13}C . A partir de la détermination des rotamères *cis* et *trans* de l'ester deutérométhyle de la N-acétyl proline en RMN ^1H , on peut attribuer les signaux correspondants en RMN ^{13}C .

On constate, en accord avec de nombreuses études antérieures,^{12,16} que les carbones du cycle placés du côté de carbonyle (C_α dans le rotamère *trans a*, C_β dans le rotamère *cis b*) sont blindés par rapport aux carbones placés du côté du substituant R (C_α dans *a*, C_β dans *b*). Afin d'étudier plus en détail l'origine de cet effet nous avons répertorié dans le Tableau 2, les déplacements chimiques δ et les différences de déplacements chimiques $\Delta\delta'$ entre les rotamères *cis* et *trans* dans une série de L-prolines et L-Hydroxyprolines substituées à l'azote.

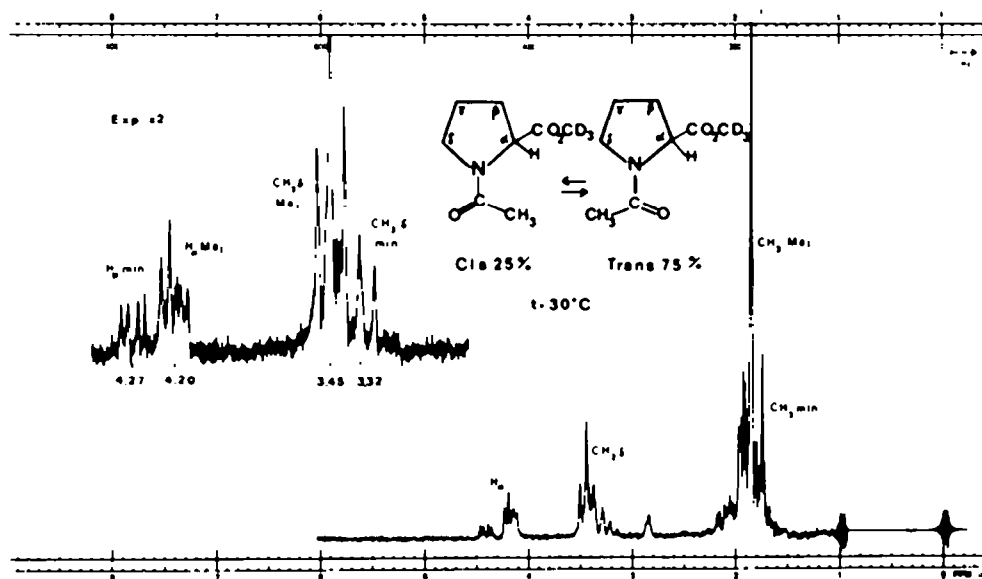


Fig. 1. Spectre de l'ester deutérométhyle de la N-acétyl L-proline dans l'acétone d_6 à température ordinaire.

Tableau 2. Déplacements chimiques (δ ppm par rapport au TMS) et différences de déplacements chimiques $\Delta\delta_c$ entre isomère cis et trans de prolines substituées (solutions dans D₂O).

cis

trans

R	R'	δ_c	$\Delta\delta_c^{\dagger}$	δ_n	$\Delta\delta_n^{\dagger}$	δ_s	$\Delta\delta_s^{\dagger}$	δ_a	$\Delta\delta_a^{\dagger}$
CH ₃	H	c 61.5	1.8	31.6	1.5	23.2	-1.8	47.5	1.7
		t 59.7		30.1		25.0		49.2	
-p C ₆ H ₄ Cl [†]	H	c 61.3	2.0	31.5	2.1	22.7	-2.7	46.7	3.3
		t 59.3		29.4		25.4		50.0	
-OCH ₂ C ₆ H ₅ [†]	H	c 59.6	0.6	30.9	1.6	23.5	-0.8	46.8	0.00
		t 59.0		29.3		24.3		46.8	
CH-NH ₂ (5)	H	c 65.0	0.00	34.4	2.1	25.1	-2.5	50.4	+0.1
		t 65.0		32.3		27.6		50.3	
-CH ₂ -NH ₂ (8)	H	c 61.6	-0.4	31.6	1.9	22.4	-1.7	47.3	+0.6
		t 62.0		29.7		24.1		46.7	
-CN ₂ -CN ₂ NH ₂	H	c 63.7	0.8	32.7	1.7	23.8	-1.7	48.2	-0.6
		t 62.9		31.0		25.5		48.8	
-(CH ₂) ₄ -NH ₂	H	c 64.1	1.5	§	§	§	§	48.7	0.9
		t 62.6		§		49.6			
-CH ₃	OH [‡]	c 59.8	1.4	39.3	1.5	69.0	-1.4	54.6	-1.8
		t 58.4		37.8		70.4		56.4	
-OCH ₂ C ₆ H ₅	OH [‡]	c 58.7	0.00	39.0	0.70	69.7	-0.6	55.2	0.0
		t 58.7		38.3		70.3		55.2	
-l-Pro	OH [‡]	c 61.4	-0.4	40.6	2.2	68.9	-1.7	56.8	0.0
		t 61.8		38.4		70.6		56.0	

†Sol. dans CDCl₃.

‡Trans.

§La présence des carbones de la chaîne ne permet pas d'attribution certaine.

DISCUSSION

La synthèse d'un ester deutérométhyle de la N-acétyl L-proline a permis de supprimer le signal du OCH₃, qui apparaissait dans la même région que H_a, mais son principal intérêt est de minimiser la relaxation intramoléculaire entre H_a et le proton (acide) ou le groupe de protons (ester) portés par le carbonyle. Dans ces conditions, le proton H_a est relaxé principalement dans la conformation cis, par le groupement CH₃ de l'acétyle et le CH₂- β , et dans la conformation trans, par le CH₂- β uniquement. La relaxation du proton H_a est dominée par le terme d'interaction dipolaire qui varie avec la distance entre les protons concernés. En solution diluée et dégazée, la relaxation intramoléculaire devient prépondérante et si l'on admet, ce qui est logique, que le temps de corrélation τ_c est identique dans les deux rotamères, on s'attend à une différence notable des T₁ de H_a dans les deux conformères et à la présence d'un effet Overhauser entre CH₃ et H_a uniquement dans la structure cis. Comme nous l'avons montré précédemment,⁴ une telle étude exige la connaissance des zones d'échange dans lesquelles s'effectuent les mesures.

Celles-ci sont déterminées par application de la relation d'Eyring à partir des enthalpies d'activation ΔG_c^\ddagger mesurées à la température de coalescence t_c . On remarquera l'augmentation sensible (~1 kcal/mole) de la barrière de rotation dans l'eau, en accord avec l'existence de liaisons hydrogène, entre le solvant et le carbonyle amidique, ce qui accroît la délocalisation du doublet de l'azote cyclique et par conséquent le caractère π de la liaison OC = N.

Du fait de la ressemblance entre leur caractère polaire, la valeur ΔG_c^\ddagger déterminée dans le DMSO d_6 a été utilisée pour interpréter les mesures de T₁ et NOE effectuées dans l'acétone. A température ordinaire, le temps de vie moyen τ est de l'ordre des T₁ des protons H_a dans les deux rotamères. Il existe donc un transfert d'aimantation pratiquement total et on mesure un accroissement de 17% et 15% sur H_a minoritaire par irradiation des méthyles minoritaire et majoritaire respectivement. Dans les mêmes conditions, on obtient sur H_a majoritaire respectivement 10% et 12%. On remarque cependant qu'à cette température, H_a minoritaire possède un T₁ (18s) plus court que le T₁ de H_a majoritaire (23s) ce qui semble indiquer une structure cis pour le rotamère minoritaire.

A -20°C, le temps de vie moyen τ est suffisamment grand devant le T₁ des H_a dans les deux rotamères pour permettre un effet Overhauser sélectif. Dans ces conditions, l'irradiation du CH₃ minoritaire conduit à une augmentation de 14% du signal de H_a minoritaire alors qu'elle laisse inchangé le pic de H_a majoritaire. L'augmentation inattendue de 7% observée sur H_a majoritaire, par irradiation du CH₃ majoritaire n'est pas due à un transfert d'aimantation, mais à la saturation des protons du CH₂- β dans le conformère majoritaire qui se trouvent en partie recouverts par le signal du CH₃ majoritaire.

Les résultats obtenus prouvent de façon certaine que le rotamère minoritaire possède la structure cis, en accord avec les déterminations antérieures.

Notons qu'à -20°C, les mesures de T₁ permettent également de conclure dans le même sens. En particulier

le rapport $T_{1\text{rot}}/T_{1\text{rot}}$ augmente sensiblement quand la température baisse, bien que les valeurs absolues aient diminué. Ainsi l'abaissement de la température conduit à une augmentation du temps de corrélation τ_c de la molécule se traduisant par une diminution rapide des T_1 dans les deux rotamères. La dépendance thermique aiguë des T_1 rend donc leur utilisation en analyse conformationnelle assez délicate. Par contre, une telle diminution des T_1 est favorable à l'accès au domaine d'échange lent ($\tau \gg T_1$) et à l'apparition d'un effet Overhauser sélectif.

Dans le cas de la N-acétyl-L-proline, l'effet de champ du carbonyle est donc ressenti de façon paramagnétique dans l'axe du carbonyle et diamagnétique dans une zone latérale.

Cet effet du carbonyle est en accord avec celui trouvé dans le N-acétyl nitro-3 pyrrole, mais en opposition avec celui trouvé dans les N-acétyl pyrrole, N-formyl et N-acétyl indolines et tétrahydroquinoléines.

Cette difficulté d'utilisation des effets de champ du carbonyle en RMN ^1H a fait préférer, dans les prolines, les études en RMN ^{13}C .

En effet de nombreux auteurs¹⁶ ont constaté une très nette différence entre les déplacements chimiques des carbones du cycle dans les isomères cis et trans de diverses N-acyl prolines. Toutefois comme l'ont indiqué récemment Torchia *et al.*,¹⁷ ces différences $\Delta\delta_c$ sont beaucoup plus faibles sur les carbones α et δ lorsque le substituant R n'est plus un groupement alcoyle simple (L-Ala-L-Pro par rapport à Ac-L-Pro) (Tableau 2). Aucune explication satisfaisante n'a été donnée à ce phénomène.¹⁸

Les écarts $\Delta\delta_c$ sur un carbone i d'un dérivé de la proline peuvent provenir d'effets électroniques, électriques ou stériques dus à des changements de conformation de la chaîne, du cycle pyrrolidine, ou du carbonyle de la fonction acide. Grâce à la synthèse d'un certain nombre de modèles nous avons tenté d'estimer ces différentes contributions.

Il semble que l'on puisse exclure un effet stérique prépondérant résultant de l'encombrement du substituant R. Dans ce cas en effet, les $\Delta\delta_c$ en α et δ pour R = p-C₆H₄Cl devraient être fortement modifiés par rapport à leur valeur pour R = CH₃, ce qui n'est pas le cas.

Bien que nous ayons montré l'existence d'un changement de conformation du cycle de la proline dû à l'isomérisation cis-trans autour de la liaison C-N, il ne semble pas qu'un tel phénomène puisse rendre compte des effets remarquables observés. En effet, comme l'avait déjà signalé Torchia,¹⁷ le cycle pyrrolidine adopte sans doute des conformations différentes dans la série des composés étudiés. Mais, dans ces conditions, les écarts $\Delta\delta_c$ devraient être perturbés de façon encore plus importante sur les carbones β et γ , directement concernés par les modifications de conformation. On peut toutefois noter que Fosssel⁹ a récemment montré par des mesures de T_1 des carbones du cycle dans les deux conformères de Gly-L-Pro une différence de mobilité importante du carbone C₂.

On remarque d'autre part que l'état d'ionisation du carbonyle ne semble jouer aucun rôle dans les différences $\Delta\delta_c$ en α et δ puisque celles-ci sont pratiquement identiques dans Ac-L-Pro (α : 1.76; δ : -1.68) et l'ester éthylique de Ac-L-Pro (α : 1.64; δ : -1.75). Ce résultat est confirmé par la faible variation en fonction du pH des écarts $\Delta\delta_c$ sur les carbones du cycle pyrrolidine dans Gly-L-Pro ou β -Ala-L-Pro.

Si l'on admet que les effets inducteurs et mésomères

des groupements COR sont du même ordre dans les deux rotamères d'acyl-prolines, on peut alors penser que les valeurs $\Delta\delta_c$ reflètent en partie des effets de champ électrique dus aux orientations respectives des dipôles des carbonyles amidique et carboxylique. Ellenberger *et al.*¹⁹ ont récemment mis en évidence des orientations différentes du groupement amide (CONH₂) dans les deux rotamères de l'acétyl-L-prolinamide.

Cependant le fait que l'écart $\Delta\delta_c$ en α et δ soit minimisé dans les dérivés portant dans la chaîne R un hétéroatome nous a fait soupçonner le rôle prépondérant de l'effet de champ électrique de ce dernier.

Afin de tester cette hypothèse nous avons synthétisé les β -Ala-L-Pro et N (amino-5 valéryl) L-Pro afin d'éloigner l'hétéroatome des carbones α et δ . Les deux composés montrent l'isomérisation cis-trans habituelle, et, comme prévu l'écart $\Delta\delta_c$ en α grandit au fur et à mesure que le CH₂-N terminal s'éloigne, pour retrouver dans la N (amino-5 valéryl) L-Pro une valeur proche de celle de Ac-L-Pro.

En conclusion, on peut penser que différents facteurs interviennent sur les différences $\Delta\delta_c$ des carbones du cycle des acylprolines, mais que le rôle primordial est joué par la chaîne latérale R.

On peut remarquer que la constance des écarts $\Delta\delta_c$ en β et γ , permettant d'effectuer de façon relativement sûre l'attribution des rotamères cis et trans dans les prolines ou les peptides contenant ces aminoacides, n'est pas transposable aux acylpyrrolidines ni aux tétrahydroquinoléines.⁴ En effet dans ces dérivés les écarts $\Delta\delta_c$ sur les carbones β (ou 2) de formyl-indoline, β (ou 2) et γ (ou 3) des formyl et acétyl-tétrahydroquinoléines sont pratiquement nuls.

Ceci montre que le comportement des carbones du cycle de la pyrrolidine dans les prolines est très particulier et que par conséquent il est nécessaire d'être prudent dans la transposition des résultats de cette série à d'autres.

PARTIE EXPERIMENTALE

L'ester deutérométhyle de la L-proline a été préparé par action du deutérométhanol chlorhydrique sur l'acétyl-L-proline, l'ester éthylique de la L-proline par action de l'éthanol dans les mêmes conditions.

La N-p-chlorobenzoyl-L-proline a été obtenue par action du chlorure de p-chlorobenzoyle sur l'ester méthyle de la L-proline, en présence de triéthylamine dans CH₂Cl₂, suivie d'une saponification par la soude aqueuse. Les Z-L-hydroxy proline sont des produits FLUKA.

Les synthèses des L-Pro-L-Hypro, β -Ala-L-Pro et N(amino-5 valéryl) L-proline, ont été effectuées par condensation directe des chlorures d'acides correspondants sur les L-proline ou L-hydroxyproline en milieu alcalin et seront décrites en détail ultérieurement.

Les expériences de RMN ont été effectuées à l'aide des appareils Varian HA 100, XL 100, et CFT 20. Seules les mesures de T_1 ont été faites à 220 MHz sur un appareil Varian HR 220. Dans le cas de l'ester deutérométhyle de la proline nous avons vérifié que les pourcentages d'effet Overhauser, mesurés en onde continue sur un appareil Varian HA 100 et ceux obtenus sur le même échantillon en enregistrant par impulsions et transformée de Fourier à l'aide du XL 100, étaient bien identiques, aux erreurs d'expérience près. Par précaution cependant, les durées des impulsions ont été choisies très faibles (3 μ s) correspondant à un angle de 10° environ.

Remerciements-Nous sommes très reconnaissants à Mesdames Fournie-Zaluski et Garbay-Jaureguiberry pour la détermination des paramètres d'activation des acétyl prolines et à Monsieur Oberlin pour la synthèse des modèles.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹O. Oster, E. Breitmaier et W. Voelter, *NMR Spectroscopy of Nuclei other than Protons*. Ed. T. Axendrod and G. Webb, Wiley-Interscience, New York (1974); R. Deslauriers et I.C.P. Smith. *Topics in ¹³C NMR Spectroscopy* Vol. 2 ed. G. C. Levy Wiley-Interscience, New York (1975) (communication personnelle des auteurs).
- ²W. A. Thomas et M. K. Williams, *J. C. S. Chem. Comm.* **994** (1972).
- ³H. Nishihara, K. Nishihara, T. Uefuji et N. Sakota. *Bull. Chem. Soc. Japan* **48**, 553 (1975).
- ⁴S. Combrisson et B. P. Roques, *Tétrahédon*, article précédent.
- ⁵D. A. Torchia, J. R. L. yerla et C. M. Deber, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 5009 (1974).
- ⁶D. E. Dorman et F. A. Bovey, *J. Org. Chem.* **38**, 2379 (1973).
- ⁷T. Prange, C. Garbay-Jaureguiberry, B. Roques et M. Anteunis, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **61**, 104 (1974).
- ⁸E. T. Fossel, K. R. K. Easwaran et E. R. Blout, *Biopolymers* **14**, 927 (1975).
- ⁹L. Pogliani, M. Ellenberger et J. Valat, *J. Org. Magn. Res.* **7**, 61 (1975).
- ¹⁰L. Pogliani et M. Ellenberger, *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 1621 (1974).