

50376  
1972  
N° d'ordre 332  
66

50376  
1972  
66

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

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

par

**MICHEL MORCELLET**

---

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA TRANSITION  
CONFORMATIONNELLE DE L'ACIDE POLY L GLUTAMIQUE



Soutenu le 8 juillet 1972 devant la Commission d'examen :

M. C. LOUCHEUX, président  
M<sup>me</sup> M. EVRARD, examinateur  
M<sup>me</sup> M.-H. LOUCHEUX, examinateur  
M. G. WEILL, membre invité



|     |                       |                           |
|-----|-----------------------|---------------------------|
| 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 1 <sup>er</sup> 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  | EVARD 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.   | JOURNEL 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 Ladislav           | 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 Joëlle

A mes parents,

A ma soeur,

A mon frère,

A mes amis,

en témoignage de ma  
profonde affection.

A Monsieur le Professeur C.LOUCHEUX

qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et qui m'a  
proposé le sujet du travail exposé dans cette thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde et respectueuse  
gratitude pour ses conseils éclairés et pour les fructueuses  
discussions que nous avons eues ensemble.

Je suis reconnaissant à M<sup>me</sup> M.H.LOUCHEUX, Chargée de Recherche au C.N.R.S., de m'avoir fait profiter de son expérience scientifique.  
Qu'elle soit remerciée pour avoir accepté de participer au Jury de cette thèse.

Je remercie également M<sup>me</sup> M.EVRARD, Chef du Département de Chimie de l'Institut Universitaire de Technologie de Lille, qui a bien voulu me faire l'honneur d'examiner ce travail.

Monsieur G.WEILL, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg a bien voulu participer au Jury de cette thèse.  
Qu'il en soit vivement remercié.

Monsieur le Professeur J.MONTREUIL m'a permis d'effectuer les mesures de pouvoir optique rotatoire dans son laboratoire. Qu'il veuille bien accepter ici mes remerciements.

Une partie de ce travail a été réalisé au laboratoire de biophysique de Monsieur le Professeur M.DAUNE à Strasbourg, et au laboratoire de génétique moléculaire de Monsieur le Professeur V.LUZZATI à Gif sur Yvette. Je suis heureux de leur exprimer ici ma reconnaissance.

Je ne voudrais pas oublier tous mes camarades de laboratoire dont la gentillesse n' a cessé d'entretenir un climat de franche amitié dont je les remercie. Ils ont contribué à un titre ou à un autre à la réalisation de cette thèse, en particulier M<sup>me</sup> HILDEBRAND qui s'est chargée du travail de dactylographie.

I N T R O D U C T I O N

L'étude de la structure secondaire des protéines présente de grandes difficultés en raison de la variété des acides aminés enchaînés les uns aux autres pour constituer le squelette peptidique de ces protéines. Le problème est en grande partie simplifié si on utilise comme modèle pour l'étude des protéines des polypeptides de synthèse ne comportant qu'un seul type de résidu.

Pour beaucoup de ces polypeptides synthétiques, on a pu mettre en évidence par diverses méthodes physico-chimiques une transition morphologique entre l'hélice  $\alpha$  de PAULING et COREY, et une structure désordonnée.

Cette transition peut avoir deux types de mécanismes:

-Dans un premier cas, le polymère est en solution dans un mélange de deux solvants organiques dont un stabilise la forme hélice, et l'autre la forme chaîne. La transition est alors induite en faisant varier la composition du solvant. C'est le cas du poly-L-glutamate de benzyle (PLGB) en solution dans un mélange acide dichloroacétique (ADC) - dichloréthane (DCE) (1).

En présence de DCE, le PLGB se présente sous forme d'hélice  $\alpha$  et les liaisons hydrogène intramoléculaires stabilisent la structure. Si l'on ajoute de l'ADC à un tel système, les liaisons hydrogène s'établissent entre les groupes peptidiques du PLGB et l'ADC lui-même. L'hélice  $\alpha$  est alors détruite et une structure désordonnée apparaît.

-Le second cas est celui des polypeptides portant sur leur chaîne latérale des groupements ionisables acides ou basiques. La transition est alors provoquée par la variation du pH.

L'exemple le plus connu est celui de l'acide poly-L-glutamique (PLGA). L'augmentation du pH provoque l'ionisation des groupes carboxyliques en  $\text{COO}^- \text{H}^+$ . Il y a simultanément rupture des liaisons hydrogène, partiellement responsables de la stabilité de l'hélice  $\alpha$ . De plus, l'augmentation de la densité de charge le long de la chaîne provoque des

répulsions électrostatiques importantes qui désorganisent l'hélice  $\alpha$ . Bien qu'on sache depuis longtemps que l'existence des répulsions électrostatiques agissant sur une chaîne de polymère, provoque une extension de cette chaîne, les polypeptides chargés ont néanmoins été considérés comme des modèles de chaîne statistique.

L'acide poly-L-glutamique (PLGA) a déjà fait l'objet de nombreux travaux<sup>(2-7)</sup>, et le but de notre travail a été de préciser le type de structures rencontrées au cours de la transition.

Nous sommes partis du résultat bien connu de DOTY, WADA, YANG et BLOUT<sup>(2)</sup> qui ont étudié le PLGA dans un solvant constitué par un mélange 2/1 en volumes, d'une solution aqueuse de NaCl 0,2M et de dioxanne.

Ces auteurs ont montré qu'à pH 4,4, le PLGA est sous forme d'hélice  $\alpha$  et à pH 12 sous forme de chaîne statistique. Ils ont étudié la transition entre ces deux formes, qui se situe au pH 6,0.

Cependant, il semblait intéressant de faire une étude systématique de l'influence du dioxanne sur la stabilité de l'hélice  $\alpha$ . Nous avons donc étudié les propriétés de solutions de PLGA contenant des quantités variables de dioxanne, en nous intéressant bien entendu à mettre en évidence la transition qui se produit lorsque le pH varie.

Les méthodes physico-chimiques que nous avons employées sont la mesure de viscosité intrinsèque des solutions d'une part, et des propriétés optiques liées à la présence du carbone asymétrique du résidu acide glutamique de l'autre. Ces propriétés sont mises en évidence par l'étude de la dispersion optique rotatoire (D.O.R.) et du dichroïsme circulaire (D.C.) des solutions. Nous avons porté un intérêt tout particulier aux résultats fournis par cette dernière technique qui est très utilisée depuis quelques années dans le domaine des polypeptides. Nous avons tenu le plus grand compte des résultats obtenus par KRIMM et TIFFANY qui ont montré que les polypeptides ionisés n'adoptent pas une structure unique chaîne statistique<sup>(3-4-5)</sup>.

P L A N

INTRODUCTION.

PREMIER CHAPITRE. Etude de la transition du PLGA par la technique viscosimétrique.

DEUXIEME CHAPITRE. Etude optique de la transition du PLGA par Dispersion optique rotatoire (D.O.R.).

TROISIEME CHAPITRE. Etude optique de la transition du PLGA par Dichroïsme circulaire(D.C.).

QUATRIEME CHAPITRE. Discussion des résultats.

CONCLUSION.

--oo O oo--

PREMIER CHAPITRE

ETUDE DE LA TRANSITION DU PLGA PAR LA TECHNIQUE VISCOSIMETRIQUE

I Principe et rappel des résultats généraux pour les polymères.

II Echantillon utilisé. Préparation des solutions.

III Résultats.

- a) dans l'eau + Na Cl 0,2M.
- b) dans l'eau + acétate de Na 0,15M
- c) dans le mélange eau + Na Cl 0,2M  
+ dioxanne en différentes proportions.
- d) dans l'eau + Na Cl 5M.

## I PRINCIPE

A partir des données classiques de la viscosité, si on appelle  $\eta$  la viscosité d'une solution de concentration  $c$ , et  $\eta_0$  la viscosité du solvant, on définit la viscosité intrinsèque du soluté, comme étant la limite de la quantité  $\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c}$  quand  $c$  tend vers zéro.

Dans le cas de macromolécules, la relation de MARK-HOUWINK décrit très convenablement les propriétés hydrodynamiques

$$[\eta] = K M^a$$

$K$  et  $a$  sont des constantes pour un couple soluté-solvant donné. La valeur de  $a$  dépend de la morphologie des macromolécules dissoutes.  $a$  varie de 0,5 à 0,8 pour des chaînes souples, 0,5 étant la valeur limite obtenue pour une chaîne de GAUSS en solution dans un solvant théta. Pour des macromolécules en forme de bâtonnet rigide, la théorie indique que  $a$  doit avoir la valeur 2. La mesure de  $[\eta]$  permettra donc de mettre en évidence le passage d'une structure à une autre, pour autant qu'il se traduise par des différences de rigidité du soluté.

### Remarque

Dans le cas des polyélectrolytes en solution dans l'eau pure, la quantité  $\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c}$  augmente lorsque  $c$  diminue.

Ce comportement (effet de polyélectrolyte) a pour origine les répulsions électrostatiques entre charges de même signe, portées par le polymère. On le fait disparaître en ajoutant au milieu un électrolyte fort de petite

.../...

masse moléculaire, comme Na Cl. Les petits ions ajoutés font écran entre les charges portées par la macromolécule, et le comportement redevient normal.

Toutes nos mesures ont été effectuées à la température de 25°C en utilisant le viscosimètre automatique VISCOMAT de la firme FICA.

## II ECHANTILLON UTILISE ET PREPARATION DES SOLUTIONS.

### a) Echantillon utilisé.

L'échantillon d'acide poly-L-glutamique, sous forme acide, utilisé pour les mesures de viscosité, a été fourni par la firme PILOT (lot N° G 120).

La viscosité de cet échantillon a été mesurée dans les conditions standard, décrites par WADA<sup>(6)</sup>, afin de déterminer sa masse moléculaire. La viscosité intrinsèque dans une solution aqueuse de Na Cl 0,2M à pH 7,3 est:

$$[\eta] = 127 \text{ cm}^3/\text{g}$$

A l'aide de la courbe d'étalonnage, la masse moléculaire moyenne en poids  $\bar{M}_w$  a été trouvée égale à 58.000 pour le PLGA sous forme acide, c'est à dire pour un résidu de masse égale à 129 ( $\overline{DP}_w = 450$ ).

### Remarque

Certains auteurs, en particulier D.CONSTANTIN<sup>(7)</sup>, ont soulevé le problème de l'hydratation de l'acide poly-L-glutamique. En particulier sous forme de sel de sodium, il peut contenir une mole d'eau fixée par mole de résidu, ce qui entraînerait dans ce cas une erreur de 10% environ sur la détermination des concentrations.

Que ce soit par analyse élémentaire ou par dosage acide-base, nous n'avons pas pu mettre en évidence dans notre échantillon la présence d'eau. Le dosage potentiométrique des fonctions acides a montré que le nombre de fonctions acides correspondait à celui calculé par pesée.

#### b) Préparation des solutions.

Les solutions utilisées au cours de ce travail ont été préparées par dissolution à la température ambiante, dans une solution aqueuse de soude normale, d'une quantité pesée d'acide poly-L-glutamique. Quand la dissolution est terminée, on ajoute une solution aqueuse de chlorure de sodium 0,2M pour obtenir le volume désiré. (La force ionique 0,2M en Na Cl est destinée à supprimer l'effet polyélectrolyte).

Finalement, le pH de la solution est ajusté à la valeur souhaitée par addition d'acide chlorhydrique normal ou décimormal selon le cas.

Dans le cas des solutions en mélange binaire eau-dioxanne, les solutions aqueuses préparées ci-dessus ont été diluées avec le volume nécessaire de dioxanne distillé. La composition du solvant est alors caractérisée par la fraction en volume de dioxanne.

Les pH ont été mesurés à l'aide d'un pH mètre Radiometer, modèle n° 26, équipé d'une électrode de verre Radiometer G 202 C et d'une électrode au Calomel Radiometer K 401.

Le pH a été étalonné à l'aide de tampons étalons de pH 6,50 et 4,62 (Merck).

Avant d'être introduites dans le viscosimètre, les solutions ont été filtrées afin d'éviter la perturbation des mesures par des poussières. On a utilisé pour cela des filtres Millipore de deux types:

- UGWP 047 Solvinert pour les solutions purement aqueuses  $\phi = 0,25 \mu$
- LSWP 047 Mitex pour les mélanges avec le dioxanne  $\phi = 5,0 \mu$

La mesure du pH de la solution en fin de manipulation a montré, dans tous les cas, que la dilution ne provoquait qu'une variation de pH inférieure à 0,1, que le dioxanne soit présent ou non dans la solution.

### III RESULTATS EXPERIMENTAUX.

#### a) Solutions de PLGA dans l'eau + Na Cl 0,2M

Nous avons tout d'abord étudié le comportement viscosimétrique du PLGA en l'absence de dioxanne.

Les mesures ont été effectuées en faisant varier le pH des solutions de 4 à 11. Dans tous les cas, la variation de la quantité  $\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c}$  est

bien linéaire en fonction de la concentration c.

La figure(1) montre que la transition morphologique présentée par le PLGA se situe au pH 5,5. La structure correspondant aux pH les plus bas, a une faible viscosité comparée à celle que l'on obtient pour la structure correspondant aux valeurs élevées du pH. Ce comportement est tout à fait différent de celui mis en évidence par DOTY et ses collaborateurs<sup>(2)</sup>.

C'est pourquoi nous avons tenu à vérifier deux points qui font l'objet des paragraphes b) et c):

-que ce comportement se retrouve avec d'autres sels que Na Cl.

-que, si nous ajoutons du dioxanne, nous retrouvons le comportement signalé par DOTY.

#### b) Solutions de PLGA dans le tampon acétate 0,15M

Le comportement viscosimétrique obtenu est reporté également sur la figure (1).

Nous constatons que la variation de viscosité intrinsèque se fait dans le même sens que dans le cas précédent. De plus, les valeurs des viscosités à pH égal sont très voisines dans les deux cas.

Des mesures effectuées en tampon phosphate 0,1M à des pH basiques donnent également des valeurs de  $(\eta)$  pratiquement égales aux précédentes:

$$(\eta) = 157 \text{ cm}^3/\text{g}$$

.../...

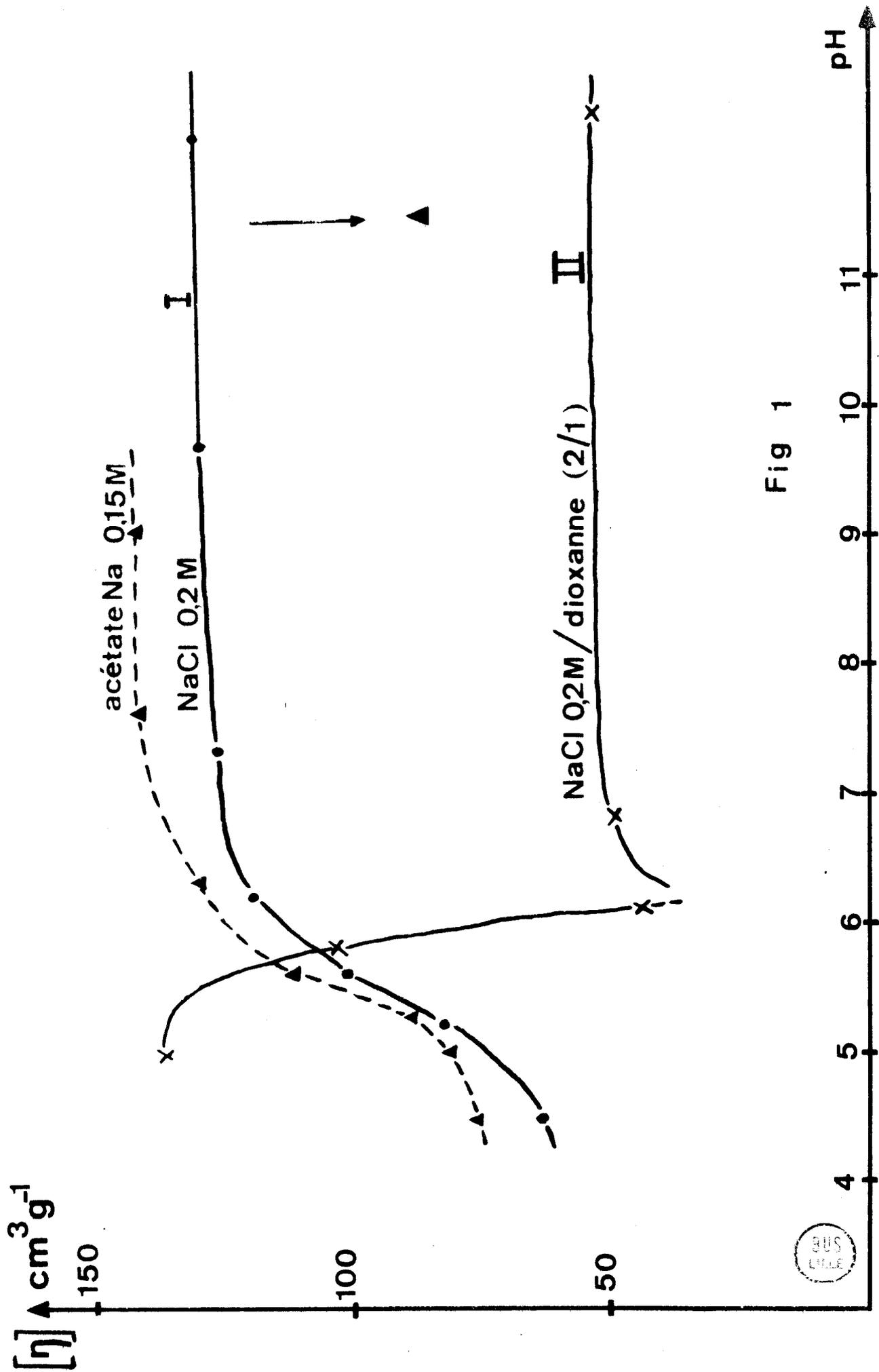


Fig 1



c) Solutions de PLGA dans les mélanges : eau, Na Cl 0,2M / Dioxanne.

Les résultats obtenus dans le mélange eau, Na Cl 0,2M / Dioxanne, 2/1, apparaissent sur la figure(1).

Nous retrouvons ici le même comportement que celui qui a été décrit par DOTY et Coll. Ce résultat montre l'influence importante de la présence du dioxanne. De plus, le pH de la transition en présence de dioxanne passe de la valeur 5,5 à la valeur 6. Nous voyons donc que la présence de dioxanne stabilise bien la forme présente aux bas pH.

Ces deux comportements, qui se traduisent par des viscosités intrinsèques très différentes pour une même valeur du pH selon que l'on est en présence de dioxanne ou non, nous ont conduit à une série supplémentaire de mesures.

Aux deux pH extrêmes de 4,8 et 11, nous avons étudié la viscosité intrinsèque de solutions aqueuses de PLGA, avec 0,2M Na Cl et des quantités variables de dioxanne. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure (2) .

Aucune discontinuité n'apparaît sur les courbes et nous pouvons donc dire que l'on passe de l'un à l'autre comportement représentés sur la figure (1), de manière continue.

Nous voyons que pour 19% en volume de dioxanne, on doit obtenir la transition du PLGA sans variation de viscosité intrinsèque. La figure (3) montre qu'il en est bien ainsi, aux erreurs d'expérience près. (Cette série de mesures a été effectuée sur un autre échantillon de PLGA).

d) Solutions de PLGA dans Na Cl 5M.

La force ionique a une influence importante sur le comportement du PLGA.

A pH 11, la chaîne ionisée de PLGA, en présence de Na Cl 5M, a une viscosité intrinsèque beaucoup plus faible qu'en présence de Na Cl 0,2M. ( $86 \text{ cm}^3/\text{g}$  au lieu de  $130 \text{ cm}^3/\text{g}$ ). Cette expérience montre que, en solution dans Na Cl 0,2M, on a affaire à une structure assez déployée,

.../...

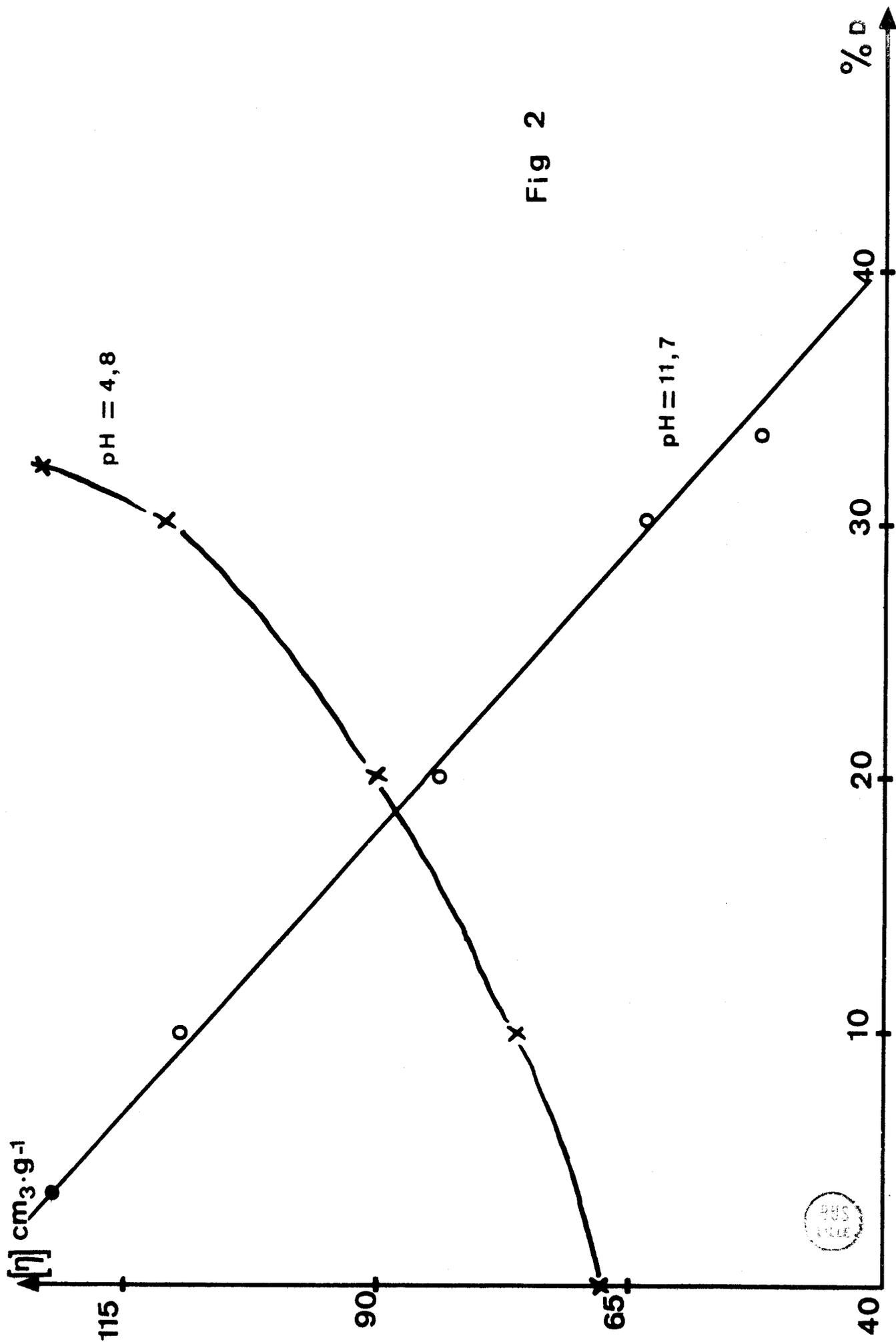


Fig 2

PHS  
LILLE

Mélange (NaCl 0,2M - Dioxanne)  
81% - 19%

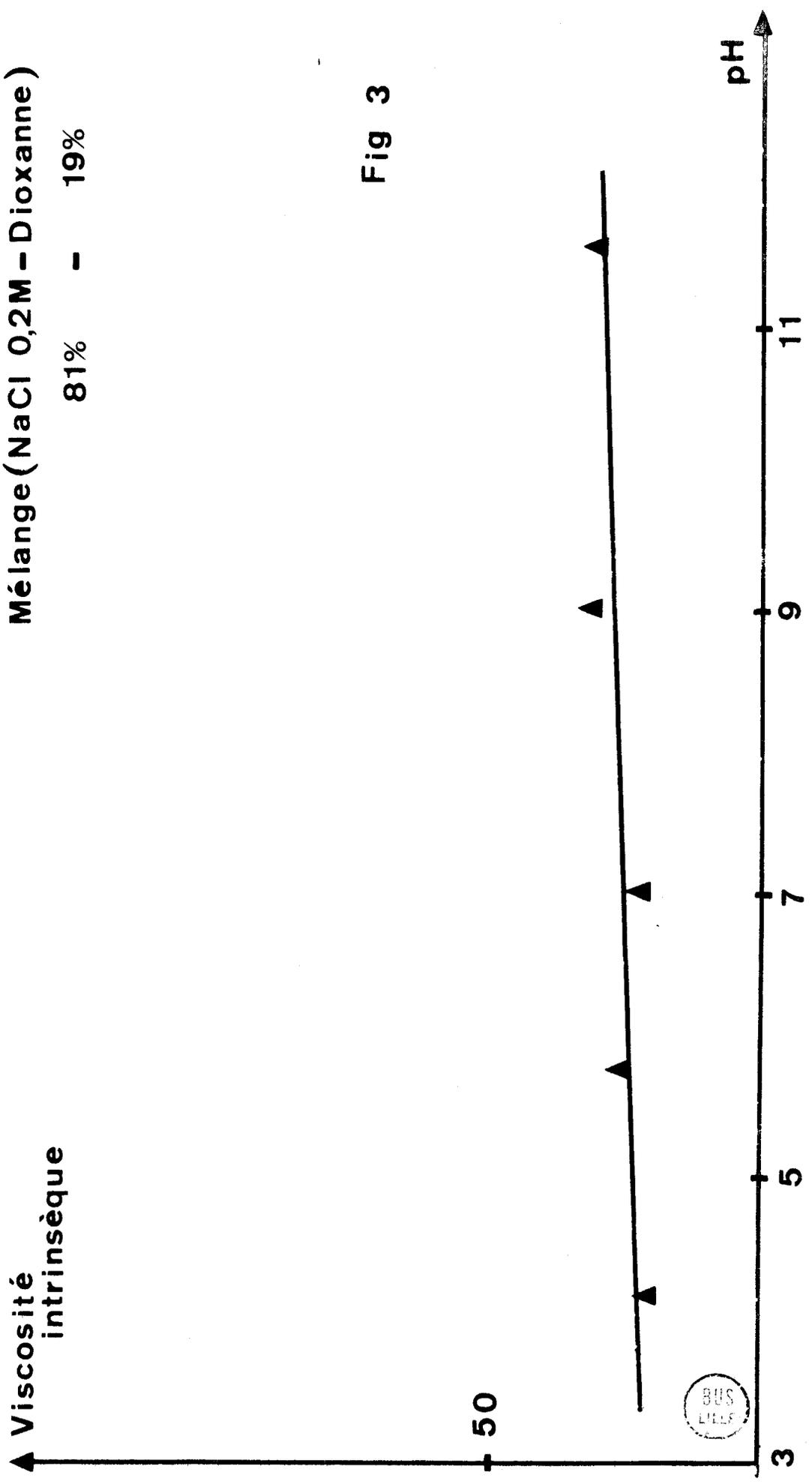


Fig 3

susceptible de se ramasser fortement sur elle-même lorsqu'on augmente la force ionique du milieu.

Pour conclure, l'étude viscosimétrique pose plus de problèmes qu'elle n'en résout.

Cependant si, à partir des résultats expérimentaux obtenus par DOTY et Coll. et par nous-mêmes en présence de dioxanne (mélange 2/1) à pH 5, on calcule la relation de MARK-HOUWINK correspondante, on trouve:

$$[\eta] = 1,33 \cdot 10^{-7} \bar{M}_w^{1,47}$$

La valeur élevée de  $a$  indique un comportement de molécules assez rigides et est compatible avec tout ce que l'on sait des propriétés de l'hélice  $\alpha$  de PAULING et COREY. Cette valeur est cependant entachée d'une erreur très grande étant donné qu'elle est calculée à partir de deux points expérimentaux seulement.

Nous pouvons faire le même calcul à partir des mêmes données expérimentales (eau, Na Cl 0,2M / Dioxanne), mais en milieu basique, à pH 7,3.

Nous avons la relation:

$$[\eta] = 0,395 \cdot 10^{-2} \bar{M}_w^{0,45}$$

L'erreur sur  $a$  est bien entendu très grande, pour les mêmes raisons que précédemment, mais il semble que l'on ait affaire ici à un comportement voisin de celui d'une chaîne de GAUSS. Ceci est confirmé par le fait que le coefficient de HUGGINS obtenu dans ce cas est très faible.

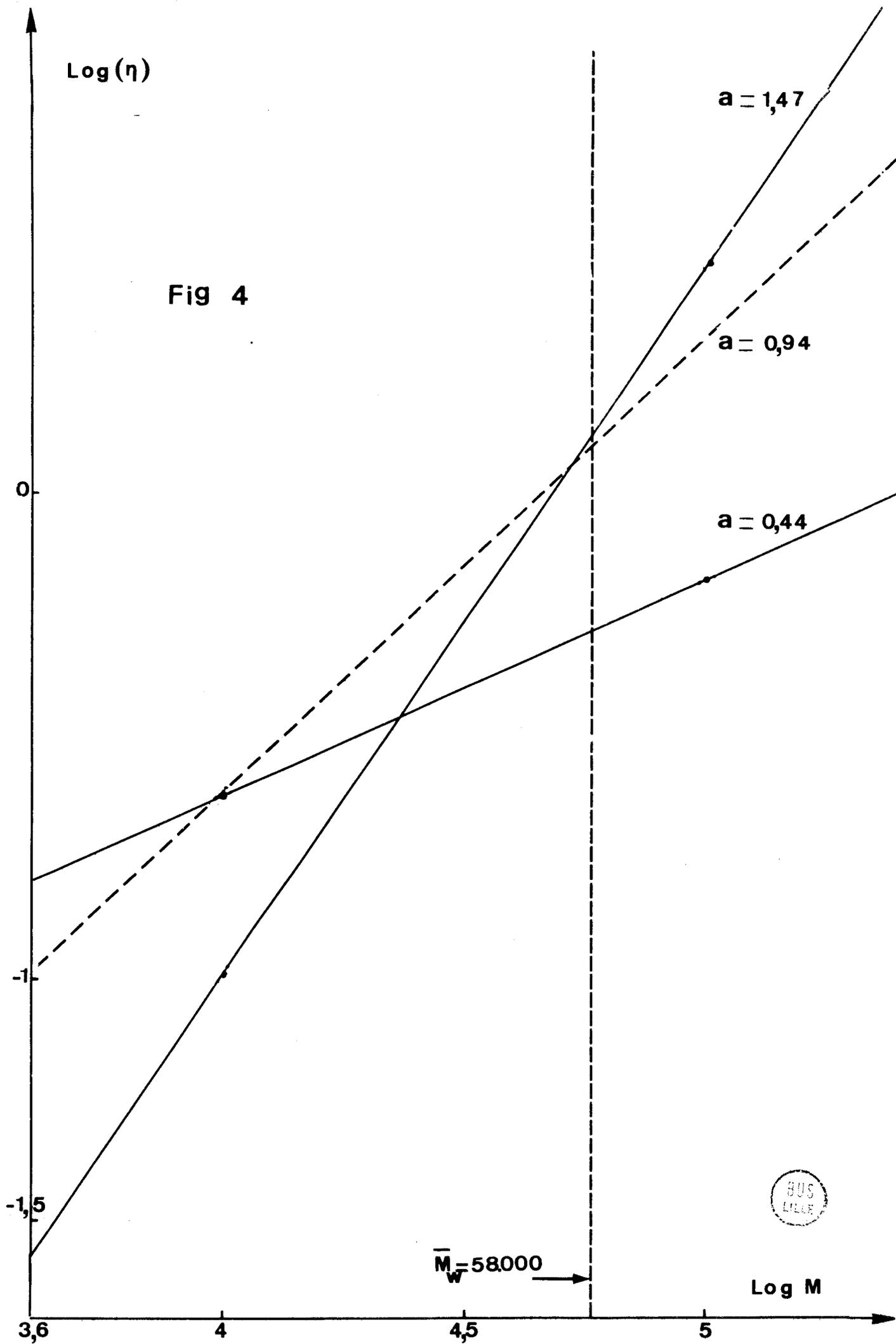
En l'absence de dioxanne, nous disposons d'une série de valeurs expérimentales obtenues par WADA à pH 7,3 dans Na Cl 0,2M, et utilisées pour tracer la courbe d'étalonnage des masses moléculaires que nous avons déjà utilisée plus haut pour caractériser notre échantillon de PLGA. Ces

.../...

valeurs correspondent à la relation:

$$[\eta] = 4,25 \cdot 10^{-5} \frac{M_w}{M_w}^{0,94}$$

La figure (4) montre les courbes correspondant à ces trois relations. Il apparaît bien que, pour notre échantillon, la viscosité dans Na Cl 0,2M à pH 7,3 est voisine de la viscosité dans le mélange Na Cl 0,2M / Dioxanne 2/1, à pH 5.



DEUXIEME CHAPITRE

ETUDE OPTIQUE DE LA TRANSITION DU PLGA PAR  
DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE

- I Rappels théoriques sur la dispersion optique rotatoire.
- II Dispersion du pouvoir optique rotatoire.
- III Expressions mathématiques.
- IV Résultats expérimentaux.
  - a) Mode opératoire.
  - b) Résultats.

--oo 0 oo--

I RAPPELS THEORIQUES SUR LA DISPERSION DU POUVOIR OPTIQUE ROTATOIRE.

Une substance est dite optiquement active si son indice de réfraction est différent pour la lumière polarisée circulairement gauche et pour la lumière polarisée circulairement droite. Cette différence d'indice, donc de vitesse de propagation, provoque une rotation  $\alpha$  du plan de polarisation de la lumière rectilignement polarisée .Figure (5a).

FRESNEL a relié cet angle de rotation  $\alpha$  à la différence  $(n_G - n_D)$  entre les 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.

De plus, pour des solutions, BIOT a relié la valeur de l'angle de rotation  $\alpha$  à la concentration  $c$ :

$$\alpha = (\alpha) l c$$

On définit ainsi la rotation spécifique  $(\alpha)$  qui correspond à l'angle de rotation qu'on observe pour une solution de concentration  $1g/cm^3$  sous l'épaisseur de 1 dm.

On peut évidemment utiliser d'autres unités de concentration. Si  $c$  est exprimé (comme il est d'usage) en moles pour  $100 cm^3$  de solution, on obtient alors la rotation molaire  $(m)$  :

$$(m) = \frac{(\alpha) M_o}{100}$$

$M_0$  étant la masse moléculaire de la substance ( ou la masse moléculaire de l'unité de répétition dans le cas d'un polymère).

Enfin il faut corriger la valeur de  $(m)$  obtenue, du facteur de LORENTZ  $\frac{3}{n^2 + 2}$  pour obtenir une valeur  $(m')$  indépendante de

l'indice de réfraction du solvant.

$$(\alpha) = \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M_0}{100} (\alpha)$$

$$(\alpha) = \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M_0}{100} \frac{\alpha}{1 c}$$

## II DISPERSION DU POUVOIR OPTIQUE ROTATOIRE.

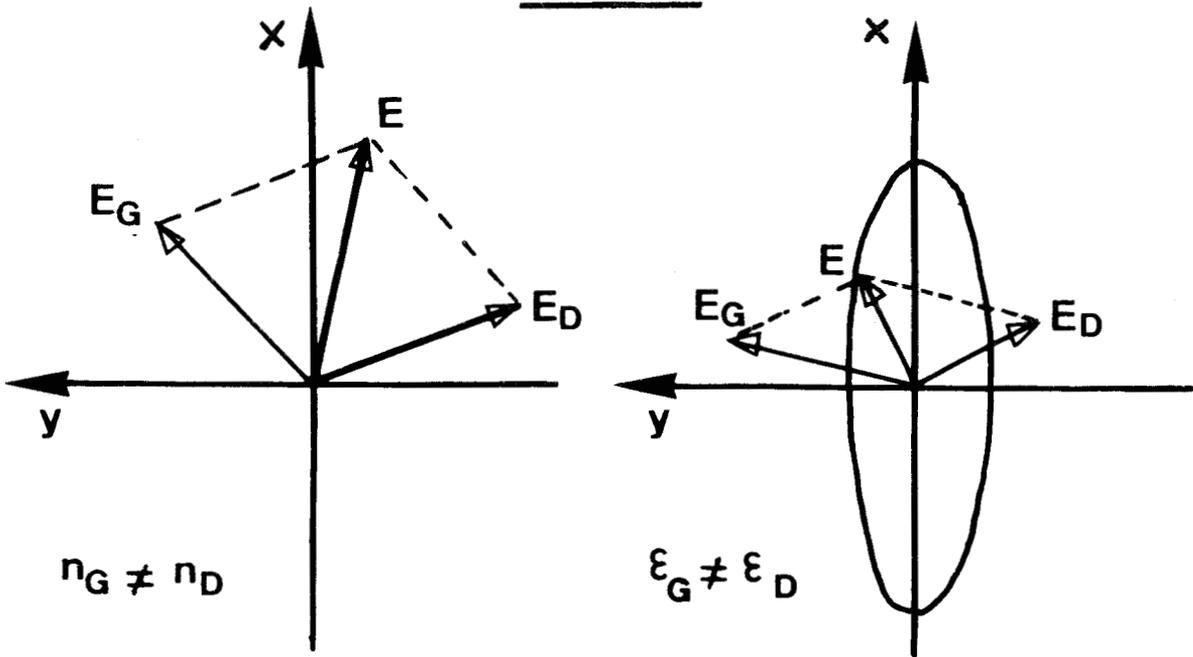
L'indice de réfraction d'une substance non optiquement active varie avec la longueur d'onde. Il en est de même pour les indices  $n_D$  et  $n_G$  d'une substance optiquement active et si, au lieu de mesurer  $\alpha$  à une seule longueur d'onde ( raie jaune du sodium de  $\lambda = 5890 \text{ \AA}$  par exemple), on enregistre  $\alpha$  ou  $(m')$  en fonction de la longueur d'onde, on observe des courbes de dispersion du pouvoir optique rotatoire.

Celles-ci peuvent être de deux types selon qu'il existe ou non des bandes d'absorption dues à la présence, dans la molécule envisagée, de chromophores optiquement actifs.

S'il n'existe pas de bandes d'absorption dans le domaine de longueurs d'onde considéré, l'on a affaire à une courbe de dispersion normale. Figure (6a). Par contre si l'on a une bande d'absorption à une longueur d'onde  $\lambda_0$ , la courbe de dispersion présente deux extréma ; on a ce que l'on appelle un effet COTTON positif ou négatif suivant le sens de variation de  $(m')$  . Figure (6b).

.../...

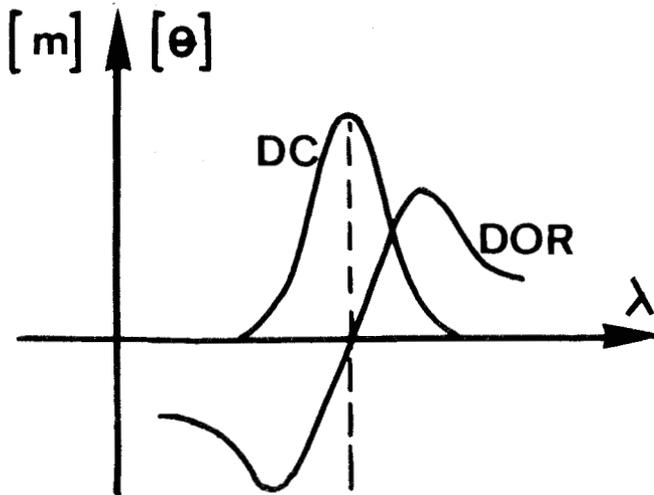
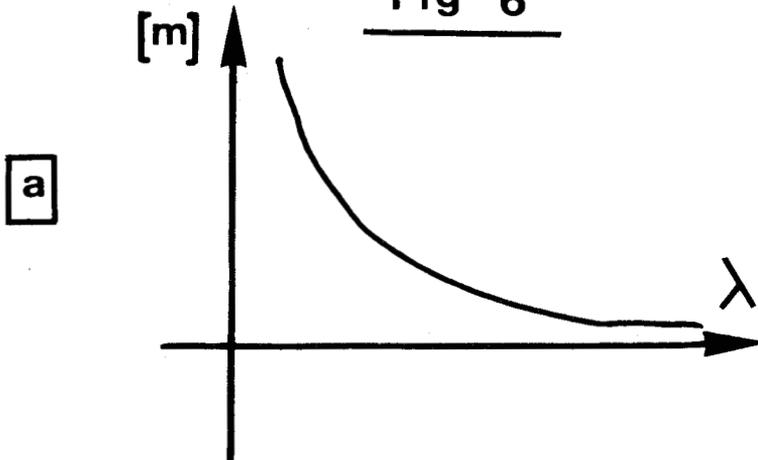
**Fig 5**



**a** rotation du plan de polarisation

**b** dichroïsme circulaire

**Fig 6**



Effet Cotton et bande dichroïque associée



Simultanément les composantes circulairement polarisées ont des coefficients d'extinction molaires  $\epsilon_G$  et  $\epsilon_D$  différents. C'est ce que l'on appelle le dichroïsme circulaire. La lumière devient alors elliptiquement polarisée. Figure (5b).

### III EXPRESSIONS MATHÉMATIQUES DE LA DISPERSION.

Plusieurs expressions mathématiques ont été proposées pour représenter les courbes de dispersion optique rotatoire.

Tout d'abord une expression générale de DRUDE multiterme de la forme :

$$(\alpha)_\lambda = \sum_i \frac{a_i \lambda_i^2}{(\lambda^2 - \lambda_i^2)}$$

où  $(\alpha)_\lambda$  est le pouvoir optique rotatoire spécifique à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  $\lambda_i$  la longueur d'onde du  $i^{\text{ème}}$  effet COTTON et  $a_i$  un paramètre proportionnel à la force rotatoire  $R_i$  de la bande.

Dans le cas où la dispersion est normale cette expression peut se réduire à :

$$(\alpha)_\lambda = \frac{k}{(\lambda^2 - \lambda_i^2)}$$

$\lambda_i$  n'a pas de signification physique et n'est qu'un paramètre destiné à ajuster les courbes expérimentales et calculées.

Dans les autres cas la dispersion peut être décrite par une équation de DRUDE à deux termes :

$$(\alpha) = \frac{k_1}{(\lambda^2 - \lambda_1^2)} + \frac{k_2}{(\lambda^2 - \lambda_2^2)}$$

.../...

MOFFITT a également proposé <sup>(11)</sup> une équation dans laquelle le nombre de paramètres nécessaires pour représenter la dispersion est réduit à trois :

$$[m'] = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}$$

La résolution graphique de cette équation sous la forme:

$$[m'] (\lambda^2 - \lambda_0^2) = a_0 \lambda_0^2 + b_0 \lambda_0^4 / \lambda^2 - \lambda_0^2$$

permet la détermination des paramètres  $a_0$  et  $b_0$ .

La valeur de  $\lambda_0$  a été choisie de façon à obtenir une droite dans la plus large gamme d'ondes possible. La valeur couramment utilisée est  $\lambda_0 = 212$  nm.

Le paramètre  $b_0$  est indépendant des interactions soluté-solvant et ne dépend que de la conformation de la molécule.

Au contraire  $a_0$  est un paramètre qui varie beaucoup suivant la nature des interactions entre la molécule et le solvant.

Comme la dispersion optique rotatoire d'une chaîne statistique peut être représentée par une équation de DRUDE à un seul terme,

$$[m'] = \frac{A_c \lambda_c^2}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$$

et comme la valeur du paramètre  $\lambda_c$  est voisine de 212 nm, on pourra utiliser la valeur de  $b_0$  pour chiffrer le contenu hélicoïdal d'une molécule.

Pour une chaîne statistique on aura  $b_0 = 0$ .

Pour la structure en hélice  $\alpha$  droite, on admet généralement que la valeur de  $b_0$  correspondant à 100% hélice est  $b_0 = -630$  <sup>(16)</sup>, bien que CASSIM et TAYLOR <sup>(8)</sup> aient montré que cette valeur dépend de l'indice de réfraction du solvant  $n$  en suivant la relation :

$$b_0 = 730,3 n - 1701$$

ceci dans le cas du poly-L-glutamate de benzyle.

.../...

Dans le cas de l'acide poly-L-glutamique, le phénomène d'agrégation qui se produit aux bas pH rend d'autant plus difficile la détermination du  $b_0$  correspondant à 100% d'hélice <sup>(9)</sup>.

En fait bien qu'elle rende compte de façon satisfaisante des données expérimentales, l'équation de MOFFITT est insuffisante car elle néglige la contribution à la dispersion de la transition  $n \rightarrow \pi^*$  des chromophores peptidiques.

Ceux-ci présentent en effet deux transitions.

- Une transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  dédoublée dans le cas d'une hélice  $\alpha$  en deux bandes: une située dans les spectres UV à 191 nm due à la transition polarisée perpendiculairement à l'axe de l'hélice. L'autre située à 205 nm associée à la transition polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice.

- Une transition  $n \rightarrow \pi^*$  à 222 nm non dédoublée.

Une autre approche du problème a été proposée par SHECHTER et BLOUT <sup>(17)</sup>. Ils utilisent pour représenter la dispersion d'un mélange d'hélice  $\alpha$  et de pelote statistique une équation de DRUDE. La proximité des transitions  $n \rightarrow \pi^*$ , et  $\pi \rightarrow \pi^*$  permet de rassembler leurs effets sur la dispersion sous forme d'une somme de deux termes de DRUDE;

$$(\text{m}') = \frac{A_{193} \lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} + \frac{A_{225} \lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}$$

Le premier terme, centré à 193 nm correspond à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée perpendiculairement.

Le second terme regroupe les autres contributions et a été ajusté pour représenter la dispersion dans la plus large gamme d'ondes possible comme le  $\lambda_0$  de l'équation de MOFFITT. Il est centré de manière purement fortuite, à 225 nm, très près de l'effet COTTON à 222 nm:

.../...

La résolution graphique de :

$$(\text{m}') \frac{(\lambda_{193}^2 - \lambda_{225}^2)}{\lambda_{193}^2} = f \left( \frac{\lambda_{225}^2}{\lambda_{193}^2} \frac{\lambda_{193}^2 - \lambda_{225}^2}{\lambda_{193}^2 - \lambda_{225}^2} \right)$$

fournit les valeurs de  $A_{193}$  et  $A_{225}$ .

L'équation de SHECHTER-BLOUT présente un avantage important par rapport à celle de MOFFITT : la cohérence des résultats obtenus à partir de  $A_{193}$  et  $A_{225}$  permet d'affirmer qu'il n'existe pas de contribution appréciable de structures différentes de l'hélice  $\alpha$  ou de la chaîne.

En effet, si on calcule ces valeurs pour un certain nombre de polypeptides dont la structure organisée est uniquement  $\alpha$  hélicoïdale en solution aqueuse, on constate qu'elles vérifient la relation

$$A_{225} = -0,55 A_{193} - 430 \quad (1) \quad \text{Figure (7)}.$$

Dans le cas où cette relation n'est pas vérifiée, on peut présumer sinon affirmer, que la molécule présente une conformation autre que l'hélice  $\alpha$  ou la pelote statistique.

On peut calculer le pourcentage d'hélicité à partir de  $A_{193}$  et  $A_{225}$  par les relations :

$$\text{H\%}_{(193)} = (A_{193} + 750) / 36,5 \quad (2)$$

$$\text{H\%}_{(225)} = -(A_{225} + 60) / 19,9 \quad (3)$$

Dans le cas où la relation (1) n'est pas vérifiée, les valeurs calculées  $\text{H\%}_{(193)}$  et  $\text{H\%}_{(225)}$  ne coïncident pas.

On peut également comparer ces valeurs au pourcentage d'hélicité calculé à partir de  $b_o$ .

$$\text{H\%} = \frac{-b_o}{630} 100$$

.../...

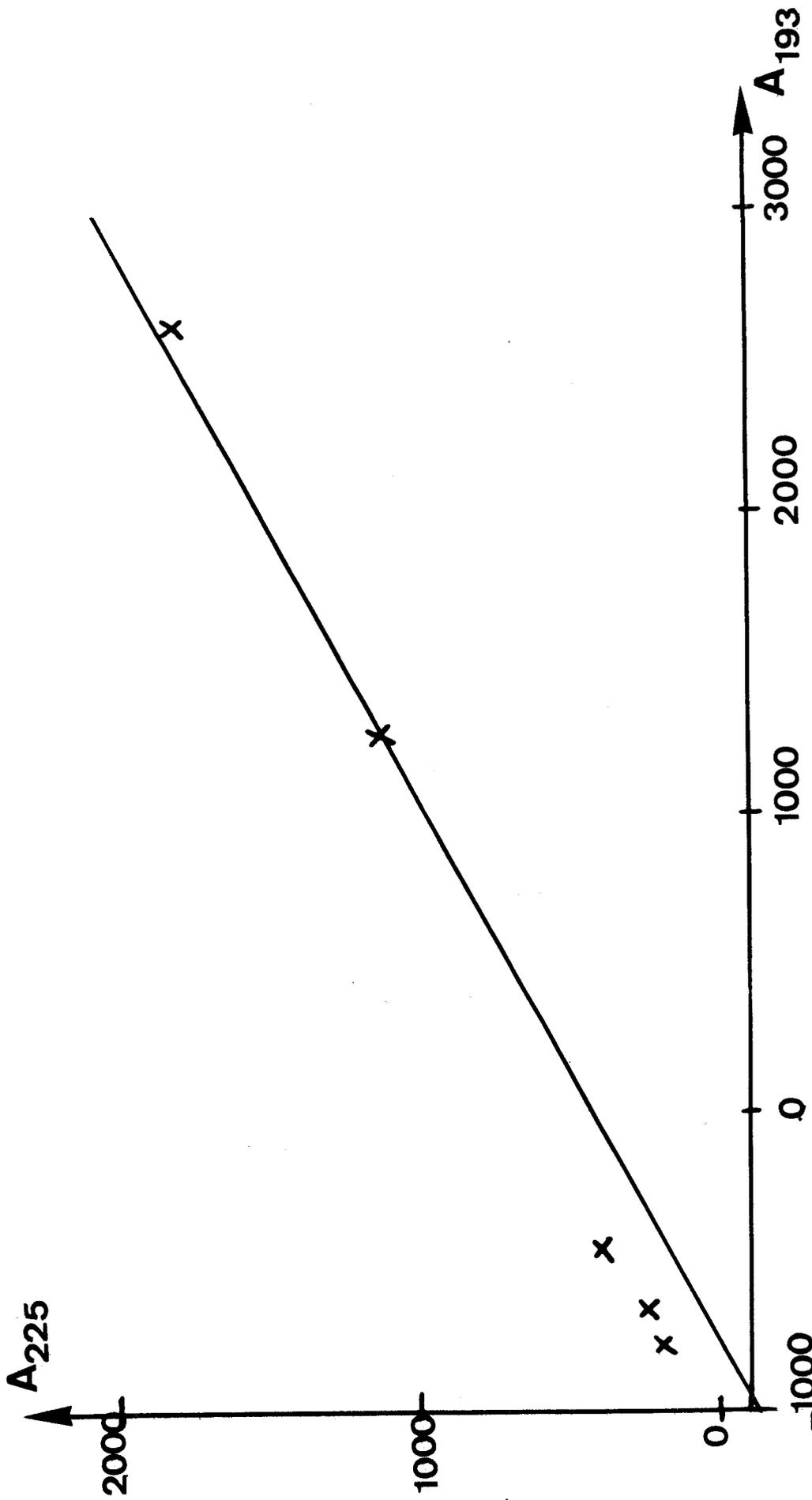
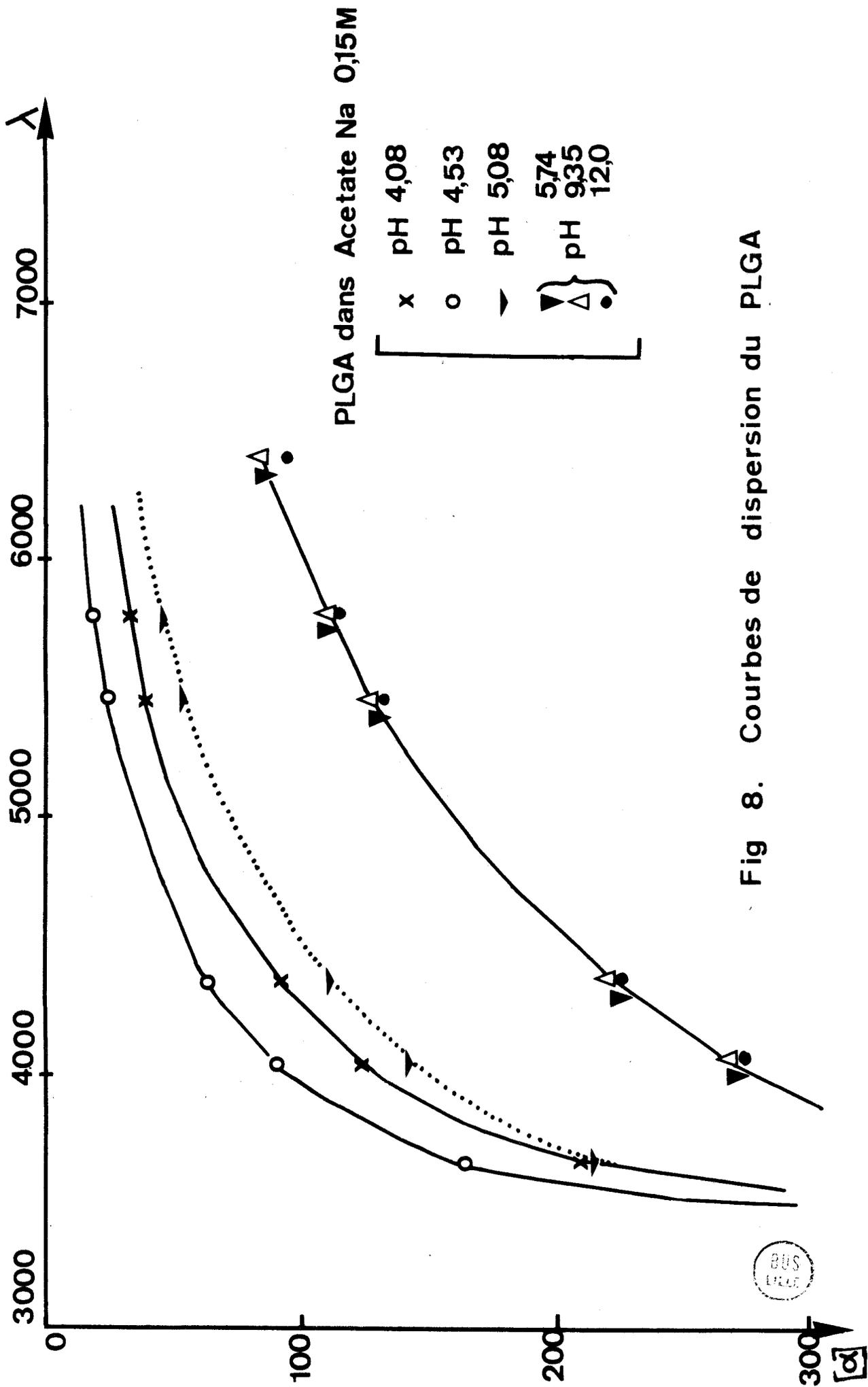


Fig 7



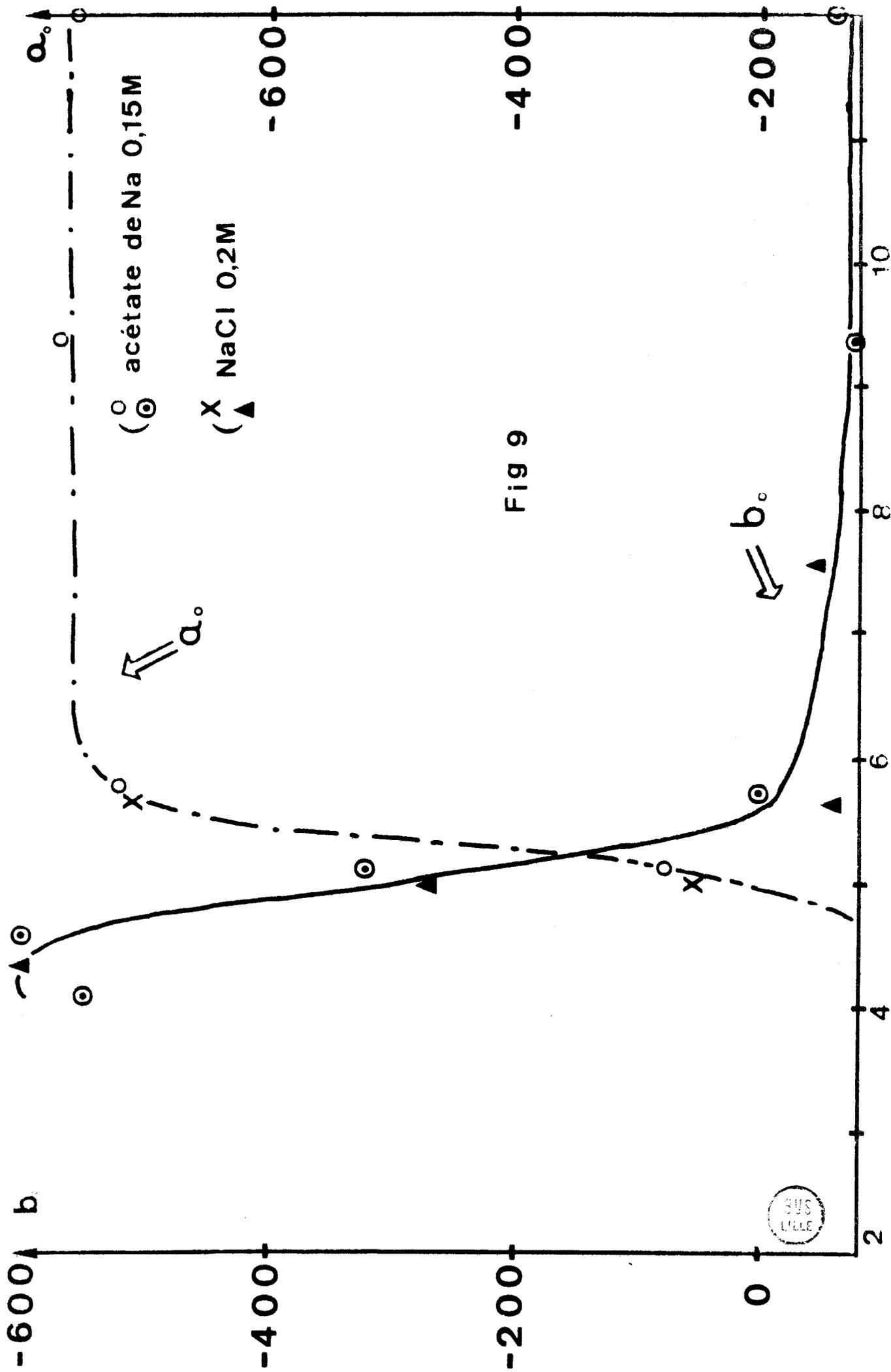


Fig 9

#### IV RESULTATS EXPERIMENTAUX .

##### a) Mode opératoire.

La mesure de la rotation optique a été effectuée aux cinq longueurs d'onde suivantes avec un polarimètre Carl Zeiss 370 746,  $\lambda = 3650 \text{ \AA}$ ,  $4050 \text{ \AA}$ ,  $4360 \text{ \AA}$ ,  $5460 \text{ \AA}$ ,  $5780 \text{ \AA}$  .

Les solutions ont été préparées de la même façon que pour les mesures de viscosité.

##### b) Résultats.

Nous avons étudié la D.O.R. du PLGA en milieu aqueux en fonction du pH, puis aux deux pH extrêmes 4,7 et 11,7, nous avons fait varier le pourcentage de dioxanne.

##### - Milieu aqueux

En milieu aqueux pour Na Cl 0,2M ou acétate de sodium 0,15M, nous retrouvons les courbes de dispersion caractéristiques:

Figure (8).

L'allure des courbes de dispersion est modifiée par la variation du pH. Le calcul de  $a_o$  et de  $b_o$  à partir de  $(\alpha)$  nous permet de tracer une courbe de transition :

$$\begin{aligned} b_o &= f(\text{pH}) \\ a_o &= f(\text{pH}) \end{aligned} \quad \text{Figure (9)}$$

Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau suivant avec les valeurs correspondantes de  $A_{193}$  et  $A_{225}$  (Tableau I).

Nous avons reporté les valeurs du pourcentage d'hélicité en fonction du pH, calculées à partir de ces paramètres (Tableau II) en utilisant les relations (2-3).

.../...

TABLEAU I

| pH   | $a_o$ | $b_o$ | $A_{193}$ | $A_{225}$ |
|------|-------|-------|-----------|-----------|
| 4,1  | -135  | -550  | +2295     | -1800     |
| 4,5  | -25   | -600  | +2590     | -1780     |
| 5,1  | -271  | -323  | +1240     | -1145     |
| 5,7  | -725  | 0     | -440      | -320      |
| 9,4  | -770  | +80   | -757      | -128,5    |
| 12,0 | -761  | +61   | -667,4    | -185,4    |

TABLEAU II

| pH   | % hélicité calculé à partir de : |           |           |
|------|----------------------------------|-----------|-----------|
|      | $b_o$                            | $A_{193}$ | $A_{225}$ |
| 4,1  | 88%                              | 85%       | 87%       |
| 4,5  | 95%                              | 93%       | 93%       |
| 5,1  | 54%                              | 54,5%     | 54,5%     |
| 5,7  | 0%                               | 8,5%      | 13%       |
| 9,4  | 0%                               | 0%        | 3,4%      |
| 12,0 | 0%                               | 2,3%      | 6,3%      |

On remarque qu'en milieu acide entre pH 4,1 et 5,1,  $b_o$  est négatif et les pourcentages d'hélicité calculés à partir de  $b_o$ ,  $A_{193}$  et  $A_{225}$  coïncident de façon satisfaisante ; il n'en est plus de même aux pH plus élevés car  $b_o$  devient positif et les pourcentages diffèrent sensiblement.

De plus  $A_{193}$  et  $A_{225}$  ne vérifient plus aussi bien la relation (1).

Figure (7).

.../...

Des résultats analogues ont été publiés par IIZUKA et YANG (16) qui donnent des valeurs de  $b_o$  pour le PLGA à pH 7,3 en milieux de force ionique variable (Tableau III).

TABLEAU III

| KF    |       |  | Li Br |       |  |
|-------|-------|--|-------|-------|--|
| $\mu$ | $b_o$ |  | $\mu$ | $b_o$ |  |
| 0     | 50    |  | 2     | 40    |  |
| 0,2   | 50    |  | 4     | 30    |  |
| 0,5   | 50    |  | 6     | 0     |  |
| 1     | 40    |  | 7,5   | -20   |  |
| 2     | 20    |  | 8     | -40   |  |
| 3     | 10    |  |       |       |  |
| 4     | -20   |  |       |       |  |
| 6     | -50   |  |       |       |  |

SHECHTER a suggéré que l'accord entre les valeurs calculées à partir de  $A_{193}$  et  $A_{225}$  indique la présence en solution de deux conformations en équilibre : hélice  $\alpha$  et pelote. Les résultats ci-dessus semblent montrer l'existence en milieu basique d'une conformation différente.

Un autre argument vient à l'appui de cette hypothèse. En effet, par addition de Na Cl au milieu réactionnel de façon à obtenir une force ionique élevée ( $\mu = 5M$ ) nous avons observé une variation de + 80 à 0, valeur qui correspondrait à une structure beaucoup plus proche de la chaîne statistique.

Ces données semblent confirmer les résultats de viscosité, à savoir l'existence en solution aqueuse basique d'une configuration étendue qui tendrait, par augmentation de la force ionique, vers une structure de chaîne statistique.

- D.O.R. en solvant binaire

Nous avons déterminé les valeurs de  $b_o$  pour différents pourcentages de dioxanne aux pH 4,7 et 11,7, pour essayer de les relier aux résultats de viscosité.

Les valeurs obtenues sont les suivantes:

TABLEAU IV

| ( % dioxanne ) | ( : ) | ( pH 4,7 ) | ( : ) | ( pH 11,7 ) |
|----------------|-------|------------|-------|-------------|
| ( 10 )         | ( : ) | ( -540 )   | ( : ) | ( +15 )     |
| ( 20 )         | ( : ) | ( -660 )   | ( : ) | ( +30 )     |
| ( 30 )         | ( : ) | ( -485 )   | ( : ) | ( +20 )     |

Bien que les résultats soient plus délicats à interpréter, nous constatons que la conformation reste essentiellement hélicoïdale en milieu acide.

En milieu basique, l'addition de dioxanne joue le même rôle que l'augmentation de la force ionique, c'est à dire diminue la valeur de  $b_o$ .

Les valeurs publiées par IIZUKA et YANG (Tableau V) montrent également une diminution de  $b_o$  lorsque le pourcentage en volume de dioxanne augmente en milieu basique ( pH = 7,3).

TABLEAU V

| ( % en volume de ) | ( : ) | ( $b_o$ ) |
|--------------------|-------|-----------|
| ( dioxanne )       | ( : ) | ( )       |
| ( 10 )             | ( : ) | ( +30 )   |
| ( 10 + 0,2M KF )   | ( : ) | ( +50 )   |
| ( 20 )             | ( : ) | ( -30 )   |
| ( 30 )             | ( : ) | ( -60 )   |
| ( 40 )             | ( : ) | ( -340 )  |
| ( 50 )             | ( : ) | ( -670 )  |

.../...

On sait qu'à partir de 30% environ, l'addition de dioxanne provoque la transition chaîne  $\rightleftharpoons$  hélice <sup>(16)</sup>. Cependant il est possible que la diminution des valeurs de  $b_o$  à 10 et 20 % de dioxanne, par rapport à celles obtenues en milieu aqueux, soit due à une contraction de la macromolécule.

La courbe de dispersion optique rotatoire correspondante entre 190 et 250 nm ressemble davantage à celle d'une chaîne qu'à celle d'une hélice <sup>(16)</sup>.

Si on suppose que l'addition de 30% de dioxanne provoque un retour partiel à l'hélice  $\alpha$ , il est difficile de donner une signification au minimum de viscosité observé par DOTY et Coll Figure (1).

En effet, pour cette composition du solvant, la diminution du pH devrait favoriser l'hélice et on ne voit pas très bien pourquoi l'augmentation de l'hélicité provoquerait un minimum dans la viscosité.

## CONCLUSION

Les valeurs de  $b_o$  obtenues doivent être interprétées prudemment, en particulier celles qui correspondent aux mélanges avec le dioxanne. En effet la valeur de  $\lambda_o$  qui a été fixée à 212 nm varie en fait sensiblement avec la composition en dioxanne, la relation de MOFFITT n'est plus valable, et la valeur de  $b_o$  obtenue n'a plus de sens.

Si nous utilisons la méthode de SHECHTER, nous ne pouvons pas calculer les pourcentages d'hélicité correspondant aux mélanges Na Cl 0,2M / Dioxanne, car il faudrait utiliser pour cela deux couples de relations différents selon que le polypeptide est en solution dans l'eau ou dans un solvant organique, et le choix de l'un ou de l'autre couple de relations est impossible à faire dans notre cas.

L'écart de nos points expérimentaux ( $A_{193}; A_{225}$ ), en milieu basique, par rapport à la droite de SHECHTER est peu important, comparé à celui qu'on observe lorsqu'un polypeptide peut adopter une structure organisée différente ( par exemple la structure  $\beta$  de la poly-L-sérine).

Cette faible différence fait que la part des erreurs expérimentales devient importante. Seules les valeurs obtenues aux bas pH sont sans ambiguïté, et il faut faire appel à une méthode plus fine comme le dichroïsme circulaire, pour préciser la nature de la conformation qui existe en milieu basique.

TROISIEME CHAPITRE

ETUDE OPTIQUE DE LA TRANSITION DU PLGA PAR  
DICHROISME CIRCULAIRE

I Rappels théoriques.

II Résultats généraux concernant les polypeptides.

- a) Spectre dichroïque de l'hélice  $\alpha$ .
- b) Spectre dichroïque de la chaîne statistique.

III Résultats expérimentaux.

- a) Mode opératoire.
- b) Résultats.
  - 1. Spectres dans  $H_2O$
  - 2. Spectres dans Na Cl 0,2M
  - 3. Spectres dans Na Cl 5M
  - 4. Spectres dans le mélange (2/3  $H_2O$  - 1/3 Dioxanne)
  - 5. Spectres dans le mélange (2/3 Na Cl 0,2M - 1/3 Dioxanne).
  - 6. Influence de la proportion de solvant organique.
  - 7. Influence du milieu sur le pH de transition.
  - 8. Interprétation des spectres dichroïques.

## I RAPPELS THEORIQUES.

Lorsqu'on envoie une lumière linéairement polarisée sur un milieu contenant des chromophores optiquement actifs, la biréfringence circulaire, qui est à l'origine de la dispersion du pouvoir optique rotatoire, s'accompagne d'un dichroïsme circulaire.

Cela signifie que le coefficient d'extinction molaire est différent pour la lumière polarisée circulairement droite et la lumière polarisée circulairement gauche ( $\epsilon_G \neq \epsilon_D$ ). La lumière devient elliptiquement polarisée. Figure (5b).

Si on appelle  $\Psi$  l'ellipticité, on peut la relier aux indices d'absorption  $X_G$  et  $X_D$  de la lumière circulairement polarisée droite et gauche par une relation analogue à celle de FRESNEL.

$$\Psi = \frac{\pi}{\lambda} (X_G - X_D) l$$

En remplaçant  $X_G$  et  $X_D$  par leur expression en fonction de  $\epsilon_G$  et  $\epsilon_D$ , on obtient :

$$(\Psi) = \frac{3300 (\epsilon_G - \epsilon_D)}{M_0}$$

où  $(\Psi)$ , l'ellipticité spécifique est définie par  $\Psi = (\Psi) l c$ .

L'ellipticité molaire  $(\theta) = \frac{(\Psi)}{M_0}$  sera alors :

$$\boxed{(\theta) = 3300 \Delta \epsilon} \quad \text{avec } \Delta \epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$$

## II RESULTATS GENERAUX CONCERNANT LES POLYPEPTIDES

### a) Spectre de l'hélice $\alpha$ .

Depuis les premiers travaux de HOLZWARTH, GRATZER et DOTY<sup>(10)</sup>, le spectre dichroïque des polypeptides  $\alpha$  hélicoïdaux est bien connu et chacune des bandes dichroïques qu'il présente entre 180 et 250 nm a pu être attribuée à une transition électronique. Ce spectre est composé de trois bandes caractéristiques :

- Une bande négative à 222nm attribuée à la transition  $n \rightarrow \pi^*$ .
- Une bande négative à 209 nm et une bande positive à 190 nm attribuées respectivement à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice et à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée perpendiculairement à l'axe.

L'ellipticité de la bande à 190 nm est voisine de + 70 000 degré.  $\text{cm}^2$ / décimole.

Les ellipticités des bandes à 209 et 222 nm sont toutes deux voisines de - 40 000 degré.  $\text{cm}^2$ / décimole. Ceci dans le cas où on a affaire à une hélice  $\alpha$  droite.

On a l'habitude d'utiliser l'ellipticité de la bande à 222 nm pour évaluer le contenu hélicoïdal d'un polypeptide en choisissant  $(\theta) = - 36\ 000$  degré.  $\text{cm}^2$ / décimole comme valeur correspondant à 100 %.

On a alors :

$$H\% = \frac{(\theta) \times 100}{- 36\ 000} \quad (4)$$

Cependant les valeurs de  $(\theta)$  données par différents auteurs pour l'hélice  $\alpha$  varient entre 36 000 et 40 000<sup>(10-18)</sup>. Il en résulte donc une incertitude assez grande sur la valeur du contenu hélicoïdal. De plus, la relation (4) suppose qu'à la longueur d'onde de 222 nm, l'ellipticité correspondant à la chaîne statistique est nulle. Nous discuterons ce point par la suite.

.../...

b) Spectre dichroïque de la chaîne statistique.

Le problème se complique lorsqu'on essaie de définir un modèle pour le spectre dichroïque de la chaîne statistique.

Dans un de leurs premiers articles, HOLZWARTH et DOTY<sup>(10)</sup> choisissent comme modèle de chaîne statistique le spectre dichroïque de l'acide poly-L-glutamique à pH 7,6 dans Na F 0,1M, en observant toutefois qu'il présente en plus d'une forte bande négative vers 200 nm, une faible bande positive ( $\epsilon \approx 2500$ ) entre 210 et 235 nm.

Selon TIFFANY et KRIMM<sup>(5)</sup>, le spectre dichroïque de l'acide poly-L-glutamique chargé en absence d'électrolyte fort suggère la présence d'une structure qui ne serait pas une chaîne statistique, mais une hélice étendue. La molécule présenterait localement des portions hélicoïdales organisées suffisamment longues pour donner naissance à un signal dichroïque. Voir figure (10 d). Ils proposent comme modèle de chaîne statistique, le spectre dichroïque de la poly-L-proline dans Ca Cl<sub>2</sub> 6M ou celui du PLGA dans Li Cl O<sub>4</sub> 4,5M après chauffage à 50°C. Ce spectre est très différent de celui qui est donné par HOLZWARTH et DOTY. Il est formé essentiellement d'une large bande négative aux environs de 205 nm. Voir figure (10a).

En fait le spectre donné par HOLZWARTH et DOTY pour le modèle de chaîne statistique est très proche de celui que donnent TIFFANY et KRIMM pour le modèle d'hélice étendue. L'argument le plus solide de TIFFANY et KRIMM à l'appui de leur hypothèse est que ce spectre est proche de celui de la poly-L-proline<sup>(5)</sup>.

Les modèles actuellement proposés pour l'hélice  $\alpha$ , la chaîne statistique et le configuration étendue sont représentés sur la figure (10). Le spectre dichroïque représenté ici (figure (10b)) pour la chaîne statistique est celui proposé par QUADRIFOGLIO et URRY<sup>(19)</sup>, pour la poly-L-sérine dans Li Cl 9M. Ce spectre est très voisin de celui du PLGA dans Li Cl O<sub>4</sub> 0,5M dont il est question plus haut.

Les tentatives de calcul du spectre dichroïque d'une chaîne statistique menées par ZUBKOV et Coll. ne permettent ni d'établir un modèle théorique pour ce spectre, ni d'interpréter les données expérimentales<sup>(20)</sup>.

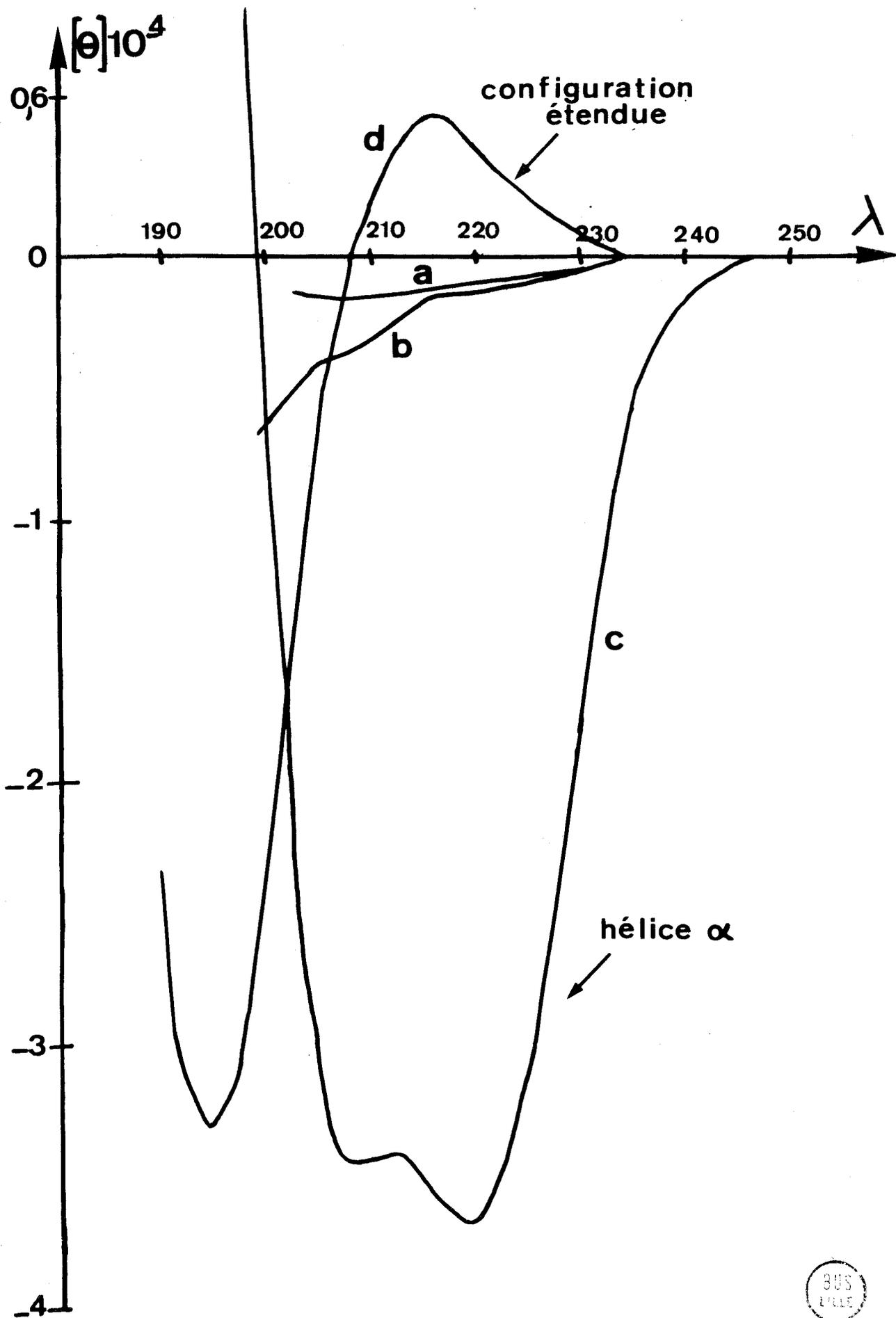


Fig 10



### III RESULTATS EXPERIMENTAUX

#### a) Mode opératoire

Les spectres dichroïques ont été enregistrés à l'aide d'un dichrographe Roussel - Jouan. Les mesures ont été faites sous balayage d'azote en utilisant comme source lumineuse une lampe au Xénon.

L'échantillon utilisé est un sel de sodium de l'acide poly-L-glutamique (Pilot). Les solutions ont été préparées de la même façon que pour les mesures de viscosité et de D.O.R. Nous avons utilisé une cuve de quartz de 0,1 mm en particulier pour les mesures en présence d'un solvant organique ou d'une grande quantité de sel.

#### b) Résultats

Nous avons enregistré les spectres dichroïques du PLGA en fonction du pH dans les solvants suivants :

- H<sub>2</sub>O
- Na Cl 0,2M
- Na Cl 5M
- H<sub>2</sub>O + Dioxanne (2/1)
- Na Cl 0,2M + Dioxanne (2/1)

pour essayer de les relier aux résultats de viscosité et de D.O.R., et dissocier les effets dûs à l'addition de sel et à l'addition de solvant organique.

#### 1. Spectres dans H<sub>2</sub>O. Figure (11).

-----

En milieu basique, le spectre a bien l'allure attendue, c'est à dire présente deux bandes caractéristiques, une bande positive à 218 nm de  $(\theta) = 5\ 000\ \text{degré.cm}^2 / \text{décimole}$  environ et une bande négative intense centrée à 195 nm de  $(\theta) = - 33\ 000\ \text{degré.cm}^2 / \text{décimole}$  environ.

.../...

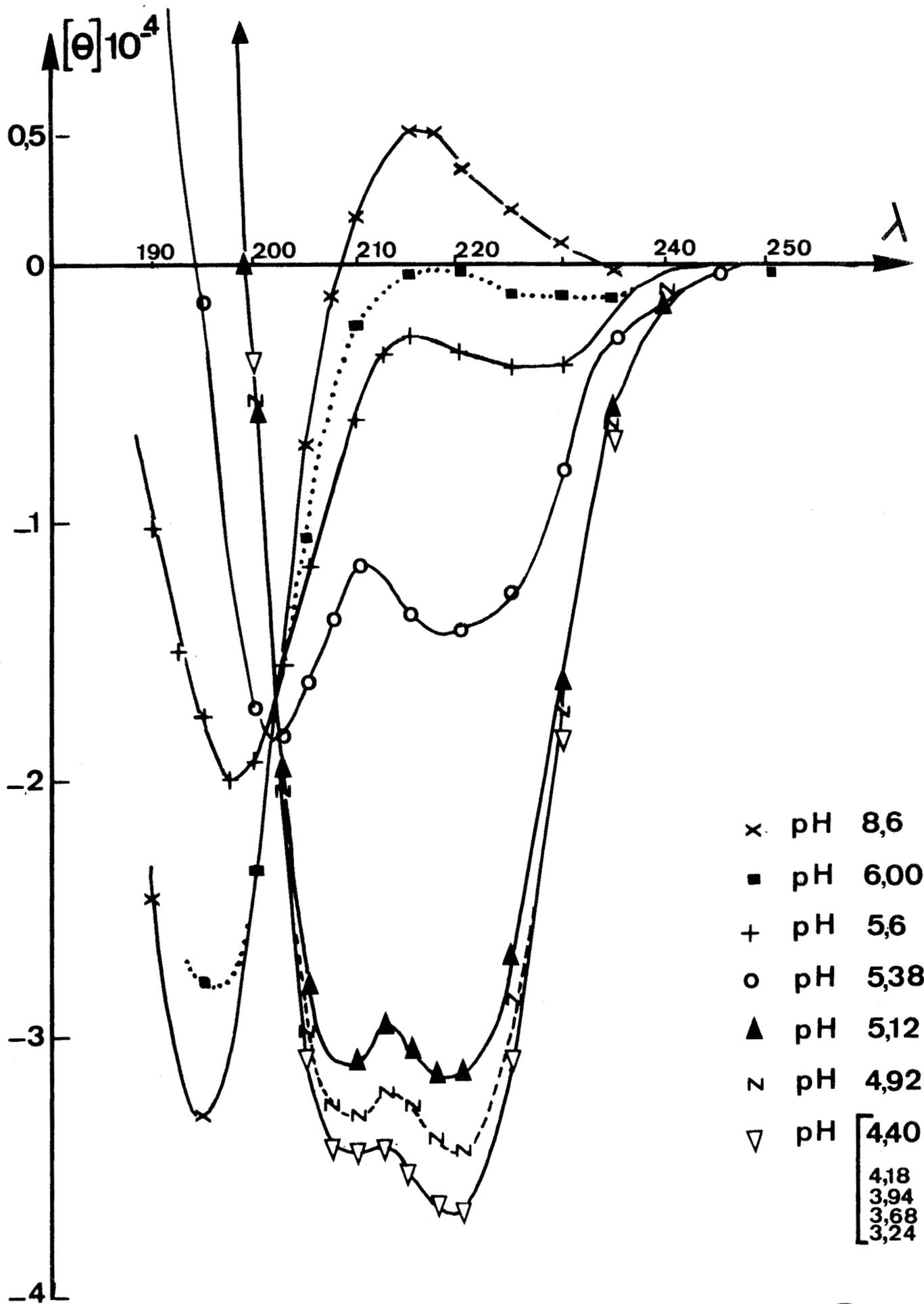


Fig 11 Spectre dichroïque du PLGA en fonction du pH dans H<sub>2</sub>O.



Lorsqu'on abaisse le pH le spectre dichroïque est modifié par l'apparition d'une transition.

La bande positive à 218 nm disparaît, tandis qu'apparaît une faible bande négative vers 230 nm.

En même temps, l'intensité de la bande négative à 195 nm décroît tandis qu'elle se déplace vers les grandes longueurs d'onde.

En abaissant progressivement le pH, on parvient à pH 4,4, au spectre caractéristique d'une hélice  $\alpha$  avec ses deux bandes négatives à 209 et 222 nm. L'ellipticité maximum obtenue pour la bande à 222nm est  $(\theta) = - 37\ 000$  degré.cm<sup>2</sup>/ décimole. On observe à  $\lambda = 202$  nm et  $(\theta) = - 17\ 000$  degré.cm<sup>2</sup> / décimole, l'existence d'un point isodichroïque.

### 2. Spectres dans Na Cl 0,2M. Figure (12).

L'addition d'un électrolyte au milieu provoque une diminution de l'intensité de la bande à 218 nm, sans modifier la bande négative à 195 nm.

On observe également les spectres intermédiaires au cours de la transition. On retrouve un point isodichroïque pour  $\lambda = 202$  nm et  $(\theta) = - 17\ 000$  degré.cm<sup>2</sup> / décimole au même endroit que pour les solutions dans l'eau pure.

A pH 4,07 l'écrasement de la bande à 209 nm semble dû à un début d'agrégation dans la solution.

L'ellipticité maximale à 222nm reste voisine de  $- 40\ 000$  degré.cm<sup>2</sup> / décimole.

### 3. Spectres dans Na Cl 5M. Figure (13).

Lorsqu'on augmente fortement la force ionique du milieu (0,2M  $\rightarrow$  5M) la bande positive à 218 nm disparaît presque complètement, en milieu basique. L'abaissement du pH fait apparaître une bande négative à 230 nm puis les deux bandes de l'hélice  $\alpha$  vers 209 et 222 nm. L'intensité de ces bandes est beaucoup plus faible que dans l'eau pure ( $12$  et  $15\ 000$  degré cm<sup>2</sup> / décimole).

.../...

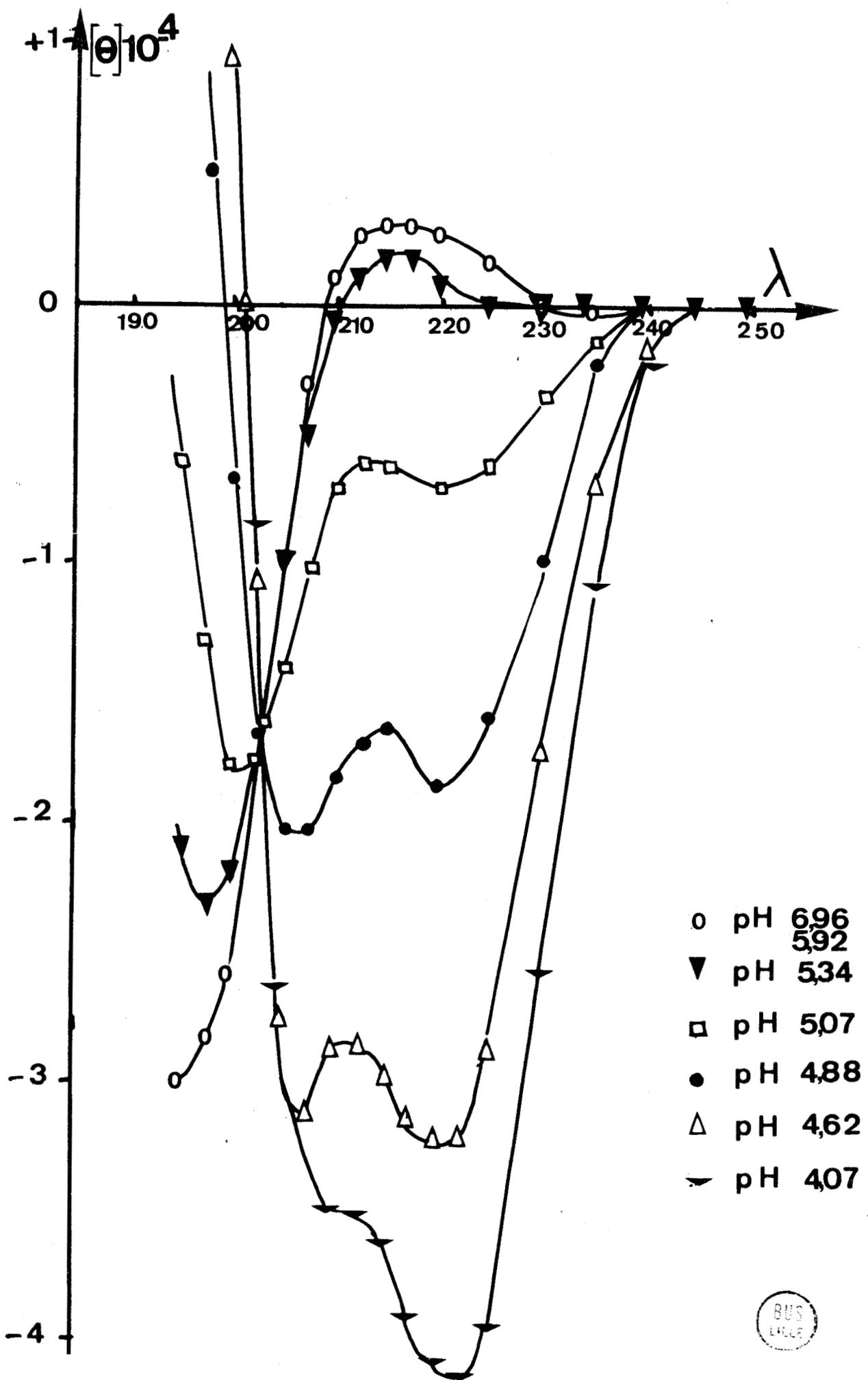


Fig 12 Spectre dichroïque du PLGA en fonction du pH dans NaCl 0,2M

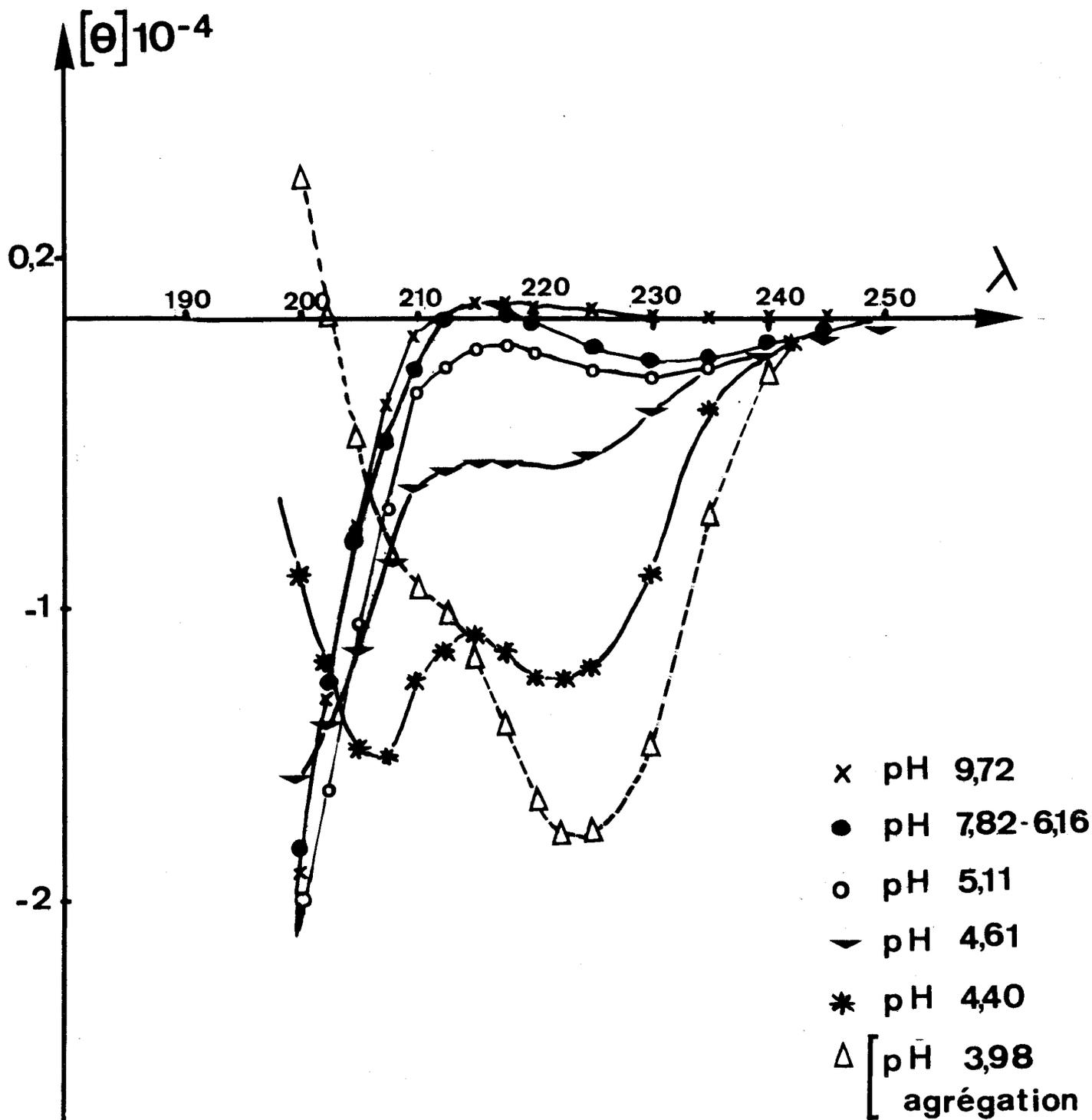


Fig13 Spectre dichroïque du PLGA  
 en fonction du pH dans NaCl 5M

Les spectres sont rapidement perturbés par une agrégation et une précipitation importantes.

4. Spectres dans le mélange (2/3 H<sub>2</sub>O - 1/3 Dioxanne)  
-----2-----

Figure (14).  
-----

Dès pH 8, ce spectre fait apparaître une bande négative à 235 nm qui semble d'être à l'addition du solvant organique.

La bande à 218 nm est plus faible ( $(\theta) = 2500 \text{ degré cm}^2 / \text{décimole}$ ).

La transition est très brutale car elle a lieu entièrement entre pH 7,1 et 6,6.

L'ellipticité maximum est supérieure à celle obtenue dans l'eau pure ( $(\theta)_{222} = -43\,000$  contre  $-37\,000 \text{ degré.cm}^2 / \text{décimole}$ ).

5. Spectres dans le mélange (2/3 NaCl 0,2M - 1/3 Dioxanne). Figure (15).

Les spectres sont semblables à ceux obtenus dans le mélange 2/3 H<sub>2</sub>O - 1/3 Dioxanne.

La position des bandes est la même, mais leur intensité est supérieure.

Tous les spectres obtenus en milieu acide sont caractéristiques de l'hélice  $\alpha$ . L'ellipticité à 222 nm est de  $-40\,000 \pm 3\,000 \text{ degré.cm}^2 / \text{décimole}$ , sauf dans le cas de NaCl 5M.

En milieu aqueux à pH < 4, l'agrégation se manifeste par la disparition de la bande négative à 209 nm et par la diminution de l'intensité de la bande positive à 190 nm. Ces résultats sont en bon accord avec ceux de URRY et COLL (18).

Tous les spectres présentent également un point isodichroïque à  $\lambda = 202 \text{ nm}$  et  $(\theta) = -17\,000 \text{ degré.cm}^2 / \text{décimole}$ , sauf les spectres

.../...

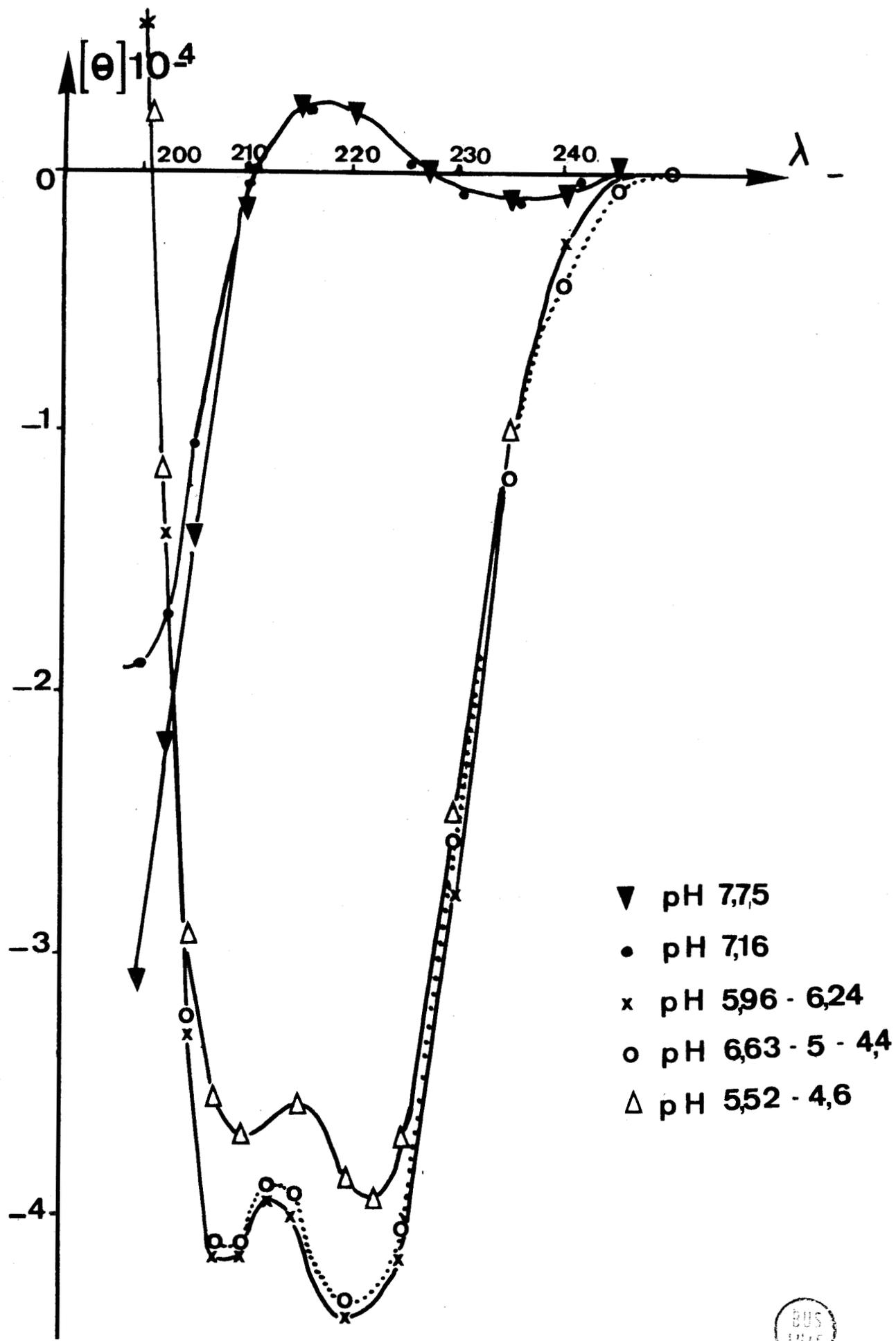


Fig 14 Spectre dichroïque du PLGA

en fonction du pH dans

$\frac{2}{3}$  H<sub>2</sub>O  
 $\frac{1}{3}$  dioxanne



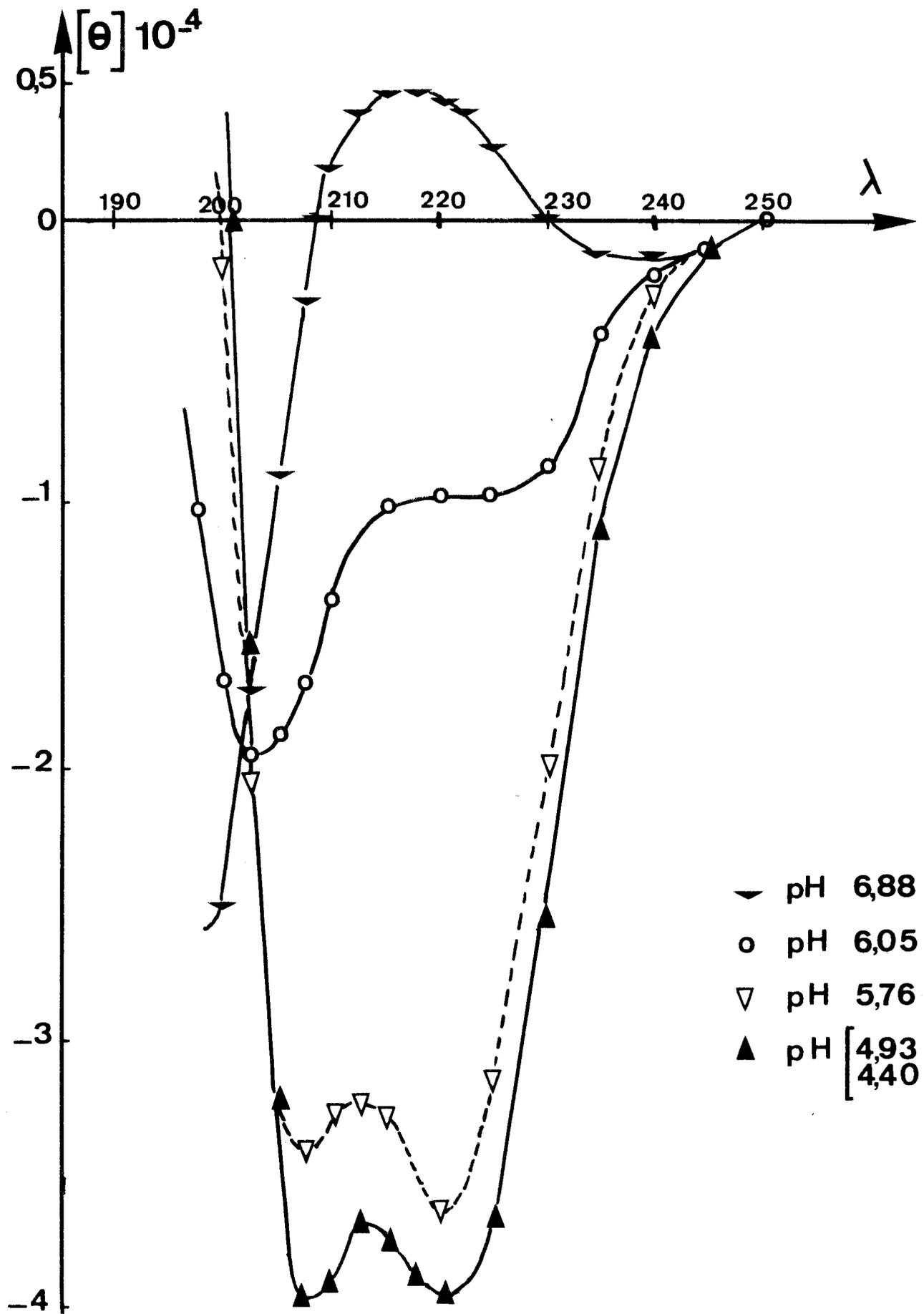


Fig 15 Spectre dichroïque du PLGA  
 en fonction du pH dans  $\frac{2}{3}$  NaCl 0,2 M  
 $\frac{1}{3}$  Dioxanne



enregistrés sur les solutions dans Na Cl 5M.

Cela suggère que dans tous les cas, sauf celui des solutions dans Na Cl 5M, les spectres correspondent à des mélanges essentiellement constitués d'hélice  $\alpha$  et de structure étendue.

En aucun cas et même en présence d'une force ionique importante, nous n'avons pu obtenir un spectre dichroïque correspondant au modèle de TIFFANY et KRIMM. Figure (10a).

#### 6. Influence de la proportion de solvant organique.

Lorsqu'on ajoute à pH 7-8, 33% de dioxanne à la solution aqueuse, on constate l'apparition d'une bande négative vers 235 nm. Pour expliquer cela nous avons fixé le pH à 7 et nous avons fait varier la quantité de dioxanne présente dans la solution. Les spectres obtenus sont représentés sur la Figure (16).

On constate que l'augmentation du pourcentage de dioxanne à pH constant induit la transition vers une hélice  $\alpha$  comme l'ont observé TIFFANY et KRIMM en ajoutant du méthanol à une solution de PLGA (3).

La transition est ici plus rapide et plus brutale que dans le cas du méthanol. Figure (17).

Il semble que l'apparition de la bande négative à 235 nm soit due à la contribution d'une fraction d'hélice au spectre dichroïque.

#### 7. Influence du milieu sur le pH de transition.

Pour mettre mieux en évidence les transitions qui ont lieu dans les différents solvants, nous avons tracé pour chacun d'eux la variation de l'ellipticité à 222 nm avec le pH.

Ces courbes sont portées sur la figure (18).

Nous pouvons en tirer les points suivants :

- L'amplitude de la transition est diminuée par la présence de sel dans la solution ; elle augmente par addition de dioxanne.

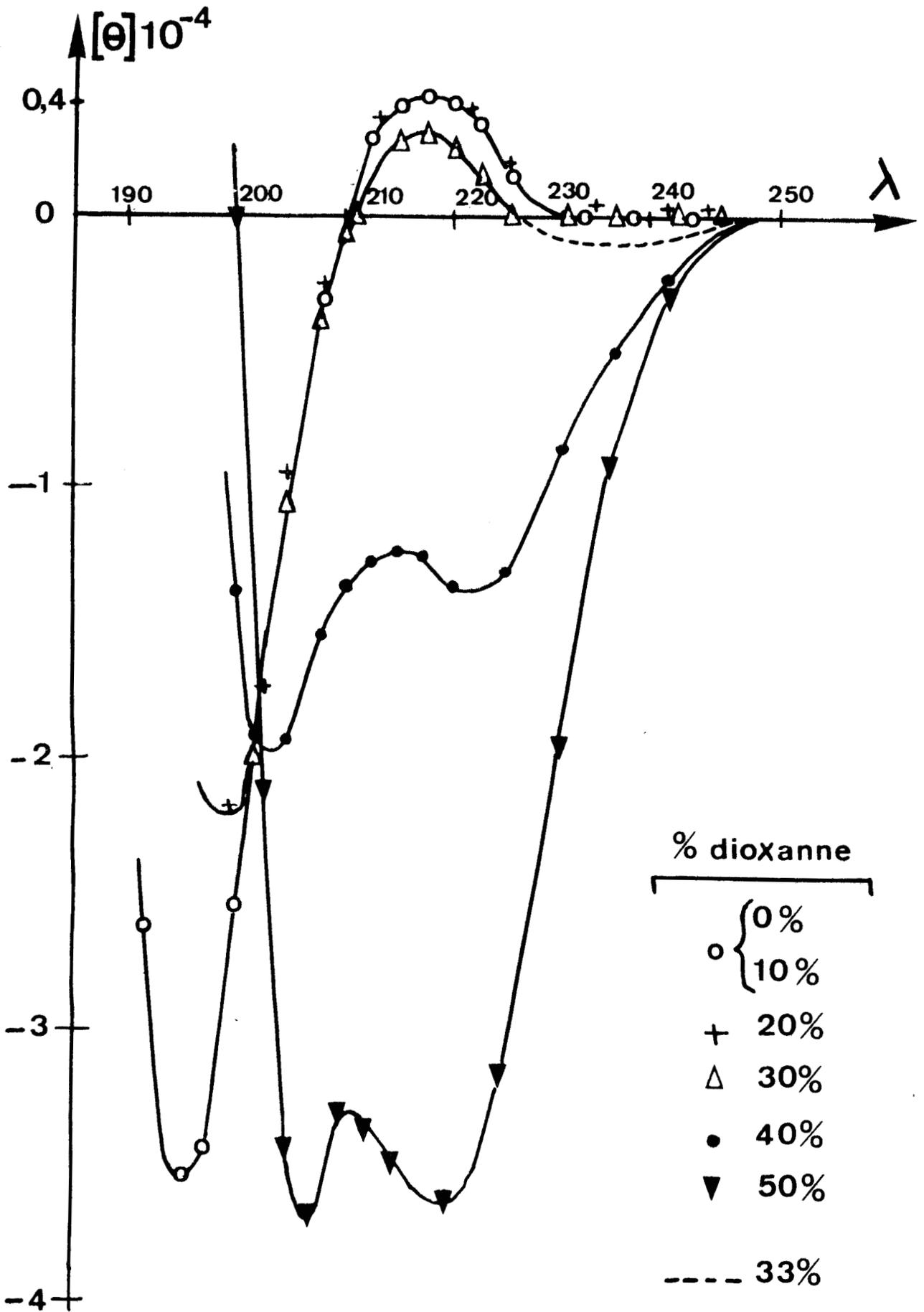


Fig 16 Influence de la composition en dioxanne à pH 7



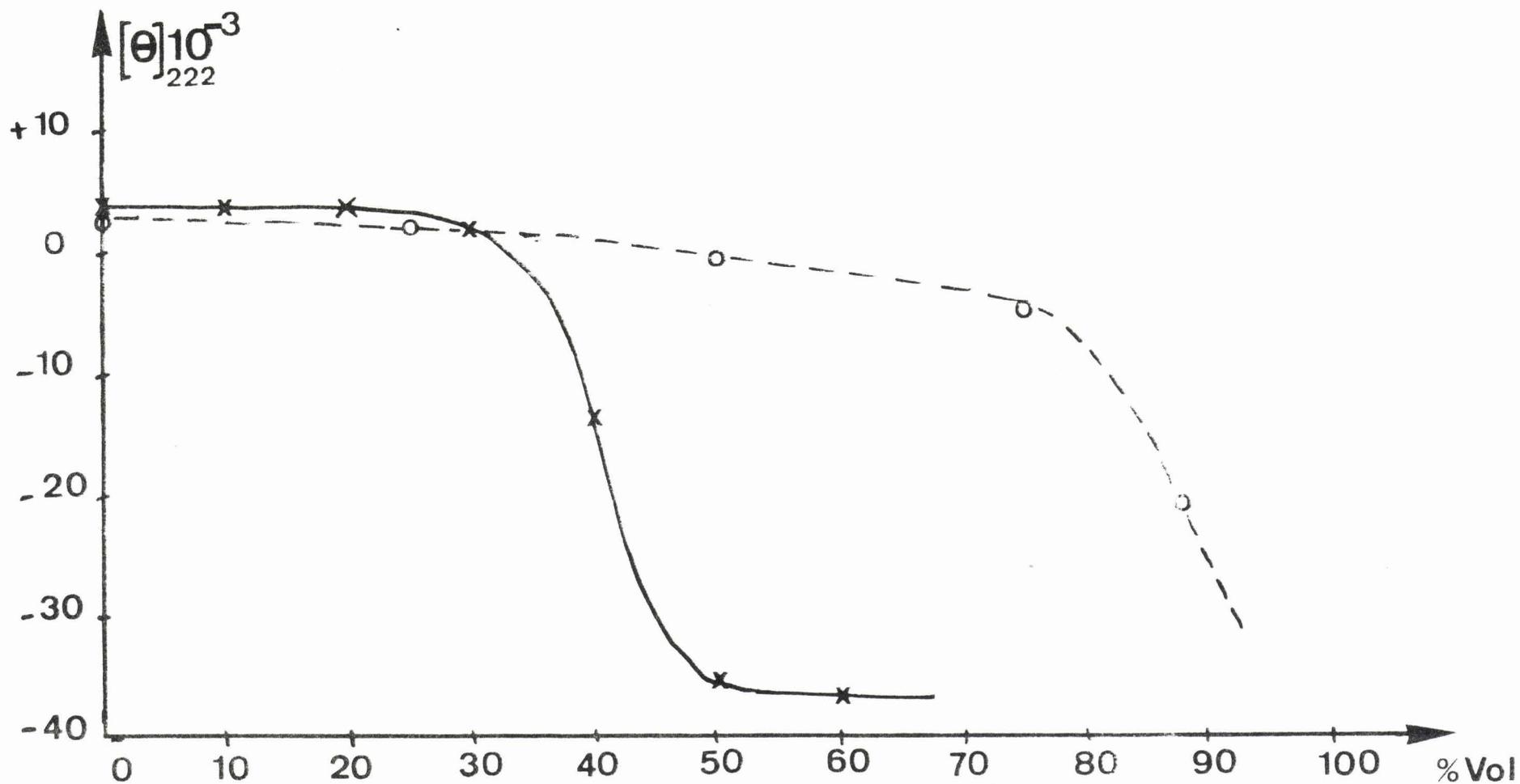


Fig 17 Transition du PLGA induite par addition de solvant organique à pH 7

{ x Dioxanne  
 { o Methanol (Tiffany Krimm)



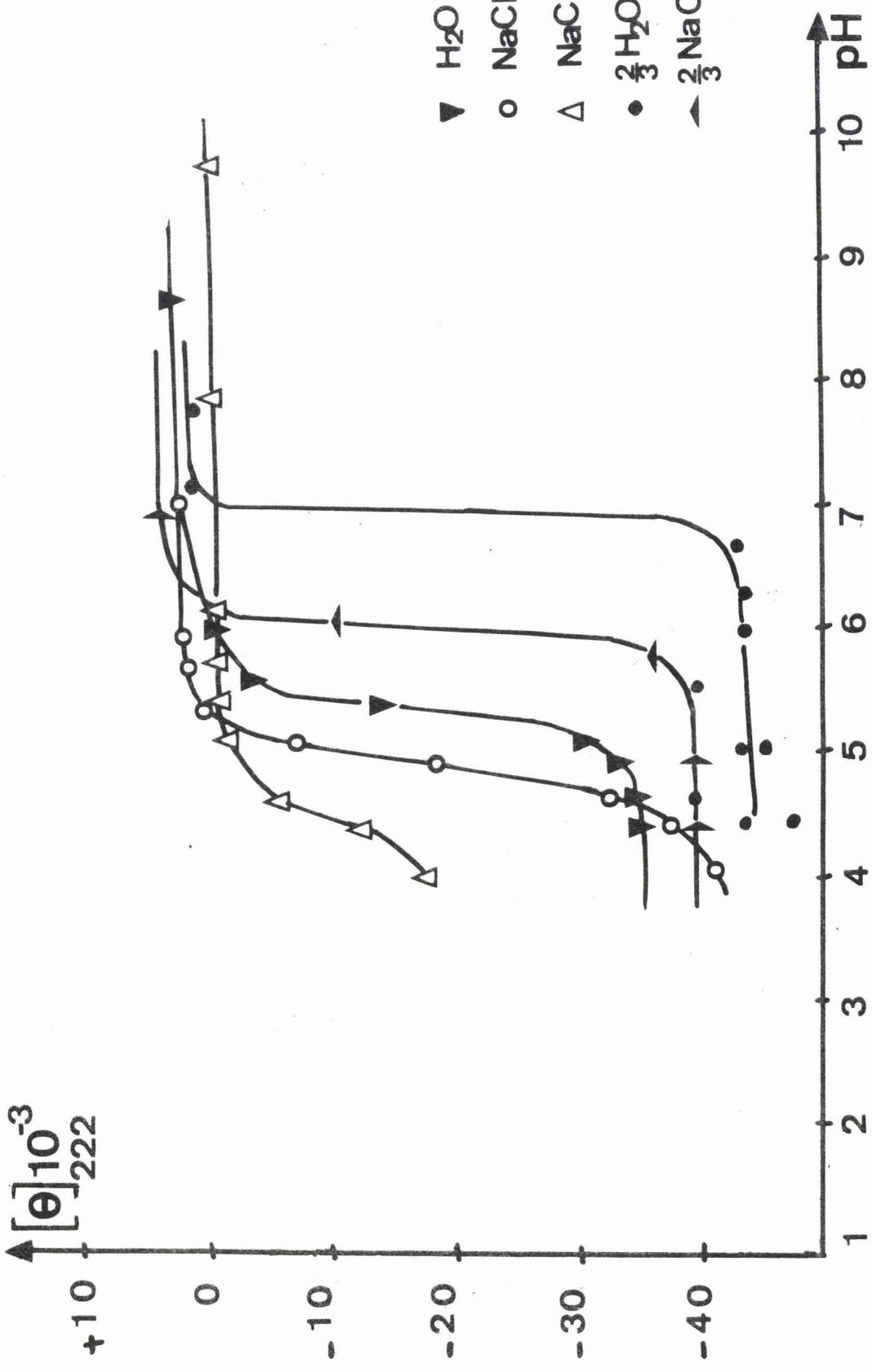


Fig 18 Transition dans differents solvants



- La transition est d'autant plus brutale que la force ionique est faible ou que la proportion de dioxanne est grande.
- Le pH de transition est déplacé vers les bas pH en présence de sel, vers les pH élevés en présence de dioxanne, ce second effet étant prépondérant dans la cas où le milieu contient à la fois du chlorure de sodium et du dioxanne.

TABLEAU VI.

| Solvants                            | pH de transition |
|-------------------------------------|------------------|
| H <sub>2</sub> O                    | 5,35             |
| Na Cl 0,2M                          | 4,90             |
| Na Cl 5M                            | 4,50             |
| 2/3 H <sub>2</sub> O + 1/3 Dioxanne | 6,95             |
| 2/3 Na Cl 0,2M + 1/3 Dioxanne       | 6,00             |
| 1/3 Dioxanne                        |                  |

Les mesures de viscosité intrinsèque dans Na Cl 0,2M et 2/3 Na Cl 0,2M + 1/3 Dioxanne montrent un excellent accord avec ces résultats quant au pH de transition.

D'autre part les résultats de viscosité dans Na Cl 0,2M en milieu basique sont en bon accord avec l'hypothèse d'une structure rigide plus étendue que l'hélice  $\alpha$  .  
 Nous pensons ainsi apporter un argument supplémentaire pour étayer l'hypothèse de TIFFANY et KRIMM.

## 8. Interprétation des spectres dichroïques.

- dans l'eau pure.

Le problème qui se pose lorsqu'on considère la transition du PLGA dans l'eau en fonction du pH, est donc de savoir si l'on passe directement de la conformation étendue à l'hélice  $\alpha$  ou si l'on passe par l'intermédiaire d'une chaîne statistique.

L'existence d'un point isodichroïque à 202-203nm est en faveur de la première hypothèse mais n'exclut pas la présence en faible proportion d'une troisième conformation. En effet, si on examine les modèles de spectres dichroïques représentés sur la figure 10, on constate qu'à 203nm l'ellipticité pour l'hélice  $\alpha$  et la conformation étendue est  $(\theta) = -19.000$  degré  $\text{cm}^2$ /décimole; pour la chaîne statistique elle est de  $-5\ 000$  degré  $\text{cm}^2$ /décimole.

Si on calcule  $(\theta)$  pour un mélange contenant 20% de chaîne statistique on obtient  $(\theta) = -16\ 200$  degré  $\text{cm}^2$ /décimole. L'ellipticité à 202nm de la structure en chaîne statistique selon URRY et QUADRIFOGLIO est trop faible pour que l'on puisse avec certitude affirmer que cette structure entre en jeu en même temps que la structure étendue et l'hélice  $\alpha$ .

Pour résoudre le problème posé, nous avons calculé à partir de nos données expérimentales, la contribution de chaque conformation en fonction du pH en utilisant comme modèles le spectre du PLGA dans l'eau à pH 8 (conformation étendue), et à pH 4,4 (hélice  $\alpha$ ) ainsi que le modèle de chaîne statistique proposé par QUADRIFOGLIO et URRY<sup>(19)</sup> (Tableau VII).

Ce calcul a été fait en supposant d'une part un mélange purement constitué d'hélice  $\alpha$  et de conformation étendue (Tableau VIII), d'autre part un mélange d'hélice  $\alpha$  et de chaîne statistique (Tableau IX).

TABLEAU VII. Ellipticité des conformations modèles.

| Longueur d'onde<br>m $\mu$ | $(\theta)$ en degré.cm <sup>2</sup> / décimole. |              |              |
|----------------------------|---|--------------|--------------|
|                            | Hélice $\alpha$                                 | Conf.étendue | Chaîne stat. |
| 235                        | - 6600  | 0            | 0            |
| 230                        | -18400  | + 900        | - 600        |
| 225                        | -30600  | + 2200       | -1000        |
| 220                        | -36600  | +3700        | -1600        |
| 215                        | -35200  | +5300        | -1800        |
| 210                        | -34200  | +1900        | -3500        |
| 205                        | -30700  | -7000        | -4100        |
| 200                        | - 2500  | -23600       | -6800        |
| 195                        | +45000  | -33000       |              |

TABLEAU VIII. Calcul du pourcentage d'hélices  $\alpha$  en supposant un mélange hélice  $\alpha$  - configuration étendue.

| $\lambda$ | pH 5,6 |    | pH 5,38 |    | pH 5,12 |    | pH 4,92 |      |
|-----------|--------|----|---------|----|---------|----|---------|------|
| 235       | - 1800 | 27 | - 2700  | 41 | - 5600  | 85 | - 5700  | 86   |
| 230       | - 3900 | 25 | - 8000  | 46 | -16200  | 89 | -17200  | 94   |
| 225       | - 3900 | 19 | -12700  | 45 | -26800  | 89 | -28500  | 93,5 |
| 220       | - 3400 | 18 | -14200  | 44 | -31400  | 87 | -34400  | 94,5 |
| 215       | - 2700 | 20 | -13600  | 47 | -30400  | 88 | -32600  | 93,5 |
| 210       | - 6000 | 22 | -11600  | 38 | -31000  | 91 | -33000  | 96,5 |
| 205       | -11600 | 19 | -16200  | 39 | -28000  | 89 | -29600  | 96   |
| 200       | -19400 | 20 | -17200  | 30 | - 5400  | 86 | - 5500  | 86   |
| 195       | -17500 | 20 | - 1500  | 40 | +36000  | 88 |         |      |



TABLEAU IX

Calcul des pourcentages d'hélice  $\alpha$  en supposant un mélange d'hélice  $\alpha$  - chaîne statistique.

| $\lambda$ | pH 5,6 |      | pH 5,38     |
|-----------|--------|------|-------------|
| 235       | -1800  | 27,3 | -2700 41    |
| 230       | -3900  | 18,5 | -8000 41,5  |
| 225       | -3900  | 9,8  | -12700 39,6 |
| 220       | -3400  | 5,2  | -14200 36   |
| 215       | -2700  | 2,6  | -13600 35   |
| 210       | -6000  | 8,2  | -11600 26,4 |
| 205       | -11600 | 28,2 | -16200 45,5 |
| 200       | -19400 | <0%  | -17200 <0%  |

On a utilisé pour cela les relations :

$$\% \text{ hélice } \alpha = \frac{(\theta) - (\theta)_{\text{ét}}}{(\theta)_{\alpha} - (\theta)_{\text{ét}}} \times 100$$

et

$$\% \text{ hélice } \alpha = \frac{(\theta) - (\theta)_c}{(\theta)_{\alpha} - (\theta)_c} \times 100$$

En appelant  $(\theta)$  l'ellipticité mesurée.

$(\theta)_{\text{ét}}$  l'ellipticité de la conformation étendue.

$(\theta)_{\alpha}$  l'ellipticité de l'hélice  $\alpha$ .

$(\theta)_c$  l'ellipticité de la chaîne statistique.

à la longueur d'onde  $\lambda$ .

On constate qu'en solution dans l'eau pure l'accord entre les pourcentages calculés en supposant un mélange hélice  $\alpha$  - chaîne statistique est très médiocre alors que cet accord est bon si l'on considère un mélange d'hélice  $\alpha$  et de conformation étendue.

Les calculs ont été faits pour quatre pH différents de 5,6 à 4,92 encadrant la transition (voir tableaux VIII et IX).

- En ce qui concerne les solutions dans Na Cl 0,2M à pH 7, nous avons calculé le pourcentage de conformation étendue dans

deux cas, d'abord en supposant un mélange de conformation étendue et d'hélice  $\alpha$ , puis un mélange de chaîne statistique et de conformation étendue (Tableau X). A ce pH, l'erreur expérimentale sur les valeurs des ellipticités fait que l'accord est médiocre dans les deux hypothèses. Par contre à pH 5,07 nous constatons que seul un mélange hélice  $\alpha$  - conformation étendue permet un accord avec nos résultats expérimentaux. (Voir tableau XI.).

- Quand on ajoute du dioxanne à l'eau pure (Figure 16), on peut passer à pH 7 de la conformation étendue à l'hélice  $\alpha$ . Nous avons calculé pour le cas où on a 40% de dioxanne en volume, le pourcentage d'hélice  $\alpha$ . L'accord excellent que nous obtenons montre que l'hypothèse du mélange conformation étendue-hélice  $\alpha$  est tout à fait justifiée (Voir tableau XII.).

TABLEAU X

Calcul du pourcentage des différentes conformations en supposant :

- a) mélange hélice  $\alpha$  - conformation étendue
- b) mélange conformation étendue- chaîne statistique.

| $\lambda$ | Na Cl 0,2M<br>( $\theta$ ), pH 7,0 | % conformation étendue |      |
|-----------|------------------------------------|------------------------|------|
|           |                                    | a)                     | b)   |
| 235       | 0                                  | 100%                   |      |
| 230       | 0                                  | 95,3%                  | 40%  |
| 225       | 1700                               | 98,5%                  | 85%  |
| 220       | 2600                               | 97,3%                  | 89%  |
| 215       | 3100                               | 94,5                   | 69%  |
| 210       | 1100                               | 97,8                   | 85%  |
| 205       | -10000                             | 87,3                   | >100 |
| 200       | -25800                             | >100                   | >100 |
| 195       | -30000                             | 96,1                   |      |

TABLEAU XI

Calcul du pourcentage des différentes conformations en supposant :

a) mélange hélice  $\alpha$  - conformation étendue

b) mélange hélice  $\alpha$  - chaîne statistique.

Dans Na Cl 0,2M ,pH 5,07

| ( $\theta$ ) 5,07 | a) % hélice $\alpha$ | b) % hélice $\alpha$ |
|-------------------|----------------------|----------------------|
| -1400             | 21,2%                | 21,2%                |
| -3600             | 23%                  | 17%                  |
| -6300             | 26%                  | 18%                  |
| -7200             | 27%                  | 16%                  |
| -6300             | 28,5%                | 13,5%                |
| -7200             | 25%                  | 12%                  |
| -14200            | 30%                  | 41%                  |
| -18000            | 26,6%                | <0%                  |
| -6200             | 34%                  |                      |

TABLEAU XII

Calcul du pourcentage des différentes conformations en supposant :

a) un mélange d'hélice  $\alpha$  et de conformation étendue.

b) un mélange d'hélice  $\alpha$  et de chaîne statistique.

H<sub>2</sub>O + 40% de dioxanne à pH7.

| $\lambda$ | $\theta$ | a) % hélice $\alpha$ | b) % hélice $\alpha$ |
|-----------|----------|----------------------|----------------------|
| 235       | -5000    | 76%                  | 76%                  |
| 230       | -8500    | 49%                  | 44,5%                |
| 225       | -13000   | 46,5%                | 40,5%                |
| 220       | -13500   | 42,5%                | 34%                  |
| 215       | -12300   | 43,5%                | 31%                  |
| 210       | -13500   | 42,5%                | 32,6%                |
| 205       | -19300   | 52%                  | 57%                  |
| 200       | -13800   | 46,5%                | <0%                  |

.../...

- Si le pourcentage de dioxanne n'est plus que de 33%, au même pH de 7, le spectre dichroïque est très différent. Les valeurs des différences d'ellipticité sont trop faibles pour qu'on puisse interpréter valablement les résultats en termes de mélanges de structures. Le tableau XIII montre les essais que nous avons effectués.

Cependant nous avons pu grâce à la mesure de l'ellipticité à 222nm représenter la transition en fonction du pourcentage de dioxanne ajouté à l'eau pure à pH 7. (Figure 17).

- Les résultats obtenus lorsqu'on utilise le mélange Na Cl 0,2M/dioxanne (2/1) (voir figure 15), montrent qu'à pH 6,88, le spectre dichroïque correspond à un pourcentage de conformation étendue de 100% aux erreurs expérimentales près. L'addition de sel lorsqu'on se trouve en présence de dioxanne semble augmenter la proportion de conformation étendue, alors que en l'absence de dioxanne, l'addition de sel semble diminuer la proportion de cette conformation (voir Figure 12). Nous n'avons pas d'explication pour ce phénomène.

Les résultats à pH 6,05 dans Na Cl 0,2M/dioxanne 2/1 (tableau XIV) ne nous permettent pas de dire si on est en présence d'un mélange conformation étendue-hélice  $\alpha$  ou d'un mélange hélice  $\alpha$ -chaîne statistique. Il faudrait probablement introduire une contribution due à une structure en chaîne statistique. Si l'on introduit trois structures différentes, il n'est plus possible de donner un seul ensemble de trois pourcentages correspondant à ces structures. Ce point de vue est confirmé par l'examen des spectres obtenus dans Na Cl 5M.

TABLEAU XIII

Calcul du pourcentage des différentes conformations en supposant :

- a) un mélange hélice  $\alpha$  -conformation étendue
  - b) un mélange hélice  $\alpha$  -chaîne statistique.
- H<sub>2</sub>O + 33% dioxanne à pH 7.

| $\lambda$ | $\theta$ | a) % hélice $\alpha$ | b) % hélice $\alpha$ |
|-----------|----------|----------------------|----------------------|
| 235       | -1500    | 15%                  |                      |
| 230       | - 800    | 6,3%                 | 0 %                  |
| 225       | + 400    | 4,1%                 | 44%                  |
| 220       | +2300    | 3 %                  | 74%                  |
| 215       | +2500    | 6,2%                 | 60%                  |
| 210       | -1500    | 7,8%                 | 37%                  |
| 205       | -14000   | 27%                  | > 100%               |
| 200       | -31000   | <0%                  | > 100%               |

TABLEAU XIV.

Calcul du pourcentage des différentes conformations en supposant :

a) mélange hélice  $\alpha$  - conformation étendue.

b) mélange hélice  $\alpha$  - chaîne statistique.

Dans Na Cl 0,2M- Dioxanne (2/1) ,pH 6,05

| $\lambda$ | $\theta$ | a) % hélice $\alpha$ | b) % hélice $\alpha$ |
|-----------|----------|----------------------|----------------------|
| 235       | -4200    | 64%                  | 64%                  |
| 230       | -9100    | 52%                  | 48%                  |
| 225       | -10200   | 38%                  | 31%                  |
| 220       | -10200   | 35%                  | 25%                  |
| 215       | -10500   | 39%                  | 26%                  |
| 210       | -14000   | 44%                  | 34%                  |
| 205       | -19000   | 50%                  | 56%                  |
| 200       | -17000   | 31%                  | <0%                  |

- Dans Na Cl 5M : Si l'on considère le spectre dichroïque obtenu à pH 9,7 ( Figure 13) on constate que l'ellipticité de la bande à 218 nm a fortement diminué par rapport à ce que l'on observe dans l'eau pure. Nous avons essayé d'interpréter ce spectre en termes de mélange de deux conformations; d'une part un mélange conformation étendue-hélice  $\alpha$ , d'autre part un mélange conformation étendue-chaîne statistique. (Tableau XV). Dans le premier cas, la valeur absolue des ellipticités de l'hélice  $\alpha$  est telle que le pourcentage calculé de conformation étendue est toujours voisin de 100% donc peu significatif. De plus le pourcentage de conformation étendue ainsi calculé est très voisin de celui trouvé dans le cas des solutions dans Na Cl 0,2M au même pH. On aurait donc la même proportion de conformation étendue dans Na Cl 0,2M ou Na Cl 5M, ce qui est en désaccord complet avec les résultats de viscosité. Il ne semble donc pas que l'on puisse interpréter le spectre obtenu dans Na Cl 5M à pH 9,7 en terme d'un mélange conformation étendue-hélice  $\alpha$ .

Au contraire en supposant un mélange conformation étendue-chaîne statistique, les pourcentages calculés sont voisins pour les longueurs d'onde situées entre 230 et 215 nm, c'est à dire dans la gamme la plus facilement exploitable. (Tableau XV). Cette hypothèse est en meilleur accord avec les résultats de viscosité.

.../...

TABLEAU XV.

Calcul du pourcentage des différentes conformations en supposant :

a) un mélange conformation étendue-chaîne statistique.

b) un mélange conformation étendue-hélice  $\alpha$   
Na Cl 5M, pH 9,72

| $\lambda$ | $\theta$ | a) % conformation étendue | b) % conformation étendue. |
|-----------|----------|---------------------------|----------------------------|
| 235       | 0        |                           | 100%                       |
| 230       | 0        | 40%                       | 95%                        |
| 225       | +200     | 37,5%                     | 94%                        |
| 220       | +300     | 36%                       | 91,5%                      |
| 215       | +500     | 32,5%                     | 88%                        |
| 210       | -700     | 52%                       | 93%                        |
| 205       | -7200    | >100%                     | > 100%                     |
| 200       | -19200   | 73,5%                     | 79%                        |

En milieu acide dans Na Cl 5M, le spectre dichroïque est caractéristique d'une hélice  $\alpha$  mais l'ellipticité maximale obtenue est d'environ  $-16\ 000$  degré/cm<sup>2</sup>/ décimole alors qu'elle est de  $-36\ 000$  degré cm<sup>2</sup> / décimole dans l'eau pure.

Le spectre dichroïque à pH 4,40 semble correspondre à une molécule qui n'est pas encore entièrement hélicoïdale car l'ellipticité à 222 nm est inférieure à l'ellipticité à 208nm.

Le spectre obtenu à pH 3,98 présente l'allure caractéristique d'un polymère partiellement agrégé<sup>(18)</sup>. Si on examine les courbes de transition présentées sur la figure 18 on voit que la présence de sel déplace la transition vers les bas pH c'est à dire retarde la formation d'hélice. De plus, dès que le pH de la solution est abaissé à 3,98, on observe l'apparition de la précipitation qui accompagne l'agrégation<sup>(7)</sup>.

Il semble donc qu'il y aurait précipitation et agrégation dans la solution avant que la molécule ne soit entièrement sous forme hélicoïdale. Une seconde explication peut être avancée. En effet, à la concentration utilisée (5M), le chlorure de sodium présente une absorption importante aux faibles longueurs d'onde. Il est possible que la mesure des ellipticités soit faussée par cette absorption importante. (Le dichrographe

.../...

Roussel Jouan utilisé est un appareil monofaisceau.)

Enfin le point isodichroïque apparaît beaucoup moins net que dans le cas de l'eau ou de Na Cl 0,2M. Cela s'explique si l'on suppose la contribution d'une fraction appréciable d'une troisième conformation (chaîne statistique) aux spectres dichroïques de la solution. Cependant l'explication invoquée ci dessus ( absorption importante dûe au chlorure de sodium) doit également être prise en considération.

QUATRIEME CHAPITRE

DISCUSSION DES RESULTATS.

Nous avons essayé d'interpréter les spectres dichroïques obtenus en termes de mélange de deux conformations. Ces calculs donnent des résultats satisfaisants dans deux cas :

- dans l'eau pure, lorsqu'on induit la transition en abaissant le pH.

- dans l'eau pure à pH constant lorsqu'on induit la transition en ajoutant du dioxanne dans le milieu.

Dans le premier cas nous avons pu montrer que la transition se fait de la conformation étendue à l'hélice  $\alpha$  sans passer par l'intermédiaire d'une chaîne statistique. Ceci est en bon accord avec les résultats de viscosité (Figure 1). En effet, la courbe viscosimétrique obtenue ( Courbe I) ne présente pas de minimum qui correspondrait au passage par une chaîne statistique.

Dans le second cas, on passe de la conformation étendue à l'hélice  $\alpha$  en ajoutant au milieu des quantités croissantes de dioxanne ( Figures 16 et 17). Ici encore la transition se fait directement de la conformation étendue à l'hélice  $\alpha$ . Ces résultats sont en bon accord avec ceux de IIZUKA et YANG<sup>(16)</sup> qui ont montré par dispersion optique rotatoire que l'addition de dioxanne induit la transition. TIFFANY et KRIMM quant à eux, ont obtenu des résultats analogues par addition de méthanol à une solution basique (pH 7) d'acide poly-L-glutamique .(Figure 17).

Le problème se complique lorsqu'on ajoute du chlorure de sodium aux solutions. Les résultats de viscosité, de D.O.R. et de dichroïsme circulaire laissent à penser que la conformation étendue se transforme progressivement en chaîne statistique au fur et à mesure de l'augmentation de la force ionique.

Il semble alors que l'interprétation des spectres dichroïques en termes de mélange de deux conformations soit insuffisante. Il faut donc considérer des mélanges de trois conformations à savoir :

.../...

- hélice  $\alpha$  .
- chaîne statistique.
- conformation étendue.

mais les résultats expérimentaux ne pourront alors être interprétés qu'avec l'aide de calculateurs.

En milieu acide, les spectres dichroïques sont tous caractéristiques de l'hélice  $\alpha$  . Si l'on excepte le cas des solutions dans Na Cl 5M, la seule différence observée est une différence entre les ellipticités maximales à 222 nm selon qu'on est ou non en présence de dioxanne. ( - 43 000 contre - 37 000 degré  $\text{cm}^2$ / décimole). Ceci est à rapprocher des résultats de viscosités qui montrent qu'en présence de dioxanne, l'hélice  $\alpha$  est plus rigide que dans l'eau pure. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette différence de viscosité :

- la première fait intervenir des paramètres d'interaction entre les deux solvants eau et dioxanne. En effet, DONDOS et PATTERSON ont montré que les dimensions d'une chaîne macromoléculaire en solution dans un mélange de solvants sont fortement influencées par le paramètre d'interaction entre les deux solvants. Cependant la différence de viscosité intrinsèque à pH acide peut mieux s'expliquer en supposant que en l'absence de dioxanne le polypeptide présente un certain nombre de "points non rigides". La viscosité dans Na Cl 0,2M serait alors expliquée. On sait par ailleurs que la présence de dioxanne stabilise les liaisons hydrogène intramoléculaires et par conséquent tendrait à faire disparaître ces " points non rigides". Le coefficient  $a$ , de la loi de MARK HOUWINK, est de 1,47 en présence de dioxanne et cela correspond bien à une macromolécule rigide. Nous ne disposons pas, malheureusement de la valeur de  $a$ , dans Na Cl 0,2M, ce qui aurait pu étayer notre hypothèse.

En milieu basique purement aqueux, la conformation étendue est bien établie par l'étude de la viscosité et des spectres dichroïques. Cette conformation est liée à l'existence des répulsions électrostatiques dues aux charges électriques du polypeptide ionisé. Si l'on diminue ces répulsions en ajoutant un électrolyte soluble, la conformation étendue semble céder progressivement la place à une conformation plus voisine de la chaîne statistique. Cependant nous ne pensons pas que, même en présence de Na Cl 5M, on ait purement une chaîne statistique.

.../...

Si l'on ajoute du dioxanne à pH constant, on induit la transition d'une façon très brutale et l'on passe d'une conformation très proche de 100% de la conformation étendue (dans Na Cl 0,2M) à l'hélice  $\alpha$ .

Un point intrigant n'a cependant pas reçu de solution : dans Na Cl 0,2M/Dioxanne, la viscosité intrinsèque est faible, et cependant les spectres dichroïques indiquent une conformation très proche de celle qui existe dans l'eau pure ou dans Na Cl 0,2M. L'explication fournie par DONDOS et PATTERSON, et que nous avons rejetée dans le cas de l'hélice  $\alpha$  pourrait ici s'appliquer. Des calculs ultérieurs seraient alors susceptibles d'apporter des arguments pour ou contre cette explication.

CONCLUSION

Notre étude des solutions de PLGA confirme l'hypothèse d'une conformation étendue dans le cas des solutions basiques, en l'absence de sel ou à force ionique faible. Pour ce qui est de la transition, notre étude pose plus de problèmes qu'elle n'en résoud et il sera nécessaire de préciser par la suite le rôle de la chaîne statistique. Une étude thermodynamique des interactions entre le PLGA et les divers solvants, devrait aussi permettre une clarification du problème.

|                           |
|---------------------------|
| B I B L I O G R A P H I E |
|---------------------------|

- (1) E.MARCHAL, C.STRAZIELLE. C. R.Acad.Sci.Paris. 267, 135 (1968)
- (2) P.DOTY, A.WADA, J.T.YANG, E.R.BLOUT. J.Polymer.Sci. 23, 851 (1957)
- (3) M.L.TIFFANY, et S.KRIMM. Biopolymers. 6, 1379 (1968)
- (4) M.L.TIFFANY, et S.KRIMM. Biopolymers. 6, 1770 (1968)
- (5) M.L.TIFFANY, et S.KRIMM. Biopolymers. 8, 347 (1969)
- (6) A.WADA. Molec.Phys. 3, 409 (1960)
- (7) D.CONSTANTIN. Thèse Strasbourg. (1969) p 15
- (8) J.Y.CASSIM, E.W.TAYLOR. Biophys.J. 5, 553 (1965)
- (9) J.Y.CASSIM, E.W.TAYLOR. Biophys.J. 5, 573 (1965)
- (10) G.HOLZWARTH, P.DOTY. J.A.C.S. 87, 218 (1965)
- (11) W.MOFFITT. Proc.Natl.Acad.Sci. 42, 736 (1956)  
J.Chem.Phys. 25, 467 (1956)
- (12) L.PAULING, et R.B.COREY. Proc.Natl.Acad.Sci. 37, 241 (1951)
- (13) G.HOLZWARTH, W.B.GRATZER, P.DOTY. J.A.C.S. 84, 3194 (1962)
- (14) K.IMAHORI, J.TANAKA. J.Mol.Biol. 1, 359 (1959)
- (15) P.DOTY, J.T.YANG. J.A.C.S. 78, 498 (1956)
- (16) E.IIZUKA, et J.T.YANG. Biochemistry 4, 1249 (1965)

.../...

- (17) E.SHECHTER, et E.R.BLOUT Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 51, 695 (1964)  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 51, 794 (1964)
- (18) D.W.URRY dans " Spectroscopic Approaches to Biomolecular  
Conformation"  
American Medical Association 1970.
- (19) F.QUADRIFOGLIO, et D.W.URRY. J.A.C.S. 90, 2760 (1968)
- (20) V.A.ZUBKOV, T.M.BIRSHEIN, I.S.MILEVSKAYA, M.V.VOLKENSTEIN,  
Biopolymers 10, 2051 (1971).

--oo O oo--