

50376

N° d'ordre 343

1972

153

50376

1972

153

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

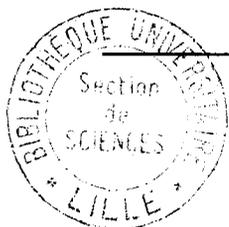
LE TITRE DE DOCTEUR DE 3<sup>me</sup> CYCLE

en chimie physique

par

**NICOLE HELBECQUE**

INGÉNIEUR CHIMISTE HEI



CONTRIBUTION A LA DÉTERMINATION  
DE L'ORIGINE DE L'ACTIVITÉ OPTIQUE INDUITE  
DANS UN CHROMOPHORE EXTRINSÈQUE

SYNTHÈSE ET ÉTUDE D'OLIGOMÈRES DU L-GLUTAMATE DE PARA NITROBENZYLE

---

Membres du jury :

M. C. LOUCHEUX,	président
M <sup>me</sup> M.-H. LOUCHEUX,	rapporteur
M. A. LABLACHE-COMBIER,	examinateur
M. M. DAUTREVAUX,	membre invité

soutenue le 27 octobre 1972





Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée
M.	VAILLAND Jean	Mathématiques
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Animale
M.	WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Générale

#### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M.	BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M.	DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
M.	FLATRES Pierre	Géographie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LINDER Robert	Botanique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	PARREAU Michel	Mathématiques
M.	PRUDHOMME Rémy	Sciences Economiques
M.	SCHILTZ René	Physique

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique
M.	DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie
M.	LANDAIS Jean	Chimie Organique
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Macromoléculaire
Mlle	MARQUET Simone	Mathématiques
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie

#### MAITRES DE CONFERENCES ET CHARGES DES FONCTIONS

M.	ADAM Michel	Economie Politique
M.	ANDRE Charles	Mathématiques et Statistiques
M.	ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M.	AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M.	BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M.	BILLARD Jean	Physique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M.	BOILLY Bénoni	Zoologie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie (Béthune)
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Analyse Numérique
M.	CHOQUET Marcel	Biologie Appliquée
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	CORTOIS Jean	Physique

M.	COULON Jean Paul	Electrotechnique
M.	DEBRABANT Pierre	Instrumentation Physique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique
Mme	EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M.	FAIDHERBE Jacques	Psychophysiologie
M.	FONTAINE Jacques	Génie Electrique
M.	FROELICH Daniel	Chimie
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Mathématiques
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GRUSON Laurent	Mathématiques
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HERMAN Maurice	Physique
M.	HUARD DE LA MARRE Pierre	Mathématiques Appliquées
M.	JOLY Robert	Biologie (Amiens)
M.	JOURNAL Gérard	Physique Appliquée
Mlle	KOSMANN Yvette	Mathématiques
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Générale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LAURENT François	Automatique
M.	LAVAGNE Pierre	Gestion
Mlle	LEGRAND Solange	Mathématiques
M.	LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme	LEHMANN Josiane	Mathématiques
M.	LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M.	LEROY Jean-Marie	Chimie (E.N.S.C.L.)
M.	LEROY Yves	Electronique
M.	LHENAFF Renée	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique
M.	LOUAGE Francis	Mesures Industrielles
M.	MAES Serge	Physique
Mme	MAILLET Monique	Sciences Economiques
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
M.	MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M.	MESSELYN Jean	Physique
M.	MIGEON Michel	Instrumentation Chimique
M.	MONTEL Marc	Physique
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie Végétale
M.	MUSSCHE Guy	Economie et Sociologie d'Entreprises
M.	NICOLE Jacques	Chimie Analytique (E.N.S.C.L.)
M.	NOWOGROCKI Guy	Chimie (Amiens)
M.	OUZIAUX Roger	Construction Mécanique
M.	PANET Marius	Physique Industrielle
M.	PAQUET Jacques	Géotechnique
M.	PARSY Fernand	Mathématiques Appliquées
M.	PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M.	PERROT Pierre	Chimie
M.	PONSOLLE Louis	Chimie
M.	POVY Jean-Claude	Automatique non linéaire
M.	RACZY Ladislas	Physique Industrielle et Radioélectricité
Mme	RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	ROYNETTE Bernard	Mathématiques
M.	SALMER Georges	Radio-Electricité et Electronique
M.	SEGUIER Guy	Electronique
M.	SIMON Michel	Psychologie
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique
M.	SMET Pierre	Physique

M.	SOMME Jean	Géographie
Mlle	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	THOMAS Daniel	Chimie Minérale Appliquée
M.	TOULOTTE Jean-Marc	Informatique
M.	TREANTON Jean-René	Psychologie
M	VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M.	VILETTE Michel	Génie Mécanique
M.	WATERLOT Michel	Géologie
Mme	ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

--oo 0 oo--

A mes parents

A ma famille

A mes amis

en témoignage de  
profonde affection.

Monsieur le Professeur C. LOUCHEUX a bien voulu m'accueillir dans son Laboratoire de Chimie macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, où ce travail a été réalisé.

Il m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Madame M-H LOUCHEUX, chargée de Recherches au C.N.R.S., m'a proposé le sujet du travail exposé dans cette thèse. Malgré ses nombreuses occupations, elle en a suivi le développement avec le plus grand intérêt.

Qu'elle veuille trouver ici l'expression de ma très vive reconnaissance pour les conseils et les encouragements qu'elle m'a prodigués et pour la clairvoyance avec laquelle elle m'a toujours guidée.

Monsieur A. LABLACHE-COMBIER, Maître de Conférences à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, a bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail.

Qu'il veuille accepter mes plus respectueux remerciements.

Je remercie vivement Monsieur M. DAUTREVAUX, Professeur à l'Université de Lille II, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées au laboratoire de biophysique de Monsieur le Professeur M. DAUNE à Strasbourg.

Je suis heureuse de lui exprimer ici ma reconnaissance.

Je ne voudrais pas oublier de remercier Monsieur P. HUBLAU, dont l'expérience en matière de synthèse peptidique m'a été très précieuse. Grâce à son amabilité, j'ai pu mettre en oeuvre immédiatement la technique de Merrifield, qui s'est avérée très fructueuse.

Je suis très reconnaissante à la direction et au corps professoral de l'École des Hautes Etudes Industrielles, qui ont su me donner le goût de la chimie organique.

Je ne voudrais pas oublier de remercier le Directeur et les membres de l'UER de Physique du GEFIRN, qui m'ont permis d'approfondir mes connaissances en physique.

Enfin, c'est pour moi un plaisir d'associer en une même pensée tous mes camarades de laboratoire dont l'amitié m'a souvent été très précieuse et qui, à titres divers, ont contribué à la réalisation de ce travail. Je désire mentionner plus particulièrement Madame M. P. HILDEBRAND qui s'est chargée du travail de dactylographie.

Je voudrais également remercier Madame J. CELEN qui a fait les diapositives et Madame M. C. MONTAIS qui a assuré le tirage de cette thèse.

# P L A N

## INTRODUCTION.

### PREMIER CHAPITRE : PREPARATIONS

#### I GENERALITES SUR LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE. (p1)

##### A. CHOIX DES GROUPEMENTS PROTECTEURS. (p4)

- 1) Protection de la fonction amine.
- 2) Protection de la fonction acide.

##### B. FORMATION DE LA LIAISON PEPTIDIQUE. (p7)

- 1) Activation du carboxyle.
- 2) Activation du partenaire aminé.
- 3) Méthode aux carbodiimides.
- 4) Synthèse en phase solide (Merrifield)

##### C. RACÉMISATION. (p 14)

- 1) Théorie de la racémisation.
- 2) Racémisation lors de l'introduction ou de l'élimination des groupements protecteurs.
- 3) Racémisation lors de la formation de la liaison peptidique.

#### II PREPARATION DES OLIGOMÈRES PAR LA MÉTHODE DE MERRIFIELD. (p20).

##### A. NOTRE SCHEMA REACTIONNEL. (p 20)

##### B. PROCESSUS EXPERIMENTAL. (p 20)

.../...

### III PREPARATION DES OLIGOMERES PAR UNE METHODE CLASSIQUE. (p 30)

#### A. CHOIX DU GROUPEMENT PROTECTEUR (p 30)

- 1) Fonction amine.
- 2) Fonction carboxyle.

#### B. CHOIX DE LA METHODE DE COUPLAGE ET SCHEMA REACTION- NEL. (p 32)

- 1) Méthode de couplage.
- 2) Schéma réactionnel.

#### C. PROCESSUS EXPERIMENTAL. (p 32)

- 1) Ester  $\alpha$  succinimidique du N-tertiobutyloxy-carbonyl L-glutamate de 4 nitrobenzyle.
- 2) Chlorhydrate de l'ester  $\alpha$  succinimidique du L-glutamate de 4 nitrobenzyle.
- 3) Condensation en vue de la formation du dimère protégé.
- 4) Chlorhydrate de l'ester  $\alpha$  succinimidique du di-L-glutamate de 4 nitrobenzyle.
- 5) Condensation en vue de la formation du trimère protégé.

### DEUXIEME CHAPITRE : ETUDE DE L'ACTIVITE OPTIQUE D'OLIGO-L-GLUTAMATES DE 4 NITROBENZYLE.

#### I GENERALITES SUR LA DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE ET LE DICHROISME CIRCULAIRE. (p 39)

##### A. RAPPELS CONCERNANT CES DEUX TECHNIQUES. (p 39)

- 1) Substances optiquement actives.
- 2) Effet Cotton.
- 3) Comparaison entre les techniques de dispersion optique rotatoire et de dichroïsme circulaire.

.../...

B. GRANDEURS MACROSCOPIQUES CARACTERISANT LA DISPERSION  
OPTIQUE ROTATOIRE ET LE DICHROISME CIRCULAIRE. (p 41)

- 1) Dispersion optique rotatoire.
- 2) Dichroïsme circulaire.
- 3) Force rotatoire.

II APPLICATION AUX OLIGO-L-GLUTAMATES DE 4 NITROBENZYLE. (p 45)

A. ETUDE DU CHROMOPHORE EXTRINSEQUE. (p 47)

- 1) Spectres ultra-violet du monomère et des oligomères.
- 2) Spectres dichroïques.
- 3) Conclusion.

B. ETUDE DU CHROMOPHORE INTRINSEQUE. (p 52)

- 1) Conformation des chaînes peptidiques.
- 2) Mécanismes proposés comme étant à l'origine de l'activité optique de petites molécules.
- 3) Cas des peptides.
- 4) Cas des oligo-L-glutamates de 4 nitrobenzyle.
- 5) Conclusion.

CONCLUSION.

--oo 0 oo--

## G L O S S A I R E

DMF : diméthylformamide.  
EDTA : acide éthylène diamine tétracétique.  
t-Boc: tertio-butyloxycarbonyle.  
DCCI : dicyclohexylcarbodiimide.  
DMSO : diméthylsulfoxyde.  
AcOH : acide acétique.  
TMP : triméthylphosphate.  
DOR : dispersion optique rotatoire.  
DC : dichroïsme circulaire.  
 $\lambda$  : longueur d'onde.

--00 0 00--

## INTRODUCTION

Il est très important de connaître la structure des protéines, car celle-ci semble reliée de façon très étroite à leur activité biologique. C'est pourquoi de nombreux chercheurs ont essayé de déterminer cette structure à partir de mesures de dispersion optique rotatoire et de dichroïsme circulaire. Pour l'interprétation des spectres obtenus, on les compare à des courbes d'activité optique de peptides, dont la structure est bien déterminée. Dans ce but, de nombreuses études ont été faites sur les polypeptides et, en particulier, sur les polyglutamates.

Le rôle que joue la chaîne latérale dans la structure secondaire d'un polypeptide étant très mal connu, des études ont été entreprises dans le laboratoire sur des poly-L-glutamates, et sur des poly-L-aspartates sous forme hélice  $\alpha$  portant un chromophore intrinsèquement symétrique dans leur chaîne latérale. Le choix s'est porté sur le groupement nitrobenzyle car d'une part ce groupement est intrinsèquement symétrique; il ne deviendra donc optiquement actif que s'il est perturbé de façon dissymétrique; d'autre part, ce groupement n'absorbe pas dans la région où absorbe le groupement peptidique; son activité optique peut donc être aisément dissociée de celle due au squelette.

Mais ces études n'ont pas permis de dire si l'activité optique du chromophore nitrobenzylique était due au champ asymétrique de l'hélice ou si elle était due à des interactions entre chaînes latérales voisines. Dans ces conditions, il a paru intéressant de synthétiser des oligomères portant des groupements nitrobenzyle afin d'étudier leur activité optique. Notre choix s'est porté sur les oligo-L-glutamates de para nitrobenzyle car de nombreux peptides dérivés de l'acide -L-glutamique ont déjà été synthétisés et étudiés par dispersion optique rotatoire.

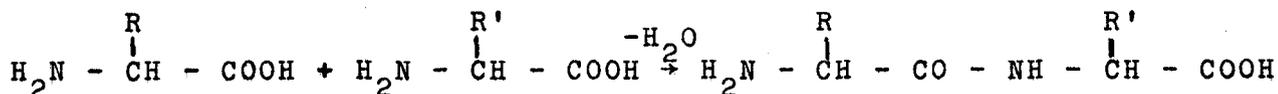
Après avoir synthétisé quelques oligomères, nous avons donc étudié leur structure par dichroïsme circulaire, de façon à connaître l'origine de l'activité optique induite dans le chromophore nitrobenzylique.

P R E M I E R C H A P I T R E

P R E P A R A T I O N S

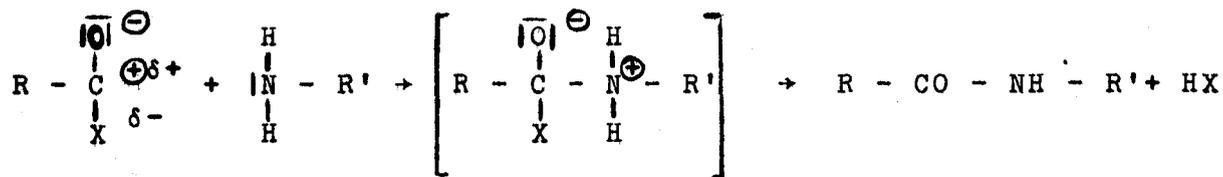
## I GENERALITES SUR LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.

La synthèse peptidique consiste à créer une liaison amide entre le groupement carboxylique d'un acide  $\alpha$  aminé et le groupement amine d'un second acide  $\alpha$  aminé selon le schéma :



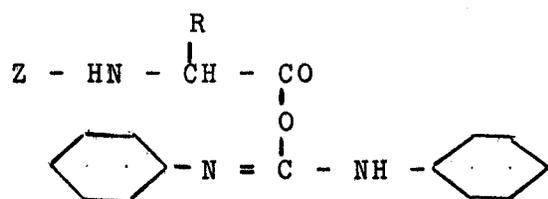
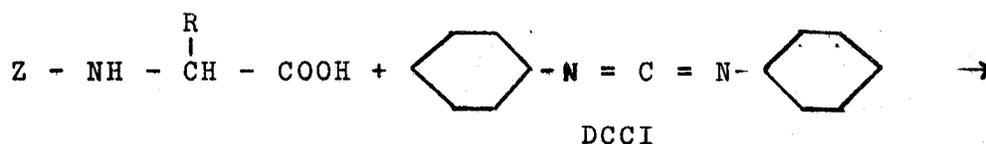
Mais cette réaction ne se fait pas spontanément, sauf à température élevée; il est donc nécessaire de rendre plus réactif l'un des deux partenaires. On peut ainsi activer:

- soit l'acide carboxylique (1) par introduction d'un substituant négatif X. L'atome de carbone, déjà chargé positivement dans la forme polaire du carboxyle, acquiert une charge positive plus importante; l'attaque du groupement aminé, grâce à sa paire d'électrons libres, est alors facilitée :

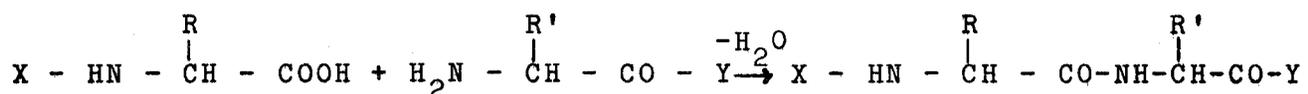


- soit le groupement aminé par acylation. Mais, même dans ce cas, c'est l'atome de carbone qui se trouve finalement chargé positivement. La réaction est alors facilitée par l'arrangement stérique résultant.

En dehors de ces méthodes d'activation, on connaît aussi un certain nombre de "réactifs de couplage", les carbodiimides étant les plus utilisés, ils sont ajoutés au mélange des composés carboxylique et aminé au moment du couplage. De même que dans les cas précédents, il y a, dans une première étape, formation d'un dérivé réactif du composé carboxylique:

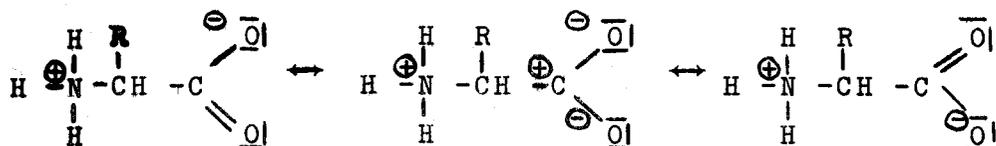


D'autre part, on ne peut pas utiliser des acides  $\alpha$  aminés libres en vue de la synthèse peptidique, car le composé activé réagirait non seulement avec le groupe fonctionnel du second acide  $\alpha$  aminé, mais aussi avec son propre groupement aminé. Le résultat en serait une polycondensation incontrôlée. La synthèse des peptides purs nécessite la protection de tous les groupements fonctionnels qui ne doivent pas réagir dans la réaction désirée



Les résidus utilisés pour ces blocages sont appelés groupements N-protecteurs (X), et groupements C-protecteurs (Y). En plus de leur fonction de protection des groupes aminés et carboxyliques, ces résidus ont pour buts de faciliter le couplage et d'améliorer la solubilité des produits de départ dans les solvants organiques.

En effet, un acide  $\alpha$  aminé existe souvent sous forme ionique; il y a différentes formes mésomères :

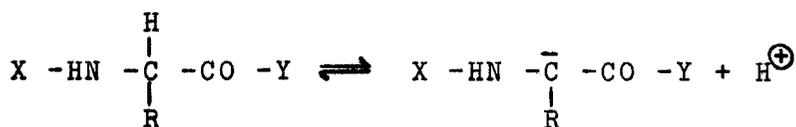


Il serait difficile d'activer le carboxyle sous cette forme ionique et l'addition du dérivé N aminé serait impossible. De plus, les acides  $\alpha$  aminés sont faiblement solubles dans les solvants organiques nécessaires comme milieu réactionnel dans la plupart des réactions de couplage. La substitution d'un de ses groupements fonctionnels ôte à l'acide  $\alpha$  aminé sa capacité d'ionisation. L'autre groupe fonctionnel devient alors utilisable pour la réaction et on a de meilleures solubilités dans les solvants organiques.

Enfin, il faut ajouter que le but de la synthèse peptidique est d'obtenir des produits purs. Pour remplir cette condition, il faut non seulement protéger tous les groupements fonctionnels n'ayant pas à réagir lors du couplage, mais aussi choisir une méthode de couplage telle qu'il n'y ait pas racémisation lors de la réaction.

En effet, à l'exception de la glycine, tous les acides  $\alpha$  aminés ont au moins un carbone asymétrique. La détermination de l'activité optique des acides  $\alpha$  aminés et des peptides pourra donc être utilisée comme critère de pureté. Or, la pureté optique peut être perdue lors de la synthèse, si on ne prend pas certaines précautions.

La racémisation est essentiellement due au fait que le dérivé intermédiaire réactif du composé carboxylique peut perdre un proton sur le carbone  $\alpha$ , puis le fixer à nouveau :



.../...

Même si cet équilibre est fortement déplacé à gauche, on aura racémisation partielle et formation d'un mélange de diastéréoisomères. Il est donc nécessaire de tenir compte de ce problème lors du choix des groupements protecteurs et de la méthode de couplage en vue de la synthèse.

#### A. CHOIX DES GROUPEMENTS PROTECTEURS.

Il n'existe pas de méthode générale de protection en synthèse peptidique; dans chaque cas, il est nécessaire de choisir les groupements protecteurs les plus appropriés.

Ce choix est délicat, car il faut que ceux-ci puissent être facilement mis en place, et qu'ils puissent aussi être éliminés facilement et sélectivement, de façon à obtenir des dérivés pouvant réagir dans des étapes de synthèse ultérieures. D'autre part il faut veiller à garder les produits optiquement purs.

##### 1) Protection de la fonction amine (2,3,4).

Il s'agit ici de diminuer la disponibilité du doublet électronique libre. Pour cela, on peut utiliser des groupements protecteurs de différents types :

a) Groupements du type acyle (formyle (5), trifluoroacétyl (6), phtalyle (7), orthonitrophénylsulfényl (8), tosyle (9)...). Certains, comme les benzoyles ou les acétyles, ne peuvent plus être enlevés, une fois la liaison peptidique formée, sans que celle-ci ne se rompe simultanément.

b) Groupements du type alkyle ( trityl (10), mono- et dibenzyle (11) ). On peut encore citer dans cette catégorie le groupe trialkylsilane (12), qui n'est pas utilisé dans la pratique. Ce sont des groupements encombrants en général.

c) Groupements du type uréthane (benzyloxycarbonyl (13) et ses dérivés, tertiobutyloxycarbonyl (14) et d'autres groupes uréthanes aliphatiques, cyclopentyl- et cyclohexyloxycarbonyl (15)...).

d) On peut citer aussi la protonation de la fonction amine (16); mais il ne s'agit pas à proprement parler d'un groupement protecteur.

e) Quelques autres groupes ont été cités dans la littérature ces dernières années (tertioamyloxy-carbonyle (17), furfuryloxy-carbonyle (18), diisopropylméthoxy-carbonyle (19) ...).

Il est donc assez difficile de choisir un groupement protecteur pour la fonction amine. Les groupements les plus souvent utilisés sont répertoriés dans le tableau I, ainsi que leurs modes de greffage et d'élimination. On peut leur adjoindre quelques groupes du type alkyle, tels que formyle (Form), trifluoroacétyle (Tfa) et phtalyle (Phth).

## 2) Protection de la fonction acide (2,3,4).

L'énergie de formation d'une liaison peptidique est fonction directe des possibilités d'ionisation des fonctions acides et basiques du peptide formé; il a été montré expérimentalement que cette énergie de formation est moins élevée si la liaison peptidique est incluse dans une structure déjà complexe. C'est pour cela que l'on cherche à supprimer les possibilités d'ionisation des fonctions carboxyliques par le choix d'un groupement protecteur approprié.

### a) Estérification.

Différents esters ont été utilisés pour protéger le carboxyle : méthylique ou éthylique (20), tertiobutylique (21), benzylique (22), paranitrobenzylique (23), paraméthoxybenzylique (24), phtalimidométhylique (25)...

### b) Formation d'amides ou d'hydrazides substitués.

La différence chimique entre liaison peptidique et liaison amide est insignifiante. D'autre part, la formation d'amide n'est pas réversible en général (26).

Quant aux hydrazides de peptides libres, ils servent de point de départ à des polycondensations ou à des cyclisations (27).

.../...

TABLEAU I: Groupes protecteurs de la fonction amine  
les plus usités en synthèse  
peptidique.

Nom du groupement protecteur	Formule	Modes de greffage	Modes d'élimination.
I { Benzyloxycarbonyle (encore appelé carbobenzoxy) Z ou Cbo  Tertio-butyloxycarbonyle Boc		Action du chlorure de benzyloxycarbonyle sur l'acide $\alpha$ aminé en solution alcaline aqueuse.	- Action de l'acide bromhydrique 2N dans un solvant organique à température ordinaire. - Hydrogénolyse; catalyseur au palladium.
	$(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-\text{N}~$	- Isocyanates - Cyanoformate - Azidoformate - Carbonate d'aryl-alkyle.	- Traitement à l'acide trifluoroacétique anhydre ou à l'acide chlorhydrique 2N à température ambiante.
II { Ortho-nitrophénylsulfényle Nps  Para-toluènesulfonyle (encore appelé tosylo) Tos		Action du chlorure d'ortho-nitrophénylsulfényle, en présence d'une base, sur le sel de sodium de l'acide $\alpha$ aminé.	- Traitement aux acides faibles ou dilués à température ordinaire.
	$\text{CH}_3-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-\text{N}~$	Action du chlorure de p-toluène-sulfonyle sur l'acide $\alpha$ aminé en présence d'une base.	- Réduction par le sodium dans l'ammoniac liquide. - Action prolongée de l'acide bromhydrique dans l'acide acétique à température ambiante.
III { Triphénylméthyle (encore appelé trityle) Trt		Action du chlorure de trityle sur les esters des acides $\alpha$ aminés dans les solvants organiques en présence d'une base.	- Action des acides dilués - Hydrogénation catalytique.

I typeuréthane

II type acyle

III type alkyle

### c) Formation de sels.

Les sels d'acides  $\alpha$  aminés ne sont solubles que dans l'eau. La réaction de couplage doit donc obligatoirement se faire en milieu aqueux et il y a de gros risques d'hydrolyse du composé actif (28).

Quant aux sels que peuvent former les peptides relativement longs avec des bases organiques, ils sont souvent solubles dans le diméthylformamide. Il n'y a donc plus de risque d'hydrolyse et on les utilise parfois en synthèse peptidique.

Il faut encore noter que, dans le cas des acides  $\alpha$  aminés dicarboxyliques, il est nécessaire de protéger sélectivement les deux fonctions carboxyliques, de façon à éviter l'apparition d'un mélange de peptides en  $\alpha$  et en  $\omega$  lors de la condensation.

## B. FORMATION DE LA LIAISON PEPTIDIQUE.

Nous savons que la création d'une liaison peptidique nécessite non seulement le blocage des fonctions aminées ou carboxyliques qui ne doivent pas réagir, mais aussi un apport d'énergie nécessaire à la condensation. Cette fourniture d'énergie a été longtemps réalisée par activation de la fonction carboxylique et, jusqu'en 1950, elle a consisté presque exclusivement en la formation d'un azide ou d'un chlorure d'acide.

### 1) Activation du carboxyle.

Il existe quatre méthodes de ce type :

#### a) Méthode aux azides, préconisée par Curtius (29).

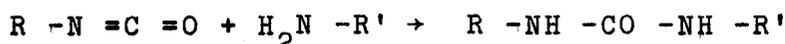
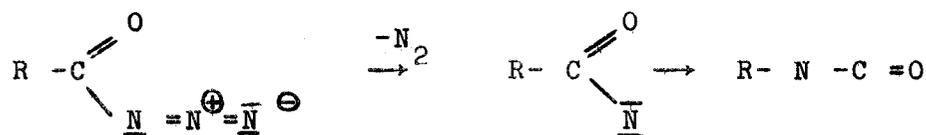
La réaction s'écrit :  $R-CO-N_3 + H_2N-R' \rightarrow R-CO-NH-R'$

C'est une des rares méthodes de synthèse peptidique qui ne provoque pas de racémisation détectable du partenaire carboxylique, quelle que soit la nature de celui-ci. Bien qu'il s'agisse d'un procédé conduisant à de faibles rendements, c'est une technique de couplage encore largement utilisée.

.../...

Les principales réactions secondaires sont :

. la formation d'isocyanate, par suite du réarrangement de Curtius. Par réaction avec le composé aminé, il y a formation d'un dérivé de l'urée :



. l'hydrolyse de l'azide avec formation d'un amide:



b) Méthode aux chlorures d'acides, développée par Fischer (1)

Le couplage se fait selon la réaction suivante :



Cette méthode a été très employée, surtout aux débuts de la synthèse peptidique. Mais elle présente de très gros inconvénients :

. l'utilisation de ce procédé de couplage limite les possibilités de protection de la fonction amine : certains chlorures d'acides  $\alpha$  aminés N protégés ne sont pas stables, lorsqu'on les conserve longtemps à température ambiante.

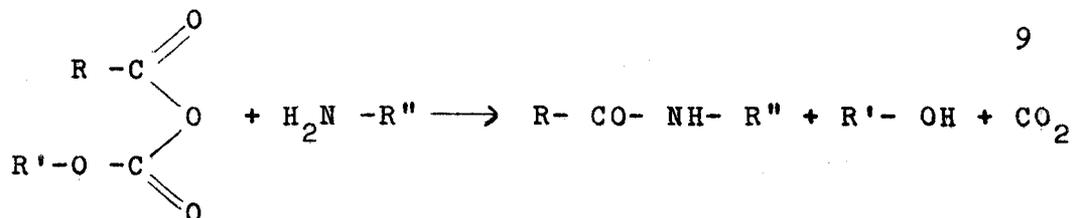
. dans la plupart des cas, les halogénures de N acyl acides  $\alpha$  aminés ne conservent pas la configuration initiale du centre d'asymétrie.

Par suite de ces graves inconvénients, cette méthode est à peu près complètement abandonnée de nos jours.

c) Méthode aux anhydrides mixtes, préconisée par Wieland (30) et Boissonnas (31)

On a alors formation de la liaison peptidique suivant l'équation :

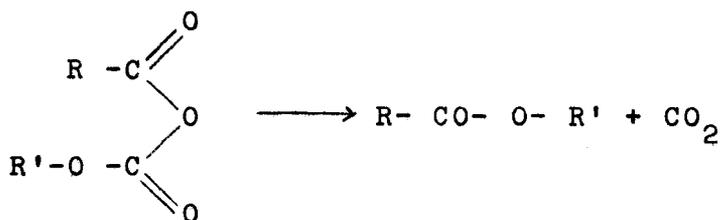
.../...



Il existe de nombreux types d'anhydrides mixtes. Celui qui est le plus couramment employé est obtenu par action du chloroformiate d'isobutyle sur l'acide  $\alpha$  aminé N protégé en présence d'une base à basse température. Cette méthode est très souvent utilisée à cause de la facilité d'obtention de ces anhydrides mixtes.

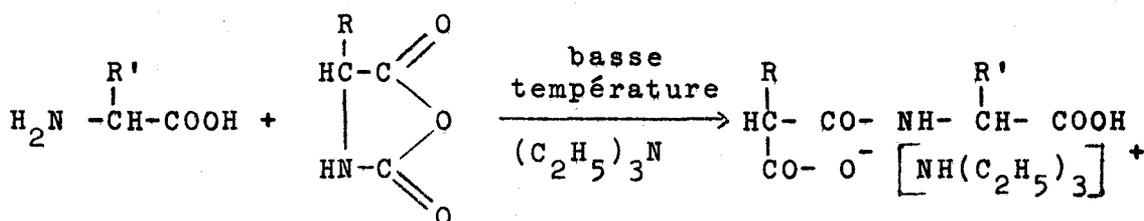
Néanmoins il faut prendre quelques précautions lorsqu'on utilise ce procédé de couplage :

. il faut opérer à basse température, de façon à éviter la décomposition de l'anhydride mixte en ester :



. il faut constamment travailler en milieu anhydre, de façon à éviter une hydrolyse toujours possible.

Quand on parle des anhydrides mixtes, il faut citer encore les N-carboxyanhydrides (3-alkyloxazolidine-2,5 diones), appelés aussi anhydrides de Leuchs. On les obtient par action du phosgène sur un acide  $\alpha$  aminé en suspension dans un solvant organique inerte. Ces dérivés sont assez peu utilisés en synthèse peptidique, bien que quelques tentatives aient été effectuées (32,33). On a alors :



En laissant revenir à température ambiante, on constate qu'il y a dissociation du sel de l'acide carbamique et décarboxylation. On obtient donc le peptide désiré.

.../...

Cependant, les anhydrides de Leuchs sont plus couramment utilisés pour synthétiser des polypeptides. La polymérisation se fait à température ambiante; il n'y a pas racémisation.

d) Méthode aux esters activés (Bodanszky)(34).

Ces esters ne sont pas aussi réactifs que les chlorures d'acides, les azides ou les anhydrides mixtes. Cependant, on a pu synthétiser par ces dérivés de nombreux peptides complexes, ainsi que des peptides cycliques.

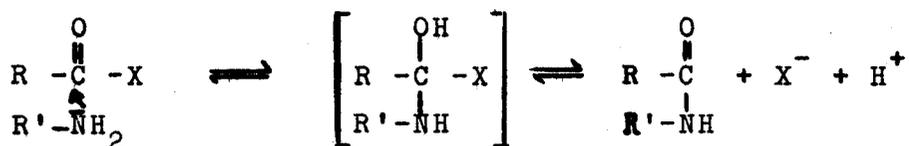
Les esters de ce type les plus souvent utilisés sont les esters nitrophényliques, pentachlorophényliques, ainsi que ceux de la N-hydroxysuccinimide. Citons encore les esters cyanométhylés, ainsi que les thiolesters.

La réaction de couplage est une réaction du second ordre. Par conséquent, sa vitesse dépend de la concentration des réactifs. On a donc intérêt à travailler avec un excès de l'un des réactifs, de façon à avoir une vitesse réactionnelle non négligeable au fur et à mesure que progresse le couplage. Les rendements en peptides sont généralement élevés et cette méthode de synthèse connaît un grand succès.

2) Activation du partenaire aminé.

Les méthodes de couplage, que nous venons d'examiner, nécessitent la formation d'un dérivé intermédiaire réactif du groupement carboxylique. Ces méthodes sont basées sur une augmentation de la réactivité du carboxyle, due à un accroissement des propriétés électrophiles du carbone portant le carbonyle.

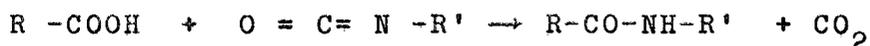
La réaction globale s'écrit en effet :



Plus le groupe clivé X est électronégatif, ou moins X est basique, ou plus XH est acide, plus la formation d'amide sera favorisée et l'équilibre déplacé vers la droite.

On a quelquefois pensé à augmenter le caractère nucléophile du groupement amine du partenaire aminé. Néanmoins, toutes les méthodes utilisées dans ce but sont des cas particuliers de la méthode aux anhydrides mixtes.

a) Méthode aux isocyanates (35)



La pureté optique du produit obtenu dépend du groupement protecteur utilisé pour le carboxyle.

b) Phosphazo-amides (36)



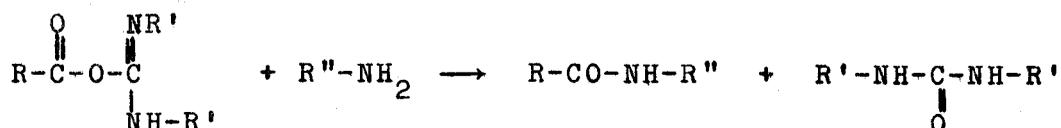
La réaction procède, ici aussi, comme s'il s'agissait d'un anhydride mixte. Cette méthode est très peu utilisée en synthèse peptidique.

3) Méthode aux carbodiimides.

Depuis que Sheehan et Hess ont introduit, en 1955, les carbodiimides N,N'-dialkylées, cette méthode de couplage a connu un succès grandissant (37). Elle réalise la formation de la liaison peptidique à la température du laboratoire et avec d'excellents rendements. L'élimination d'une molécule d'eau, aux dépens du carboxyle de l'un des acides  $\alpha$  aminés et de la fonction aminée de l'autre, s'effectue grâce à la transformation simultanée d'une carbodiimide en une uréide disubstituée.

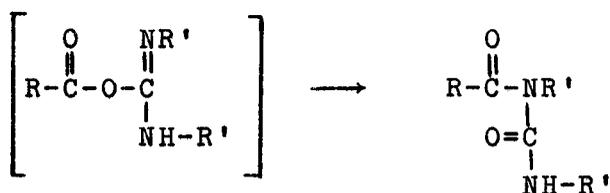
Il y a formation intermédiaire d'une O-acylurée par réaction avec l'acide carboxylique, puis attaque nucléophile du partenaire aminé selon le schéma :





Cette méthode présente cependant quelques inconvénients :

. si on est en absence de réactifs nucléophiles, ou si la réactivité des nucléophiles présents est faible ou amoindrie, l'O-acylurée intermédiaire peut se réarranger en une N-acylurée, plus stable et qui ne réagit plus avec les nucléophiles.



On peut éviter ce réarrangement en utilisant l'acétonitrile ou le chlorure de méthylène comme solvants (38).

. d'autre part, quand on utilise la dicyclohexylcarbodiimide comme agent de couplage, il est très difficile d'éliminer complètement l'urée disubstituée du milieu réactionnel. En effet, la solubilité de ce sous-produit dans les solvants organiques est augmentée du fait de la présence d'autres substances en solution. On ne pourra éliminer complètement la dicyclohexylurée que dans les cas où il est possible de recristalliser le peptide à partir de l'alcool.

#### 4) Synthèse en phase solide (Merrifield)(39).

La méthode de Merrifield est caractérisée par l'addition d'un seul résidu à la fois, sans purification intermédiaire. Elle repose sur le fait que l'on peut assembler des acides  $\alpha$  aminés en chaîne peptidique tandis que l'une des extrémités de la chaîne est liée par covalence à un support insoluble. Le support choisi par Merrifield est composé de grains d'une résine synthétique, préparée par copolymérisation du styrène avec 2% de divinylbenzène. Cette résine est donc réticulée et, par suite, complètement insoluble dans tous

.../...

les solvants usuels. De plus, le faible taux de réticulation lui permet de gonfler beaucoup dans certains solvants organiques, ce qui permet une pénétration satisfaisante des solvants et des réactifs jusqu'aux extrémités des chaînes peptidiques en formation portées par le polymère.

La méthode est basée sur l'utilisation d'un ester benzylique insoluble d'un acide  $\alpha$  aminé ou d'un peptide sur lequel on fixe un dérivé N-tertiobutyloxycarbonylé d'un acide  $\alpha$  aminé par le procédé à la dicyclohexylcarbodiimide ou par celui aux esters actifs. Après élimination de la protection de la fonction amine par un réactif approprié, on peut coupler un second acide  $\alpha$  aminé N protégé au premier précédemment fixé sur le polymère. En répétant les étapes de déprotection et de couplage, on peut construire ainsi n'importe quel peptide.

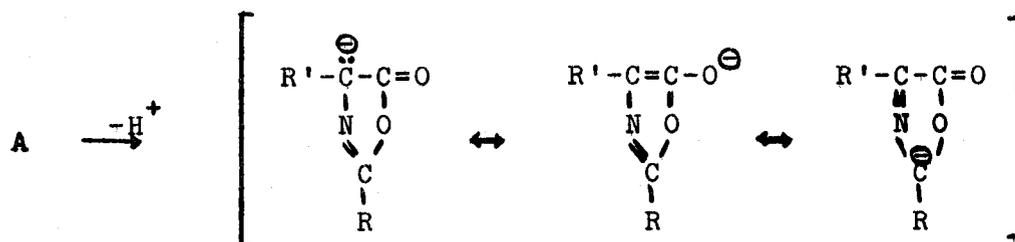
Ce procédé de synthèse, dans ses principes, reste un procédé classique, car il utilise pour l'inactivation du carboxyle terminal un dérivé benzylique et pour celle de la fonction amine le radical tertibutyloxycarbonyle.

Les esters benzyliques ont été choisis d'une part parce que la liaison covalente qu'ils forment avec le polymère reste inchangée lors des réactions de couplage et d'élimination des groupements protecteurs; et d'autre part, parce qu'on peut détacher le peptide de son support en rompant cette liaison ester par action de l'acide bromhydrique sec dans un milieu réactionnel convenable.

Pour que cette technique puisse être utilisée de façon satisfaisante, il faut que toutes les étapes de couplage et d'élimination de groupes protecteurs puissent être effectuées avec un rendement quantitatif, car les défauts accidentels de construction résultant de réactions incomplètes sont conservés jusqu'à ce que le peptide soit finalement détaché de son support.

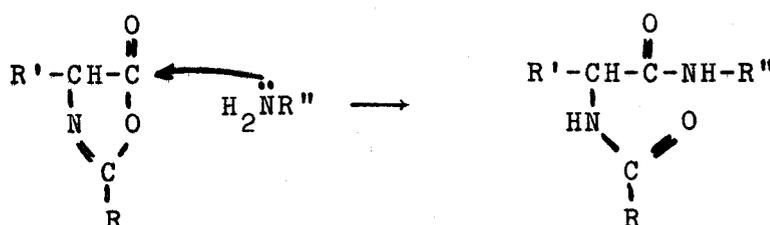
Dans cette méthode, on construit la chaîne peptidique à partir de son extrémité carboxylique. Ceci présente un très grand avantage, à savoir que l'on n'observe pas de racémisation. En effet, seul le groupement carboxylique de l'acide  $\alpha$  aminé N protégé est activé en vue du couplage, jamais le carbo-





Si X est un substituant électronégatif, ce qui est toujours le cas en synthèse peptidique, on peut supposer que l'augmentation du caractère électrophile du carbone 5 facilitera l'attaque de l'oxygène du carbonyle 1. L'intermédiaire cyclique résultant est stabilisé par élimination de HX. Ensuite, l'oxazolone formée perd un proton en présence d'une base, conduisant à plusieurs structures du type oxazole qui sont en résonance; on peut ainsi avoir racémisation.

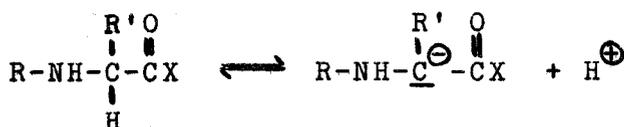
La formation d'une quantité, même minime, d'oxazolone est suffisante pour qu'il y ait racémisation; toutefois, la cyclisation observée ne gêne pas le couplage peptidique, car les 5-oxazolones réagissent aussi avec les amines pour former des amides:



De nombreuses études (40, 41, 42) confirment ce mécanisme de racémisation.

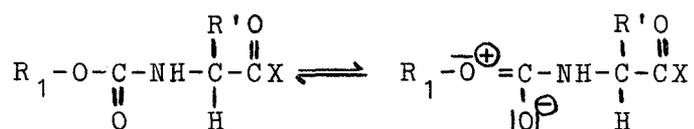
b) Arrachement direct du proton.

Cependant, on a aussi observé la racémisation de dérivés carboxyliques optiquement actifs dans des circonstances telles que la formation d'azlactone est impossible ou improbable. Il y aurait alors ionisation directe du proton porté par le carbone  $\alpha$  du dérivé de l'acide  $\alpha$  aminé :



.../...

La stabilité de la liaison C-H est fortement influencée par le substituant R. Il peut ainsi y avoir stabilisation de l'hydrogène dans le cas des groupements protecteurs du type uréthane, car ces groupements existent sous plusieurs formes mésomères :



Il faut dire que la racémisation par arrachement direct du proton n'est pas rencontrée couramment en chimie peptidique, car elle requiert un milieu fortement basique et des dérivés d'acides  $\alpha$  aminés particuliers.

## 2) Racémisation lors de l'introduction ou de l'élimination des groupements protecteurs.

Le fait que l'on observe ou non une racémisation lors de l'introduction ou de l'élimination des groupements protecteurs dépend essentiellement des conditions réactionnelles. Ainsi, il n'y a pas racémisation lorsque la fonction amine est protégée par des groupements du type uréthane ou des groupements p-toluènesulfonyle, trifluoroacétyle ou formyle; par contre, on observe une racémisation partielle lors de l'introduction des groupements trityle ou N-phthaloyle. Enfin, la perte d'activité optique est vraiment très importante dans le cas des groupements benzoyle et acétyle.

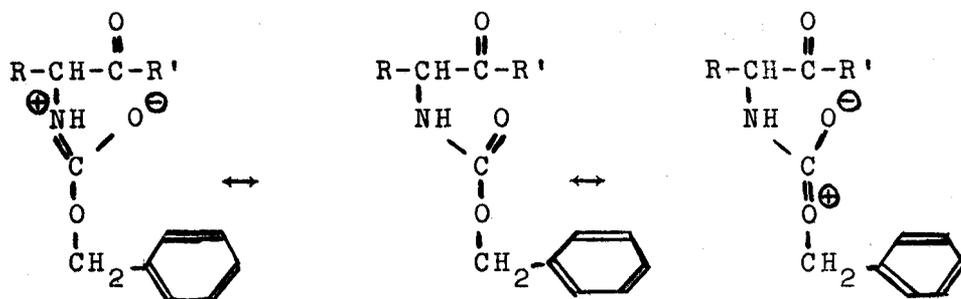
Les méthodes habituellement utilisées pour éliminer les groupements protecteurs de la fonction amine sont telles que l'on n'observe pratiquement pas de racémisation. La pureté optique est conservée également lors de l'estérification des acides  $\alpha$  aminés catalysée par les acides; par contre, il semble qu'il y ait racémisation lorsqu'on élimine ces fonctions esters en milieu basique.

### 3) Racémisation lors de la formation de la liaison peptidique.

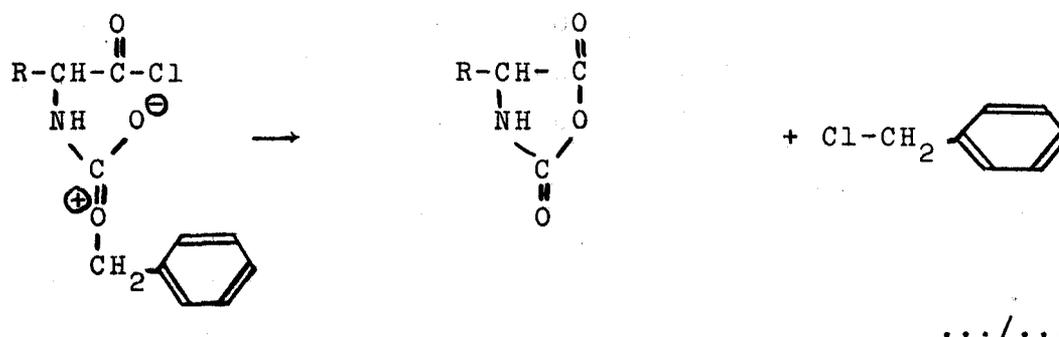
C'est essentiellement lors du couplage que l'on a le plus de risques de perte de la pureté optique. Parmi les nombreux facteurs qui peuvent influencer la racémisation lors de cette étape, les plus importants sont la nature du groupement protecteur du dérivé carboxylique, la nature de l'acide  $\alpha$  aminé terminal du composé carboxylique, et la méthode de couplage employée.

a) Influence du groupement protecteur de la fonction amine.

On a remarqué que l'utilisation du groupement benzyloxycarbonyle permet d'éviter la racémisation lors de la formation de la liaison peptidique. Cela s'explique par le fait qu'il ne peut y avoir formation intermédiaire d'une oxazolone, lorsqu'on utilise ce groupement : il y a polarisation de la liaison carbonyle des acides  $\alpha$  aminés benzyloxy-carbonylés par suite de la possibilité d'existence de différentes structures entrant en résonance :



On n'observera une cyclisation que dans le cas où le substituant  $R'$  est fortement électronégatif; il y aura alors formation d'un N-carboxyanhydride et non d'une oxazolone :



On peut noter également que l'on n'observe pas de racémisation lors de l'utilisation d'autres groupements protecteurs de la fonction amine, tels que les groupements phtalyle, p-toluènesulfonyle, triphénylméthyle, ou o-nitrophénylsulfé-nyle, qui sont tous assez encombrants ....

b) Influence de la nature de l'acide  $\alpha$  aminé terminal.

Les dérivés de la proline ne se racémisent pas facilement, car un dérivé N-acylé de la proline, où le groupement N-H est absent, ne peut pas se cycliser pour former une azlactone.

Par contre, on a remarqué que les acides  $\alpha$  aminés portant un substituant électronégatif en  $\beta$ , tels que la cystéine, l'acide aspartique, la tyrosine, etc..., ont une fâcheuse tendance à se racémiser. On pense que ces substituants électro-négatifs en position  $\beta$  facilitent l'élimination d'un proton porté par le carbone en  $\alpha$ , d'où formation d'isomères optiques.

c) Influence de la méthode de couplage employée.

Mis à part la méthode aux azides et celle de Merrifield, toutes les méthodes de couplage classiques utilisées en synthèse peptidique entraînent une racémisation du dérivé obtenu; le degré de racémisation est variable suivant les conditions réactionnelles :

-il est minimisé par l'emploi de solvants aussi peu polaires que possible;

-il est favorisé par la présence d'une base quelconque ou par une élévation de la température.

Si l'on utilise pour le couplage la méthode à l'ester de p-nitrophénol, on peut éviter la racémisation si l'on travaille dans des conditions optima, à savoir l'utilisation d'esters libres dans des solvants non polaires. Si l'on travaille dans de moins bonnes conditions, on peut avoir des pourcentages de racémisation de 20% ou plus suivant les cas.

Dans le cas de la méthode à la N,N' dicyclohexylcarbo-diimide, on n'observe pratiquement pas de racémisation si l'on travaille à  $-5^{\circ}\text{C}$  dans des solvants non polaires en utilisant des esters libres. Pour cette méthode, l'influence du solvant

.../...

est considérable; le diméthylformamide est un solvant très défavorable. En travaillant à température ambiante, on a pu observer un taux de racémisation de 50%.

En attachant suffisamment d'importance aux facteurs influençant la racémisation, on peut choisir des procédés de couplage permettant de réaliser des synthèses peptidiques avec un minimum de racémisation.

## II PREPARATION DES OLIGOMERES PAR LA METHODE DE MERRIFIELD.

### A. NOTRE SCHEMA REACTIONNEL.(43).

Le polymère utilisé ("Merrifield polymer" Fluka, 200-400 mesh) est un copolymère styrène-2% divinylbenzène, portant des groupements réactifs chlorométhylés.

Le processus de synthèse en phase solide se décompose en trois grandes parties : fixation du premier acide  $\alpha$  aminé à la résine, déprotection de cet acide  $\alpha$  aminé et greffage d'un second acide  $\alpha$  aminé ( ce processus pouvant se répéter autant de fois qu'on le désire jusqu'à obtention du peptide voulu), séparation du peptide de son support (Figure 1).

Le protocole technique que nous utilisons est celui décrit par Stewart et coll.(44): il est constitué d'une succession de lavages et de contacts par agitation de la résine dans différents systèmes solvants et réactifs; chacun des solvants a pour rôles d'éliminer le réactif ou le solvant précédent et de préparer l'action du réactif par lavages à l'aide du solvant utilisé pour ce réactif. Le temps de réaction est important à considérer; pour s'assurer d'un rendement aussi voisin que possible de 100%, on utilise des temps de réaction relativement longs.

### B. PROCESSUS EXPERIMENTAL.

1) Synthèse du N-tertio-butyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitro benzyle (Figure 2).

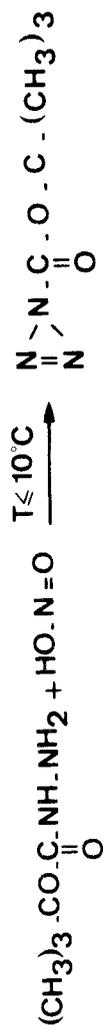
a) Préparation de l'azide de tertio-butyloxycarbonyle(45)

On refroidit dans un bain de glace une solution de 6,84g de carbazate de tertio-butyloxycarbonyle (51,9mmole)

.../...



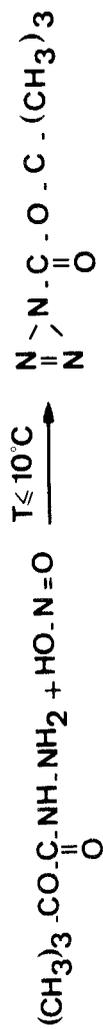
Figure 2  
 Synthèse du N - tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle



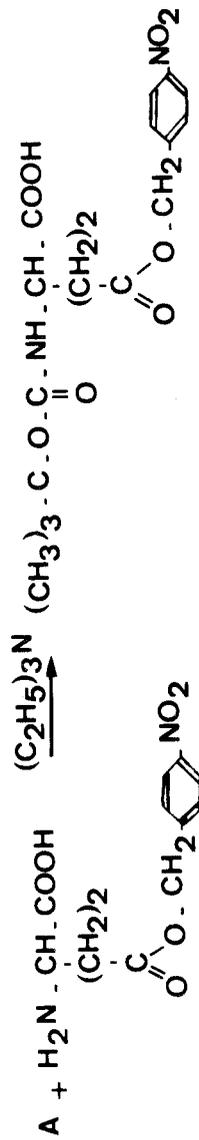
A



Figure 2  
 Synthèse du N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle



A



dans 5,72 ml d'acide acétique glacial et 9,5 ml d'eau. Tout en agitant vigoureusement cette solution et en maintenant la température du bain vers 5 à 10°C, on y ajoute en vingt minutes 40 ml d'une solution de sulfite de sodium à 10%. On laisse encore agiter le mélange à froid pendant une demi-heure; puis on y ajoute 10 ml d'eau. On sépare alors la couche azide jaune d'or par décantation et on extrait la couche aqueuse avec quatre fois 15 ml d'éther éthylique. Les couches organiques mélangées sont ensuite lavées trois fois avec 15 ml d'eau et trois fois avec 15 ml de bicarbonate de sodium 1M. On sèche alors la solution jaune pâle sur du sulfate de magnésium. Puis on élimine le solvant au rotavapor. Il faut prendre garde à ne pas trop élever la température du bain-marie, car cet azide est un dérivé explosif. On obtient ainsi 6 cm<sup>3</sup> d'azide, soit un rendement de 82%.

b) Synthèse du N-tertiobutyloxycarbonyl-L-glutamate de 4 nitrobenzyle (43,46).

A une suspension de 9,52g (34 mmole) de L glutamate de 4 nitrobenzyle (47) dans 230 cm<sup>3</sup> de DMSO, on ajoute successivement 12,48 ml (92 mmole) de triéthylamine et 6,93ml (46 mmole) d'azide de tertibutyloxycarbonyle. Ce mélange est agité pendant 20 heures à 25°C. On dilue alors la solution avec trois volumes d'eau et on extrait trois fois à l'éther éthylique pour éliminer l'azide qui n'a pas réagi. Puis on refroidit la phase aqueuse; on acidifie avec l'acide citrique jusqu'à pH=3,5 et on extrait de nombreuses fois à l'acétate d'éthyle. On lave ensuite les couches organiques par l'eau, on sèche sur sulfate de magnésium et on élimine le solvant au rotavapor. On obtient ainsi une huile, qui cristallise par addition de DMSO. On recristallise le N-tertibutyloxy-carbonyl L-glutamate de 4 nitrobenzyle à partir de l'acétate d'éthyle. On obtient ainsi 8,29g de produit après deux recristallisations, soit un rendement de 53,3%.

F = 104-105 °C (littérature : 104-105°C (46)).

Le produit cristallise avec une molécule de DMSO, que l'on peut doser par la méthode préconisée par Allenmark (48).

.../...

## Résultats de l'analyse élémentaire :

	C	H	O	N	S
Calculé	49,6	6,1	31,3	6,1	7,0
Trouvé	49,6	6,2	31,5	6,1	6,7

Le noyau paranitrobenzyle absorbe dans l'ultra-violet;

$$\epsilon_{270\text{m}\mu} = 10\,700 \quad (c = 0,050\text{g.l}^{-1}; \text{ solvant: dioxanne}) \quad (\text{Figure 3})$$

20,5

( $\alpha$ )  $578 = -7,4^\circ$  ( $c = 1,042$ ; solvant  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (littérature:  $-8^\circ$ ,  
température :  $22^\circ\text{C}$  (46))

On peut constater que le produit est pur par chromatographie en couche mince. L'éluant utilisé est le mélange :  $\text{CHCl}_3$ /  
 $\text{CH}_3\text{OH}/\text{AcOH}$  dans les rapports 42,5/5/2,5 en volumes. On obtient ainsi ;  $R_f = 0,96$ .

c) Préparation du sel de dicyclohexylammonium du N-tertio-butyloxy-carbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle (49).

On dissout 4,60g (10 mmole) de N-tertio-butyloxy-carbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle dans 30 ml d'éther éthylique sec. On traite la solution résultante à température ambiante avec 2 ml de dicyclohexylamine (10 mmole) tout en maintenant une agitation vigoureuse. Un précipité apparaît au bout de 10 minutes. On recristallise le produit à partir de l'eau bouillante. On obtient ainsi 4,2g de sel de dicyclohexylammonium de notre dérivé, soit un rendement de 74,5%.

$F = 146-150^\circ\text{C}$  (littérature:  $144-146^\circ\text{C}$  (50)

$146-148^\circ\text{C}$  (49))

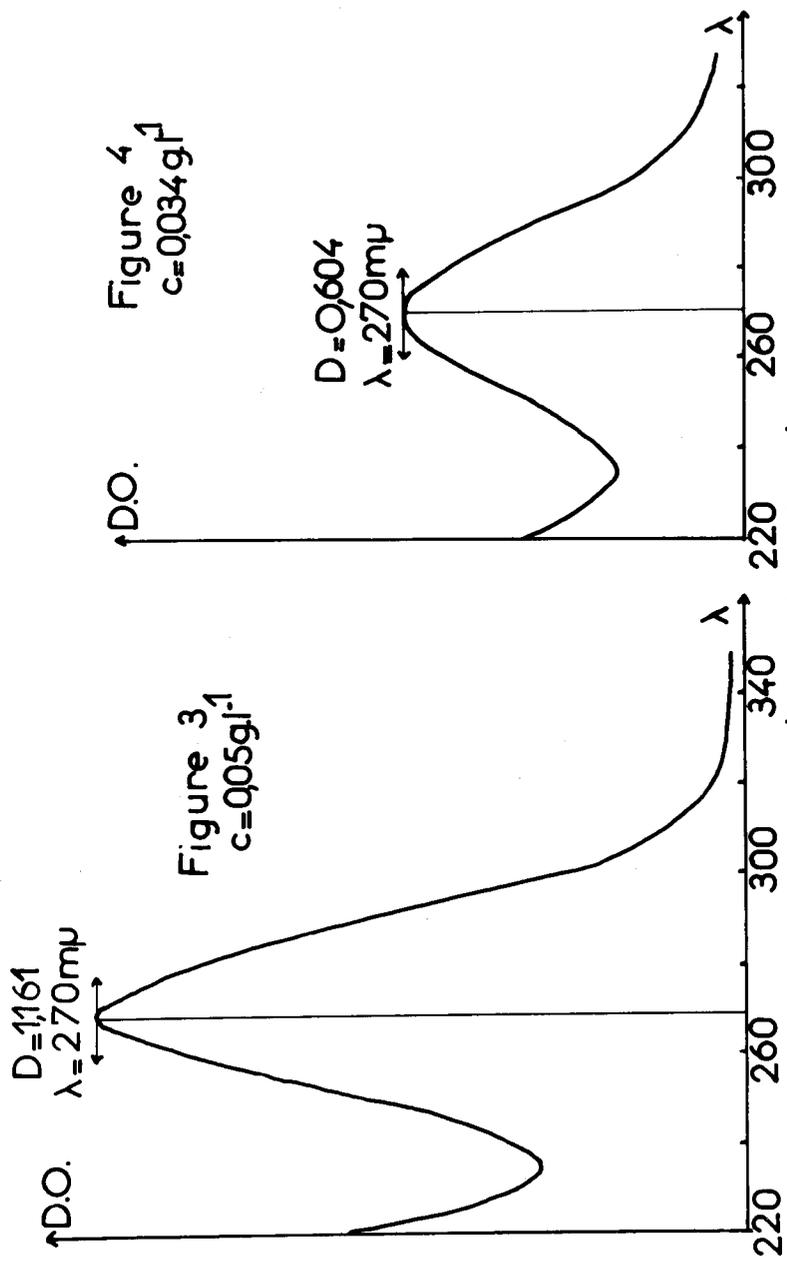
Le noyau paranitrobenzyle absorbe dans l'ultra-violet :

$$\epsilon_{270\text{m}\mu} = 10\,000 \quad (c = 0,034 \text{ g.l}^{-1}; \text{ solvant: dioxanne}) \quad (\text{figure 4}).$$

## 2) Préparation des oligomères par la méthode de Merrifield.

Pour ces synthèses, on suit le schéma général indiqué par la figure 1. La résine utilisée porte 0,7 milli-équivalents Cl par gramme de résine, dosés par la méthode de Volhard (51).

.../...



Spectres ultra-violet dans le dioxane.



a) Greffage du premier acide  $\alpha$  aminé.

Avant de pouvoir procéder au greffage proprement dit, il faut d'une part faire gonfler la résine dans un milieu convenable (48 heures dans du chlorure de méthylène), d'autre part fabriquer le sel de triéthylammonium de notre acide  $\alpha$  aminé N protégé.

. Libération du N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle (49).

On part de 2,215g (3,9 mmole) du sel de dicyclohexylammonium du N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle, que l'on mélange avec 1,472g (7,0 mmole) d'acide citrique monohydraté en suspension dans 25 ml d'acétate d'éthyle et 15 ml d'eau. On agite vigoureusement le mélange pendant 30 minutes (on constate qu'au bout de 5 minutes le produit passe en solution). On extrait alors la couche aqueuse avec beaucoup d'acétate d'éthyle; on lave les couches organiques à l'eau et on les sèche sur sulfate de magnésium. On évapore alors le solvant au rotavapor; on obtient ainsi le N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle sous forme d'une huile.

. Préparation du sel de triéthylammonium de notre acide  $\alpha$  aminé N protégé.

On traite 3,824g de notre dérivé huileux (0,01mole) en suspension dans 25 ml d'acétate d'éthyle par 1,40ml (0,01mole) de triéthylamine fraîchement distillée. Le sel obtenu se solubilise dans l'acétate d'éthyle. On peut alors éliminer le solvant au rotavapor et on récupère ainsi une huile, qui cristallise au bout de quelques heures à température ambiante.

. Mise en route de l'attachement du premier acide  $\alpha$  aminé au polymère support.

On fait bouillir à reflux pendant 48heures au bain d'huile porté à 90°C un mélange de 1g de résine chlorométhylée (0,7 milliéquivalents Cl), 0,34g (0,7 mmole) du sel de triéthylammonium de notre acide  $\alpha$  aminé N protégé en suspension dans 10 ml d'éthanol absolu. On filtre alors la résine sur verre fritté et on la lave successivement avec de l'éthanol absolu, de l'eau, du méthanol et du chlorure de méthylène, trois

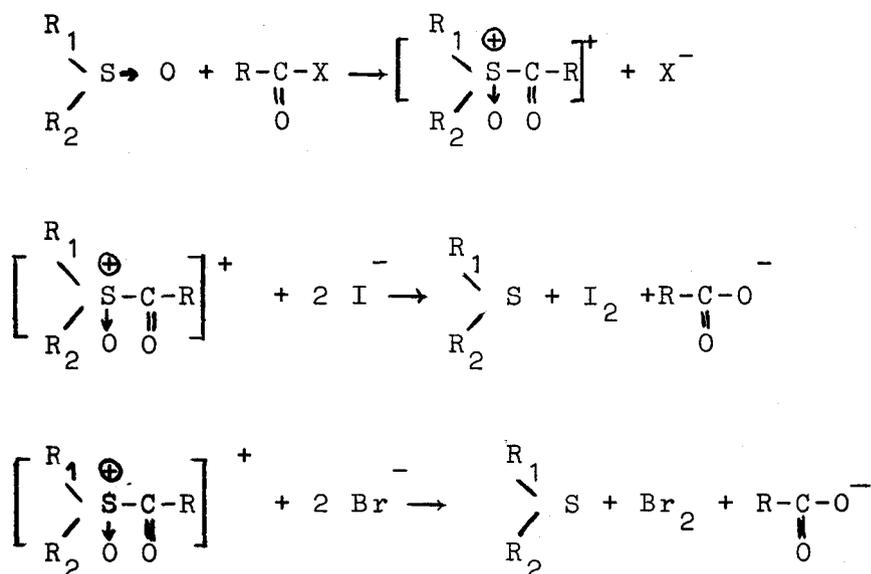
.../...

fois avec chaque solvant en laissant à chaque fois un temps de contact suffisant pour permettre aux différents solvants de pénétrer à l'intérieur du réseau de polymère et aux solutés de diffuser à l'extérieur. Après avoir décanté plusieurs fois la résine en suspension dans le chlorure de méthylène, de façon à éliminer les grains les plus petits, on la sèche sous vide jusqu'à obtenir un poids constant.

. Dosages du dérivé N-tertiobutyloxycarbonylé accroché à la résine.

- On peut doser la fonction sulfoxyde dans le filtrat après l'accrochage.

Pour cela, on utilise la méthode décrite par Allenmark (48). Cela consiste à acyler le sulfoxyde en présence d'iode. Il y a formation d'un sel d'acyloxysulfonium selon le schéma:



L'iode libérée est ensuite titrée par le thiosulfate de sodium. La réaction se fait à température ambiante; elle est complète en quelques minutes.

On constate que l'on accroche 0,33 mmole d'acide  $\alpha$  aminé par gramme de polymère chlorométhylé.

- On peut évaluer par pesée la quantité de dérivé N-tertiobutyloxycarbonylé accrochée à la résine. Cette méthode est assez peu précise, du fait que la quantité accrochée est très faible (quelques centaines de mg).

.../...

- On peut doser les fonctions chlorométhylées n'ayant pas réagi.

On fait bouillir à reflux pendant une heure un échantillon de 50 mg de N- tertiobutyloxycarbonyl acide  $\alpha$  aminé lié à la résine en suspension dans 5 ml de pyridine. Après avoir neutralisé la solution avec 30 ml d'un mélange acide acétique/eau dans un rapport 1/1 en volumes et l'avoir amenée à un pH de 2 avec 5 ml d'acide nitrique concentré, on dose les groupements chlorométhylés selon la méthode préconisée par Volhard (51). On constate que l'on a 0,4 mmole de ces groupements par gramme de résine, qui n'ont pas réagi.

#### b) Préparation des oligomères.

Une fois le premier radical aminé greffé au polymère support, on peut commencer la synthèse peptidique proprement dite. L'avantage de la méthode de Merrifield réside dans le fait que le peptide en formation reste toujours attaché à la résine; il y a donc un gain de temps appréciable lors de la construction de la chaîne d'acides  $\alpha$  aminés, car il n'y a aucune étape intermédiaire de purification. Simplement, après chaque accrochage, on lave le support avec de nombreux solvants, de façon à éliminer les réactifs en excès.

On peut reporter dans un tableau le cycle des opérations à effectuer lors du couplage de chaque résidu aminé (Tableau II).

. Préparation d'une solution de HCl N dans l'acide acétique (43).

On fait buller de l'acide chlorhydrique sec dans de l'acide acétique glacé, jusqu'à ce que la solution soit saturée à température ambiante. On détermine la quantité de HCl en solution par le procédé décrit par Volhard (51). Si la concentration est supérieure à 1N, cela signifie que l'acide acétique utilisé n'était pas anhydre.

. Test à la ninhydrine (52).

On utilise pour ce test la méthode décrite par Kaiser et coll. Le réactif nécessaire pour ce test est le même que celui qui a été employé par Troll et Canan (53); il nous faut les trois solutions suivantes : (1) 500 mg de ninhydrine dans 10 ml d'éthanol; (2) 80 mg de phénol dans 20 ml d'éthanol;

.../...

TABLEAU II: *Mode opératoire utilisé pour greffer chaque résidu aminé : méthode de Merrifield.*

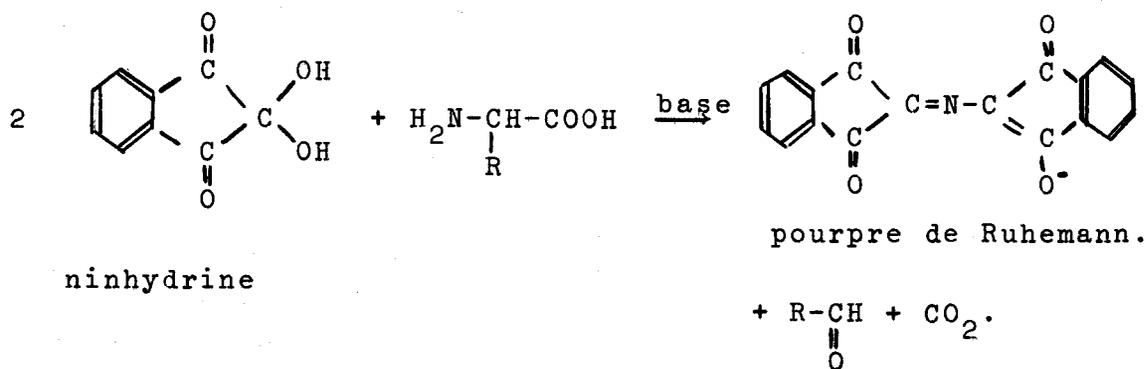
- 1) Laver avec trois fois 30 ml de  $\text{CH}_3\text{-COOH}$ .
- 2) Agiter avec HCl N dans l'acide acétique ( 30ml pendant 30 minutes).
- 3) Laver avec trois fois 30 ml d'acide acétique.
- 4) Laver avec trois fois 30 ml d'éthanol absolu.
- 5) Laver avec trois fois 30 ml de chloroforme.
- 6) Neutraliser le chlorure formé par traitement à la triéthylamine (1 volume) en solution dans le chloroforme (9 volumes).
- 7) Laver avec trois fois 30 ml de chloroforme.
- 8) Dosier les chlorures sur les filtrats 6) et 7) réunis (dosage potentiométrique).
- 9) Test à la ninhydrine(52).
- 10) Laver avec trois fois 30 ml de chlorure de méthylène.
- 11) Ajouter une quantité de t-Boc-acide  $\alpha$  aminé égale à 2,5 fois celle nécessaire d'après le dosage des chlorures. Ce t-Boc-acide  $\alpha$  aminé est utilisé en solution dans du chlorure de méthylène; on agite pendant 10 minutes.
- 12) Introduire dans le réacteur un nombre de moles de DCCI égal à celui du t-Boc-acide  $\alpha$  aminé ajouté. La DCCI est utilisée en solution dans un minimum de chlorure de méthylène; le mélange est ensuite agité 2 heures, puis laissé en contact 12 heures (49).
- 13) Laver avec trois fois 30 ml de chlorure de méthylène.
- 14) Test à la ninhydrine (52).

(3) 2 ml d'une solution 0,001M de cyanure de potassium diluée à 100 ml avec de la pyridine. On prélève alors un petit échantillon de peptide lié à la résine (10 à 20 mg: poids humide), auquel on ajoute deux à trois gouttes de chacun des réactifs précédents. On met alors cette suspension à l'étuve à 100°C pendant 5 minutes en prenant soin d'agiter de temps en temps. Si les grains restent blancs et la solution devient jaune, on a un test négatif : aucun  $\text{-NH}_2$  libre.

Si les grains et la solution deviennent bleus foncés, le test est positif : tous les  $\text{-NH}_2$  sont libres.

On peut observer des colorations intermédiaires permettant, après étalonnage, de déterminer le pourcentage d'avancement d'une réaction. Ce test est très sensible : d'après Kaiser, on peut détecter ainsi moins de 5  $\mu\text{mole/gramme}$  de fonction amine terminale libre.

La réaction est la suivante :



Ce test, très rapide, permet la détection de couplages incomplets, non discernables par analyse des acides  $\alpha$  aminés. Il permet également de suivre l'avancement de la réaction par diminution des intensités colorées. Ce test est intéressant en association avec le dosage des chlorures.

. Avant de commencer l'accrochage d'un second acide  $\alpha$  aminé, il est nécessaire de faire gonfler la résine dans le chlorure de méthylène, de façon à avoir un contact maximum entre le polymère et les différents réactifs.

. On utilise pour le couplage la méthode à la DCCI, car elle est beaucoup plus rapide que la méthode aux esters activés, assez souvent employée aussi par Merrifield. Lors de cette étape,

.../...

on dissout les réactifs dans le minimum de solvant pour favoriser au maximum la réaction de couplage (concentrations en réactifs plus élevées) et pour minimiser le réarrangement de l'intermédiaire réactif en N acylurée, stable, qui ne réagit plus avec les nucléophiles.

c) Séparation du peptide de la résine.

Avant de procéder à cette étape, il est nécessaire de bien laver le peptide lié à la résine, d'abord au chlorure de méthylène, puis à l'éthanol. On le sèche ensuite sous vide jusqu'à poids constant. Pour séparer le peptide formé de son polymère support, on met en suspension la résine-peptide dans 15 à 20 ml d'acide trifluoracétique anhydre et on y fait passer lentement un courant d'acide bromhydrique à la température ambiante pendant 30 minutes (HBr gazeux-Gaz Matheson C°). Durant cette opération, on évite la présence de la moindre trace d'eau, qui risquerait de provoquer l'hydrolyse du peptide. On filtre, puis on lave à l'acide trifluoracétique. Les filtrats sont réunis et le solvant est éliminé au rotavapor. On reprend le peptide par du méthanol, on filtre et on élimine le solvant au rotavapor. Après avoir repris plusieurs fois par le méthanol et éliminé le solvant, on redissout l'oligomère dans le méthanol et on le précipite :

-par l'eau, s'il s'agit du dimère,

-par l'éther éthylique, s'il s'agit du trimère.

Les oligomères de degré plus élevé ne sont plus solubles dans le méthanol, même à très faibles concentrations. Cela permet donc une première purification de ces dérivés.

Les rendements obtenus, aussi bien dans le cas du dimère que dans celui du trimère, sont très faibles.

. Di-L-glutamate de 4 nitro-benzyle.

F = 146-148°C.

Les noyaux para nitrobenzyle absorbent dans l'ultra-violet :  
 $\epsilon_{272 \text{ m}\mu} = 18\,600$  ( $c = 0,042 \text{ g.l}^{-1}$ ; solvant : TMP) (figure 5).

On peut constater que le produit est pur par chromatographie en couche mince. Les éluants utilisés sont les mélanges :

.../...

$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{COO}-\text{C}_2\text{H}_5 / \text{C}_5\text{H}_5\text{N} / \text{CH}_3\text{COOH} / \text{H}_2\text{O}$  dans les rapports 5/5/1/3 en volumes  $R_F = 0,96$ .

n butanol /  $\text{CH}_3\text{COOH} / \text{H}_2\text{O}$  dans les rapports 4/1/1 en volumes.

$R_F = 0,75$ .

En infra-rouge, on observe bien les bandes dues à la liaison peptidique, en particulier la bande amide I à  $1610 \text{ cm}^{-1}$  et la bande amide II à  $1535 \text{ cm}^{-1}$ , ainsi que les bandes dues à la fonction ester de para nitrobenzyle.

$(\alpha)_{546}^{23} = -4,8^\circ$  ( $c=0,42$ ; solvant : TMP)

• Tri-L-glutamate de 4 nitrobenzyle.

F =  $125-126^\circ\text{C}$ .

Les noyaux para nitrobenzyle absorbent dans l'ultra-violet:

$\epsilon_{272\text{m}\mu} = 30\ 800$  ( $c=0,0245 \text{ g.l}^{-1}$ ; solvant : TMP) (figure 6).

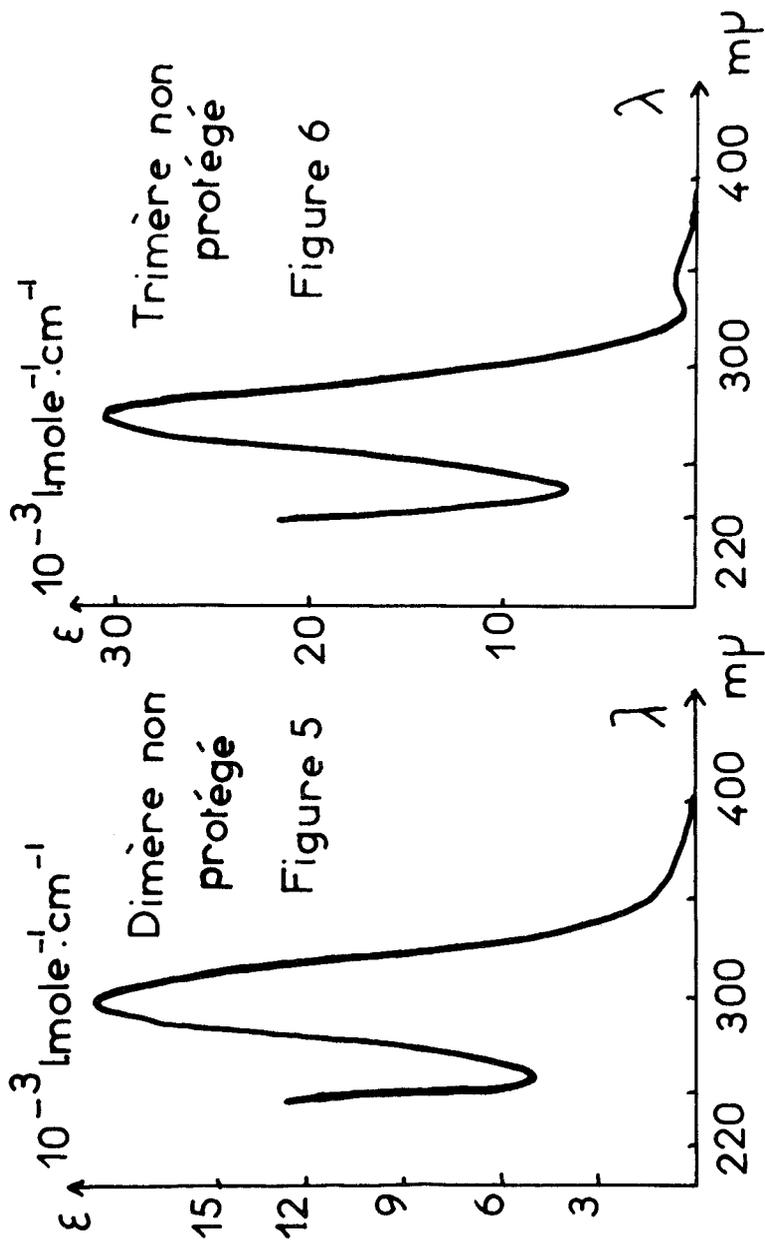
On peut constater que le produit est pur par chromatographie en couche mince. L'éluant utilisé est le mélange :

$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{COO}-\text{C}_2\text{H}_5 / \text{C}_5\text{H}_5\text{N} / \text{CH}_3\text{COOH} / \text{H}_2\text{O}$  dans les rapports 5/5/1/3 en volumes.  $R_F = 0,96$ .

En infra-rouge, on observe bien des bandes dues à la liaison peptidique, en particulier la bande amide I à  $1610 \text{ cm}^{-1}$  et la bande amide II à  $1525 \text{ cm}^{-1}$ , ainsi que les bandes dues à la fonction ester de para nitrobenzyle.

$(\alpha)_{546}^{23} = -3,8^\circ$  ( $c=0,79$ ; solvant : TMP)

• Sur les dérivés obtenus, on peut voir s'il y a eu ou non racémisation. Pour cela il est nécessaire de détruire un échantillon de produit par hydrolyse acide (traitement par HCl 6N dans le dioxanne; on fait bouillir à reflux pendant 24 heures). Dans ces conditions, il y a rupture des liaisons peptidiques. Par comparaison du pouvoir rotatoire molaire du glutamate obtenu avec le pouvoir rotatoire molaire du monomère ayant subi lui aussi l'hydrolyse acide, on vérifie qu'il n'y a pas eu racémisation en cours de synthèse.



Spectres ultra-violet dans le TMP

### III PREPARATION DES OLIGOMERES PAR UNE METHODE CLASSIQUE.

#### A. CHOIX DU GROUPEMENT PROTECTEUR.

Ce problème est très important en synthèse peptidique, car il faut protéger de façon sélective tous les groupements fonctionnels portés par les acides  $\alpha$  aminés, qui n'ont pas à réagir lors du couplage. Notre but étant d'étudier la conformation des peptides par des méthodes optiques et spectroscopiques, il nous faut choisir des groupements ne perturbant pas les spectres de façon importante dans les régions qui nous intéressent. Enfin, il est intéressant d'obtenir des dérivés cristallins, ayant perdu la structure dipolaire de l'acide  $\alpha$  aminé.

##### 1) Fonction amine.

Parmi les groupes protecteurs les plus usités en synthèse peptidique (Tableau I), nous avons choisi ceux du typeuréthane, car ils n'absorbent pas trop dans l'ultra-violet aux longueurs d'onde qui nous intéressent. D'autre part, ces groupes ne sont pas trop encombrants et on peut les introduire et les éliminer facilement sans toucher à la fonction ester para-nitrobenzylique qui protège, obligatoirement dans notre cas, le carboxyle en  $\gamma$  de l'acide glutamique.

Au départ, nous avons pensé utiliser le groupe benzyl-oxycarbonate, mais la synthèse d'un N- carbobenzoxyacide  $\alpha$  aminé se fait en milieu alcalin à un pH optimum de 8. Or, la fonction paranitrobenzyle se coupe dès pH 8; il était donc nécessaire de travailler à pH strictement contrôlé; c'est ce que nous avons fait, mais le rendement en N- benzyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle n'était que de 35%. Nous avons alors essayé de trouver un autre groupement protecteur, d'autant plus que l'élimination du carbobenzoxy nécessite l'action

.../...

de l'acide bromhydrique dans l'acide acétique, ceci entraînant inévitablement la formation de dérivés bromés, difficiles à éliminer.

Nous avons alors utilisé le groupe tertiobutyloxycarbonyle, qui s'élimine facilement par action de l'acide chlorhydrique à température ambiante. Comme tous les groupements du type uréthane, le tertiobutyloxycarbonyle réagit avec la fonction amine en milieu fortement basique. Néanmoins, certains auteurs (43,46) ont mis au point un procédé de fixation de ce groupement aux acides  $\alpha$  aminés en utilisant comme solvant le DMSO. De ce fait, le milieu réactionnel n'est plus trop basique et nous avons pu employer cette méthode avec succès dans le cas du L-glutamate de 4-nitrobenzyle.

## 2) Fonction carboxyle.

Pour la protection du  $-COOH$  de nos dérivés, nous nous sommes heurtée à des problèmes de cristallisation des produits. C'est ainsi que nous avons dû renoncer à fabriquer l'ester méthylique du L glutamate de 4 nitrobenzyle. Nous avons pu isoler l'ester éthylique de notre monomère sous forme de chlorhydrate avec un rendement de l'ordre de 50%. Malheureusement, nous n'avons pu faire cristalliser l'ester éthylique du dimère N-protégé. Nous avons alors décidé de protéger la fonction carboxyle de notre acide  $\alpha$  aminé par une fonction ester actif, dont les bonnes propriétés de cristallisabilité sont connues. Nous avons alors le choix entre : esters de paranitrophénol ou de pentachlorophénol, qui absorbent dans l'ultra-violet de façon importante aux longueurs d'onde qui nous intéressent; ou nous pouvions choisir l'ester de la N-hydroxysuccinimide, dont l'emploi semble diminuer le danger de racémisation, et que l'on peut considérer déjà comme un anhydride mixte. Nous avons opté pour cette seconde voie.

.../...

B. CHOIX DE LA METHODE DE COUPLAGE ET SCHEMA  
REACTIONNEL.

1) Méthode de couplage.

Les méthodes les plus usitées pour former une liaison peptidique sont, dans l'ordre : la méthode à la DCCI, la méthode aux azides et celle aux anhydrides mixtes, la méthode aux esters activés. Dans le choix d'un procédé, nous sommes guidé par deux critères essentiels : il faut d'une part que l'agent de couplage soit de force suffisante pour avoir de bons rendements réactionnels; d'autre part, il est nécessaire que le temps de réaction soit raisonnable, ce qui explique que l'on trouve dans la littérature de nombreux procédés différents.

Pour notre part, nous avons utilisé systématiquement la méthode à la DCCI, parce que c'est la plus employée d'une part, mais aussi parce que le couplage peptidique s'effectue alors en une seule étape.

2) Schéma réactionnel.

Dans ce procédé de synthèse classique, il nous faut isoler et purifier les dérivés intermédiaires, de façon à obtenir des oligomères purs en fin de synthèse. Le schéma réactionnel suivi est indiqué dans le tableau III.

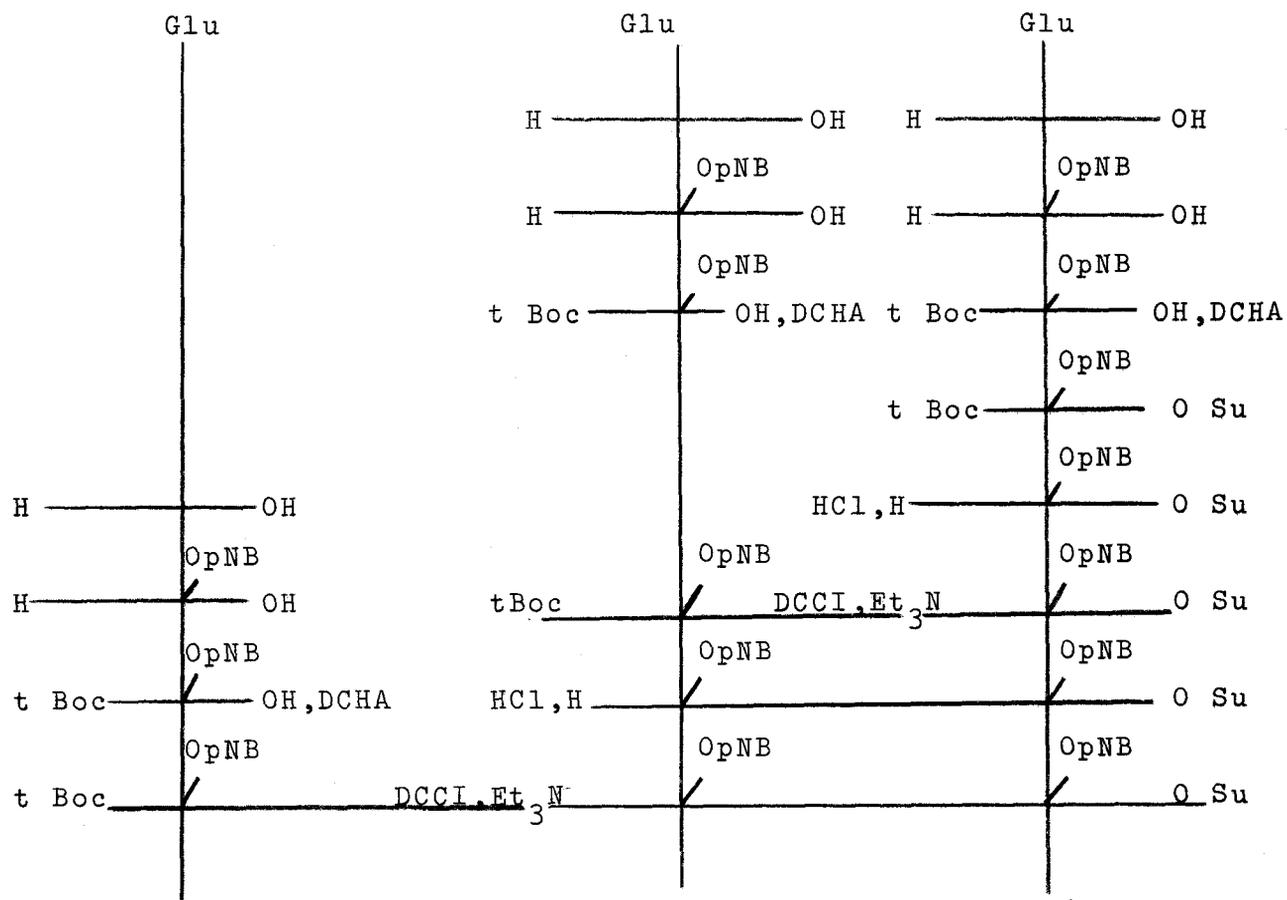
Le groupement ester de la N- hydroxysuccinimide est utilisé ici en tant que protection de la fonction carboxyle, et non pas en vue d'un couplage par la méthode aux esters activés.

C. PROCESSUS EXPERIMENTAL.

On utilise le sel de dicyclohexylammonium du N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle préparé comme cela a été décrit précédemment. Le mode opératoire se rapproche de celui utilisé par Spach et coll (54,55) pour la synthèse d'oligomères du L glutamate de benzyle.

.../...

TABLEAU III: Schéma réactionnel suivi pour la synthèse des oligomères par la méthode classique.



- où DCHA : sel de dicyclohexylammonium.  
 O Su : ester de la N-hydroxysuccinimide.  
 OpNB : ester de 4 nitrobenzyle.



1) Ester succinimidique du N-tertiobutyl-oxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle (54).

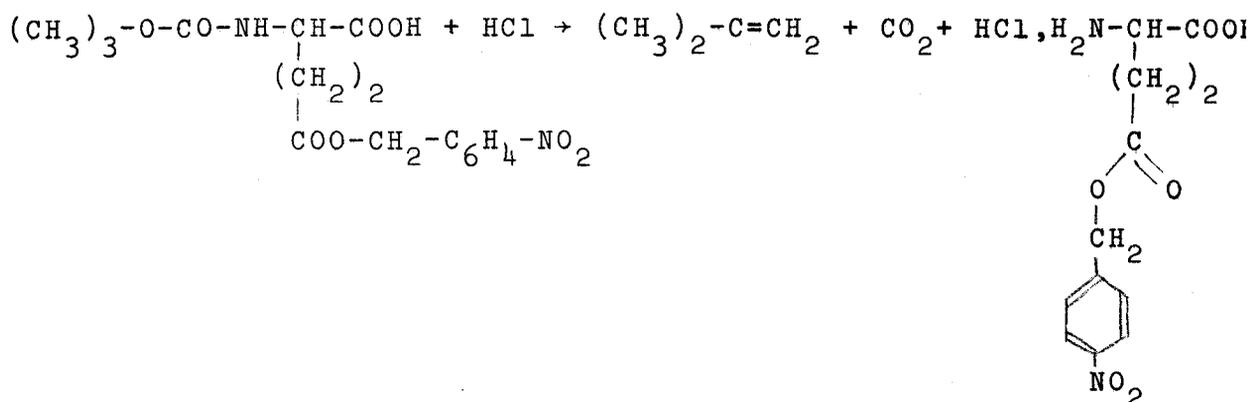
Il nous faut d'abord libérer notre acide  $\alpha$  aminé N protégé de son sel de dicyclohexylammonium. Pour cela, on met 5,64g (0,01mole) du sel de dicyclohexylammonium du N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle en suspension dans 250 ml d'acétate d'éthyle dans une ampoule à décanter. On agite cette suspension avec 75 ml d'acide sulfurique 0,2N jusqu'à dissolution. On décante alors, et on lave la phase organique plusieurs fois avec de l'eau jusqu'à neutralité des eaux de lavage. On peut alors sécher la solution pendant une heure sur sulfate de magnésium avant d'éliminer le solvant au rotavapor. On obtient ainsi un dérivé huileux, que l'on utilise directement pour la suite de la synthèse. On suppose que l'on a eu un rendement de 100%. Par conséquent on dissout l'huile obtenue précédemment dans 50 ml d'acétate d'éthyle refroidi à  $-20^{\circ}\text{C}$ . A cette solution, on ajoute successivement 1,15g (0,01mole) de N-hydroxysuccinimide et 2,06g (0,01mole) de dicyclohexylcarbodiimide. On abandonne alors le mélange réactionnel pendant deux heures à  $0^{\circ}\text{C}$ , puis pendant deux heures à  $20^{\circ}\text{C}$ . Après filtration de la dicyclohexylurée, le solvant est évaporé sous vide et l'huile résiduelle est reprise par de l'éthanol absolu bouillant. Après refroidissement de la solution alcoolique, on obtient un produit huileux que l'on<sup>ne</sup> peut faire cristalliser, que ce soit par trituration sous un solvant inerte ou en tirant sous vide.

2) Chlorhydrate de l'ester  $\alpha$  succinimidique du L glutamate de 4 nitrobenzyle (55).

Pour cette préparation, on dissout l'huile précédente dans 25 ml d'acétate d'éthyle et on fait passer l'acide chlorhydrique gazeux pendant 15 minutes à température ambiante. On observe alors formation brusque d'un gel avec dégagement gazeux. La réaction est exothermique.

.../...

On a :



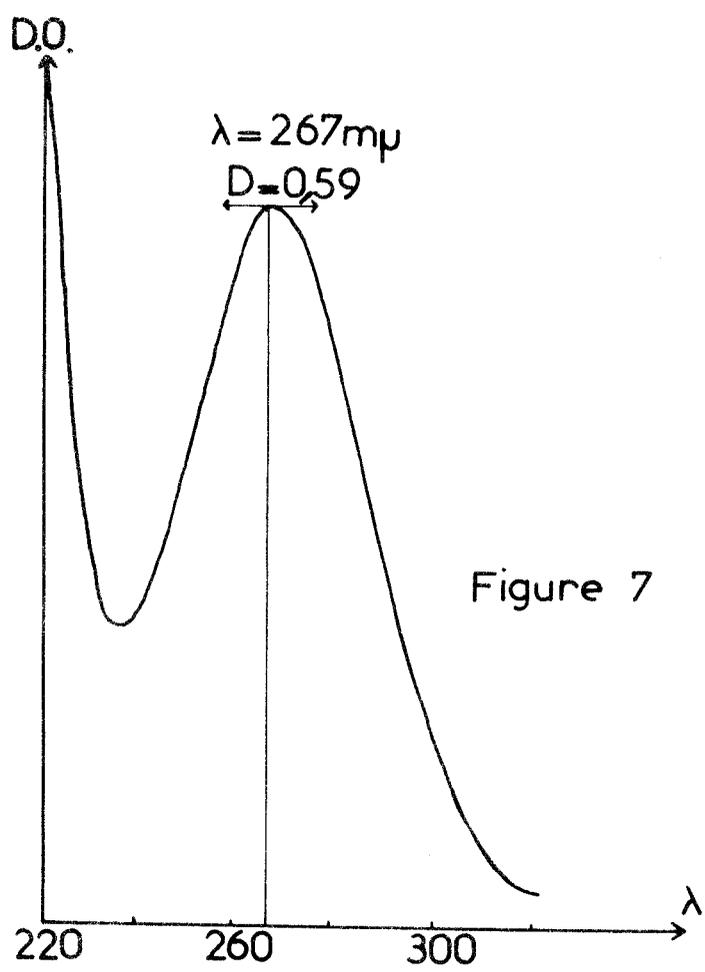
On dilue à ce moment la solution par de l'éther éthylique sec et on fait buller de nouveau de l'acide chlorhydrique. On observe une cristallisation progressive du dérivé que nous désirions préparer. On peut le filtrer et le sécher sous vide. On obtient ainsi 2,33g de chlorhydrate, soit un rendement de 56%, calculé par rapport au sel de dicyclohexylammonium du N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle, puisque tous les dérivés intermédiaires étaient huileux. Le noyau paranitrobenzyle absorbe dans l'ultra-violet:

$\epsilon_{267\text{m}\mu} = 9440$  ( $c=0,026 \text{ g.l}^{-1}$ ; solvant : méthanol)(figure 7). Le produit obtenu est très hygroscopique; il est donc nécessaire de le conserver dans un dessiccateur sous vide.

### 3) Condensation en vue de la formation du dimère protégé (55).

On dissout 2,82g (5mmole) du sel de dicyclohexylammonium du N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle dans 55 ml de chloroforme. A cette solution refroidie à  $-10^\circ\text{C}$ , on ajoute successivement 1,03g (5 mmole) de DCCI, puis 2,08g (5 mmole) de chlorhydrate de l'ester  $\alpha$  succinimidique du L glutamate de 4 nitrobenzyle. Le mélange est abandonné pendant 2 heures à  $-10^\circ\text{C}$ , puis à température ambiante pendant deux heures. Après filtration de l'urée, le chloroforme est évaporé sous vide. On extrait l'huile résiduelle à l'acétate d'éthyle. Après une nouvelle filtration de l'urée et élimination du solvant au rotavapor,

.../...



HCl, HGIu(O<sub>p</sub>NB) OSu

c = 0,026 gl<sup>-1</sup>



on obtient une huile qui cristallise lorsqu'on tire sous vide. On obtient ainsi 3,34g de dimère protégé, soit un rendement de 90%,

Pour purifier le produit, on a jugé préférable d'employer la chromatographie sur gel plutôt que de le<sup>re</sup> cristalliser à partir du méthanol (comme cela avait été fait dans le cas d'un dimère protégé du L glutamate de benzyle (55)).

Le produit brut a été chromatographié (56) sur une colonne 16,5 x 2 cm de Sephadex LH20 avec du dioxanne. La vitesse d'élution était 0,3 ml/min et on a recueilli des fractions de 3 ml. La courbe de distribution a été obtenue en mesurant l'absorption des échantillons recueillis à une longueur d'onde de 320m $\mu$  (figure 8).

Les noyaux para nitrobenzyle absorbent dans l'ultra-violet ;

$\epsilon_{272 \text{ m}\mu} = 21\ 000$  ( $c = 0,00386 \text{ g.l}^{-1}$ ; solvant : TMP) (Figure 9).

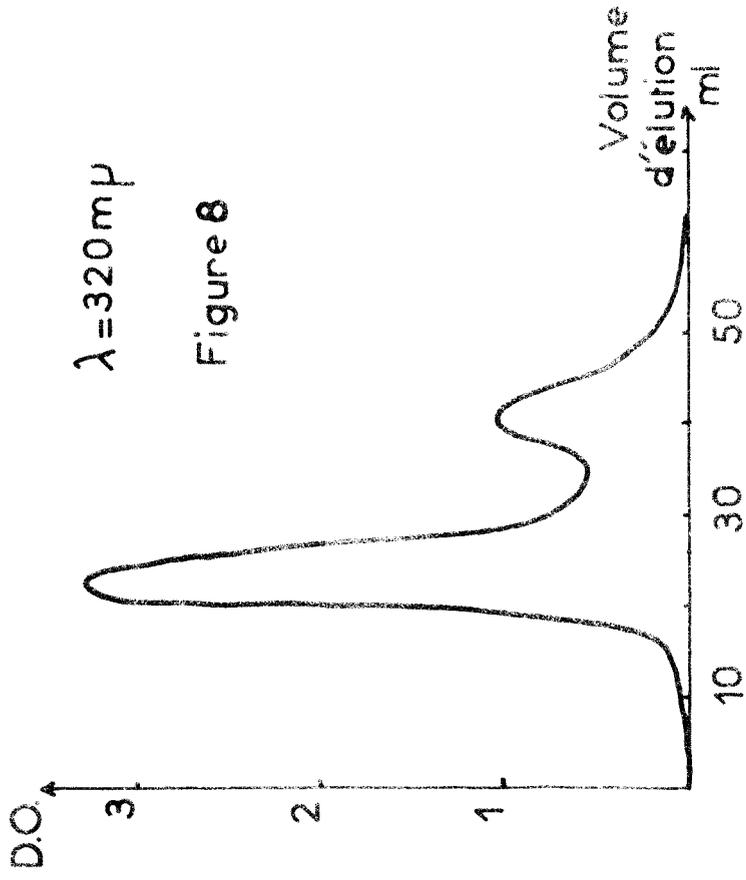
En infra-rouge, notre composé présente les bandes caractéristiques de la liaison amide, ainsi que les bandes relatives aux fonctions ester de 4 nitrobenzyle.

$(\alpha)_{546}^{23} = -5,8^\circ$  ( $c = 1,196$ ; solvant : TMP).

4) Chlorhydrate de l'ester  $\alpha$  succinimide du di L glutamate de 4 nitrobenzyle (55)

On dissout 2,60g (3,5 mmole) du dimère protégé dans 20 ml d'acétone, On y ajoute un volume égal d'éther éthylique, puis on fait buller l'acide chlorhydrique sec dans le mélange. On laisse passer l'acide pendant 10 minutes, puis on laisse agiter pendant deux heures à température ambiante. Par addition d'un excès d'éther éthylique, il y a précipitation d'un dérivé huileux. On élimine alors le solvant au rotavapor, ce qui donne une huile, que l'on essaie, sans succès, de faire cristalliser par trituration sous le n-heptane. On essaie alors de la faire cristalliser en tirant sous vide, sans plus de succès. On utilise donc ce dérivé sous forme huileuse dans l'étape suivante en vue de la préparation du trimère protégé.

.../...



Chromatographie sur colonne: dimère protégé

5) Condensation en vue de la formation du trimère protégé (55)

On dissout 0,829g (1,47 mmole) du sel de dicyclohexylammonium du N-tertiobutyloxycarbonyl L glutamate de 4 nitrobenzyle dans 10 ml de chloroforme. A cette solution refroidie à  $-20^{\circ}\text{C}$ , on ajoute successivement 0,304g (1,47 mmole) de dicyclohexylcarbodiimide, puis 1g (1,47mmole) du chlorhydrate de l'ester  $\alpha$  succinimidique du L glutamate de 4 nitrobenzyle huileux. Le mélange réactionnel est laissé une heure à  $-20^{\circ}\text{C}$ , puis quatre heures à température ambiante. Après filtration de l'urée, le chloroforme est évaporé sous vide. Après extraction de l'huile résiduelle à l'acétate d'éthyle chaud, filtration de l'urée et évaporation du solvant, le produit de la réaction est repris par 10 ml de chloroforme. Après addition de 100ml d'éthanol, la solution est concentrée sous vide. Il y a alors cristallisation du produit. On obtient ainsi 0,5 g de notre dérivé, soit un rendement de 33,7%.

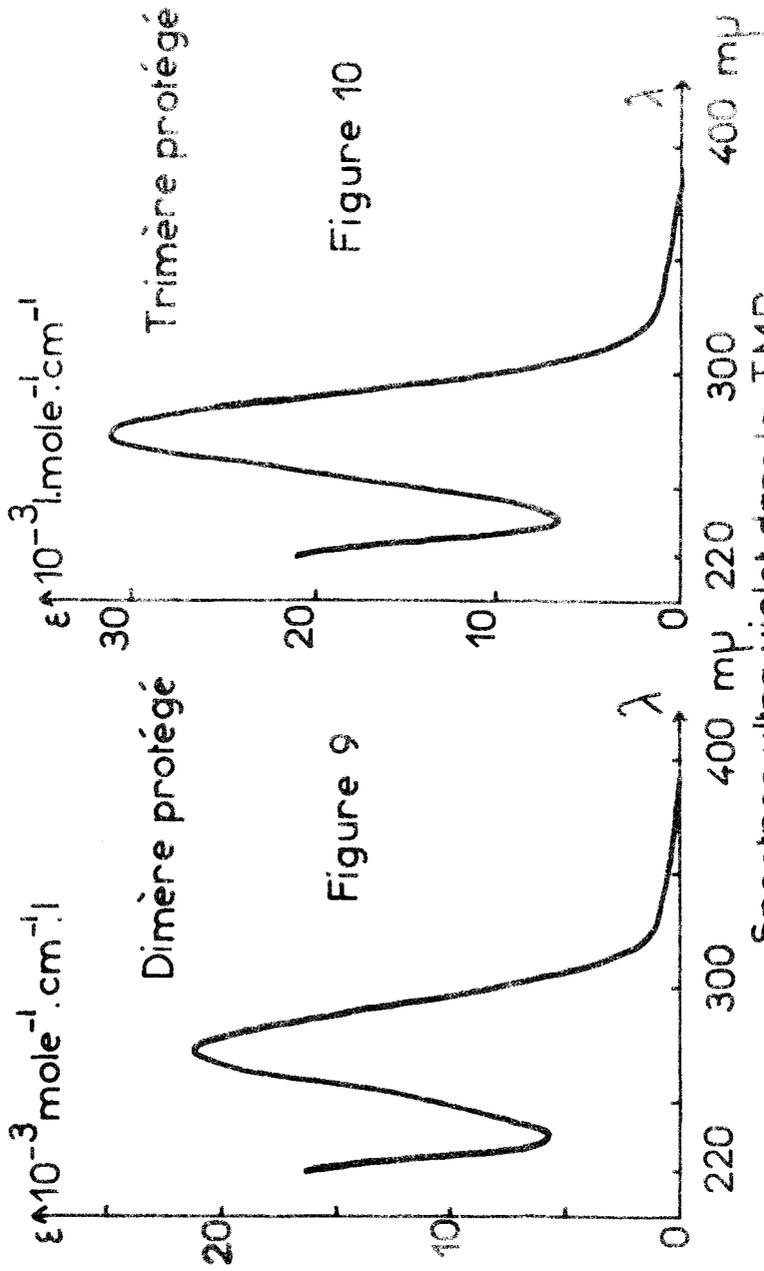
Pour purifier le produit, on emploie la chromatographie sur gel, comme dans le cas du dimère protégé. On utilise une colonne 16,5 x 2 cm de Sephadex LH20 avec le dioxanne comme éluant. La vitesse d'élution est 0,3ml/min et on recueille des fractions de 3 ml. La courbe de distribution a la même allure que celle obtenue dans le cas du dimère (Figure 8); on l'obtient en mesurant l'absorption des échantillons recueillis à une longueur d'onde de  $320\text{m}\mu$ . Le trimère sort un peu plus rapidement que le dimère, ce qui est tout à fait normal du fait que sa masse moléculaire est plus élevée.

Les noyaux para nitrobenzyle absorbent dans l'ultra-violet :

$\epsilon_{272\text{m}\mu} = 31\ 000$  ( $c=0,00361\ \text{g.l}^{-1}$ ; solvant:TMP)(Figure 10).

En infra-rouge, ce composé présente les bandes caractéristiques de la liaison amide, ainsi que celles dues aux fonctions ester de 4 nitrobenzyle.

$(\alpha)_{\text{D}}^{23} = -4,2^{\circ}$  ( $c=1,181$ ; solvant : TMP)



Spectres ultra-violet dans le TMP.

- Racémisation.

Aussi bien dans le cas du dimère que dans celui du trimère, il nous faut voir s'il y a eu ou non racémisation. Pour cela, on procède à l'hydrolyse acide d'un échantillon de chacun des dérivés préparés (action de HCl 6N dans le dioxanne; on fait bouillir à reflux pendant 24 heures). Dans ces conditions, il y a rupture de la liaison peptidique. En comparant le pouvoir rotatoire molaire des produits obtenus et celui d'un échantillon du L-glutamate de 4 nitrobenzyle ayant subi le même traitement, on peut vérifier qu'il n'y a pas eu racémisation.

DEUXIEME CHAPITRE

ETUDE DE L'ACTIVITE OPTIQUE D'OLIGO-L-GLUTAMATES  
DE 4 NITROBENZYLE.

## I GENERALITES SUR LA DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE ET LE DICHROISME CIRCULAIRE.

Le phénomène du changement dans l'activité optique avec la longueur d'onde d'un faisceau de lumière polarisée est connu depuis le début du dix-neuvième siècle grâce aux travaux de Biot, Pasteur, Fresnel... Mais ce n'est que vers 1930 qu'un grand essor a été donné aux mesures de dispersion optique rotatoire, c'est-à-dire du changement de l'activité optique en fonction de la longueur d'onde (Kuhn, Lowry).

D'autre part, dès 1847, Haidinger a constaté des différences d'absorption des composantes de la lumière circulairement polarisée; ce phénomène prit le nom de dichroïsme circulaire.

Ces deux techniques, dispersion optique rotatoire et dichroïsme circulaire, sont d'un intérêt fondamental en ce qui concerne les problèmes de détermination de structure, de configuration et de conformation des produits organiques et tout particulièrement des peptides.

### A. RAPPELS CONCERNANT CES DEUX TECHNIQUES.

#### 1) Substances optiquement actives.

D'après le principe de Pasteur, pour qu'une molécule montre une activité optique, elle doit pouvoir exister sous deux formes énantiomères, relatives à deux images dans un miroir, non superposables. Ce critère a ensuite été modifié pour donner trois conditions de symétrie stérique : pour être optiquement active, une molécule doit être dépourvue de centre de symétrie, de plan de symétrie et d'axe de symétrie de rotation-réflexion.

L'analyse d'une molécule optiquement active se fait en divisant cette molécule en groupements aisément identifiables, apportant chacun leur propre contribution à l'activité optique de la molécule dans laquelle on les trouve : groupement peptidique, groupement nitrobenzylique, .. On peut alors classer ces groupements en deux types : les chromophores ayant un spectre d'absorption caractéristique dans le visible et l'ultra-violet, et les non-chromophores qui n'absorbent que dans l'ultra-violet lointain.

Parmi les chromophores optiquement actifs, on peut considérer :

- . d'une part, ceux qui sont intrinsèquement dissymétriques, pour lesquels l'activité optique est inhérente à la géométrie du chromophore,

- . d'autre part, ceux qui sont intrinsèquement symétriques et qui sont perturbés de façon dissymétrique. L'activité optique est alors induite dans le chromophore par son environnement, contrairement au type précédent, où cette activité était inhérente. Dans de telles substances les chromophores intrinsèquement symétriques peuvent servir de test pour explorer la géométrie de la molécule, puisque l'intensité du pouvoir rotatoire constitue un mode d'expression de l'asymétrie de la molécule.

## 2) Effet Cotton.

Si, dans la région dans laquelle on observe des bandes d'absorption optiquement actives, une molécule présente d'une part une différence d'absorption, d'autre part une différence de vitesse de transmission de la lumière circulairement polarisée droite et gauche, on a alors affaire à un phénomène appelé "effet Cotton", car il a été observé par Cotton dès 1896 (57).

On peut dire que toute molécule possédant un chromophore optiquement actif présentera un effet Cotton dans la région spectrale où le chromophore absorbe.

.../...

### 3) Comparaison entre les techniques de dispersion optique rotatoire et de dichroïsme circulaire.

La dispersion optique rotatoire est un phénomène dispersif, traduisant la loi de Biot de variation de l'indice de réfraction d'une substance en fonction de la longueur d'onde. Cette variation est monotone lorsqu'on est assez loin d'une région d'absorption; mais au voisinage d'une bande d'absorption isolée, l'indice varie de façon tout à fait anormale en fonction de la longueur d'onde et on observe alors une variation brusque de l'activité optique du composé étudié. Néanmoins il est à noter que la rotation persiste à des longueurs d'onde très éloignées de cet effet Cotton; la valeur de cet angle de rotation peut être suffisante ou changer assez rapidement pour cacher un effet Cotton de faible intensité. Cela peut conduire à une fausse attribution d'un effet Cotton à une transition optiquement active d'un chromophore.

Le dichroïsme circulaire est un phénomène d'absorption, observable uniquement à des longueurs d'onde voisines de la bande d'absorption présentée en ultra-violet ou dans le visible par un chromophore donné. Il est possible alors de déterminer la position et le signe d'une bande dichroïque et de l'attribuer à une transition électronique bien définie du chromophore étudié. Cette technique est donc plus apte à des études quantitatives.

## B. GRANDEURS MACROSCOPIQUES CARACTERISANT LA DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE ET LE DICHROÏSME CIRCULAIRE.

### 1) Dispersion optique rotatoire.

Un certain nombre de grandeurs ont été définies pour chiffrer l'activité optique des solutions. Les unités employées, hors systèmes, sont imposées par la tradition.

En dispersion optique rotatoire, on mesure l'angle de rotation  $\alpha$  du plan de polarisation de la lumière après passage à travers un échantillon optiquement actif. Cet angle est relié par la relation de Fresnel à la différence ( $n_G - n_D$ ) des indices

.../...

de réfraction correspondant aux deux composantes circulairement polarisées gauche et droite :

$$\alpha = \frac{\pi}{\lambda} (n_G - n_D) l$$

$l$  est le trajet parcouru par la lumière de longueur d'onde  $\lambda$  dans le milieu optiquement actif.

On peut alors définir :

. la rotation spécifique,  $(\alpha)$  , donnée par la relation :

$$(\alpha) = \frac{\alpha}{lc}$$

$\alpha$  : angle de rotation mesuré, exprimé en degrés.

$l$  : trajet optique, exprimé en dm.

$c$  : concentration du soluté, exprimée en  $\text{g.cm}^{-3}$ .

. la rotation molaire,  $(m)$  , ou pouvoir rotatoire moléculaire. On a :

$$(m) = \frac{(\alpha) \times M_0}{100}$$

$M_0$  : masse moléculaire du composé étudié, en grammes, ramenée à un groupement chromophore.

Les résultats de dispersion optique rotatoire sont généralement donnés sous la forme de courbes :  $(m) = f(\lambda)$ . On peut avoir deux types de courbes :

. s'il n'y a pas de chromophores dans la région spectrale examinée, on obtient une courbe continue, normale ou monotone (Figure 11);

. s'il y a des chromophores optiquement actifs, on obtient une courbe dite anormale, qui présente des extrêma (effet Cotton) (Figure 12).

## 2) Dichroïsme circulaire

Cette technique est basée sur le fait que le coefficient d'extinction molaire est différent pour la lumière circulairement polarisée droite et gauche. La lumière devient alors elliptiquement polarisée.

.../...

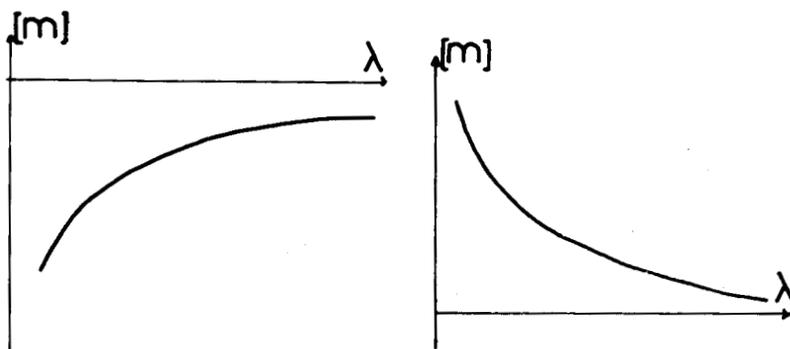


Figure 11

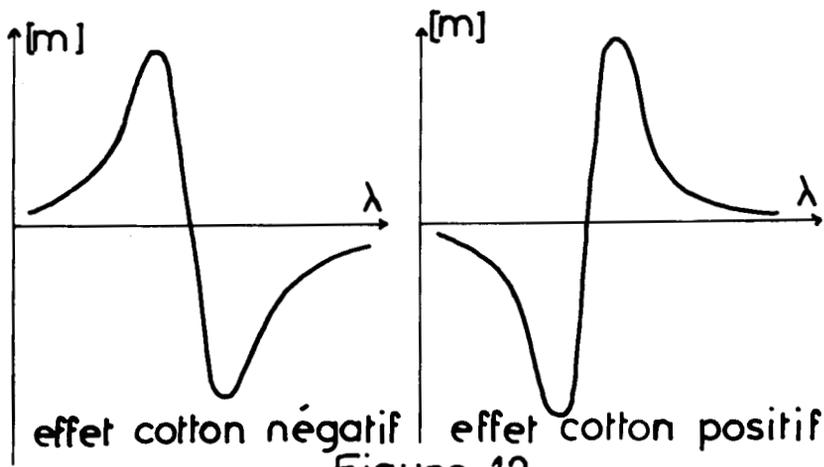


Figure 12

Courbes de dispersion optique  
rotatoire

Si on appelle  $\psi$  l'ellipticité, on peut la relier aux indices d'absorption  $K_G$  et  $K_D$  de la lumière circulairement polarisée gauche et droite par une relation analogue à celle de Fresnel:

$$\psi = \frac{\pi}{\lambda} (K_G - K_D) l$$

On peut alors définir :

. l'ellipticité spécifique,  $(\psi)$ , telle que :

$$(\psi) = \frac{\psi}{lc}$$

$\psi$ : exprimé en degré

$l$ : épaisseur du milieu, exprimée en dm.

$c$ : concentration, exprimée en  $\text{g.cm}^{-3}$ .

. l'ellipticité molaire,  $(\theta)$ , donnée par la relation :

$$(\theta) = (\psi) M_0 = 3300 (\epsilon_G - \epsilon_D)$$

$M_0$  : masse moléculaire du composé étudié, en grammes, ramenée à un groupement chromophore.

$\epsilon_G, \epsilon_D$  : coefficients d'extinction molaire pour la lumière circulairement polarisée gauche et droite.

Les résultats de dichroïsme circulaire sont donnés sous forme de courbes :  $(\theta) = f(\lambda)$ , ces courbes ayant la même allure que la courbe d'absorption correspondante. (Figure 13).

### 3) Force rotatoire.

Elle permet de mesurer les interactions entre un chromophore et son entourage asymétrique. Inversement, l'asymétrie induite dans la distribution électronique du chromophore lui-même peut se déduire de sa force rotatoire.

Lorsqu'une onde électro-magnétique est en contact avec une substance optiquement active, il peut y avoir apparition d'un moment magnétique induit, dû au champ électrique; il peut y avoir aussi apparition d'un moment électrique induit, dû au champ magnétique. Il y aura donc déplacements de charges, ces déplacements donnant naissance à des dipôles électriques et magnétiques. La force rotatoire d'un chromophore est reliée

.../...

aux moments dipolaires induits par la relation :

$$R_k = \mu_e^k \cdot \mu_m^k$$

$\mu_m^k$  : moment dipolaire magnétique induit.  
 $\mu_e^k$  : moment dipolaire électrique induit.

Dans certains cas, on n'observera pas d'activité optique, car la force rotatoire est nulle :

. si la molécule possède un plan ou un centre de symétrie, car un des moments induits est nul,

. si les deux moments dipolaires sont perpendiculaires, car leur produit scalaire est nul.

On voit donc que, dans le cas des chromophores intrinsèquement dissymétriques, les forces rotatoires ne sont jamais nulles.

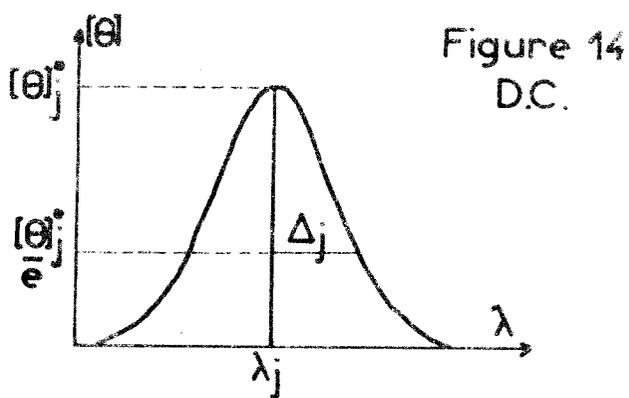
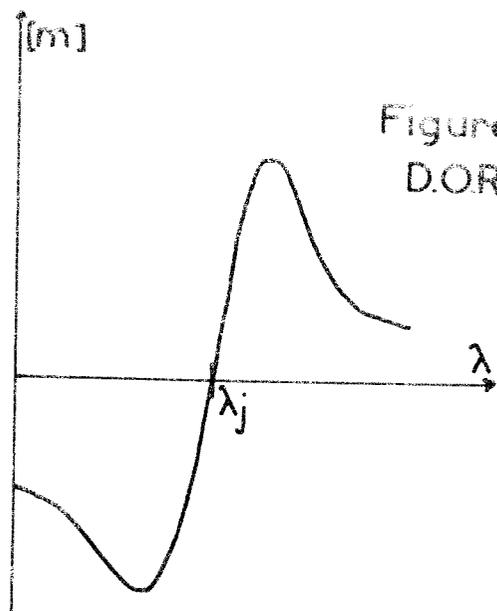
Dans le cas des chromophores intrinsèquement symétriques, il faut que leur environnement induise une dissymétrie dans la distribution électronique à l'intérieur du chromophore pour que la transition devienne optiquement active. La force rotatoire sert donc à mesurer l'interaction du chromophore avec son environnement moléculaire dissymétrique; de la connaissance de la variation de cette force rotatoire lors d'une transition particulière d'un chromophore, on peut tirer des informations importantes en ce qui concerne la structure de la molécule étudiée.

On peut calculer la force rotatoire associée à une transition électronique donnée à partir des courbes de dichroïsme circulaire obtenues expérimentalement. Si l'on suppose que la bande dichroïque est une courbe de Gauss (58) (Figure 14), on a une relation particulièrement simple, de la forme :

$$R_j = 0,696 \sqrt{\pi} \cdot 10^{-42} \cdot (\theta)_j^0 \frac{\Delta_j}{\lambda_j}$$

$\Delta_j$  et  $\lambda_j$  sont exprimés dans la même unité.  
 $(\theta)_j^0$  est exprimé en degré.cm<sup>2</sup>.décimole<sup>-1</sup>.  
 $R_j$  est exprimé en erg. cm<sup>-2</sup>. radian.

.../...



Spectres dichroïque et de dispersion  
optique rotatoire correspondants

## II APPLICATION AUX OLIGO-L-GLUTAMATES DE 4 NITROBENZYLE.

Blout et Stryer ont montré qu'il était possible d'induire une activité optique dans des molécules organiques symétriques lorsqu'elles sont liées par covalence à l'extrémité d'une macromolécule sous forme hélicoïdale; il y a alors apparition d'un effet Cotton correspondant à la bande d'absorption de ces petites molécules. On les appelle chromophores extrinsèques.

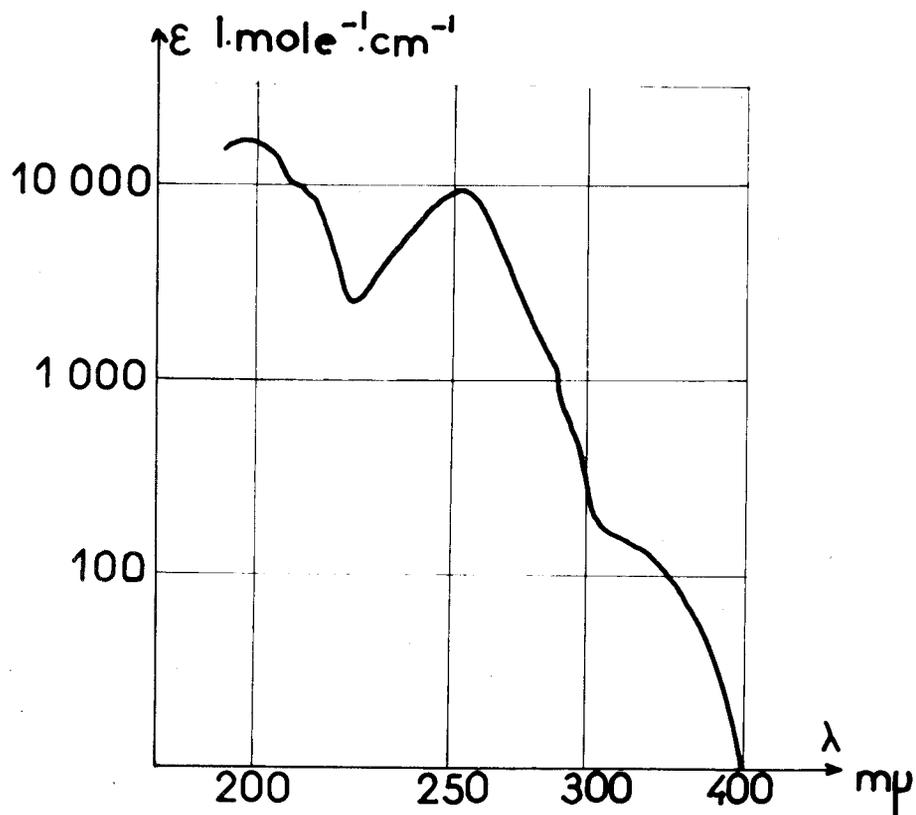
D'autre part, dans le cas des polypeptides et des protéines, de nombreuses études ont montré que l'on pouvait trouver des effets Cotton correspondant aux bandes d'absorption du groupement CO-NH de ces composés : ce sont les bandes "intrinsèques" qui correspondent au squelette polypeptidique.

Dans le cas des oligo-L-glutamates de 4 nitrobenzyle, nous pouvons distinguer deux types de bandes : celles dues au groupement nitrobenzylique (chromophore extrinsèque) et celles dues au groupement peptidique (chromophore intrinsèque). Ces deux groupements absorbent dans l'ultra-violet à des longueurs d'onde très différentes; il est donc facile de les séparer.

Pour connaître la position approximative des bandes d'absorption dues au groupement nitrobenzylique, nous nous sommes intéressée au spectre ultra-violet du nitrobenzène en solution dans l'éther de pétrole. Ce spectre présente les bandes d'absorption suivantes (Figure 15), (47):

- une bande à 322 nm qui correspond à une transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ ;
- un épaulement vers 290 nm qui correspond à la transition  $n \rightarrow \pi^*$ ;
- une bande très intense à 250 nm de transfert de charge due au mouvement des électrons depuis le noyau benzénique vers le groupement nitro;
- une bande à 197 nm due au noyau benzénique.

Il nous faut aussi connaître la position approximative des bandes dues au chromophore amide ( ou peptidique). De nombreuses études ont été faites à ce sujet; il en résulte que le spectre d'absorption électronique du chromophore amide, peut être re-

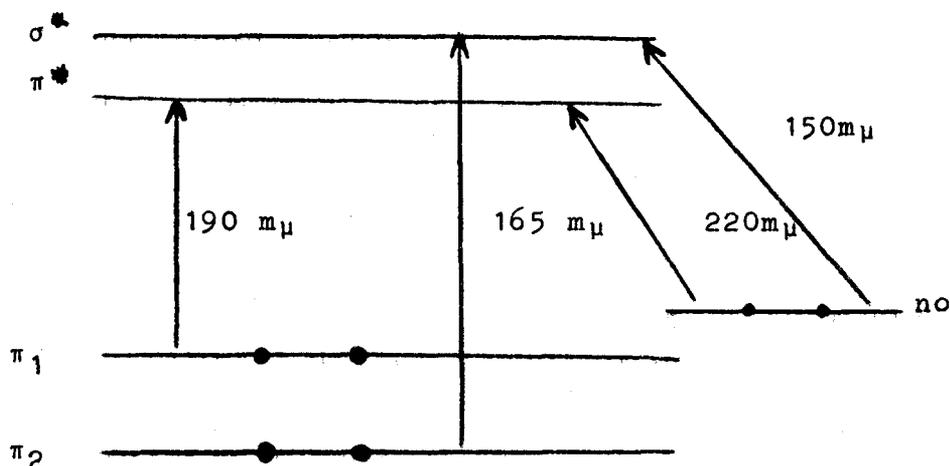


Spectre UV du nitro benzène

Figure 15



présenté de la façon suivante (60) :



Dans le cas des peptides, il semble que les chromophores amide apportent chacun leur propre contribution au spectre d'absorption total de la molécule. Cependant, Saidel (61), lorsqu'il a étudié les oligoglycines, a montré que le spectre des résidus terminaux diffère beaucoup de ceux des autres résidus, qui sont tous identiques entr'eux. Des conclusions identiques ont été tirées pour des études portant sur des peptides différents.

Pour les polypeptides en hélice  $\alpha$ , il y a dédoublement des transitions  $\pi_1 \rightarrow \pi^*$  et  $\pi_2 \rightarrow \pi^*$ . Le spectre ultra-violet de ces molécules a été décrit par Holzwarth et Doty (62) et est représenté sur la figure 16.

Dans ce travail, nous avons étudié les composés suivants:

- sel de dicyclohexylammonium du N-tertiobutyloxycarbonyl-L-glutamate de 4 nitrobenzyle, que nous appelons monomère protégé.
- L-glutamate de 4 nitrobenzyle, que nous appelons monomère non protégé.
- ester  $\alpha$  succinimidique du di-L-glutamate de 4 nitrobenzyle, que nous appelons dimère protégé.
- di-L-glutamate de 4 nitrobenzyle, que nous appelons dimère non protégé.
- ester  $\alpha$  succinimidique du tri-L-glutamate de 4 nitrobenzyle, que nous appelons trimère protégé.
- tri-L-glutamate de 4 nitrobenzyle, que nous appelons trimère non protégé.

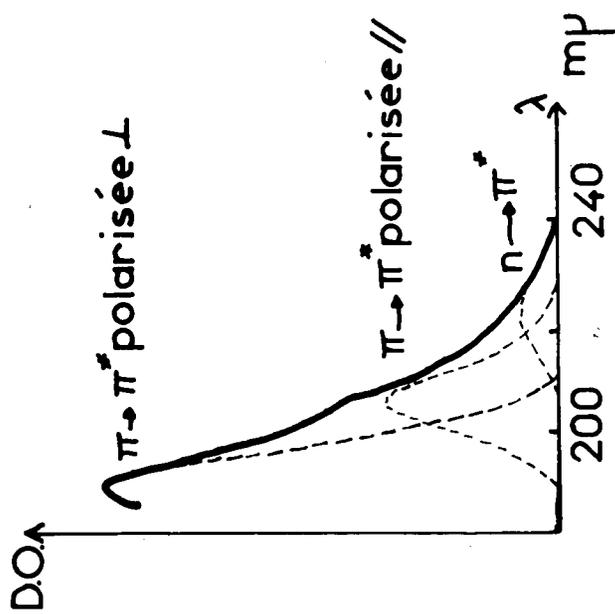


Figure 16  
 SPECTRE U.V. D'UN POLYPEPTIDE  
 EN HELICE  $\alpha$

Tous ces dérivés ont été étudiés en solution dans le triméthylphosphate, sauf le monomère non protégé qui, trop peu soluble dans le TMP, a été étudié en solution dans la soude.

#### A ETUDE DU CHROMOPHORE EXTRINSEQUE.

##### 1) Spectres ultra-violet du monomère et des oligomères.

Pour le moment, nous nous intéressons uniquement aux bandes dues au chromophore nitrobenzyle.

Deux spectrophotomètres UV ont été utilisés, le DBG Beckmann et le CARY 15 avec des cellules en quartz de 1,0 cm, 0,5 cm et 0,1 mm d'épaisseur.

Dans le tableau IV, le coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  est exprimé en  $l.mole^{-1}.cm^{-1}$ . Il n'a été calculé que pour la bande à transfert de charge, située aux environs de 270 nm, les autres bandes étant trop mal définies (Figures 17a et 17b). Dans ce tableau, on a reporté également la valeur  $\epsilon_1$  du coefficient d'extinction molaire, ramenée à un chromophore nitrobenzyle; cette valeur est exprimée en  $l.mole^{-1}.cm^{-1}$ .

Solvant :	Composé étudié :	Bande à transfert de charge		
		$\lambda_{nm}$ :	$\epsilon$ :	$\epsilon_1$ :
Soude :	Monomère non protégé :	272 :	10 600 :	10 600 :
	Monomère protégé :	270 :	9 210 :	9 210 :
	Dimère non protégé :	272 :	18 600 :	9 300 :
T.M.P. :	Dimère protégé :	272 :	21 000 :	10 500 :
	Trimère non protégé :	272 :	30 800 :	10 270 :
	Trimère protégé :	272 :	31 000 :	10 330 :

Tableau IV

Coefficients d'extinction molaire pour la bande à transfert de charge.

.../...

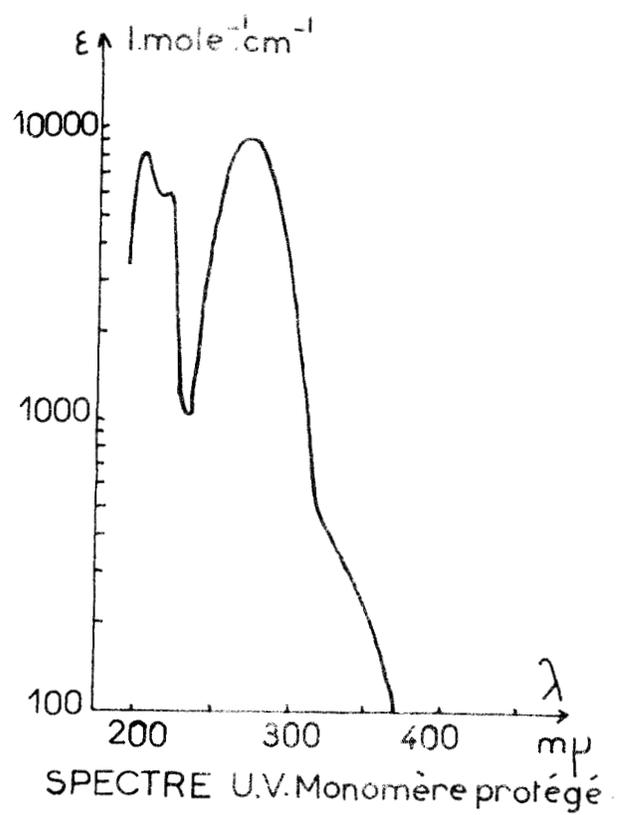
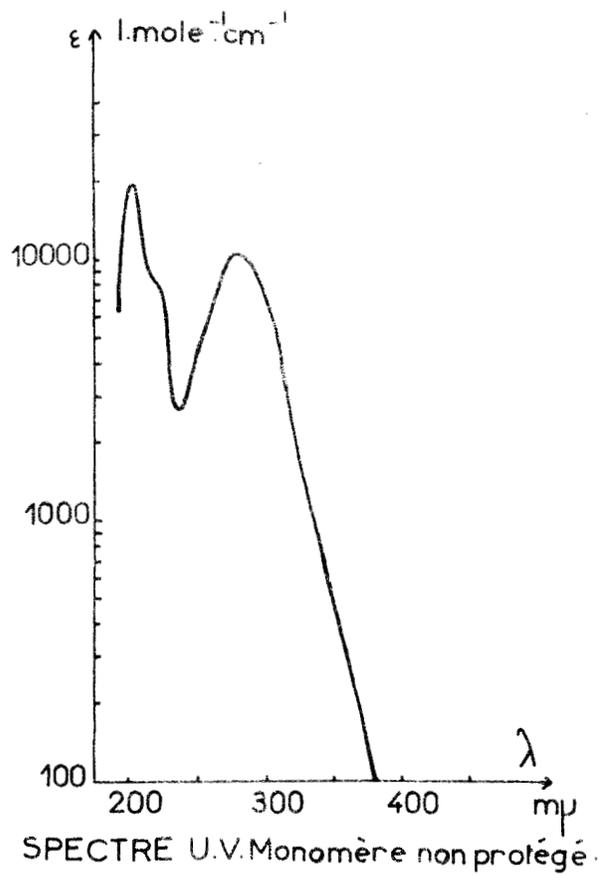


Figure 17a

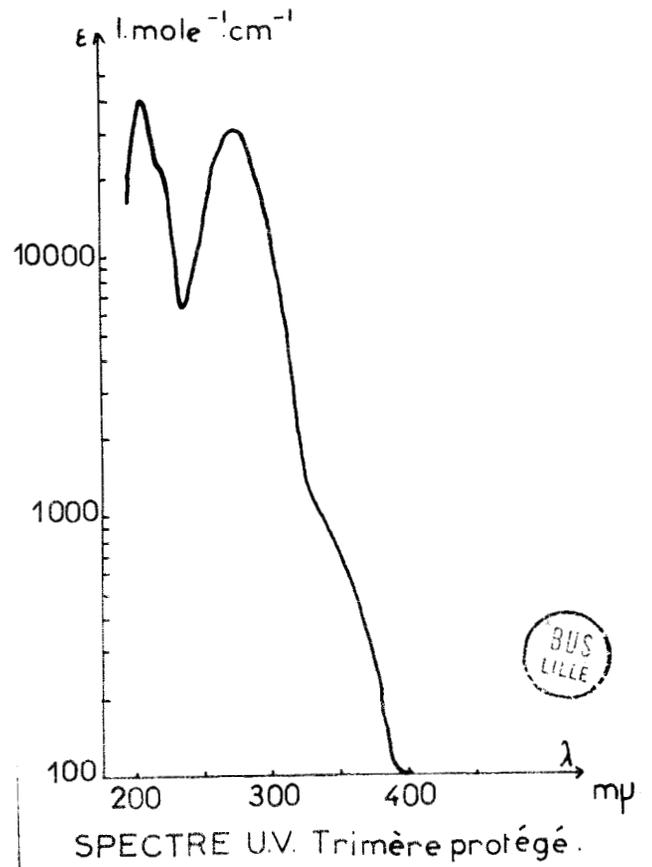
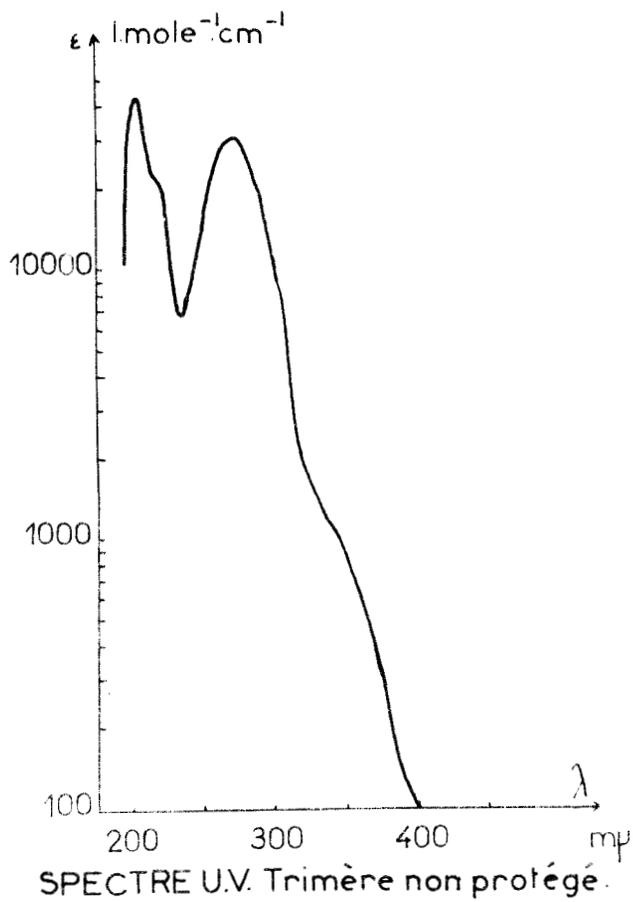
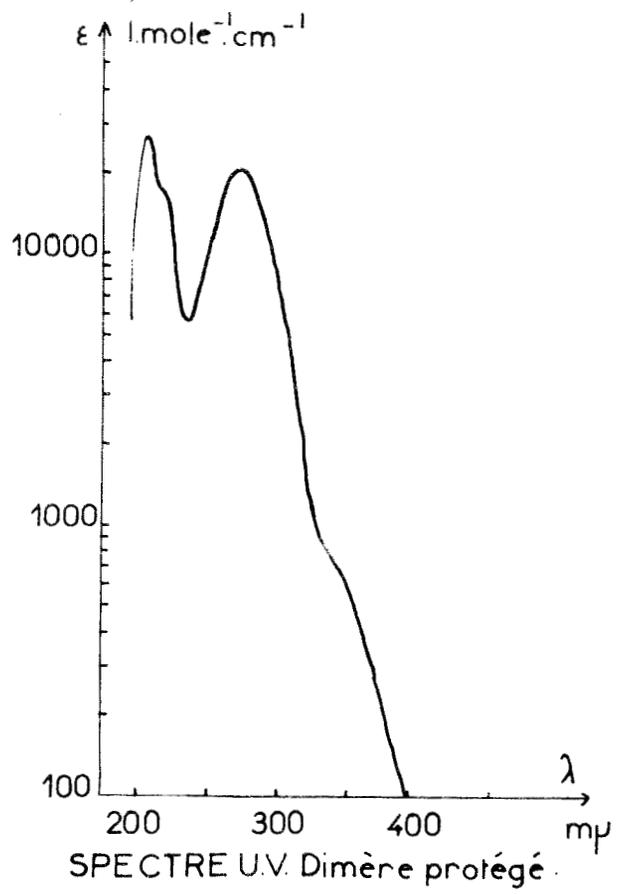
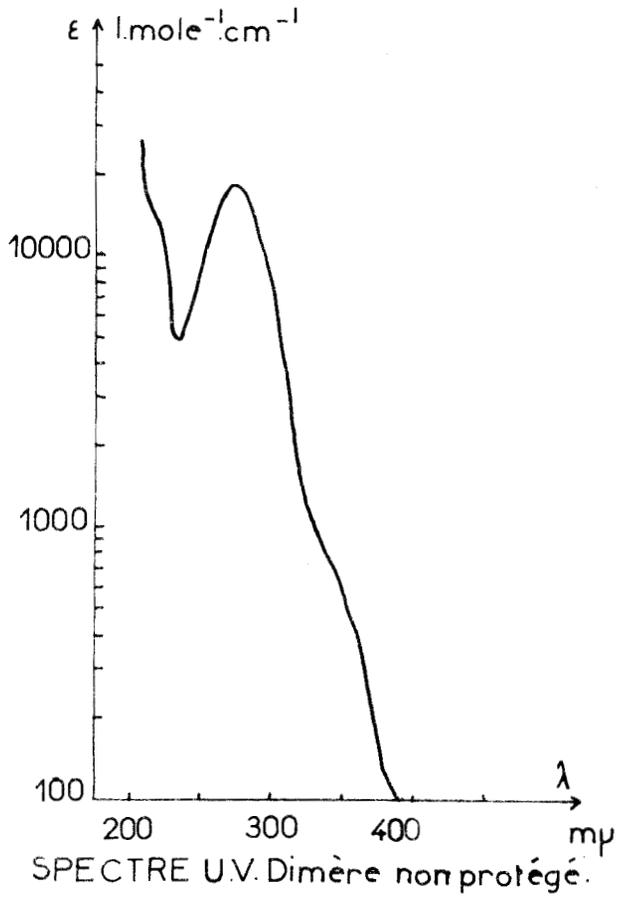


Figure 17b

En observant le spectre du monomère non protégé en solution dans la soude, on voit une bande d'absorption très importante à 272 nm ( bande à transfert de charge) et un très léger épaulement vers 330nm ( bande  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Dans le cas du monomère protégé en solution dans le TMP, on voit la bande à 270nm, qui est ici aussi très intense ( bande à transfert de charge); on constate qu'il y a un épaulement beaucoup plus visible que dans le cas précédent, situé vers 330nm (bande  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Pour ces deux dérivés, il n'y a pas sur les spectres ultra-violetts de bande vers 290nm correspondant à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  ou il se peut que ce soit un épaulement très faible.

Dans le cas des oligomères par contre, que ceux-ci soient ou non protégés, on observe trois bandes sur les spectres ultra-violetts; tous ces dérivés en solution dans le TMP présentent un maximum d'absorption à 272 nm (bande à transfert de charge), et un épaulement bien visible à 330nm (transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Il y a également un épaulement très peu visible situé vers 300nm et correspondant à la transition  $n \rightarrow \pi^*$ .

## 2) Spectres dichroïques du monomère et des oligomères.

Les spectres dichroïques ont été enregistrés sur le dichrographe Roussel-Jouan II. Nous avons à notre disposition une série de cuves en quartz d'épaisseurs suivantes : 1,0cm, 0,5cm, 0,1cm et 0,1mm.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau V. Dans ce tableau, les valeurs de l'ellipticité molaire sont données en degré.cm<sup>2</sup>.décimole<sup>-1</sup>. Elles sont ramenées à un chromophore nitrobenzylique.

Il est à noter que, certains effets Cotton présentés par nos produits étant très faibles, nous n'avons pas toujours pu obtenir une valeur de l'ellipticité molaire correcte à cause de la forte absorption de nos dérivés. En effet, le dichrographe travaille dans les conditions optimales lorsque la densité optique de la solution que l'on interpose dans le faisceau est comprise entre 0,8 et 1,5. Dans ces conditions, les solutions d'oligomères sont très diluées; par conséquent, nous n'avons pu observer de bandes dichroïques et calculer l'ellipticité molaire correspondante que si l'effet Cotton présenté était

.../...

	Bande $\pi \rightarrow \pi^*$		Bande $n \rightarrow \pi^*$		Transfert de charge	
	$\lambda$ : nm	$[\theta]$ :	$\lambda$ : nm	$[\theta]$ :	$\lambda$ : nm	$[\theta]$ :
Monomère NP (Soude)	343	28	287	26	261	52
Monomère P (TMP)	341	125	288	1219	263	-
Dimère NP (TMP)	339	79	293	-	272	739
Dimère P (TMP)	342	-	290	-	258	3141
Trimère NP (TMP)	345	-	302	-	266	3860
Trimère P (TMP)	364	432	288	-	265	1530

NP non protégé  
P protégé

Tableau V



suffisant. Néanmoins, en utilisant des solutions de densité optique supérieure à 1,5, nous avons pu vérifier que tous les dérivés étudiés présentaient trois effets Cotton correspondant aux bandes d'absorption U.V., bien que nous n'ayions pu alors calculer la valeur de l'ellipticité molaire.

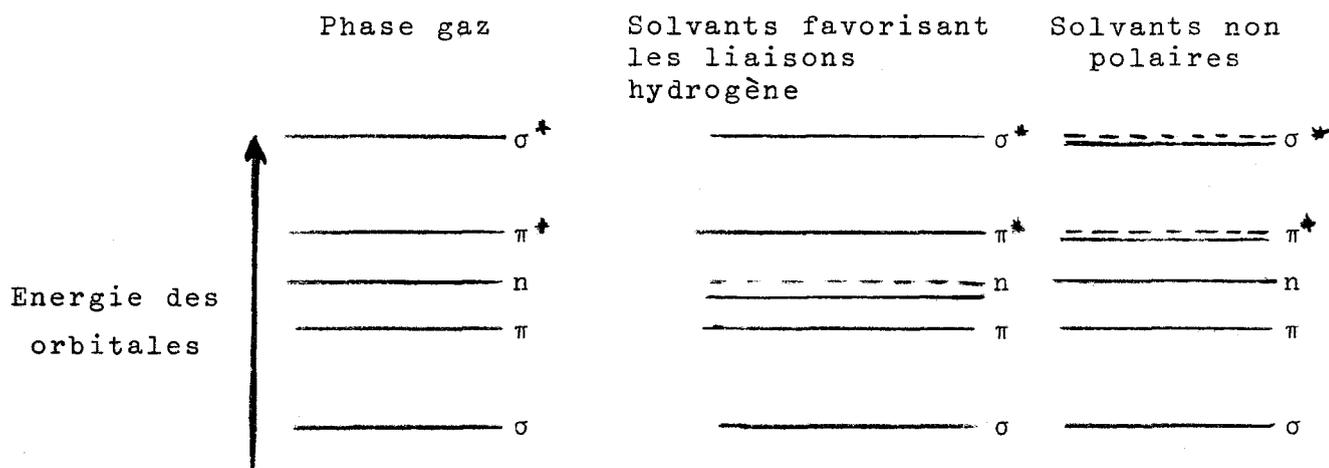
### 3) Conclusion.

Dans le cas du monomère, on observe des bandes dichroïques correspondant aux bandes d'absorption en ultra-violet. Il y a donc effets Cotton pour le monomère, comme cela avait été remarqué auparavant par Le Barny (47) qui avait étudié le L-glutamate de 4 nitrobenzyle non protégé en solution dans l'acide dichloroacétique. Le Barny avait en effet observé la présence de deux bandes dichroïques centrées à 298 nm et 260nm, et ayant pour ellipticités molaires corrigées du facteur de Lorentz les valeurs respectives de:  $(\theta')_{298} = 75$  et  $(\theta')_{260} = 294$ . Or, dans le cas de ce dérivé, on ne peut envisager d'interactions entre chaînes latérales, car les solutions étudiées sont très diluées. L'origine des effets Cotton observés semble donc être **due à un repliement** de la chaîne latérale, qui viendrait se placer à proximité du carbone asymétrique.

Dans le cas du monomère protégé, on observe aussi trois effets Cotton. On travaille ici dans un solvant organique, le TMP, alors que le monomère protégé était en solution dans la soude. Si l'on compare les résultats obtenus, on constate qu'il y a un léger déplacement des bandes dichroïques : déplacement bathochrome pour la bande  $n \rightarrow \pi^*$ , hypsochrome pour les bandes  $\pi \rightarrow \pi^*$  et à transfert de charge.

Lorsqu'on utilise le triméthylphosphate au lieu de l'eau, qui est un solvant très polaire, il y a diminution de l'énergie des orbitales  $n$  non liantes ainsi que de l'énergie des états excités  $\pi^*$  suivant le schéma :

.../...



Les déplacements observés dans notre cas prouvent donc que la bande située vers 340 nm correspond bien à une transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ , alors que celle située vers 287 nm correspond à une transition  $n \rightarrow \pi^*$ .

Dans le cas des oligomères, on ne peut pas comparer les résultats obtenus dans le cas des dérivés protégés d'une part et des dérivés non protégés d'autre part. En effet, la présence de la protection perturbe beaucoup les résultats, surtout dans le cas du dimère, car on sait que les groupes terminaux des peptides ont un comportement très différent de celui des groupes internes (Goodman (63)).

Si l'on examine attentivement les résultats du tableau V, on constate que l'ellipticité molaire de la bande  $n \rightarrow \pi^*$  est faible pour tous les dérivés étudiés; on peut en déduire que les interactions entre les différents groupes portés par les chaînes latérales ne doivent pas être grandes. Ceci n'est pas surprenant, car ces groupes sont assez éloignés les uns des autres dans les oligomères, dont la structure ne peut être qu'une chaîne statistique. Dans le cas de chaînes peptidiques plus longues, il est possible qu'il y ait des interactions entre les groupements 1 et 3 si les résidus sont portés par une hélice  $\alpha$  (cas des polyglutamates).

Intéressons-nous maintenant à la bande à transfert de charge. Si on considère uniquement les dérivés non protégés,

.../...

on voit que l'ellipticité molaire augmente quand on passe du monomère au dimère, puis du dimère au trimère. Or, en ultraviolet, le chromophore nitrobenzylique présente une bande d'absorption intense avec un coefficient d'extinction molaire de l'ordre de 10 000, correspondant à la bande à transfert de charge. Dans ce cas, d'après Urry (64), l'activité optique dépend en grande partie d'interactions avec les groupements chromophores voisins ayant de grandes bandes d'absorption. On peut donc conclure qu'il y a vraisemblablement interactions entre les chaînes latérales et le groupement peptidique CO-NH.

Enfin, la bande  $\pi \rightarrow \pi^*$  a toujours une ellipticité très faible, que ce soit dans le cas du monomère, du dimère ou du trimère non protégés.

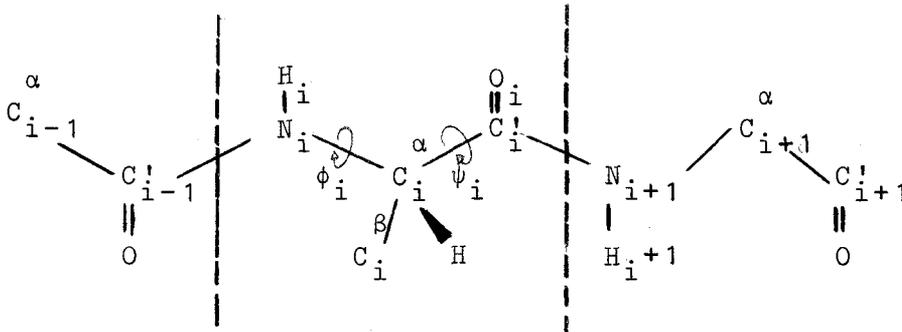
En résumé, nous pouvons dire que, aussi bien pour le monomère que pour les oligomères, les résultats obtenus sont en bon accord avec l'existence d'un repliement de la chaîne latérale vers le groupement peptidique.

#### B. ETUDE DU CHROMOPHORE INTRINSEQUE

De nombreux théoriciens (Ramachandran (65), Scheraga (66), Schellman (67)) se sont intéressés au problème de la conformation des chaînes peptidiques. Parmi eux, Schellman a plus particulièrement essayé de relier forces rotatoires et conformations des peptides. C'est un problème très ardu car, bien que de nombreux mécanismes aient été proposés pour calculer théoriquement l'activité optique d'une molécule donnée, chacun de ces mécanismes n'envisage que de façon partielle les causes de cette activité optique; d'autre part, les chaînes peptidiques peuvent à priori prendre de nombreuses configurations différentes. C'est ce qui explique que Schellman n'ait étudié jusqu'à présent que des dipeptides simples.

1) Conformation des chaînes peptidiques.

Un peptide est, par définition, une molécule composée d'un enchaînement d'acides-amino reliés entr'eux par des liaisons amide secondaire. On peut schématiser un résidu par la formule développée suivante :



Dans le plan de la liaison peptidique C'-N, une rotation est possible autour des liaisons N-C<sup>α</sup> et C<sup>α</sup>-C'. Par conséquent, pour préciser la structure des peptides, il ne suffit pas de connaître la configuration des atomes autour du carbone asymétrique, mais il faut aussi connaître les positions respectives des différents groupes constituant la molécule prise dans son ensemble.

Pour repérer ces positions, on a adopté la nomenclature préconisée par Edsall et coll. (68). Si on se réfère au schéma précédent, on désignera par  $\phi_i$  l'angle de rotation autour de la liaison  $N_i - C_i^\alpha$ , et par  $\psi_i$  l'angle de rotation autour de la liaison  $C_i^\alpha - C_i'$ . Par convention, on prend :  $\phi_i = \psi_i = 0$  dans le cas d'une chaîne polypeptidique complètement étendue. D'autre part, on prend comme sens positif de rotation, le sens des aiguilles d'une montre à partir du carbone asymétrique. Toujours en se référant au schéma précédent, on dit que les liaisons  $C_i^\alpha - C_i'$  et  $N_i - H_i$  sont en position cis si l'on prend comme axe de rotation la liaison  $N_i - C_i^\alpha$ ; de même les liaisons  $N_i - C_i^\alpha$  et  $C_i' - O_i$  sont en position cis si l'on prend comme axe de rotation la liaison  $C_i^\alpha - C_i'$ ; par contre, les liaisons  $C_i' - O_i$  et  $N_{i+1} - H_{i+1}$  sont en position trans si l'on prend comme axe de rotation la liaison  $C_i' - N_{i+1}$ .

.../...

2) Mécanismes proposés comme étant à l'origine de l'activité optique de petites molécules.

De très nombreux mécanismes ont été proposés dans cet esprit. La première théorie quantique sur l'activité optique d'une substance en solution a été présentée par Rosenfeld en 1928; celui-ci attribue l'activité optique d'une molécule à des transitions électroniques ayant des moments de transition électriques et magnétiques parallèles ou antiparallèles. Les résultats obtenus ne sont valables que dans une région du spectre où il n'y a pas de groupement chromophore. Par la suite, Kirkwood, puis Condon, Altar et Eyring, puis Moffitt ont proposé des théories un peu plus élaborées.

En 1937, Kirkwood (69) a proposé sa théorie de "l'oscillateur couplé". Il suppose que l'état électronique fondamental de la molécule n'est pas dégénéré. Il considère que la molécule optiquement active se compose de N groupes couplés par des liaisons de covalence à un groupe central inactif; ce groupe inactif sera le carbone asymétrique ou un radical hydrocarboné de configuration rigide dans le cas des spiranes. Si les groupes couplés sont optiquement actifs, on les décomposera à leur tour. On arrive finalement à une décomposition en groupes inactifs; l'activité optique de la molécule est obtenue par la juxtaposition de ces différents groupes pour former un ensemble asymétrique. Une fois la molécule décomposée, Kirkwood couple deux moments électriques de transition voisins. Dans la suite du calcul il ne tient compte que des interactions des groupes secondaires avec le groupe central, et il néglige les interactions des groupes secondaires entr'eux. Pour qu'il y ait couplage effectif dans ce cas, il faut qu'il y ait soit de grands moments de transition (fortes bandes d'absorption), soit une contiguïté virtuelle entre les deux groupes. On symbolisera ce mécanisme par l'appellation "mécanisme K".

Presque simultanément Condon, Altar et Eyring (70) ont proposé leur théorie dite "à un électron". Pour leur part, ils supposent que chaque électron de la molécule se meut dans un champ de forces dû à l'action sur cet électron de tous les autres atomes et des noyaux. L'activité optique est

.../...

alors due au mélange d'une transition magnétique d'un chromophore avec une transition électrique du même groupement sous l'influence du champ perturbateur provenant des autres groupements de la molécule. Le fait le plus important de cette théorie est qu'elle fait intervenir la nature statique du champ perturbateur à l'extérieur du groupe, et non le nombre des électrons du groupe. On désignera cette théorie par mécanisme CAE.

Ce n'est qu'en 1956 que Moffitt (71) proposa une théorie de "l'oscillateur couplé", que l'on peut rapprocher de celle de Kirkwood. Néanmoins Moffitt a tenu compte dans sa théorie du fait que l'état électronique fondamental de la molécule était dégénéré.

Enfin, un autre mécanisme de couplage a été proposé; ce mécanisme fait intervenir l'interaction d'une transition magnétiquement permise d'un chromophore avec une transition électriquement permise d'un autre chromophore. On l'appelle mécanisme  $\mu - m$ . Pendant très longtemps, on n'en a pas tenu compte.

### 3) Cas des peptides.

Dans la plupart des cas, l'activité optique des molécules peut être reliée à leur conformation en n'utilisant qu'une des théories précédentes, car l'un ou l'autre mode de couplage est prépondérant dans la molécule étudiée.

Ceci n'est plus vrai dans le cas de molécules contenant des groupements peptidiques. En effet, pour de tels dérivés, les bandes d'absorption que l'on peut mesurer expérimentalement sont dégénérées; de plus, elles sont à la fois du type électrique et du type magnétique (transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  et  $n \rightarrow \pi^*$ ). Il est donc nécessaire de tenir compte de tous les mécanismes envisagés précédemment (Kirkwood-Moffitt, CAE,  $\mu - m$ ). C'est ce qu'a fait Schellman (67) lorsqu'il a voulu relier forces rotatoires et conformations des peptides. Il voulait exprimer les forces rotatoires des transitions électroniques d'une molécule en fonction de toutes les transitions électroniques de ses N groupements constituants. Pour cela, il a supposé que ces groupements possèdent des états fondamentaux définis indépendamment les uns des autres, et qui sont perturbés dans la molécule par

.../...

des interactions entre les groupements. Ces interactions peuvent conduire à une dégénérescence des états à l'intérieur d'un groupe aussi bien qu'à un couplage des états dans différents groupes. D'autre part, il a négligé l'échange électronique entre les différents groupes. Une fois son modèle bien défini, Schellman est arrivé à une équation mathématique très complexe, incluant les théories de Kirkwood-Moffitt, Condon Altar et Eyring et  $\mu$ -m. Pour simplifier le problème, il n'a considéré qu'un nombre limité d'états électroniques des groupements individuels; en particulier, il n'a pas tenu compte des transitions spectrales inconnues, situées à des longueurs d'onde inaccessibles expérimentalement. De plus, il a supposé que l'état fondamental n'intervenait pas lors des interactions, de même que les configurations impliquant l'excitation simultanée de deux groupements différents. Il a pu ainsi établir un programme de calculs qu'il a appliqué à quelques molécules modèles, en particulier au cas de peptides trans-trans comportant deux groupements amide secondaire (ce qui correspond à un segment de deux unités peptidiques dans une chaîne polypeptidique). Ses résultats sont reportés sur des cartes donnant le signe de la force rotatoire totale correspondant à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  en fonction des angles conformationnels  $\phi$  et  $\psi$  du peptide. Sur la figure 18 sont représentés les résultats qui sont obtenus selon que l'on fait appel à l'une ou l'autre des théories considérées.

Les cartes a. et b. ont la même allure, ce qui montre que les calculs de Condon, Altar et Eyring (mécanisme CAE) et ceux de Kirkwood-Moffitt (mécanisme K) peuvent être utilisés indifféremment pour une étude de ce genre. Par contre, la carte c., qui fait intervenir également le mécanisme  $\mu$ -m, est très différente des deux premières, ce qui prouve l'importance de ce mécanisme dans le cas des peptides. Sur la carte d., enfin, on a tracé en pointillé des contours permettant une évaluation de la force rotatoire suivant la conformation envisagée, d'après les calculs de Schellman (67). Il faut cependant noter que seule la partie gauche de ces cartes est représentée (angles  $\phi$  compris entre 0 et  $180^\circ$ ); on peut obtenir la partie droite par symétrie de rotation autour du point  $\phi = 180^\circ$ ,  $\psi = 180^\circ$ , en

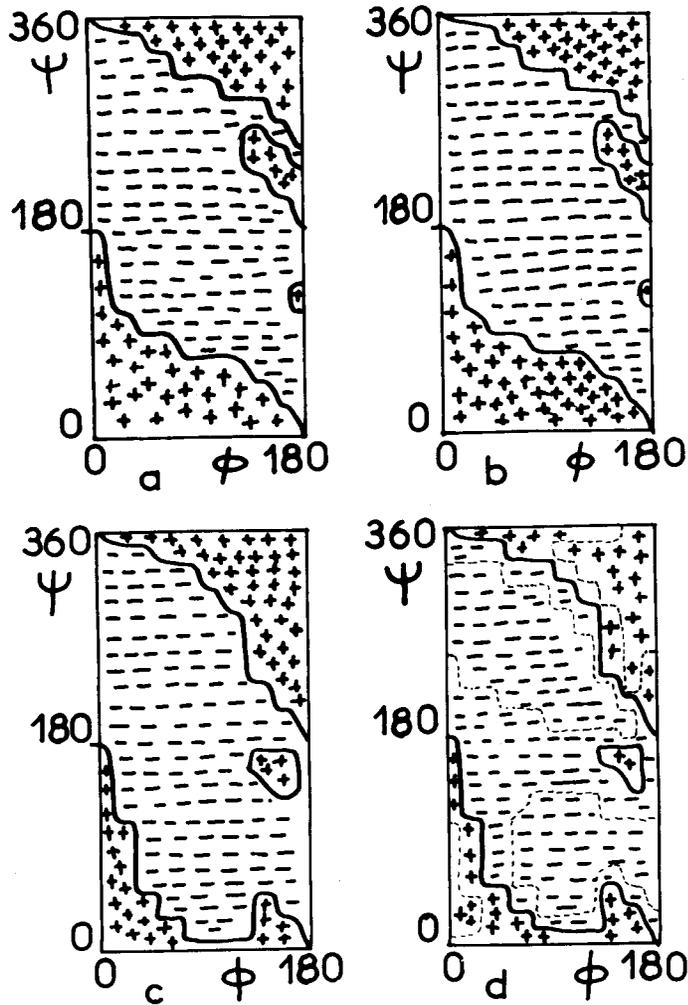


Figure 18

- a Mécanisme CAE
- b Mécanismes CAE + K
- c Mécanismes CAE + K +  $\mu$ -m
- d comme c -----  $R_j = \pm 0,1 DM.$



Cartes de Schellman

prenant soin toutefois d'intervertir les signes plus et moins.

#### 4) Cas des oligo-L-glutamates de 4 nitro-benzyle.

Expérimentalement, nous avons pu observer la bande dichroïque correspondant à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  peptidique pour tous les oligomères préparés. Cette bande étant électriquement défendue n'est pas très visible en ultra-violet (épaulement situé vers 220nm), mais est optiquement active et présente une ellipticité molaire intense. De plus, comme cette transition est éloignée des transitions dues au chromophore nitrobenzylique, nous avons pu évaluer la force rotatoire  $R_j$  en utilisant la relation de Moscovitz obtenue en assimilant la bande dichroïque à une gaussienne et que nous avons vue précédemment :

$$R_j = 0,696 \sqrt{\pi} \cdot 10^{-42} (\theta)_j^0 \frac{\Delta_j}{\lambda_j}$$

Les résultats sont reportés dans le tableau VI. Dans ce tableau l'ellipticité molaire est exprimée en degré.cm<sup>2</sup>.décimole<sup>-1</sup> et la force rotatoire est en DM. (DM = magneton Debye).

#### 5) Conclusion

On peut constater que, quel que soit le dérivé considéré, la force rotatoire est positive. Si on considère les longueurs d'onde auxquelles se situe la transition  $n \rightarrow \pi^*$  peptidique, on constate que cette bande est centrée aux alentours de 212 nm dans le cas des dimères, tandis qu'on la retrouve vers 218nm dans le cas des trimères. Pour les polypeptides sous forme hélicoïdale, cette transition se trouve vers 222 nm, tandis qu'elle est située vers 217nm dans le cas des polypeptides sous forme désordonnée. Nous voyons donc que la bande  $n \rightarrow \pi^*$  se situe sensiblement à la même longueur d'onde dans le cas de nos trimères que dans le cas des polypeptides sous forme désordonnée; cela semble normal, car un trimère n'est pas un enchaînement assez long pour que l'on puisse envisager

.../...

TABLEAU VI

*Mesures de dichroïsme circulaire.  
Chromophore peptidique.*

	$\lambda$ nm	$(\theta)_j^{\circ}$	$R_j$ DM.
Monomère protégé	213	2980	0,0334
Dimère protégé	214	29320	0,2006
Dimère non protégé	211	9080	0,0573
Trimère protégé	217,5	11000	0,0706
Trimère non protégé	220	15900	0,1715

--00 0 00--



une conformation autre qu'une chaîne. Par contre, la bande  $n \rightarrow \pi^*$  est décalée vers le bleu dans le cas des dimères. Ce phénomène a déjà été observé par Schellman (67), qui situe cette bande à  $212 \pm 2 \text{ m}\mu$ . Le di-L-glutamate de 4 nitrobenzyle, qu'il soit ou non protégé, présente une bande correspondant à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  peptidique située dans cet intervalle de longueurs d'onde.

Nous nous intéresserons plus particulièrement au cas du trimère non protégé, en utilisant les cartes conformationnelles établies par Schellman (67) dans le cas des peptides trans-trans comportant deux groupements amide secondaire (Figure 18d). Nous pouvons simplement dire que le tri-L-glutamate de 4 nitrobenzyle aura une conformation indiquée sur la carte 18d- par les zones notées +.

Ces conformations seront donc situées dans une des zones répertoriées dans le tableau VII. Dans ce tableau, on a repéré les valeurs possibles de l'angle  $\psi$  correspondant à une certaine valeur de l'angle  $\phi$ . Nous ne pouvons pas être plus précise, car, n'ayant pu atteindre expérimentalement la bande dichroïque correspondant à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  des oligo-L-glutamates de 4 nitrobenzyle, nous ne pouvons utiliser la carte établie par Schellman et précisant le signe de la force rotatoire en fonction de la conformation du peptide dans le cas de cette transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

TABLEAU VII

*Conformations possibles pour le trimère  
non protégé.*

$\phi^{\circ}$	0-10	10-20	20-30	30-50	50-90	90-110
$\psi^{\circ}$	0-180 ou 350-360	0-180 ou 190-230 ou 330-360	0-150 ou 190-230 ou 330-360	0-150 ou 190-210 ou 310-360	0-60 ou 350-360	10-30 ou 350-360
$\phi^{\circ}$	110-130	130-150	150-170	170-180	180-210	210-230
$\psi^{\circ}$	10-30 ou 330-360	0-10 ou 310-360	0-10 ou 250-360	0-10 ou 180-360	160-190 ou 230-330	130-190 ou 210-310
$\phi^{\circ}$	230-250	250-310	310-330	330-350	350-360	
$\psi^{\circ}$	50-350	30-330	30-310	10-250	0-180	

--00 0 00--



## CONCLUSION.

Dans un premier temps, nous avons fabriqué quelques oligo-L-glutamates de para nitrobenzyle, d'une part par la méthode en phase solide de Merrifield, d'autre part par la méthode classique " pas à pas ". Les dérivés intermédiaires préparés étant difficilement cristallisables, nous n'avons pu fabriquer que le dimère et le trimère par les deux méthodes indiquées plus haut.

L'étude par dichroïsme circulaire de ces oligomères est compliquée par le fait que le chromophore nitrobenzylique présente une bande d'absorption intense en ultra-violet dans le domaine de longueurs d'onde étudiées.

Cependant les bandes dichroïques dues au groupement peptidique et celles dues au groupement nitrobenzylique sont nettement séparées, ces deux groupements présentant des bandes d'absorption UV dans des domaines de longueurs d'onde bien distincts. Cela nous a permis, en utilisant les calculs de Schellman (67), de proposer plusieurs conformations possibles pour le trimère non protégé, ces conformations étant déterminées à partir du signe de la force rotatoire pour la transition  $n \rightarrow \pi^*$  du chromophore peptidique. N'ayant pu atteindre expérimentalement la bande dichroïque correspondant à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  de ce même chromophore, nous n'avons pu préciser la ou les conformations les plus probables pour ce dérivé.

D'autre part, aussi bien pour le monomère que pour les oligomères, nous avons pu mettre en évidence des effets Cotton correspondant aux bandes d'absorption en ultra-violet dues au chromophore nitrobenzylique. Ce résultat nous amène à penser qu'il y a repliement de la chaîne latérale vers le " squelette " peptidique. L'origine des effets Cotton présentés par le monomère proviendrait donc de l'influence du carbone asymétrique; pour les autres composés, il y aurait également influence du carbone asymétrique; mais, par suite du repliement de la chaîne latérale vers le "squelette" peptidique, nous pensons qu'il y aurait aussi couplage entre les transitions dues au groupement

.../...

nitrobenzylique et celles dues au groupement peptidique. Ce résultat est d'autant plus intéressant que, contrairement à ce qu'on admettait généralement jusqu'ici, la structure hélicoïdale des polypeptides serait stabilisée non pas par les interactions entre chaînes latérales, mais plutôt par les interactions entre chaînes latérales et squelette polypeptidique (72). Une conclusion analogue avait pu être tirée à la suite de travaux entrepris au laboratoire sur les poly-L-glutamates d'ortho et de para nitrobenzyle.

Il est donc intéressant de continuer cette étude en fabriquant des oligomères plus longs, jusqu'à ce que l'enchaînement polypeptidique soit suffisamment important pour que les produits adoptent une configuration hélicoïdale.

## B I B L I O G R A P H I E

---

1. E.FISCHER et K.OTTO. Ber. Deut. Chem. Ges. 34, 2106 (1903).
2. K.D.KOPPLE. "*Peptides et acides aminés*", Ediscience, Paris 1968.
3. M.BODANSZKY et M.A.ONDETTI. "*Peptide Synthesis*", John Wiley and Sons, New York 1966.
4. E.SCHRÖDER et K.LÜBKE. "*The peptides*", Vol. I, Academic Press, New-York 1965.
5. S.G.WALEY. Chem. Ind. (London) 1953, 107.
6. F.WEYGAND et E.CSENDES. Angew. Chem. 64, 136 (1952).
7. J.C.SHEEHAN et V.S.FRANK. J. Amer. Chem. Soc. 71, 1856 (1949).
8. L.ZERVAS, D.BOROVAS et E.GAZIS. J. Amer. Chem. Soc. 85, 3660 (1963).
9. E.FISCHER et W.LIPSCHITZ. Ber. Deut. Chem. Ges. 48, 360 (1915).
10. G.AMIARD, R.HEYMES et L.VELLUZ. Bull. Soc. Chim. France 1955, 191.
11. G.AMIARD, R.HEYMES et L.VELLUZ. Bull. Soc. Chim. France 1954, 1012.
12. K.RÜHLMANN et U.KAUFMANN. Ann. Chem. Liebigs 656, 22 (1962).
13. M.BERGMANN et L.ZERVAS. Ber. Deut. Chem. Ges. 65, 1192 (1932).
14. F.C.Mc.KAY et N.F.ALBERTSON. J. Amer. Chem. Soc. 79, 4686 (1957).
15. R.PAUL et G.W.ANDERSON. J. Org. Chem. 27, 2094 (1962).
16. R.A.BOISSONNAS, st. GUTTMANN, P.A.JAQUENOUD et J.P.WALLER. Helv. Chim. Acta. 38, 1491 (1955).

.../...

17. S. INOUE, S. SAKAKIBARA. *Bull. Chem. Soc. Japan* 38, 1522 (1965).
18. G. LOSSE, K. NEUBERT, H. JESCHKEIT. *Chem. Ber.* 99, 2803 (1966).
19. S. SAKAKIBARA, T. FUKUDA, Y. KISHIDA, I. HONDA. *Bull. Chem. Soc. Japan.* 43, 3322 (1970).
20. H. SACHS et E. BRAND. *J. Amer. Chem. Soc.* 75, 4610 (1953).
21. G. W. ANDERSON et F. M. CALLAHAN. *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 3359 (1960).
22. M. BERGMANN, L. ZERVAS et L. SALZMANN. *Ber. Deut. Chem. Ges.* 66, 1288 (1933).
23. H. SCHWARZ et K. ARAKAWA. *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 5691 (1959).
24. F. WEYGAND et K. HUNGER. *Chem. Ber.* 95, 1 (1962).
25. G. H. L. NEFKENS, G. I. TESSER et R. J. F. NIVARD. *Rec. Trav. Chim.* 82, 941 (1963).
26. O. K. BEHRENS et M. BERGMANN. *J. Biol. Chem.* 129, 587 (1939).
27. M. Z. MAGEE et K. J. HOFMANN. *J. Amer. Chem. Soc.* 71, 1515 (1949).
28. H. ZAHN et N. H. LA FRANCE. *Ann. Chem. Liebigs* 630, 37 (1960).
29. J. CURTIUS. *Ber.* 35, 3226 (1902).
30. T. WIELAND, W. KERN et R. SEHRING. *Ann.* 117, 569 (1950).
31. R. A. BOISSONNAS. *Helv. Chim. Acta.* 34, 874 (1951).
32. J. L. BAILEY. *J. Chem. Soc.* 1956, 3461.
33. Y. IWAKURA, K. UNO, M. OYA et R. KATAKAI. *Biopolymers* 9, 1419 (1970).
34. M. BODANSZKY. *Acta. Chim. Acad. Sci. Hung.* 10, 335 (1956).

35. S.GOLDSCHMIDT. Angew. Chem. 62, 538 (1950).
36. S.GOLDSCHMIDT et C.JUTZ. Chem. Ber. 86, 1116 (1953).
37. J.C.SHEEHAN et G.P.HESS. J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 (1955).
38. J.C.SHEEHAN, M.GOODMAN et G.P.HESS. J. Amer. Chem. Soc. 78, 1367; (1956).
39. M.B.MERRIFIELD. J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1964).
40. M.GOODMAN et K.C.STUEBEN. J. Org. Chem. 27, 3409 (1962).
41. M.W.WILLIAMS et G.T.YOUNG. J. Chem. Soc. 1964, 3701.
42. M.GOODMAN et M.J.Mc GAHREN. Tetrahedron 23, 2031 (1967).
43. J.M.STEWART et J.D.YOUNG. "*Solid Phase Peptide Synthesis*", Freeman and Co, San Francisco 1969.
44. J.M.STEWART, J.D.YOUNG, E.BENJAMINI, M.SHIMIZU et C.Y.LEUNG. Biochemistry 5, 3396 (1966).
45. L.A.CARPINO, C.A.GIZA et B.A.CARPINO. J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1959).
46. J.HALSTRØM, O.SCHOU, K.KOVÁCS et K.BRUNFELDT. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1576 (1970).
47. P.LE.BARNY Thèse (Lille) 1972.
48. S.ALLENMARK. Acta. Chem. Scand. 20, 910 (1966).
49. K.BRUNFELDT et J.HALSTRØM. Acta. Chem. scand. 24, 3013 (1970).
50. E.SCHNABEL. Ann. 702, 188 (1967).

.../...

51. P.B.HAWK, B.L.OSER et W.H.SUMMERSON Practical Physiological Chemistry (Blakiston, 13th ed,1954),955.
52. E.KAISER, R.L.COLESCOTT, C.D.BOSSINGER et P.I.COOK. Anal. Biochem. 34, 595 (1970).
53. W.TROLL et R.K.CANNAN.J.Biol.Chem.200, 803 (1953).
54. Y.TRUELLE et G.SPACH.Bull.Soc.Chim.France.1971, 4495.
55. A.BRACK et G.SPACH.Bull.Soc.Chim.France. 1971, 4484.
56. H.DETERMANN "*Chromatographie sur gel*", Masson et Co.,Paris 1969.
57. A.COTTON. Ann.Chim.Phys. 8, 347 (1896).
58. A.MOSCOWITZ "*Optical Rotatory Dispersion*" (C.Djerassi, Mc Graw-Hill ed., New-York, 1960), 150.
59. E.R.BLOUT et L.STRYER.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 45, 159 (1959).
60. D.L.PETERSON,et W.T.SIMPSON.J.Amer.Chem.Soc. 79, 2375 (1953).
61. L.J.SAIDEL.Arch.Biochem.Biophys. 56, 45 (1955).
62. G.HOLZWARTH et P.DOTY.J.Amer.Chem.Soc. 87, 218 (1965).
63. M.GOODMAN, I.LISTOWSKY, E.E.SCHMITT. J.Amer.Chem.Soc. 84, 1296 (1962).
64. D.W.URRY "*Spectroscopic Approaches to Biomolecular Conformation*" (D.W.Urry Ed., Chicago, 1969) p 33.
65. G.N.RAMACHANDRAN. Biopolymers 6, 1494 (1968).

66. H.A.SCHERAGA, R.A.SCOTT, G.VANDERKOOI, S.J.LEACH, K.D. GIBSON, T.OOI et G.NEMETHY. "Conformation of Biopolymers", (G.N.Ramachandran Ed., London and New-York, 1967) p 43.
67. P.M.BAYLEY, E.B.NIELSEN et J.A.SCHELLMAN. J.Phys.Chem. 73, 228 (1969).
68. J.T.EDSALL, P.J.FLORY, J.C.KENDREW, A.M.LIQUORI, G.NEMETHY, G.N.RAMACHANDRAN et H.A.SCHERAGA. Biopolymers 4, 121 (1966).
69. J.G.KIRKWOOD J.Chem.Phys. 5, 479 (1937).
70. E.U.CONDON, W.ALTAR et H.EYRING. J.Chem.Phys. 5, 753 (1937).
71. W.MOFFITT J.Chem.Phys. 25, 467 (1956).
72. A.V.FINKELSTEIN et O.B.PTITSYN. J.Mol.Biol. 62, 613 (1971).

--oo 0 oo--

