

# Réactivité du nitrite de sodium. V. Action sur les amino-acides, peptides et protéines

JEAN-PAUL GOUESNARD<sup>1</sup>

Manuscrit reçu le 13-06, accepté le 02-12-1988

L'action du nitrite de sodium sur divers amino-acides a été réexaminée dans des conditions voisines de celles du milieu biologique. La RMN <sup>13</sup>C met en évidence l'existence de cyclisations intramoléculaires et formation de cycles à 5 atomes avec l'ornithine, la citrulline et l'arginine. La réaction de la cystine montre l'ouverture du pont disulfure tandis que la cystéine conduit à l'obtention de carboxy-thiirane et d'acide sulfo-3 lactique. L'hydrolyse des liaisons amide de l'asparagine et de la glutamine est complète tandis que les peptides étudiés — carnosine et aspartame — ne montrent aucune hydrolyse de la liaison peptidique. Cependant, avec le glutathion (γ-Glu-Cys-Gly), la première désamination induit une coupure de la liaison peptidique Glu-Cys et une cyclisation avec formation de lactone. Une seconde désamination a lieu sur le résidu cystéinyle libéré et permet la formation d'un thiirane par cyclisation intramoléculaire avec la fonction thiol. L'obtention du thiirane est également observée avec le glutathion oxydé qui présente un pont disulfure. Enfin la formation de nitrosamines est détectée par RMN <sup>15</sup>N lors de la réaction du nitrite de sodium avec deux produits commerciaux « grand public ».

**Summary.** — The action of sodium nitrite on various amino-acids was re-examined in conditions approximating to a biological medium. <sup>13</sup>C-NMR provides evidence of the existence of intramolecular ring closures and the formation of 5-membered rings with ornithine, citrulline and arginine. The reaction of cystine shows the opening of the sulphur bridges, whereas cysteine leads to the formation of carboxy-thiiran and 3-sulpho-lactic acid. The hydrolysis of the amide bonds of asparagine and glutamine is complete whereas the peptides studied — carnosine and aspartame — do not undergo hydrolysis of the peptide linkage. However, the first deamination of glutathion (γ-Glu-Cys-Gly) induces the peptide link to be broken and a cyclization with the formation of lactone to occur. A second deamination takes place on the cysteinyl residue released and allows the formation of a thiiran by intramolecular cyclization with the thiol group. The formation of thiiran was also observed with oxidized glutathion which has an S-S bridge. Finally, the formation of nitrosamines was detected by <sup>15</sup>N-NMR during the reaction of sodium nitrite with two commercial products available to the general public.

L'action du nitrite de sodium sur les constituants des aliments et de la viande en particulier présente un grand intérêt puisque à côté de son pouvoir bactériostatique, il peut conduire à la formation de nitrosamines cancérigènes. Différentes tentatives ont été réalisées pour étudier les interactions du nitrite avec des protéines purifiées (1). Cependant les difficultés rencontrées, souvent liées à la taille des protéines, ont conduit nombre d'auteurs à s'intéresser aux peptides ou à leurs dérivés (2) ainsi qu'aux acides aminés pris séparément (3). Dans ce dernier cas, les conditions opératoires employées (concentration, pH, température, acide utilisé...) varient souvent considérablement d'une expérience à l'autre et rendent les résultats difficilement comparables.

Aussi cette étude — acides aminés + nitrite de sodium — a-t-elle été reprise dans des conditions expérimentales identiques pour tous les acides aminés envisagés : ces conditions restent si possible les plus proches de celles du milieu biologique.

A côté des acides aminés, quelques composés d'intérêt biologique, présents dans le tissu musculaire (créatine, carnitine et carnosine) ou utilisés dans l'alimentation (aspartame et bouillon de bœuf commercial) ont également été envisagés. Une attention particulière a été portée au glutathion. Ce tripeptide (L-γ-glutamyl-L-cystéinyl-glycine) est un produit naturel inoffensif présent en quantités importantes dans de nombreux tissus animaux, notamment le foie. Il joue un rôle de coenzyme dans divers systèmes enzymatiques en tant qu'agent réducteur du système NADP-NADPH et est également utilisé comme antioxydant dans les produits pharmaceutiques (4). Son action anticancérogène a

été reportée (5) et attribuée au piégeage de radicaux libres (6). Bien que l'action du nitrite sur ce peptide ait été envisagée (7), les produits formés n'ont pas été identifiés à l'exception de l'acide α-hydroxyglutarique mis en évidence lors de l'hydrolyse du glutathion désaminé.

Lors de la réaction du nitrite de sodium en solution aqueuse sur le glutathion oxydé ou réduit, la RMN <sup>13</sup>C fait apparaître des mélanges complexes pour lesquels se pose le problème de l'identification des produits formés. Il était donc indispensable d'envisager au préalable la réaction du nitrite sur les amino-acides constitutifs pris séparément.

La RMN <sup>13</sup>C est une sonde bien adaptée pour suivre les transformations éventuelles des acides aminés et identifier les produits obtenus par réaction du nitrite de sodium. Elle a permis en particulier de montrer la réalité de certaines cyclisations intramoléculaires, suivant une hypothèse avancée mais non vérifiée (3), entre le carbocation primaire formé par la nitrosation d'une fonction amine primaire et un deuxième centre réactif de la molécule. Toutefois, avec des milieux complexes comme le bouillon de bœuf, elle s'est avérée inefficace et nous avons préféré avoir recours à la RMN <sup>15</sup>N ; dans ce cas, s'il n'est pas possible d'identifier tous les composés formés, la RMN <sup>15</sup>N permet la mise en évidence de nitrosamines.

## I. Action sur les acides aminés

15 acides aminés, y compris la carnitine et la créatine ont été examinés. Les produits formés et leurs déplacements chimiques <sup>13</sup>C sont indiqués dans les tableaux 1 et 2. Le tableau 1 regroupe en fonction de la longueur de chaîne, les δ <sup>13</sup>C des composés linéaires et le tableau 2 ceux des composés hétérocycliques obtenus.

La réaction du nitrite de sodium aqueux sur les amino-acides dans des conditions voisines de celles du milieu biologique (pH = 4-5) conduit à la désamination nitreuse bien connue et utilisée pour doser les groupements amines primaires (estimation de Van Slyke). Cependant différents cas peuvent se présenter suivant la substitution et la longueur de la chaîne carbonée.

a) Les acides-aminés étudiés possèdent tous une chaîne latérale fonctionnelle à l'exception de la glycine 1, de l'acide γ-amino butyrique (GABA) 4 et de son ester méthylé 5. Ces deux derniers composés opposés au nitrite de sodium aqueux conduisent respectivement à l'hydroxyacide 4a et à l'hydroxyester 5a. Le composé 4a se lactonise spontanément et le spectre <sup>13</sup>C montre l'équilibre classique entre forme cyclique 4b et forme ouverte 4a. A côté du composé 5a, apparaît un produit minoritaire



TABLEAU 1

Déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  des produits linéaires formés lors de la réaction du nitrite de sodium sur divers amino-acides

Amino-acide de départ	A.A. modifié	R1	n	R2-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> -CH(R1)-COOH		%	C1	C2	C $\alpha$ /R2	CR2
				2	1					
1 Gly	1a	H	0	OH		100	178.0	59.8		
2 Asp (a)	2a	OH	1	COOH		100	178.2	67.7	39.2	175.6
3 Cys	3a	OH	1	SO <sub>3</sub> H		40	176.9	67.3	53.5	
4 GABA	4a	H	2	OH		30	182.2	30.0	60.1	
5 GABA-OMe	5a	H	2	OH		80	176.1	29.5	60.0	
6 Glu (b)	6a	OH	2	COOH		0	179.1	70.0	30.2	179.1
	7a	OH	3	NH <sub>2</sub>		80	178.0	69.2	38.0	
7 Orn	7b	NH <sub>2</sub>	3	OH		20	173.0	52.7	59.5	
	7c	OH	3	OH		25		69.9	60.1	
8 Arg	8a	OH	3	NH-C=NH		75	178.9	70.0	39.6	155.3
				NH <sub>2</sub>						
9 Citr	9a	OH	3	NH-C=O		20	179.4	70.5	38.4	159.9
				NH <sub>2</sub>						
	10a	OH	4	NH <sub>2</sub>		80	178.4	69.7	38.0	
10 Lys	10b	NH <sub>2</sub>	4	OH		20	173.0	53.1	60.1	
	10c	OH	4	OH		100	179.0	70.1	60.1	
11 Carnitine	11	H	(c)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		0	173.9	39.6	68.3	52.6
12 Créatine	12	H	0	N-C(=NH)CH <sub>3</sub>		0	172.5	52.0		155.7
										35.5
				NH <sub>2</sub>						

(a) Asn 2' donne un spectre identique à Asp 2

(b) Gln 6' donne un spectre identique à Glu 6

(c) n = -CH<sub>2</sub>-CH(OH)- : les attributions ont été faites grâce aux couplages  $^1\text{J}_{14\text{N}-13\text{C}} = 3.3$  et  $2.5$  Hz et  $^3\text{J}_{14\text{N}-13\text{C}} = 1,5$  Hz (8)

—  $\approx 20\%$  — de structure cyclique **5b**  $\equiv$  **4b** dû à une hydrolyse de la fonction ester.

b) Une réaction analogue conduisant à un hydroxydiacide, lui-même pouvant se lactoniser, est attendue avec l'acide glutamique **6** et la RMN  $^{13}\text{C}$  montre que la lactone **6b** se forme quantitativement. Toutefois le chauffage à  $80^\circ$  pendant 24 heures du mélange réactionnel fait apparaître 30-40 % de forme linéaire **6a**. La glutamine **6'** manifeste un comportement similaire et l'obtention de la lactone **6b** est en accord avec l'hydrolyse de la fonction amide. L'action du  $\text{NaNO}_2$  sur les acides glutamiques D ou L permet d'obtenir des lactones optiquement actives qui sont le point de départ pour la synthèse de composés biologiques (9).

L'acide aspartique **2** et l'asparagine **2'** conduisent au même hydroxydiacide **2a** mettant en évidence l'hydrolyse de la fonction amide de **2'**.

c) Les acides-aminés possédant une seconde fonction amine sont susceptibles de présenter un comportement différent puisqu'ils présentent deux fonctions réactives.

\* Avec la lysine **10**, la désamination de la fonction  $\alpha\text{-NH}_2$  est plus rapide que celle du  $\text{NH}_2$  situé en bout de chaîne et un mélange 80/20 de **10a** et **10b** est observé lorsque la réaction est effectuée mole à mole. Trois équivalents de nitrite conduisent à une désamination complète avec formation du dihydroxyacide **10c**.

\* L'ornithine **7** possède également deux fonctions aminées et un résultat similaire est obtenu (**7a/7b** 80/20) lorsque le nitrite de sodium réagit de façon équimoléculaire. Cependant un excès de nitrite (3 fois) permet de détecter dans le mélange réactionnel 3 composés : **7a** 25 %, **7c** 25 % et **7d** 50 %. Le produit **7b** est

sans doute également présent mais en trop faible quantité pour être mis en évidence.

Une structure cyclique (acide tétrahydrofurannecarboxylique-2) a été attribuée au composé **7d** grâce aux déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$ . La formation de cet acide **7d** pourrait s'expliquer sur la base d'une hypothèse spéculative proposée par Bonnett (3) pour lequel le carbocation primaire, formé lors de la désamination, serait susceptible de réagir de façon intramoléculaire.

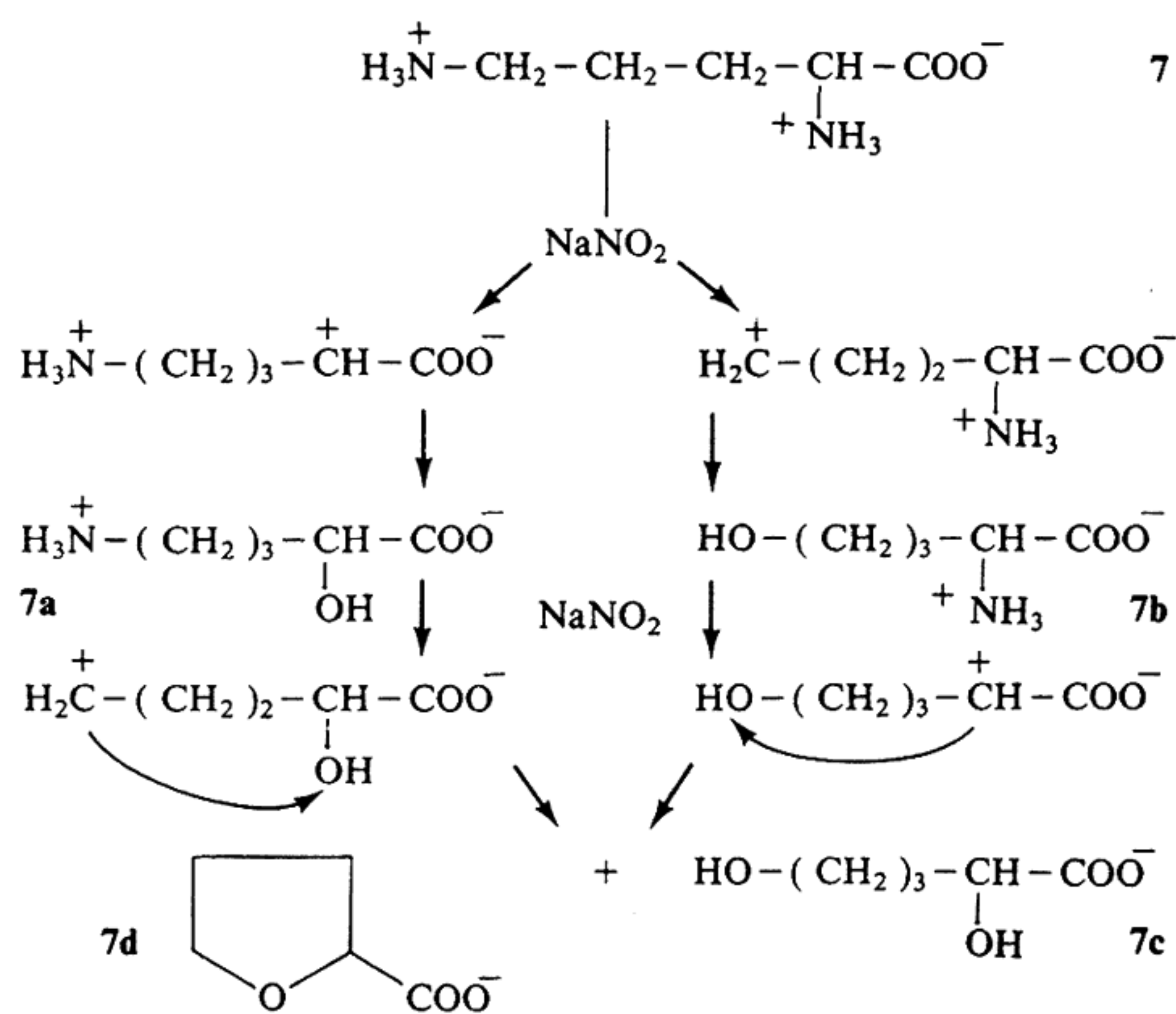
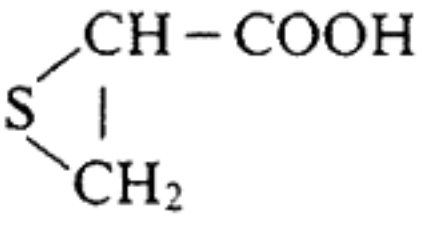
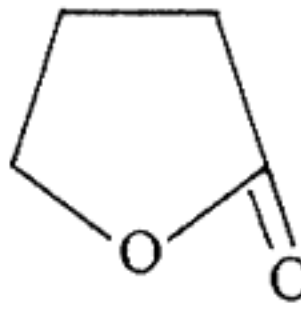
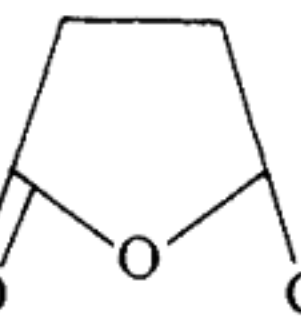
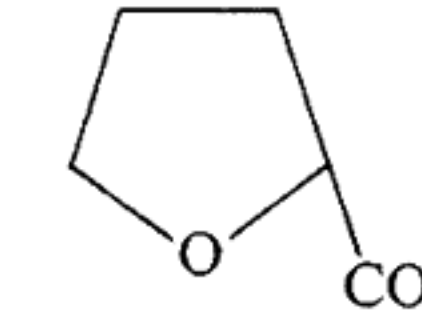
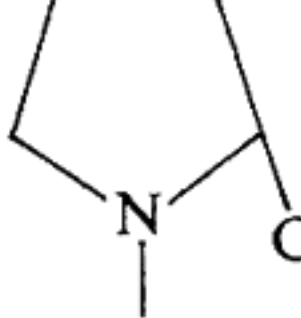
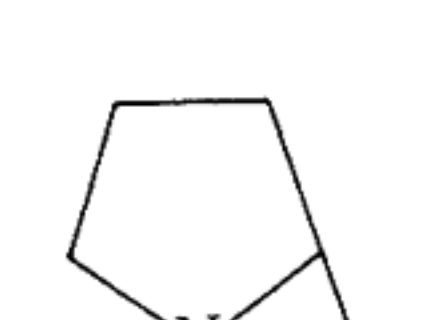
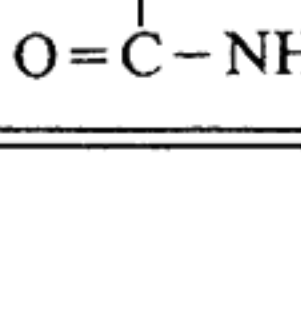




TABLEAU 2

Déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  des hétérocycles formés lors de la réaction du nitrite de sodium avec divers amino-acides

	Hétérocycle formé	%	C1	C2	C3	C4	C5
3b		60	176.2	30.6	22.4		
4b		70	182.2	27.1	20.7	69.8	
5b		20					
6b		100	175.7	77.9	24.5	26.3	180.1
7d		50	179.4	76.8	28.7	23.4	67.2
8b		25	178.9	60.3	30.8	22.6	
9b		80	178.7	60.0	29.1	22.3	45.2

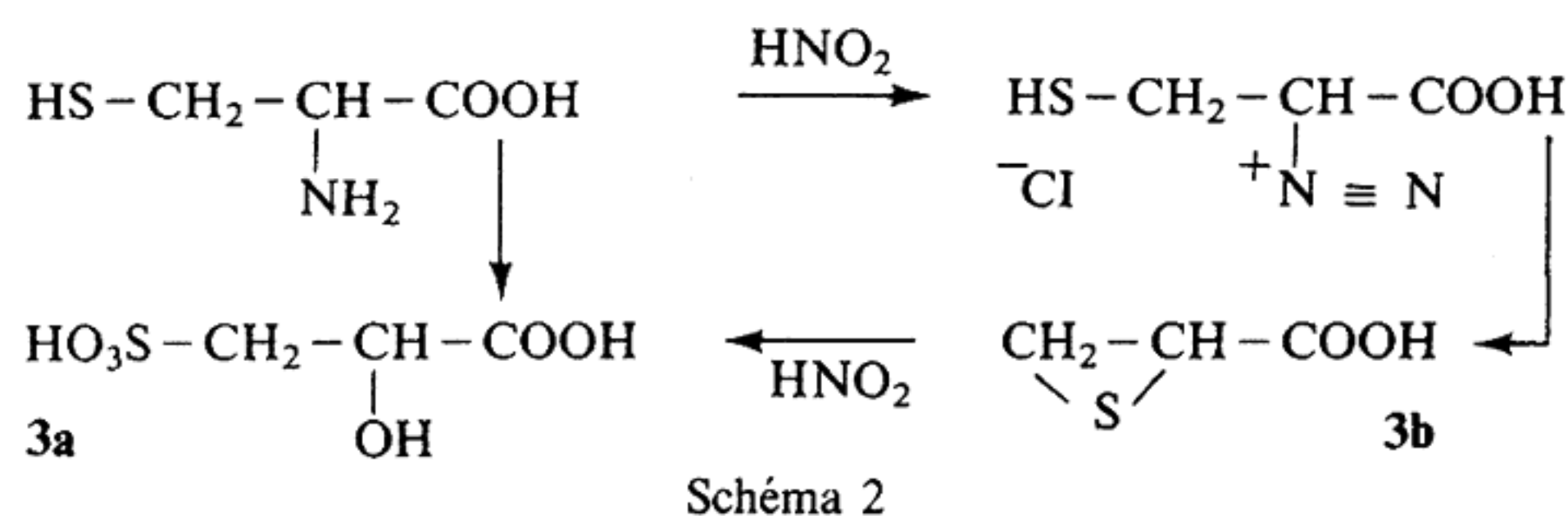
Il semble donc que cette cyclisation soit effective sur l'oxygène du OH. Par contre, il n'y a pas de cyclisation entre le carbocation et l'azote qui se trouve protoné au pH utilisé. De plus, la cyclisation ne se fait que pour l'obtention de cycle à 5 atomes puisque la lysine ne conduit à aucun composé cyclique.

\* La **citrulline 9** est un acide aminé possédant une fonction urée en bout de chaîne. L'action du nitrite de sodium provoque la désamination de la fonction amine primaire et l'alcool **9a** est obtenu en petite quantité  $\approx 20\%$ . Un second produit dont les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  sont proches de ceux de la proline est également présent à environ  $80\%$ . Ce composé majoritaire, la N-carbamoyl-proline **9b** serait dû (voir schéma de l'ornithine) à la cyclisation intramoléculaire du carbocation intermédiaire avec l'azote de la fonction urée comme l'hypothèse en a été avancée (3). Contrairement au résultat observé à  $\text{pH} = 2$  en présence d'acide sulfurique, aucune nitrosation de la fonction urée n'est détectée (10).

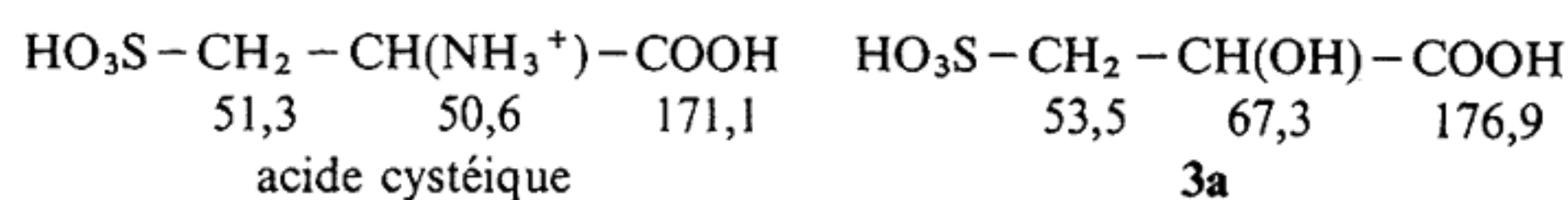
\* Le produit majoritaire  $70-80\%$  obtenu avec l'**arginine 8** est l'hydroxyacide **8a**. Les spectres  $^{13}\text{C}$  font également apparaître un second composé auquel la structure de la N-amidino-proline **8b** pourrait être attribuée par analogie avec la citrulline.

d) La nitrosation de la **cystéine 3** et la formation de cystine par l'intermédiaire de la S-nitroso-cystéine, ont été abondamment étudiées (11, 12, 13). La préparation avec un rendement de  $55\%$  de l'acide épithio-2,3 propionique (carboxythiiranne) **3b** a également été décrite sans préciser les produits secondaires formés (14). Dans des conditions expérimentales similaires — 3 équivalents de  $\text{NaNO}_2$  et  $\text{pH} = 5$  —, la RMN  $^{13}\text{C}$  nous permet

de détecter, au bout de 6 heures, dans le mélange réactionnel environ  $60\%$  de l'acide cyclique **3b** et un second composé **3a** ( $\delta^{13}\text{C} = 53,5 : 67,3$  et  $176,9$  ppm) à  $40\%$ . Abandonné 4 jours à température ambiante, le mélange fait apparaître une inversion des pourcentages ce qui suggère que **3a** se forme, au moins en partie, à partir du thiiranne **3b** et résulte d'une désamination de la cystéine. Le mécanisme de formation du thiiranne **3b** a été discuté et attribué à une N-attaque (14).



L'identification de l'acide sulfo-3 lactique **3a** a été réalisée par comparaison des déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$ . Le pic à  $67,3$  ppm suggère un CH d'acide lactique par analogie avec **2a** formé par la désamination de Asp. La raie de résonance à  $53,5$  ppm est attribuée au  $\text{CH}_2$  voisin du groupe sulfonyle grâce à l'étude effectuée sur la nitrosation des N-acétylcystéine et N-acétylcystine : dans ce cas un acide N-acétylcystéique est mis en évidence et comparé à l'acide cystéique (15).





Les différences de déplacement chimique observées sur le  $\text{CH}_2$  et le  $\text{CH}$  et qui sont dues au remplacement de  $\text{NH}_3^+$  par  $\text{OH}$  se comparent favorablement aux résultats de la littérature (16). Il faut également noter que la réaction de l'acide cystéique avec  $\text{NaNO}_2$  donne un composé **X** dont les paramètres  $^{13}\text{C}$  sont identiques à **3a**.

Composé X	$\delta \text{ C}_\text{H}$	$\delta \text{ C}_{\text{H}_2}$	$\delta \text{ C}_{\text{OOH}}$
pH = 1,7	65,9	52,55	174,2
3,0	66,8	53,2	175,97
4,0	67,26	53,58	176,77
5,0	67,26	53,52	176,94
7,0	67,40	53,70	176,96

La **cystine 3'** est très peu soluble dans l'eau (0,1 g/L à 298 K) et l'action du nitrite de sodium sur cet amino-acide ne semble pas avoir été étudiée. Le spectre  $^{13}\text{C}$  obtenu montre trois raies de résonance (22,2-30,5-175,9 ppm) attribuables à la formation du carboxy-thiiranne **3b** (tableau 2). Bien que **3b** soit présent en faible concentration, ce résultat indique que le nitrite en solution aqueuse est susceptible de couper le pont disulfure : un résultat similaire a déjà été reporté avec la N-acétylcystine (15).

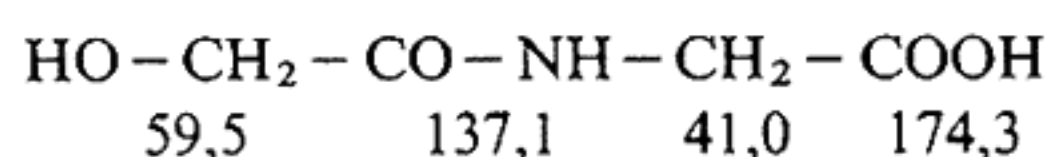
e) Dans les conditions que nous avons utilisées (voir partie expérimentale), la **carnitine 11** et la **créatine 12** ne réagissent pas avec  $\text{NaNO}_2$  et les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  correspondent aux deux composés de départ. Cependant l'action du nitrite de sodium sur **12** en milieu très acide ( $\text{HCl}$  à 25 %) a été reportée et conduit à la formation de N-nitroso sarcosine avec un rendement de 23 % (17).

L'intérêt de cette étude sur les amino-acides réalisée dans des conditions comparables à celles du milieu biologique a été de montrer la réalité des cyclisations entre le carbocation et un hétéroatome de la molécule. De telles cyclisations avaient déjà été reportées mais les rendements en composés cycliques étaient très faibles (18).

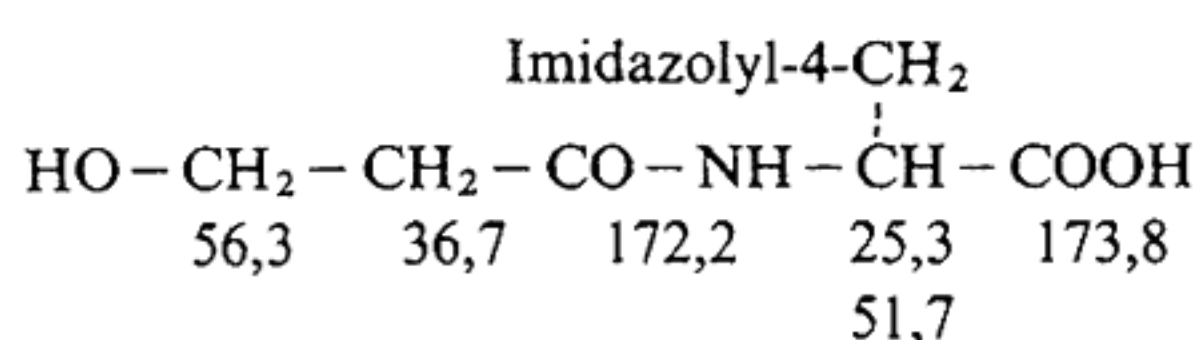
De plus, l'identification des composés obtenus doit faciliter l'étude de l'interaction du nitrite avec des produits plus complexes comme le glutathion (L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyl-glycine) (§ III).

## II. Action sur les peptides

Le plus simple des peptides-Gly-Gly-**13** subit la désamination lors de l'action du nitrite de sodium. Le même résultat est observé avec la carnosine ( $\beta$ -alanyl-L-histidine) **14**, dipeptide présent naturellement dans les muscles de nombreux animaux. Les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  des produits obtenus sont les suivants :



**13a**



**14a**

Le troisième dipeptide étudié est l'aspartame qui est l'ester méthylque de la N-L- $\alpha$ -aspartyl-L-phénylalanine **15**. Cet édulcorant de synthèse possède un pouvoir sucrant 200 fois supérieur à celui du saccharose et est utilisé comme « sucre » dans les régimes hypocaloriques et hypoglucidiques (19). Depuis sa découverte en 1965, ce composé a suscité de nombreuses recherches qui témoignent de son grand intérêt scientifique et industriel : sur une période de 20 ans, les Chemical Abstracts recensent environ 500 publications, 250 brevets et 60 mises au point dont,

pour la seule année 1985, 110 articles, 50 brevets et 27 mises au point.

Les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  de l'aspartame sont les suivants (solvant  $\text{H}_2\text{O}$ , pH = 6,0) :



34,7 } $2\text{CH}_2$	127,1 } $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)$
35,5 } $2\text{CH}_2$	127,5 } $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)$
49,1 $\text{CH}(\text{Asp})$	134,7 $\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)$
51,4 $\text{CH}_3$	167,9 } $3 \text{ C}=\text{O}$
52,9 $\text{CH}(\text{phe})$	171,4 } $3 \text{ C}=\text{O}$
	174,1 } $3 \text{ C}=\text{O}$

Après addition de nitrite de sodium mole à mole et 8 jours de réaction, le spectre  $^{13}\text{C}$  du composé **15a** obtenu apparaît comme suit (pH = 4,5) :

35,0 $\text{CH}_2(\text{phe})$	127,1 } $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)$
*38,9 } $\text{CH}_2(\text{Asp})$	127,5 } $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)$
39,0 } $\text{CH}_2(\text{Asp})$	127,6 } $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)$
51,4 $\text{CH}_3$	127,65 } $\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)$
52,0 } $\text{CH}(\text{phe})$	134,7 } $\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)$
*52,2 } $\text{CH}(\text{phe})$	*134,8 } $\text{C}(\text{C}_6\text{H}_5)$
*67,2 } $\text{CH}(\text{Asp})$	171,8 } $3 \text{ C}=\text{O}$
67,3 } $\text{CH}(\text{Asp})$	174,2 } $3 \text{ C}=\text{O}$
	176,7 } $3 \text{ C}=\text{O}$

Les raies de résonance à 67 ppm confirment la désamination de la molécule et la formation d'alcool. Le dédoublement observé sur un certain nombre de raies est en accord avec une racémisation du composé et formation de deux diastéréoisomères détectables en RMN  $^{13}\text{C}$  (40-60 %). L'astérisque indique l'isomère majoritaire (L-L ou D-L).

Dans les trois cas envisagés, l'action du  $\text{NaNO}_2$  se manifeste par la substitution du  $\text{NH}_2$  par une fonction alcool mais ne provoque pas d'hydrolyse de la liaison amide comme cela est observé avec l'asparagine **2'** et la glutamine **6'**.

## III. Réaction du glutathion

Ce peptide peut exister sous les formes réduite GSH **16** et oxydée GSSG **16'** (schémas 3 et 4) qui ont fait l'objet de diverses études par RMN  $^{13}\text{C}$  (20) et  $^{15}\text{N}$  (21). Sous sa forme réduite, il présente deux fonctions réactives  $\text{NH}_2$  et  $\text{SH}$  mais la fonction  $\text{NH}_2$  seule subsiste deux fois dans la molécule de glutathion oxydé.

D'autre part, peu de choses étaient connues sur la réaction du nitrite de sodium sur les ponts disulfure et en particulier sur la cystine et ses dérivés. Oae et coll. (22) ont étudié l'action de  $\text{N}_2\text{O}_4$  sur des disulfures aromatiques dissymétriques mais avec des conditions opératoires très différentes ( $\text{CCl}_4$  : 0 °C) de celles utilisées ici. Cependant l'étude effectuée sur la cystine (cf. § Id) et la N acétyl-cystine (15) montre que la liaison disulfure est susceptible de s'ouvrir lors de la réaction de  $\text{NaNO}_2$  : dans ces conditions, une molécule de GSSG **16'** pourra présenter 4 sites réactifs.

A. GSSG **16'**. Dans un premier temps, nous avons examiné un mélange aqueux (pH = 4,5) contenant autant de nitrite que de fonction  $\text{NH}_2$  réactive soit un rapport molaire 2/1. Le spectre  $^{13}\text{C}$  obtenu A, est très complexe et les produits présents difficilement identifiables. Cependant, l'addition au bout de 5 jours d'une quantité équivalente de  $\text{NaNO}_2$  supplémentaire ne laisse plus subsister que deux systèmes aisément analysables par comparaison avec les produits obtenus à partir des amino-acides ; l'un d'eux est la lactone **6b** formée par le résidu glutamyle et l'autre correspond à un thiiranne **16c** dû au résidu cystinyl-glycine. Il devenait alors possible de mettre en évidence dans le spectre initial A, à côté de ces composés **6b** et **16c** précédemment



identifiés, le peptide de départ GSSG **16'** à 55 % et le disulfure du peptide Cys-Gly (tabl. 3). Les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  de ces composés sont indiqués dans le schéma 4.

Pour expliquer la formation de ces différents produits, le mécanisme suivant pourrait être proposé (schéma 3). D'abord, une attaque du  $\text{NaNO}_2$  sur les fonctions  $\text{NH}_2$  des résidus glutamyle ; le carbocation formé se cyclise alors avec l'oxygène du carbonyle ce qui entraîne la rupture de la liaison peptidique avec formation de lactone **6b** et du disulfure **16b**. La nouvelle fonction  $\text{NH}_2$  présente dans **16b** réagit à son tour sur le nitrite et une rupture de la liaison disulfure suivie d'une cyclisation expliquerait l'obtention de thiirane **16c** comme cela a été montré pour la cystine.

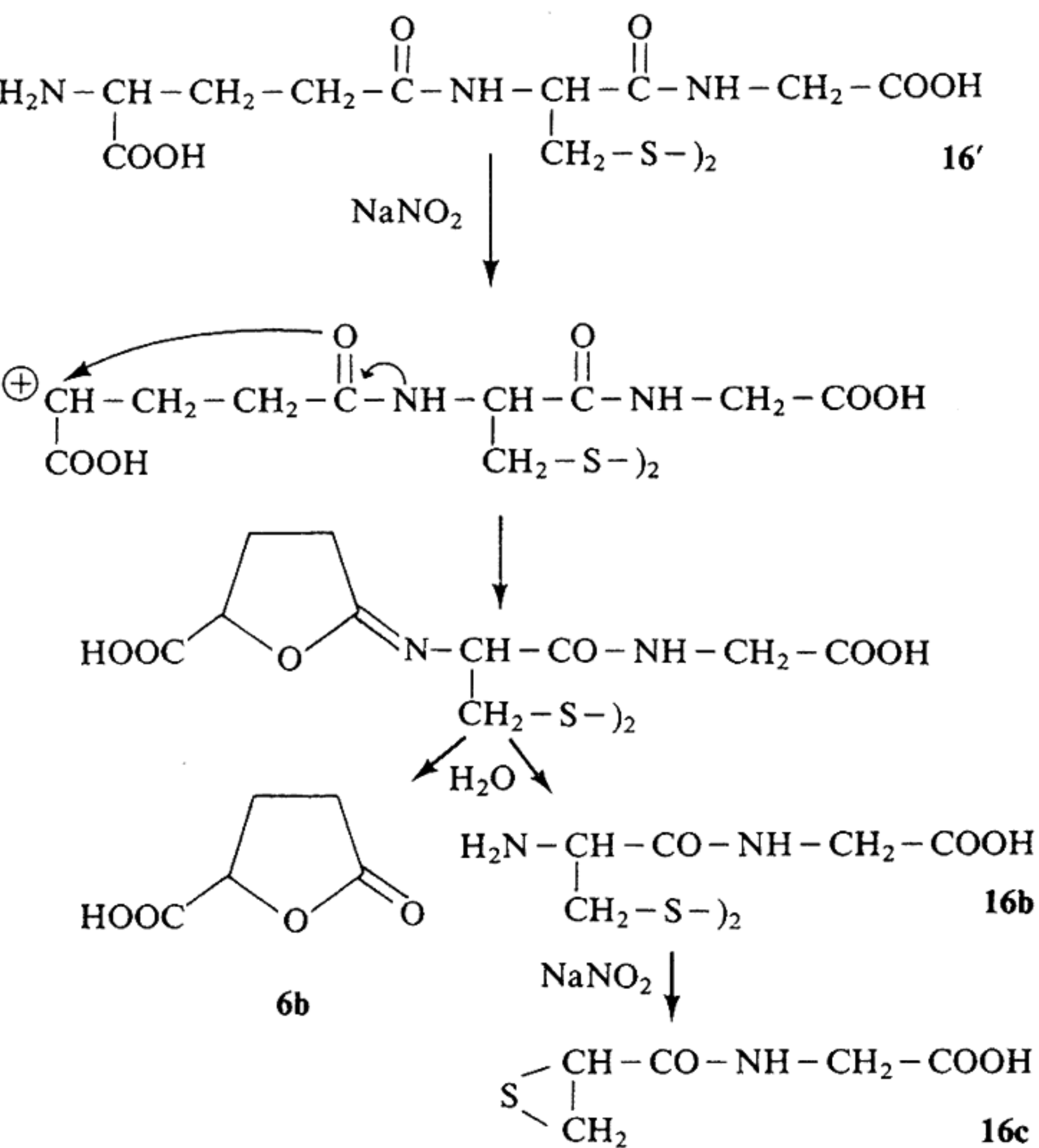


Schéma 3

A l'appui de ce mécanisme, on peut avancer les arguments suivants :

Le glutathion est un composé naturel et stable en milieu aqueux dans une gamme de pH variant de 0 à 13 (20) et une hydrolyse importante de la liaison Glu-Cys est à exclure. De plus, l'absence de raie de résonance  $^{13}\text{C}$  à 59-60 ppm montre que la liaison Cys-Gly n'est pas ouverte : dans le cas contraire, en effet, la glycine libérée subirait une désamination rapide conduisant à l'acide glycolique (hydroxyacétique) caractérisé par un déplacement chimique  $^{13}\text{C}$  voisin de 60 ppm (cf. 1a tableau 1).

Dans les conditions douces utilisées, la coupure de la liaison peptidique est donc attribuable à la présence du nitrite de sodium. Dans une note spéculative, Bonnett (3) avait avancé l'hypothèse que le carbocation primaire, formé lors de la nitrosation d'une fonction amine primaire sur une chaîne latérale de protéine, pouvait réagir de façon intramoléculaire avec une liaison peptidique voisine. La réaction du nitrite de sodium avec les amino-acides a montré que de telles cyclisations se produisaient effectivement pour donner des cycles à 5 atomes et ce travail apporte pour la première fois une confirmation très nette à cette hypothèse dans le cas d'un tripeptide.

Il faut également remarquer que le nitrite de sodium induit des réactions en chaîne avec le glutathion et sans doute aussi avec les protéines. En effet, cette coupure-cyclisation intramoléculaire se traduit par la libération d'une deuxième fonction amine qui pourra réagir à nouveau sur  $\text{NaNO}_2$ . Le nouveau carbocation formé sera susceptible d'attaquer un autre centre réactif dans la molécule c'est-à-dire une liaison peptidique ou une chaîne latérale comme le montre l'exemple du glutathion.

Enfin cette étude apporte une confirmation supplémentaire à l'ouverture des ponts disulfure par le nitrite de sodium.

B. Lorsque le nitrite de sodium est opposé au glutathion réduit GSH **16**, les deux fonctions amine et thiol sont susceptibles de réagir. Toutefois la fonction SH a été reportée comme la plus réactive vis-à-vis de la nitrosation (11) (13) et le nitrosothiol formé se décompose rapidement pour donner le disulfure (12). Avec un tel mécanisme réactionnel, le principal produit formé serait alors le glutathion oxydé **16'** qui pourrait conduire ensuite aux réactions décrites ci-contre. Cependant, la réaction de **16'** lui-même (§ A) est lente puisqu'il en reste des quantités impor-

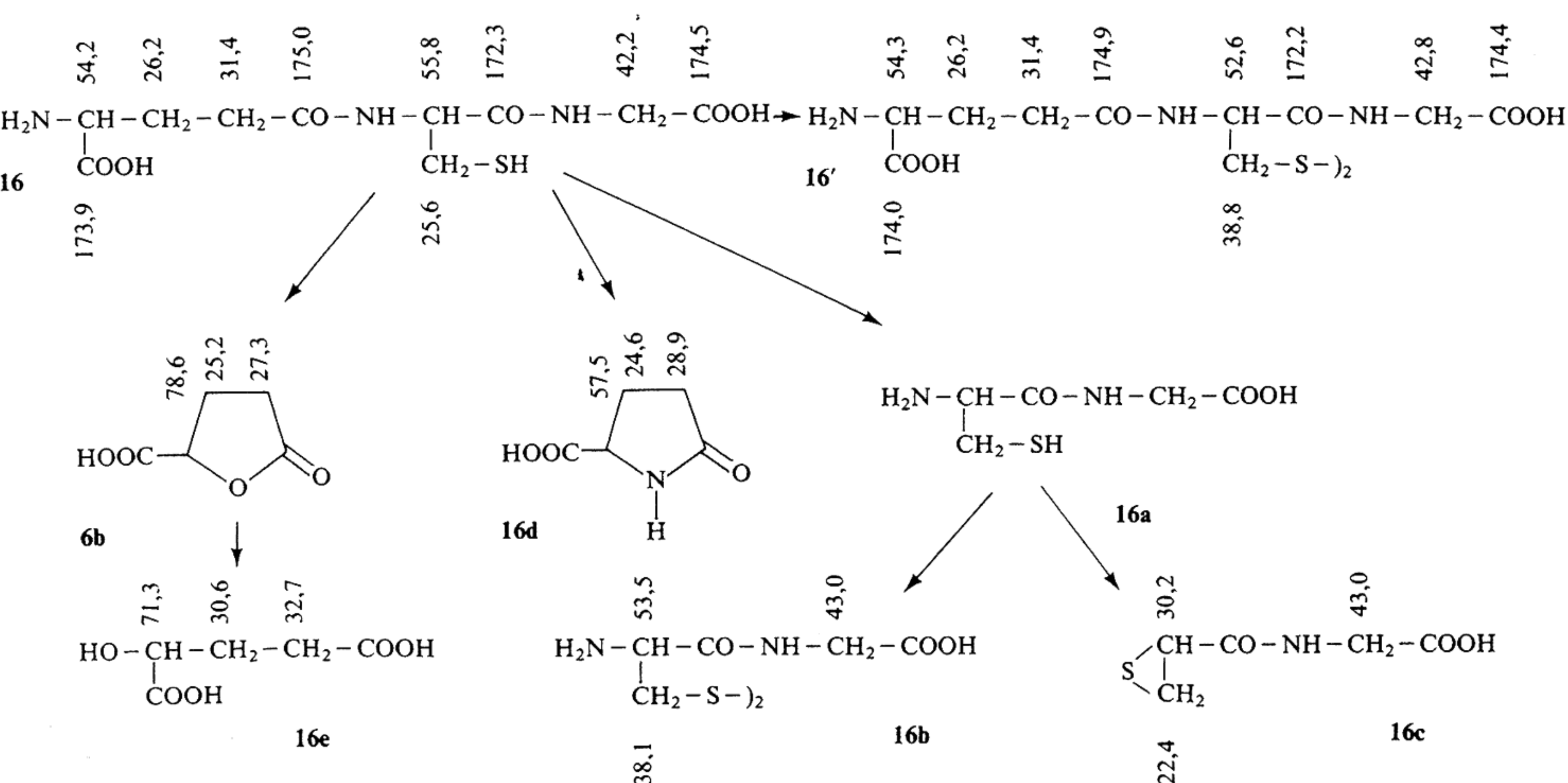


Schéma 4



TABLEAU 3

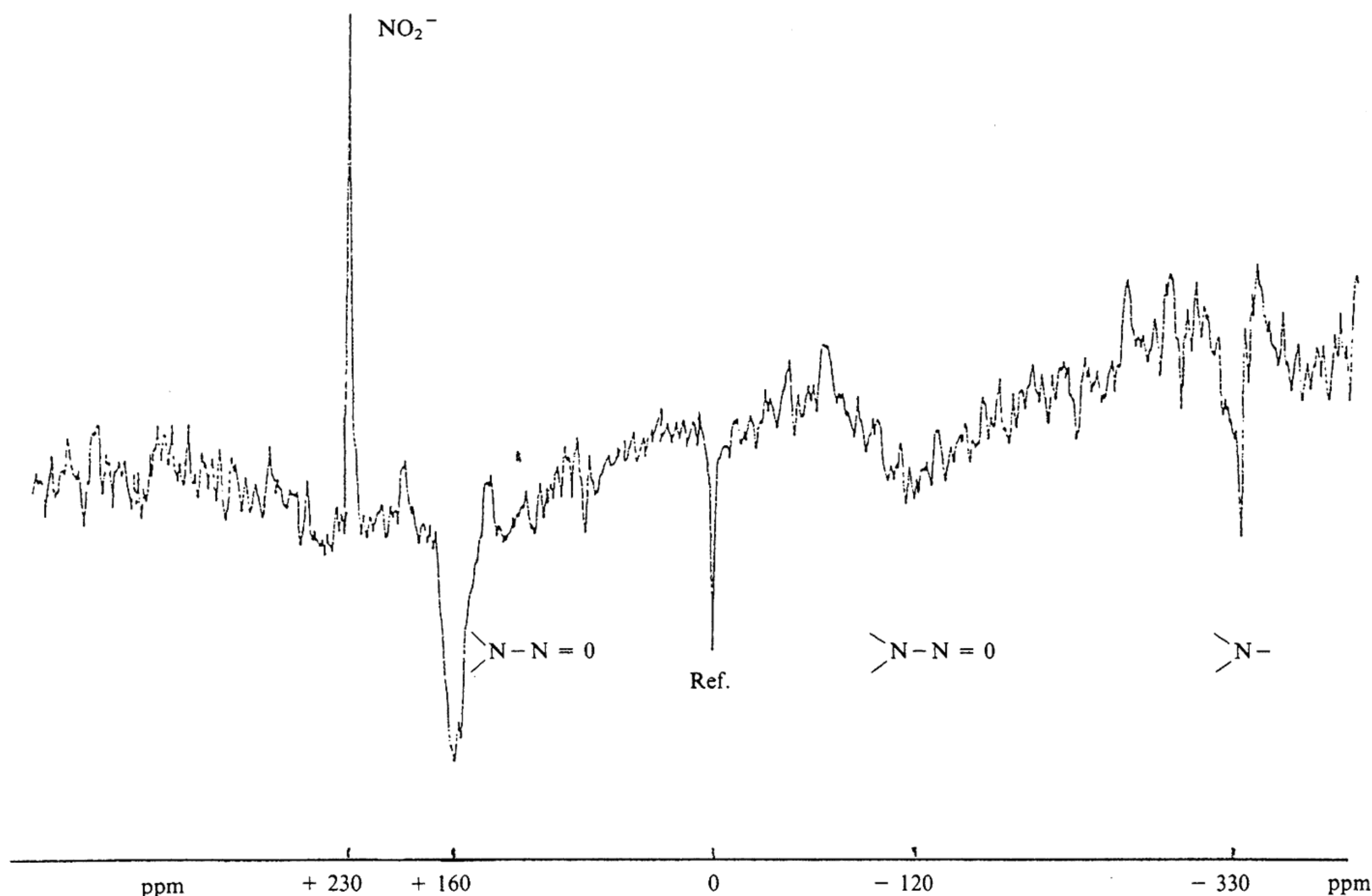
Produits formés par réaction du nitrite de sodium sur le glutathion

Produits de départ	pH	GSSG 16'			GSH 16			
		4.5	4.5	7.0	3-4-4.5	3.8	6.0	7.0
Produits formés								
GSSG 16'		55	—	40	80	35	50	65
Lactone 6b		45	100	60	20	65	50	35
Disulfure 16b		30	—	40	10-15	25	25	25
Thiiranne 16c		15	100	20	5-10	40	25	10
[Glutathion]/[NaNO <sub>2</sub> ] mole mole		1/2	1/4	1/4	1/1	1/2	1/2	1/2

## IV. Etude de produits commerciaux

Deux produits commerciaux « grand public » ont également été testés vis-à-vis du nitrite de sodium : Viandox et bouillon de bœuf Maggi. La complexité des spectres <sup>13</sup>C a conduit à envisager la RMN <sup>15</sup>N comme sonde pour détecter les produits formés.

Avec Viandox, l'addition de Na <sup>15</sup>NO<sub>2</sub> se traduit par l'apparition de 2 pics en azote 15. Le premier très fin à + 228,6 ppm/CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> peut être attribué sans ambiguïté au nitrite en excès. Le second est très large et centré à + 160 ppm (± 10 ppm). Cette zone de déplacements chimiques <sup>15</sup>N qui varient de + 150 à + 170 ppm est caractéristique de la fonction N=O des nitrosamines (24) (25). Les raies de résonance <sup>15</sup>N sont en général très fines et la largeur observée à + 160 ppm est l'indice de la présence d'un grand nombre de nitrosamines. Viandox contiendrait alors de nombreuses amines secondaires : sa composition indique des extraits aminés, extrait de viande,

Figure 1. Spectre <sup>15</sup>N du « Bouillon de bœuf Maggi » en tablettes et de 50 mg de nitrite de sodium en solution dans 7 mL d'eau.



glutamate, etc. Au bout d'un mois, le mélange montre la disparition totale du nitrite mais les nitrosamines sont toujours présentes.

Le bouillon de bœuf commercial possède une composition similaire (extrait de viande de bœuf — 20 % —, extraits aminés végétaux, extrait de levure, glutamate, etc.). Le spectre  $^{15}\text{N}$  du mélange obtenu par adjonction de 50 mg de  $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$  (voir fig. 1) montre la présence de nitrite n'ayant pas réagi (+ 228,1 ppm), de nitrosamines  $\text{>N}-\text{N}=\text{O}$  [+ 160 ppm et - 120 ppm] et d'amines [- 330 ppm]. Le pic à + 160 ppm est large (environ 15 ppm) et celui à - 120 ppm est encore plus large (environ 50 ppm). Dans une série de nitrosamines, les déplacements chimiques  $^{15}\text{N}$  de l'atome d'azote  $\text{>N}-$  varient de - 105 à - 155 ppm (24) (25).

Grâce à la RMN  $^{15}\text{N}$ , cette étude met clairement en évidence la formation de nitrosamines lors de la mise en contact de produits alimentaires commerciaux avec le nitrite de sodium. Celui-ci peut être présent naturellement dans l'alimentation (épinards, betteraves) ou ajouté pour son pouvoir bactériostatique (salaisons) : la salive en contient également des quantités non négligeables (18 mg/jour).

### Partie expérimentale

— Des solutions aqueuses équimoléculaires en nitrite de sodium et acide aminé sont réalisées à une concentration de 0,5 M ou 1 M suivant la solubilité des acides aminés. Le pH de la solution est ajusté à la valeur désirée (pH = 4-5) avec HCl 2N. Le mélange est agité à température ambiante pendant 24 heures afin que le dégagement gazeux soit terminé. Puis la solution résultante est analysée par RMN  $^{13}\text{C}$ .

— Avec les acides aminés 3, 7 et 10 qui présentent deux sites réactifs, trois équivalents de nitrite ont également été employés.

— Un mélange de cystine 3' (600 mg : 2,5 mmol) et de  $\text{NaNO}_2$  (345 mg ; 5 mmol) est réalisé dans 5 mL d'eau à pH 4,5. La cystine ne se dissout qu'en partie mais le mélange est agité 6 jours à température ambiante avant d'être filtré et étudié par RMN  $^{13}\text{C}$ .

— Pour l'aspartame 15, on dissout 75 mg (0,26 mmol) de dipeptide dans 5 mL d'eau puis 18 mg de  $\text{NaNO}_2$  (0,26 mmol) sont ajoutés et le pH est ajusté à 4,5 avec HCl 2N. Le spectre  $^{13}\text{C}$  est enregistré 8 jours après.

— 1 g (3,2 mmol) de glutathion réduit GSH 16 est mélangé avec 230 mg (3,2 mmol) de nitrite de sodium dans 3 mL d'eau. Le pH est ajusté et maintenu constant à la valeur désirée par addition de HCl 2N. Après 5 jours de réaction à température ambiante, la solution est analysée par RMN  $^{13}\text{C}$ .

La même manipulation est réalisée avec une quantité double (460 mg) de  $\text{NaNO}_2$ .

— Le glutathion oxydé GSSG 16', 500 mg (0,8 mmol), et le nitrite de sodium, 125 mg (1,6 mmol) sont dissous dans 2 mL d'eau et le pH ajusté à 4,5. Au bout de 5 jours à température ambiante, le mélange est analysé par RMN  $^{13}\text{C}$  (spectre A) puis on ajoute 125 mg de  $\text{NaNO}_2$  et après une attente de 5 jours, le mélange est à nouveau analysé en RMN.

— 5 mL de solution de « Viandox » commercial sont additionnés de 50 mg de  $\text{NaNO}_2$  marqué  $^{15}\text{N}$  à 95 %. Le pH est ajusté à 5,0 puis le mélange est analysé par RMN  $^{15}\text{N}$  au bout de 24 h.

— 1 tablette de « bouillon de bœuf Maggi » 9 g est mélangée avec 7 mL d'eau. La partie non soluble est éliminée et la solution résultante est traitée comme ci-dessus.

— Les spectres  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker WH 90 en abondance naturelle. Paramètres utilisés : SW = 6 000 Hz ; AT = 0,679 sec ; PW = 25 ° ;  $\nu_0$  = 22,365 MHz ; nombre d'accumulations 1 000 à 5 000. Avec un spectromètre Bruker WM 250, les paramètres utilisés sont les suivants : SW = 15 000 Hz ; AT = 0,541 sec ; PW =

30 ° ;  $\nu_0$  = 62,896 MHz. Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport au TMS externe dans  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Les déplacements chimiques  $^{13}\text{C}$  de GSH 16 et de GSSG 16' (0,3 M dans  $\text{H}_2\text{O}$  et pH = 3,5) sont tirés de la réf. (20).

— Les spectres  $^{15}\text{N}$  ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker WH 250. Paramètres utilisés : SW = 22 500 Hz ; AT = 0,360 sec ; PW = 50 ° ;  $\nu_0$  = 25,349 MHz ; découplage large bande (2W) ; nombre d'accumulations 100 000 ; température 298 K. Les déplacements chimiques ont été repérés par rapport à une solution de  $\text{CH}_3^{15}\text{NO}_2$  enrichi dans  $\text{CD}_3\text{NO}_2$  : cette solution est contenue dans un tube coaxial de 4 mm centré dans le tube échantillon de 15 mm.

### BIBLIOGRAPHIE

- (1) KNOWLES M. E., MCWEENY D. J., COUCHMAN L. et THOROGOOD M., *Nature*, 1974, **247**, 288. KUBBEROD G., CASSENS R. G. et GREASER M. L., *J. Food Sci.*, 1974, **39**, 1228. WOOLFORD G., CASSENS R. G., GREASER M. L. et SEBRANEK J. G., *J. Food Sci.*, 1976, **41**, 585. ITO T., CASSENS R. G. et GREASER M. L., *J. Food Sci.*, 1979, **44**, 1144. ITO T., CASSENS R. G., GREASER M. L., LEE M. et IZUMI K., *J. Food Sci.*, 1983, **48**, 1204.
- (2) KUROSKY A. et HOFMANN T., *Can. J. Biochem.*, 1972, **50**, 1282. BONNETT R., HOLLEYHEAD R., JOHNSON B. L. et RANDALL E. W., *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1975, 2261. CHALLIS B. C., MILLIGAN J. R. et MITCHELL R. C., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1984, 1050.
- (3) BONNETT R. et NICOLAIDOU P., *Heterocycles*, 1977, **7**, 637.
- (4) AKERS M. J., *J. Chem. Educ.*, 1985, **62**, 325.
- (5) NOVI A. M., *Science*, 1981, **212**, 541.
- (6) NUDD R. et WILKIE D., *Chem. Brit.*, 1983, 911.
- (7) QUASTEL J. H., STEWART C. P. et TUNNICLIFFE H. E., *Biochem. J.*, 1923, **17**, 586.
- (8) BLUNDEN G., GORDON S. M., CRABB T. A., ROCH O. G., ROWAN M. G. et WOOD B., *Magn. Res. Chem.*, 1986, **24**, 965.
- (9) LARCHEVÈQUE M. et LALANDE J., *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1987, 116.
- (10) MIRVISH S. S., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1971, **46**, 1183.
- (11) SCHULZ U. et MCCALLA D. R., *Can. J. Chem.*, 1969, **47**, 2021.
- (12) BONNETT R. et NICOLAIDOU P., *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1979, 1969.
- (13) WILLIAMS D. L. H., *Chem. Soc. Rev.*, 1985, **2**, 171.
- (14) MAYCOCK C. D. et STOODLEY R. J., *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1976, 234.
- (15) MELLET P., NOEL P., MECHIN B. et DORIE J., *J. Chem. Res.*, 1988, 30.
- (16) WEHRLI F. W. et WIRTHLIN T., « *Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra* », Heyden, Londres, 1976, p. 37.
- (17) ARCHER M. C., CLARK S. D., THILLY J. E. et TANNENBAUM S. R., *Science*, 1971, **174**, 1341.
- (18) WARTHESSEN J. J., SCANLAN R. A., BILLS D. D. et LIBBEY L. M., *J. Agric. Food Chem.*, 1975, **23**, 898.
- (19) BEERENS H., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1981, **74**, 261. MAZUR R. H., *Food Sci. Technol.*, 1984, **12**, 3. SCHIFFMAN S. S., *Food Sci. Technol.*, 1984, **12**, 207.
- (20) JUNG G., BREITMAIER E., VOELTER W., KELLER T. et TANZER C., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1970, **9**, 894. JUNG G., BREITMAIER E. et VOELTER W., *Eur. J. Biochem.*, 1972, **24**, 438. FEENEY J., PARTINGTON P. et ROBERTS G. C. K., *J. Magn. Res.*, 1974, **13**, 268.
- (21) GATTEGNO D., HAWKES G. E. et RANDALL E. W., *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1976, 1528.
- (22) OAE S., KIM Y. H., FUKUSHIMA D. et SHINKAMA K., *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1978, 913. OAE S., FUKUSHIMA D. et KIM Y. H., *Chem. Lett.*, 1978, 279.
- (23) GOUESNARD J. P., *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1986, 1901.
- (24) MARTIN G. J., MARTIN M. L. et GOUESNARD J. P., «  *$^{15}\text{N}$  NMR Spectroscopy* », Springer-Verlag, Berlin, 1981, p. 163.
- (25) GOUESNARD J. P. et MARTIN G. J., *Org. Magn. Res.*, 1979, **12**, 263.