

# Paysage conformationnel de petites chaînes peptidiques

## Étude par spectroscopie laser de double résonance IR/UV

Michel Mons, François Piuzzi et Iliana Dimicoli

### Résumé

Laisser se replier de petites chaînes peptiques en phase gazeuse sous l'action de leurs propres interactions intramoléculaires est un moyen efficace de caractériser les régions du paysage conformationnel pertinentes pour leur dynamique. C'est ce que réalisent les physico-chimistes de la phase gazeuse en désorbant des petits peptides par laser, les portant ainsi à haute température dans un état désordonné « dénaturé », puis en les refroidissant dans une détente supersonique. Le repliement est alors analysé *a posteriori* avec toute la précision des spectroscopies laser les plus modernes (technique de double résonance IR/UV) permettant, en croisant les informations spectroscopiques électroniques et vibrationnelles, de remonter à la structure des minima locaux du paysage conformationnel balayé, notamment en ce qui concerne le réseau de liaisons hydrogène intramoléculaire. Ainsi des structures secondaires typiques comme les coudes  $\beta$  et les hélices  $3_{10}$  des protéines ont pu être isolées et caractérisées avec une précision bien meilleure qu'en phase condensée, permettant de mettre à jour les interactions en jeu dans le repliement.

### Mots-clés

**Analyse conformationnelle, peptides, spectroscopie infrarouge, ultraviolette, laser, de double résonance, désorption par laser, expansion supersonique.**

### Abstract

**Conformational landscape of short peptide chains: double resonance IR/UV laser spectroscopic studies**

Enabling short peptide chains to fold spontaneously in the gas phase under the action of intramolecular forces is an efficient way to characterize the regions of their conformational landscape, that are pertinent for their dynamics. This kind of experiment can be done by gas phase physical chemists: short peptide chains are first desorbed using a laser, which leaves the molecules in a high temperature disordered "denatured" state. They are then gently cooled down in a supersonic expansion. The obtained folded structures are eventually analysed *a posteriori* with the precision achieved by the most modern laser spectroscopic techniques (namely double resonance IR/UV technique). By combining electronic and vibrational information on the observed conformations, one determines the structure of the local minima of the explored conformational landscape, especially their H-bonding network. Thus, typical secondary structures like  $\beta$  turns or  $3_{10}$  helices have been isolated and characterised with a much better precision than in the condensed phase, unravelling the intramolecular interactions playing a major role in chain folding.

### Keywords

**Conformational analysis, peptides, infrared and ultraviolet spectroscopy, laser, double resonance spectroscopy, laser desorption, supersonic expansion.**

La modélisation des protéines repose sur des modèles de dynamique moléculaire ne permettant encore que très difficilement la simulation du repliement d'une protéine de taille moyenne. L'amélioration de ces modèles passe par la nécessité d'affiner les paramètres ajustables dont ils dépendent. Ceux-ci sont très souvent déterminés par comparaison avec des calculs quantiques de haut niveau sur des composés tests. Il n'existe cependant pas ou peu de données expérimentales fiables susceptibles de valider ces calculs quantiques. C'est la raison pour laquelle les techniques expérimentales susceptibles d'apporter des informations directes sur le paysage conformationnel et énergétique des systèmes complexes et flexibles que sont les biomolécules, et les peptides en particulier, sont particulièrement prisées par les théoriciens.

Face à cette demande, les expériences de spectroscopie de biomolécules en phase gazeuse offrent un accès qualitatif rapide aux interactions contrôlant la structure des molécules

flexibles ou de leurs complexes. Menées en phase gazeuse, elles proposent un véritable équivalent expérimental de la recherche des minima les plus profonds sur la surface de potentiel du système que mènent les théoriciens. Ce domaine récent est extrêmement actif et a vu apparaître les premières études par spectroscopies laser des briques élémentaires des systèmes biologiques que sont les bases de l'ADN, les acides aminés ou les sucres [1-3]. Ces études expérimentales, sur des systèmes pourtant relativement simples, ont immédiatement mis en évidence les déficiences des outils de modélisation et ont largement contribué au questionnement en ce domaine en proposant aux théoriciens des critères de validation hautement pertinents.

Le présent article se veut une illustration de la puissance de ces techniques émergentes [4] mises en œuvre ici pour la caractérisation fine des interactions intramoléculaires, notamment les liaisons hydrogène, qui charpentent les structures secondaires des peptides et des protéines [5].

## Des modèles de chaîne peptidique

Les petits peptides dont les extrémités sont protégées chimiquement sont d'excellents modèles de chaîne peptidique, puisqu'ils s'affranchissent des effets de bord dus à la présence des extrémités amino et acide des peptides naturels. Leurs conformations les plus stables reflètent donc les préférences conformationnelles intrinsèques de la chaîne peptidique. Des petits peptides ne présentant qu'un seul résidu d'acide aminé seront donc aptes à révéler les préférences locales de la chaîne. Les chaînes plus longues pourront en revanche illustrer la compétition entre, d'une part la succession des préférences locales le long de la chaîne, et d'autre part des structures secondaires, à l'arrangement tridimensionnel, permettant le repliement de la chaîne. Ces différentes structures sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre groupements NH et CO plus ou moins distants le long de la chaîne (figure 1) et identifiées selon le nombre d'atomes présents dans le cycle formé par la liaison hydrogène : C<sub>5</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>10</sub> ou encore C<sub>13</sub>. Les deux premières sont responsables des préférences locales de la chaîne alors que les dernières sont importantes sur le plan biologique car impliquées dans la stabilité des structures secondaires comme les hélices  $\alpha$  ou encore les coudes  $\beta$  [6]. C'est la compétition entre ces différentes formes que vise à caractériser la spectroscopie en phase gazeuse.

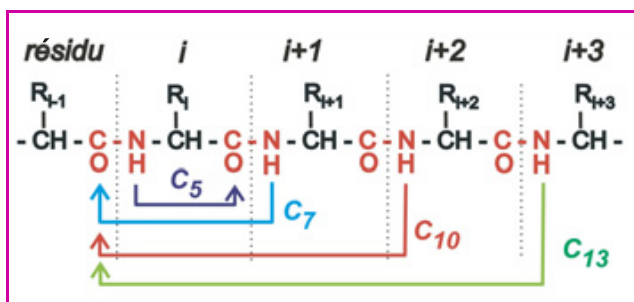


Figure 1 - Interactions possibles entre sites NH et CO d'un squelette peptidique.

### Comment ça marche ?

La stratégie expérimentale mise en œuvre (figure 2) pour trouver les conformations les plus stables de ces chaînes est d'abord de les mettre en phase gazeuse en utilisant la technique de vaporisation douce de désorption laser [7] qui, partant d'une matrice de poudre de graphite renfermant des grains de poudre de l'échantillon à étudier, consiste à vaporiser la matrice, ce qui entraîne la mise en phase gazeuse de molécules de l'échantillon en limitant leur échauffement et donc leur pyrolyse. Les molécules ainsi libérées sont ensuite entraînées par un jet de gaz rare se détendant dans le vide. La détente supersonique ainsi formée conduit à un excellent refroidissement rovibrationnel des molécules peptidiques par collision avec les molécules du gaz. Il s'accompagne aussi d'une relaxation conformationnelle très efficace, qui condense toute la population dans les conformères les plus stables. Les espèces ainsi préparées peuvent ensuite être caractérisées par spectroscopie optique UV et IR. L'excellent refroidissement obtenu en phase gazeuse permet de séparer

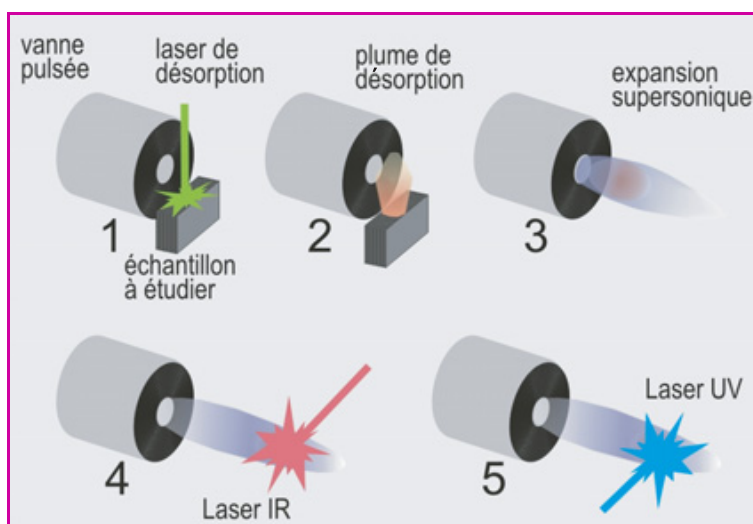


Figure 2 - Les différentes étapes de l'expérience de spectroscopie IR/UV.

aisément les contributions des différents conformères et de résoudre les spectres vibrationnels, ce qui n'est pas possible en solution à cause des élargissements spectraux dus au solvant et à l'agitation thermique. Ce point est illustré figure 3, où pour le dipeptide présenté, seuls deux des conformères les plus stables (notés A et B) sont observés dans la détente supersonique parmi les nombreuses dizaines de conformations possibles existantes [5, 8-9].

### Spectroscopie IR et liaison hydrogène

L'une des grandes forces de l'approche en phase gazeuse réside dans la possibilité de caractériser par spectroscopie IR les différents conformères présents dans le jet. La technique utilisée à ces fins est une technique dite de double résonance IR/UV, héritée de l'arsenal de spectroscopie fine développée pour l'étude des atomes, des molécules ou des agrégats (voir encadré). Le domaine IR de choix pour l'étude des peptides est la spectroscopie d'élongation des liaisons NH des liaisons peptidiques autour de 3  $\mu\text{m}$ . Les modes sont très peu couplés entre eux et apportent donc une information locale concernant leur environnement, notamment la présence d'interactions intramoléculaires révélées par un déplacement spectral vers le rouge, par rapport à des liaisons NH non perturbées, dont la fréquence se situe autour de 3 480  $\text{cm}^{-1}$ . Des bandes plus rouges que 3 400  $\text{cm}^{-1}$  (figure 3) signifieront sans ambiguïté la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires (C<sub>7</sub> ou C<sub>10</sub>). Des déplacements plus modestes traduiront la présence d'interactions plus faibles, comme les interactions C<sub>5</sub> ou encore les liaisons hydrogène de type  $\pi$  entre le groupement NH considéré et le cycle aromatique des résidus aromatiques, comme la phénylalanine. Cette véritable cartographie des interactions intramoléculaires permet de déterminer la structure des conformères détectés par leur spectre UV [5].

### Les préférences locales de la chaîne

Elles sont illustrées sur le conformère principal de Ac-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> (A, figure 3). La présence de trois bandes déplacées vers le rouge dans le spectre IR indique que ce conformère est formé à partir d'une succession de préférences conformationnelles locales de la chaîne peptidique ; au voisinage du résidu Phe, la chaîne est étendue : cette conformation (aussi

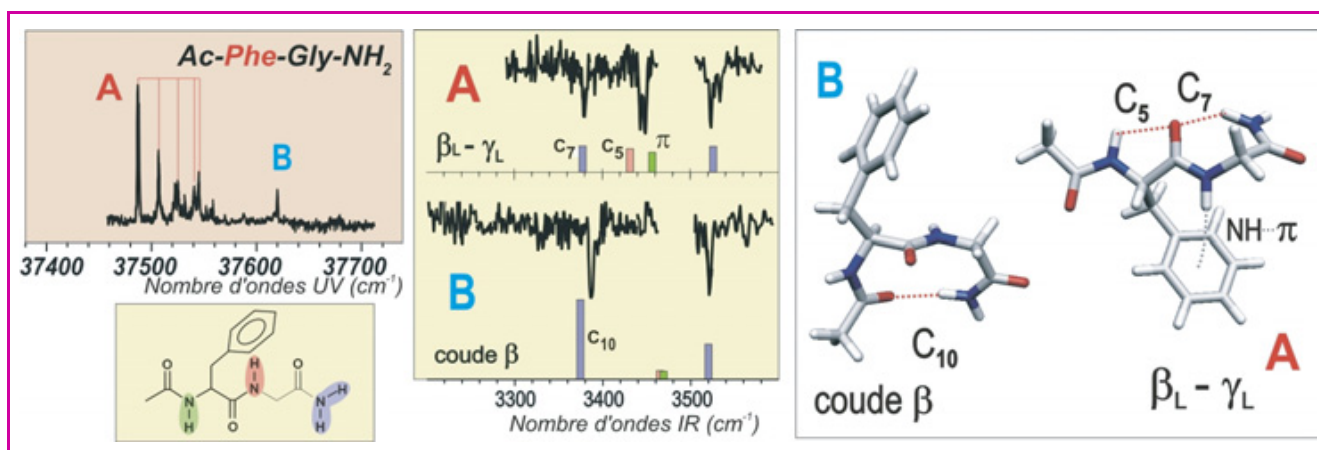


Figure 3 - **À gauche** : spectre IR2P (par ionisation résonnante à deux photons) d'absorption UV dans le domaine de l'origine de la première transition  $\pi\pi^*$  du dipeptide acétyl-phénylalanine-glycyl-amide (Ac-Phe-Gly-NH<sub>2</sub>), montrant les signatures spectrales des deux conformères observés notés A et B. **Au centre** : spectres IR (domaine amide A : élongations NH) de double résonance IR/UV obtenus pour chacun des conformères ; les attributions des bandes aux différents groupes NH du peptide sont indiquées par le code couleur et confrontées aux fréquences harmoniques obtenues par calcul quantique pour deux des conformations les plus stables (**à droite**) obtenues par ce même calcul [8].

appelée  $\beta_1$ ) est stabilisée par des interactions  $C_5$  et  $\pi$ , alors que le résidu Gly adopte une structure localement repliée ( $\gamma_L$ ), centrée sur une liaison hydrogène  $C_7$ . La conformation résultante est « ouverte », sans interaction entre les deux extrémités de la molécule.

## Émergence des structures secondaires

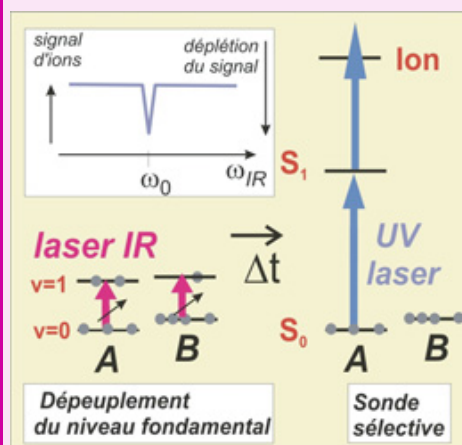
Le spectre IR du conformère minoritaire B de Ac-Phe-Gly-NH<sub>2</sub> ne présente, lui, qu'une liaison hydrogène (figure 3). Des spectres de ce type ont également été observés sur une série de dipeptides homologues, où Ala, Val, Pro ont été substitués à Gly [10]. Ceci nous a permis d'attribuer ces spectres à la formation d'une liaison H de type  $C_{10}$ . Dans ce conformère, la chaîne est repliée et les deux extrémités sont liées par cette liaison H, qui conduit donc à la formation spontanée en phase gazeuse d'un coude  $\beta$ , structure secondaire typique des peptides et des protéines [8]. La coexistence dans le jet de cette forme repliée avec la précédente, ouverte et étendue, illustre bien la compétition existant entre ces deux familles de conformations et traduit des propriétés de stabilité énergétique comparables.

## Les structures secondaires hélicoïdales

Les chaînes plus longues permettent d'aborder la question de la formation de structures secondaires encore plus spectaculaires, comme les hélices. Nous avons étudié de façon systématique des tripeptides basés sur l'alanine dans lesquels Phe était substitué à l'un de ces résidus et nous avons montré que la spectroscopie IR était toujours bien résolue dans des systèmes de cette taille. Les deux liaisons H mises en évidence spectroscopiquement (figure 4) sont compatibles avec la présence simultanée de deux liaisons  $C_{10}$

consécutives le long de la chaîne. Cette analyse a été confirmée par les calculs de chimie quantique qui ont montré que le spectre du conformère observé était en excellent accord avec celui d'une forme hélicoïdale, correspondant à une hélice  $3_{10}$  selon la terminologie des biochimistes, c'est-à-dire une structure pseudo-périodique présentant trois résidus par tour et stabilisés par des liaisons H de type  $C_{10}$  [11]. Cette observation, première mise en évidence spectroscopique de la formation spontanée d'une structure hélicoïdale en phase gazeuse, a été également confirmée expérimentalement par la même technique dans des tripeptides basés non plus sur l'alanine mais sur l'acide aminé non naturel, l'acide amino-isobutyrique, correspondant à une alanine méthylée sur le carbone  $\alpha$  et connu pour favoriser les structures hélicoïdales.

## La spectroscopie de double résonance IR/UV



Cette technique laser permet d'enregistrer sélectivement les spectres IR de chacune des espèces présentes dans le milieu (ici les conformères). Elle repose sur la sélectivité de la spectroscopie UV. Lorsque la molécule présente un chromophore UV bien identifié, comme un cycle aromatique, l'énergie de la transition électronique du système dépend très légèrement de l'environnement du chromophore. En particulier si le système existe sous plusieurs conformations, les transitions des différents conformères, refroidis en jet, seront suffisamment séparées spectralement pour pouvoir être excitées sélectivement à l'aide d'un laser UV de résolution moyenne ( $\sim 1 \text{ cm}^{-1}$ ). Cette propriété permet ainsi de

mesurer la population d'un conformère froid par fluorescence induite par laser (FIL) ou par ionisation résonnante à deux photons (IR2P), comme dans le cas présent. Dans les expériences de double résonance IR/UV, un laser IR impulsionnel est balayé dans un domaine d'intérêt pour la spectroscopie des molécules concernées et est susceptible d'exciter vibrationnellement les molécules, dépeuplant ainsi leur état vibrationnel fondamental. Un second laser UV, accordé sur la transition d'un conformère donné, vient après un certain délai sonder la population résiduelle de ce conformère. L'absorption IR du conformère sondé est alors révélée par des diminutions d'intensité dans le signal de FIL ou de IR2P (figure 3). Le spectre IR obtenu est exclusivement celui du conformère sondé par le laser UV et l'opération peut être réalisée pour toutes les espèces détectées dans le spectre UV.



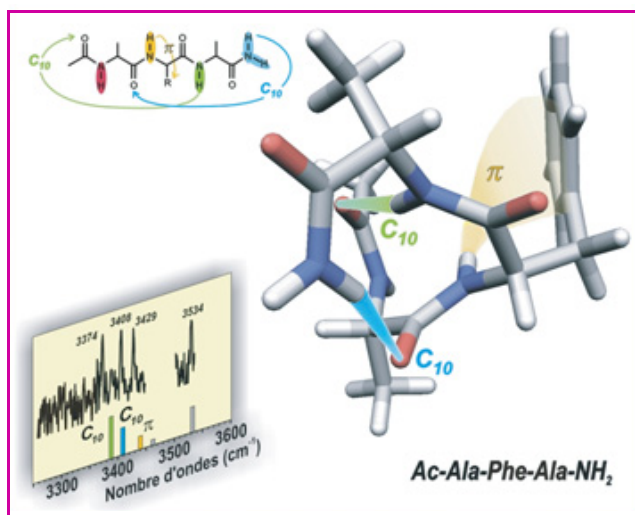


Figure 4 - Spectre IR expérimental et théorique (domaine amide A : élongations NH) d'une chaîne à trois résidus, attribué à une structure hélicoïdale de type hélice  $3_{10}$ , stabilisée par la succession de deux liaisons H  $C_{10}$  et une liaison H  $\pi$ .

## Perspectives

Ces expériences démontrent la possibilité d'obtenir en phase gazeuse des spectres résolus de molécules biologiques, de taille encore modeste pour le biochimiste mais considérable pour les spectroscopistes de la phase gazeuse classique. Cet apport est essentiellement dû à l'excellent couplage entre la désorption laser et la détente supersonique ainsi qu'au refroidissement qui l'accompagne. Le croisement des informations IR et UV permet une attribution qualitative relativement poussée en termes de réseau de liaison H dans ces systèmes, dont l'attribution précise, *in fine*, résulte d'une comparaison entre expérience et calculs quantiques réalisés sur un nombre restreint de conformations. La précision spectroscopique obtenue permet une analyse détaillée des différentes interactions stabilisant les structures observées et est directement comparable aux meilleurs calculs quantiques actuels, pour lesquels elles constituent des données de référence pour des systèmes de cette taille.

Ces résultats ouvrent de nombreuses perspectives. Tout d'abord, la finesse des bandes vibrationnelles et vibroniques observées suggère que des études à haute résolution (centième de  $\text{cm}^{-1}$  dans l'UV) peuvent encore être réalisées avec quelque chance de succès, même pour des systèmes de cette taille, permettant l'accès à des grandeurs structurales du système. La précision obtenue quant à la force des interactions présentes permet de différencier des systèmes relativement proches. On peut donc penser à étudier l'effet du changement de la chiralité de l'un des résidus de la chaîne sur la conformation adoptée, notamment sur le type des coudes  $\beta$  formés. À ce titre, la spectroscopie IR dans le domaine amide I (élongation des carbonyles) serait également un diagnostic qui mériterait d'être développé.

Enfin, la limite en termes de taille accessible par cette stratégie n'est sans doute pas encore atteinte. On peut envisager d'étudier des systèmes encore plus importants, pour traiter de questions comme les effets coopératifs dans les hélices ou encore la stabilité relative des hélices  $3_{10}$  et  $\alpha$ , ces dernières devant supplanter les hélices  $3_{10}$  à partir d'une taille critique prédite de l'ordre de huit acides aminés par la théorie. Les agrégats moléculaires, notamment les hydrates, devraient aussi pouvoir être étudiés avec comme thématique centrale la question de l'effet du solvant sur la stabilité relative des différentes conformations.

## Remerciements

Les auteurs remercient Jean-Pierre Dognon et Valérie Brenner, chercheurs au CEA Saclay, pour le volet théorique de l'étude et Benjamin Tardivel, technicien au CEA Saclay, pour la mise en œuvre du dispositif de désorption laser.

## Références

- [1] Weinkauff R., Schermann J.P., de Vries M.S., Kleinermanns K., *Eur. Phys. Journal D*, **2002**, *20*, p. 309.
- [2] Simons J.P., Jockusch R.A., Carcabal P., Hung I., Kroemer R.T., Macleod N.A., Snoek L.C., *Int. Reviews in Phys. Chem.*, **2005**, *24*, p. 489.
- [3] Mons M., Dimicoli I., Piuzzi F., Tardivel B., Elhanine M., *J. of Phys. Chem. A*, **2002**, *106*, p. 5088.
- [4] Pribble R.N., Zwier T.S., *Science*, **1994**, *265*, p. 75.
- [5] Chin W., Piuzzi F., Dimicoli I., Mons M., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2006**, *8*, p. 1033.
- [6] Branden C., Tooze J., *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, **1999**.
- [7] Piuzzi F., Dimicoli I., Mons M., Tardivel B., Zhao Q., *Chem. Phys. Letters*, **2000**, *320*, p. 282.
- [8] Chin W., Dognon J.P., Piuzzi F., Tardivel B., Dimicoli I., Mons M., *JACS*, **2005**, *127*, p. 707.
- [9] Chin W., Mons M., Dognon J.P., Piuzzi F., Tardivel B., Dimicoli I., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2004**, *6*, p. 2700.
- [10] Chin W., Dognon J.P., Canuel C., Piuzzi F., Dimicoli I., Mons M., Compagnon I., von Helden G., Meijer G., *J. of Chem. Phys.*, **2005**, *122*, p. 054317.
- [11] Chin W., Piuzzi F., Dognon J.P., Dimicoli I., Tardivel B., Mons M., *JACS*, **2005**, *127*, p. 11900.



M. Mons

**Michel Mons**  
et **François Piuzzi**  
sont chercheurs au Laboratoire Francis Perrin\*, CEA Saclay.



F. Piuzzi

**Iliana Dimicoli\*\***  
est conseillère auprès du directeur des Sciences de la matière au CEA Saclay.



I. Dimicoli

\* Laboratoire Francis Perrin, URA CEA/CNRS 2453, CEA Saclay, Bât. 522, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex.

Courriels : michel.mons@cea.fr, francois.piuzzi@cea.fr

\*\* Courriel : Iliana.dimicoli@cea.fr

*L'Actualité Chimique vous invite à visiter son site web*

Retrouvez la revue dès maintenant sur <http://www.lactualitechimique.org>

*Découvrez les sciences chimiques à l'interface des sciences de la vie et de la physique.*

*Consultez les brèves et archives en ligne.*