

50376

1972

N° d'ordre 331

68

50376

1972

68

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE 3^{me} CYCLE

par

PIERRE LE BARNY

INGÉNIEUR E. N. S. DE CHIMIE DE LILLE



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE
DES POLYPEPTIDES PORTANT DES GROUPEMENTS CHROMOPHORES
SUR LEURS CHAINES LATÉRALES

APPLICATION AU CAS DES POLYGLUTAMATES DE NITROBENZYLE

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

M. J.-P. BEUFILS, président
M^{me} M.-H. LOUCHEUX, rapporteur
M. C. 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 ^{er} 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.	BKOCHE 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.	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 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 la mémoire de mon Père,
dont la droiture est un
exemple constant pour moi.

A ma Mère,
en hommage affectueux et reconnaissant
pour son dévouement.

A Thérèse, ma femme,
en témoignage de ma profonde affection.

A toute ma famille et mes amis.

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chimie Macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille où Monsieur le Professeur C.LOUCHEUX a bien voulu m'accueillir.

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

Madame M-H.LOUCHEUX, chargée de recherche au CNRS, a dirigé constamment mon travail. Malgré ses nombreuses occupations, elle a toujours su trouver du temps à consacrer à des discussions qui, pour moi, furent des plus enrichissantes.

Je suis heureux de lui exprimer ma respectueuse reconnaissance.

Monsieur J-P.BEAUFILS, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse; qu'il veuille accepter mes remerciements respectueux et sincères.

Je remercie vivement Monsieur G.WEILL, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg de s'être intéressé à ce travail et d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées au Centre de Recherches sur les Macromolécules de Strasbourg, et au laboratoire de Génétique Moléculaire de Gif/s/Yvette, où on m'a accueilli avec beaucoup de gentillesse.

Je suis heureux d'exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur BENOIT, Directeur du CRM, ainsi qu'à Monsieur LUZZATI, Directeur de recherche au CNRS.

Au cours de mon séjour à Gif sur Yvette, j'ai eu l'occasion de discuter mes résultats avec Monsieur SHECHTER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris; Je l'en remercie très vivement.

La société FICA a mis à ma disposition son spectropolarimètre "Spectropol"; je l'en remercie chaleureusement.

Je suis très reconnaissant à Monsieur TALAMAS de m'avoir guidé pour obtenir les spectres de dispersion optique rotatoire dans les conditions optimales.

Les spectres de dichroïsme linéaire ont été enregistrés au Centre Textile de Contrôle et de Recherche Scientifique de Roubaix et au laboratoire de chimie physique du CNRS à Thiais. J'ai été très sensible à l'accueil que m'ont réservé Mademoiselle DEVILLERS et Monsieur KACZMAREK d'une part, et Mademoiselle LAFERRIERE d'autre part. Je les remercie pour leur gentillesse et leur serviabilité.

Les calculs numériques n'auraient pu être menés a bien sans le concours de Madame REMY qui a su m'accorder un peu de son temps précieux. Qu'elle veuille trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Monsieur J.M.THIERY m'a fait bénéficié des résultats de ses recherches pour effectuer les transformations de Kronig et Kramers point par point. Je lui en suis particulièrement reconnaissant.

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 d'un très précieux secours, et qui, à titres divers, ont contribué à la réalisation de ce travail. En particulier, je remercie Madame M.P.HILDEBRAND pour sa collaboration technique.

Je ne voudrais pas oublier de remercier ceux qui se sont chargés de la réalisation du travail écrit à savoir Mademoiselle A. COUSIN qui a collaboré à la dactylographie, Madame J.CELEN qui a fait les diapositives et Madame G. DESFOSSE qui a assuré le tirage de cette thèse.

P L A N D E T A I L L E

INTRODUCTION (p1)

CHAPITRE I PREPARATION DES POLYPEPTIDES

GENERALITES (p3)

I PREPARATION DES MONOMERES.

II POLYMERISATION.

- 1) Pureté du monomère.
- 2) Principe de la polymérisation.
- 3) Détermination de la masse moléculaire.

PARTIE EXPERIMENTALE (p10)

- 1) Glutamate de cuivre.
- 2) Glutamate de cuivre et de sodium.
- 3) Bromures de nitro benzyle
 - a) Bromure d'ortho nitro benzyle.
 - b) Bromure de méta nitro benzyle.
 - c) Bromure de para nitro benzyle.
- 4) Glutamates de cuivre et de nitro benzyle.
 - a) Processus expérimental.
 - b) Résultats.
- 5) Glutamates de nitro benzyle.
 - a) Processus expérimental.
 - α) Préparation de la solution de sel disodique de l'EDTA.
 - β) Obtention des glutamates de nitro benzyle.
 - b) Résultats.

.../...

6) Préparation des NCA's de glutamates de nitro benzyle.

a) Processus expérimental.

b) Résultats.

7) Détermination du chlorure dans les NCA's.

a) Préparation du dithizonate d'argent.

b) Dosage des ions contenus dans les NCA's.

Préparation des réactifs.

Méthode.

8) Polymérisation.

a) Processus expérimental.

b) Résultats.

CHAPITRE II

ETUDE DE L'ACTIVITE OPTIQUE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE.

A) RAPPELS THEORIQUES (p18)

I ORIGINE PHENOMENOLOGIQUE.

II GRANDEURS MACROSCOPIQUES LIEES A L'ACTIVITE OPTIQUE.

a) Rotation spécifique.

b) Rotation molaire ou pouvoir rotatoire moléculaire (m) .

c) Rotation molaire effective (m') .

III DISPERSION DU POUVOIR OPTIQUE ROTATOIRE.

IV LE DICHROISME CIRCULAIRE.

a) Définitions.

b) Les coefficients d'absorption en spectroscopie.

c) Grandeurs fondamentales caractérisant le dichroïsme.

.../...

V LE THEOREME DE KRONIG ET KRAMERS.

- a) Pouvoir rotatoire complexe.
- b) Le théorème de Kronig et Kramers.

VI LA THEORIE DE ROSENFELD.

- a) Exposé de la théorie.
- b) Propriétés de la force rotationnelle.
- c) Anisotropie d'une transition.

VII AUTRES THEORIES MOLECULAIRES DU POUVOIR ROTATOIRE.

B) APPLICATION DE LA DISPERSION DU POUVOIR OPTIQUE
ROTATOIRE ET DU DICHROISME CIRCULAIRE AUX POLY-
PEPTIDES. (p 34)

I SPECTRE ULTRA-VIOLET DE LA LIAISON PEPTIDIQUE.

II SPECTRES DICHROIQUES DES POLYPEPTIDES.

III COURBES DE DISPERSION DU POUVOIR OPTIQUE ROTATOIRE DES
POLYPEPTIDES.

- a) Equation de Moffitt-Yang.
- b) Equation de Drude à deux termes.
- c) Comparaison de l'équation de Drude à deux termes
et de l'équation de Moffitt.

C) ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.(p41)

RESULTATS EXPERIMENTAUX (p43)

I ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE PAR DICHROISME
CIRCULAIRE.

.../...

- a) Spectre ultra violet des polyglutamates de nitro benzyle.
 - α) Propriétés spectroscopiques du groupement nitro benzylique.
 - β) Résultats.
- b) Courbes de dichroïsme circulaire enregistrées.
 - α) Résultats obtenus dans l'hexafluoroisopropanol.
 - β) Résultats obtenus dans le 1,2 dichloréthane
 - γ) Résultats obtenus dans l'acide dichloracétique.
 - δ) Résultats obtenus dans l'acide trifluoracétique.
- c) Exploitation des résultats obtenus par dichroïsme circulaire.
 - α) Considérations sur le signe et l'intensité de la bande peptidique.
 - β) Les bandes dichroïques extrinsèques.
 - γ) Comparaison des spectres dichroïques des polyaspartates de nitro benzyle avec le spectre dichroïque des polyglutamates de nitro benzyle.

II ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE PAR DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE. (p51).

- a) Résultats expérimentaux.
- b) Calculs de Kronig et Kramers.
 - α) Méthode de Moscovitz.
 - β) Transformation de Kronig et Kramers point par point.
 - γ) Spectres dichroïques des glutamates de nitro benzyle.

III ETUDE DE LA STABILITE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE DANS LES SOLVANTS BINAIRES. (p58)

.../...

CHAPITRE III. ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE
PAR SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE.

I ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES POLYPEPTIDES PAR
SPECTROSCOPIE INFRA-ROUGE.(p 61)

- a) Historique.
- b) Bandes d'absorption du groupement peptidique.
- c) Exploitation des spectres expérimentaux. Rappels théoriques.
 - α) Intensité d'une bande d'absorption.
 - β) Définition du rapport dichroïque R.
 - γ) Rapport dichroïque expérimental.
 - δ) Causes d'erreur sur la détermination du rapport dichroïque.
 - ε) Relation entre le rapport dichroïque et les caractéristiques de l'échantillon.
 - ζ) Détermination de F
 - 1) Calcul selon Tsuboi
 - 2) Calcul selon Fraser et ses collaborateurs.

II ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE PAR SPECTROPHOTO-
METRIE INFRA-ROUGE EN LUMIERE NATURELLE. (p 71)

III ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE PAR SPECTROPHOTO-
METRIE INFRA-ROUGE EN LUMIERE POLARISEE. (p 73)

- a) Préparation des films orientés.
- b) Résultats expérimentaux.
- c) Détermination de la direction des moments de transition.
- d) Comparaison entre l'hélice des polyglutamates de nitro benzyle et l'hélice des polyglutamates de benzyle.

CONCLUSION. (p 79)

G L O S S A I R E

GC	Glutamate de cuivre.
GCN	Glutamate de cuivre et de sodium.
Glu(oNB)	Glutamate d'ortho nitro benzyle.
Glu(mNB)	Glutamate de méta nitro benzyle.
Glu(pNB)	Glutamate de para nitro benzyle.
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique.
NCA	Anhydride N carboxy aminé.
PGA	Acide polyglutamique.
PG(oNB)	Polyglutamate d'ortho nitro benzyle.
PG(mNB)	Polyglutamate de méta nitro benzyle.
PG(pNB)	Polyglutamate de para nitro benzyle.
HFIP	Hexafluoroisopropanol.
DCE	1,2 dichloréthane.
ADC	Acide dichloracétique.
ATF	Acide trifluoracétique.
n_{sp}	Viscosité spécifique.
(η)	Viscosité intrinsèque.
\bar{M}_w	Masse moléculaire moyenne en poids.
$\frac{\bar{M}_w}{DP_w}$	degré de polymérisation moyen en poids.
λ	longueur d'onde
ν	fréquence.

Les glutamates et les polyglutamates possèdent tous une conformation L.

A l'image des spectroscopistes, nous avons appelé fréquence le nombre d'onde $\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$.

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

Le rôle que joue la chaîne latérale dans la structure secondaire d'un polypeptide d'une part, la configuration de la chaîne latérale autour de l'hélice α d'autre part sont encore mal connus.

De nombreux travaux ont été faits ces dix dernières années dans ce domaine, et parmi tous les polypeptides, ce sont certainement les polyglutamates qui ont été les plus étudiés.

Il est généralement admis que la chaîne latérale d'un polyglutamate est suffisamment longue pour adopter une configuration quelconque désordonnée autour de l'hélice et pour que le squelette hélicoïdal ne puisse pas induire un effet Cotton dans la fonction ester.

Il nous a donc semblé intéressant de préparer des polyglutamates possédant dans leur chaîne latérale un groupement chromophore intrinsèquement symétrique susceptible de devenir optiquement actif s'il est perturbé de façon dissymétrique.

L'étude de l'activité optique de ces polypeptides en solution doit en effet pouvoir apporter des informations sur la chaîne latérale, que les effets Cotton extrinsèques proviennent de l'asymétrie du champ interne créé par l'hélice au niveau d'un chromophore qui lui est rigidement lié, ou de l'interaction entre groupements chromophores se déduisant par une transformation hélicoïdale, le squelette polypeptidique servant uniquement à fixer leur géométrie respective.

Le choix du groupement chromophore a été guidé par un certain nombre d'impératifs.

- Il devait être intrinsèquement symétrique.
- Il ne devait pas absorber dans la région où absorbe le groupement peptidique, afin de dissocier son activité optique de l'activité optique due au squelette;

.../...

- Enfin ,la synthèse du polypeptide devait être possible.

Le groupement nitro benzylique remplit ces conditions.

Pour préciser davantage la position de la chaîne latérale par rapport au squelette polypeptidique, il nous a semblé intéressant de faire des mesures de dichroïsme linéaire, sur des films orientés de polyglutamates de nitro benzyle, en utilisant la spectrophotométrie infra-rouge polarisée.

Notre travail se divise donc en trois parties:

- Préparer des polyglutamates de nitro benzyle.
- Etude de l'activité optique de nos polypeptides en solution par dichroïsme circulaire et dispersion du pouvoir optique rotatoire.
- Etude du dichroïsme linéaire des polyglutamates de nitro benzyle au moyen de la spectrophotométrie infra-rouge polarisée.

CHAPITRE I

S Y N T H E S E D E S P O L Y P E P T I D E S

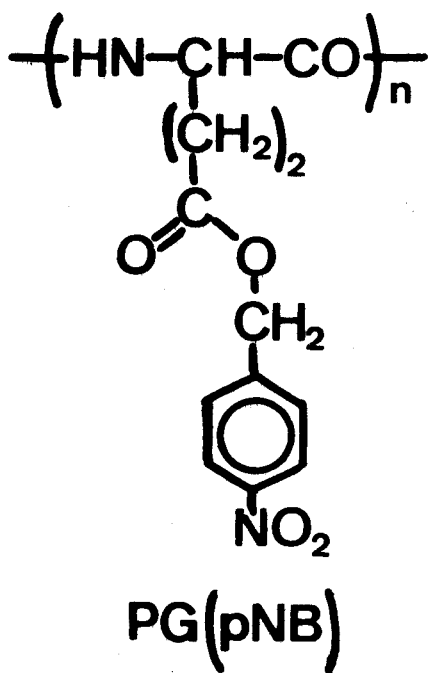
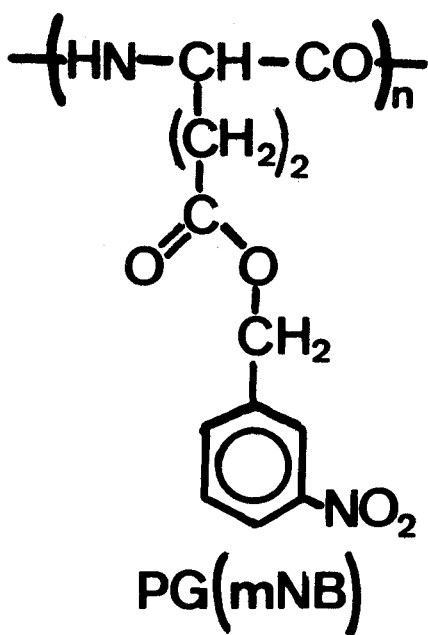
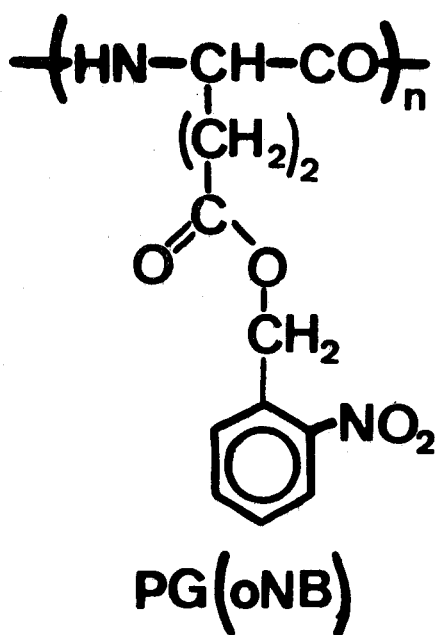
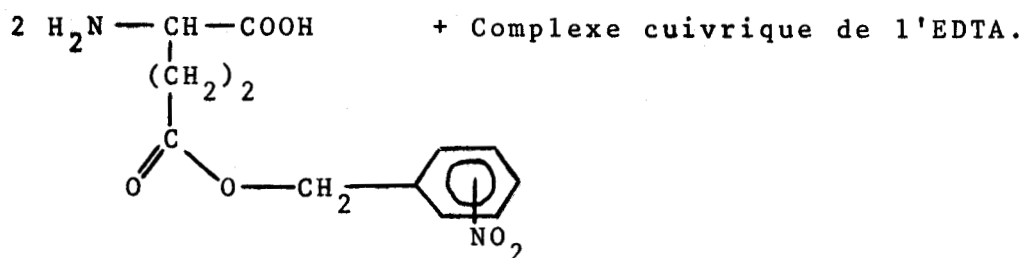
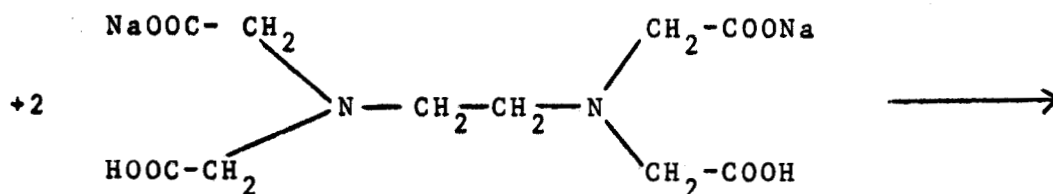
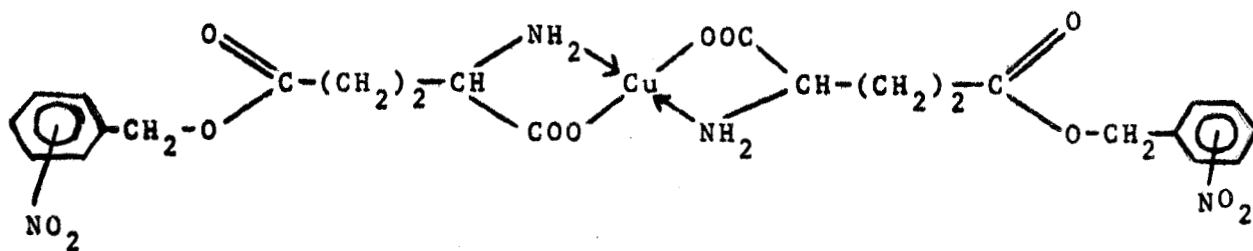


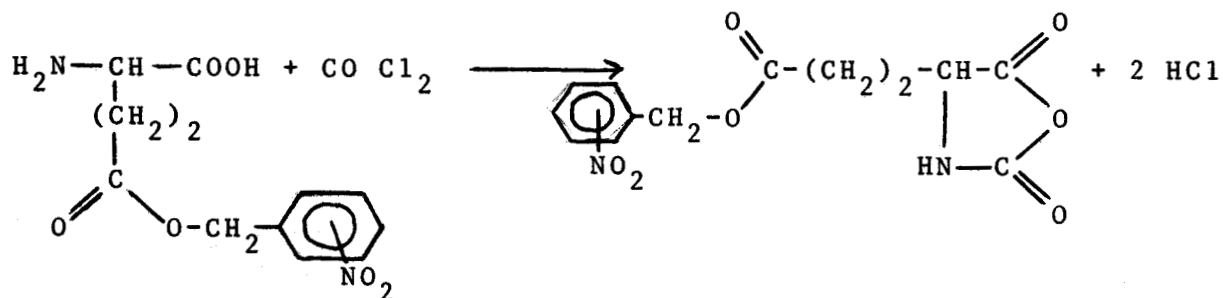
Figure I



Puis :



L' anhydride N carboxy aminé est obtenu par cyclisation du glutamate de nitro benzyle au moyen d'un courant de phosgène.

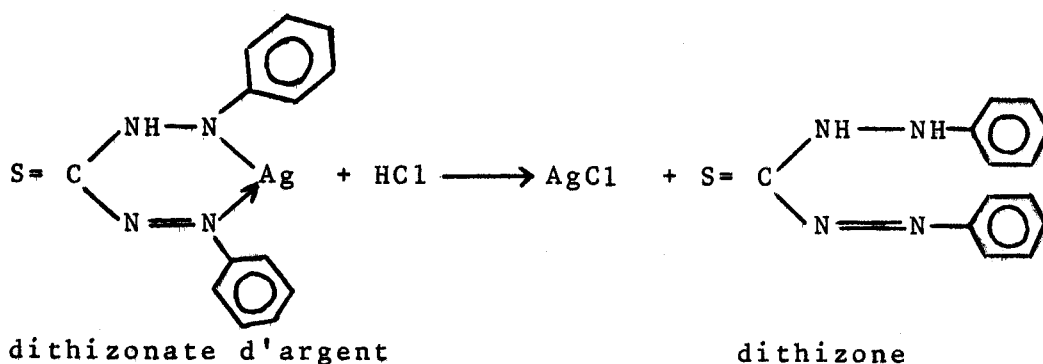


.../...

II POLYMERISATION.

1) Pureté du monomère.

Pour obtenir des polyglutamates de masse moléculaire élevée, il est nécessaire que les anhydrides N carboxy aminés soient très purs, et exempts d'ions chlorure (même à l'état de trace). Nous avons vérifié la pureté des NCA's en procédant à des analyses élémentaires quantitatives d'une part, et d'autre part en dosant les traces d'ions chlorure par spectrophotométrie visible en utilisant le dithizonate d'argent comme réactif⁽²⁾.



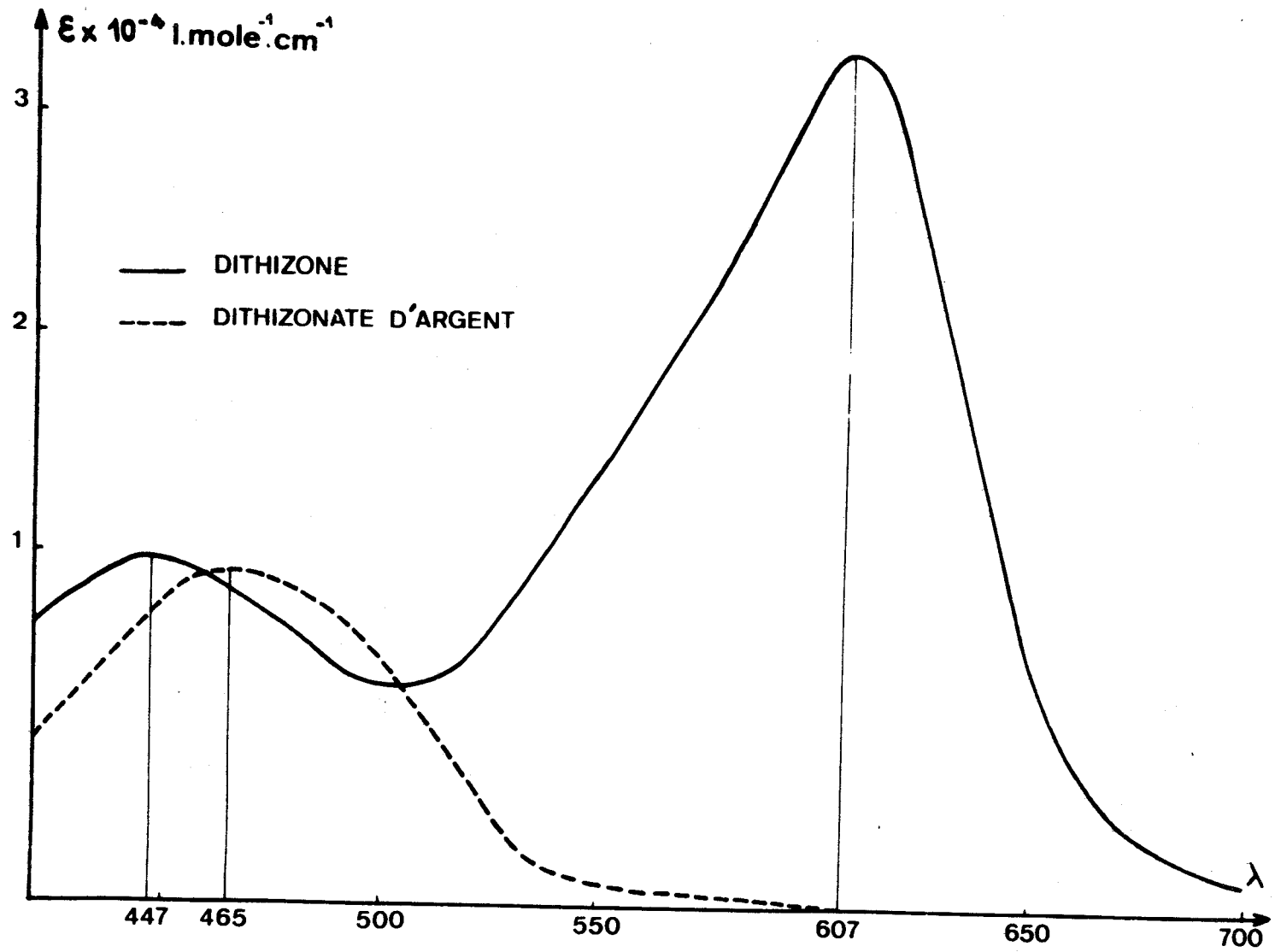
La dithizone présente un maximum d'absorption à 607 nm alors que le dithizonate d'argent absorbe à 465 nm⁽³⁾ (Figure II).

Il est donc aisé de déterminer la teneur en ions chlorure d'un NCA en mesurant la densité optique à 607 nm d'une solution de NCA contenant du dithizonate d'argent en excès.

2) Principe de la polymérisation.

La polymérisation des anhydrides N carboxy aminés s'effectue dans un solvant inerte, en présence d'un initiateur qui peut être une amine primaire, secondaire, une base aprotique comme le méthanolate de sodium ou une amine tertiaire,

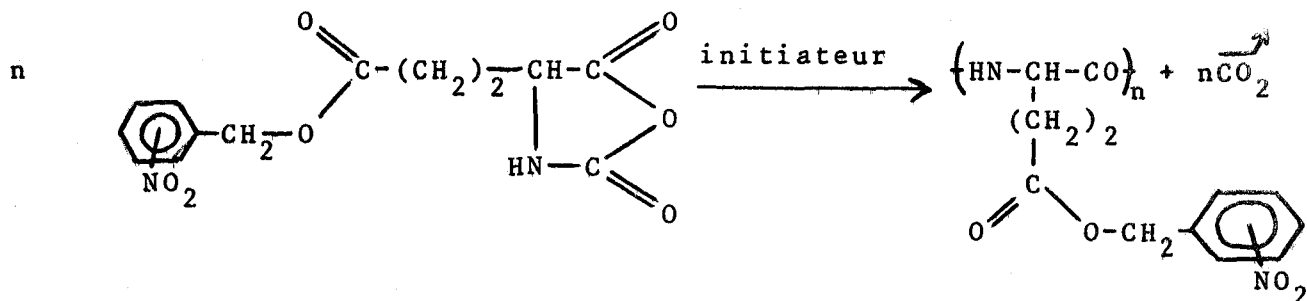
.../...



SPECTRES ULTRA-VIOLET

Figure II.





Nous avons pris comme solvant le dioxanne et comme initiateur la triéthylamine.

Seul le polyglutamate d'ortho nitro benzyle est soluble dans le milieu réactionnel. Les polyglutamates de méta nitro benzyle et de para nitro benzyle précipitent lors de leur formation.

Le degré d'avancement de la polymérisation des NCA's est suivi par spectrophotométrie infra-rouge. Au cours de la formation des polyglutamates, on peut en effet suivre la disparition des bandes situées à 1840 et 1770 cm^{-1} , caractéristiques de la fonction anhydride, et en plus, dans le cas de la polymérisation du NCA de glutamate d'ortho nitro benzyle, on peut voir apparaître les bandes amide I à 1650 cm^{-1} et amide II à 1550 cm^{-1} (Figure III).

3) Détermination de la masse moléculaire.

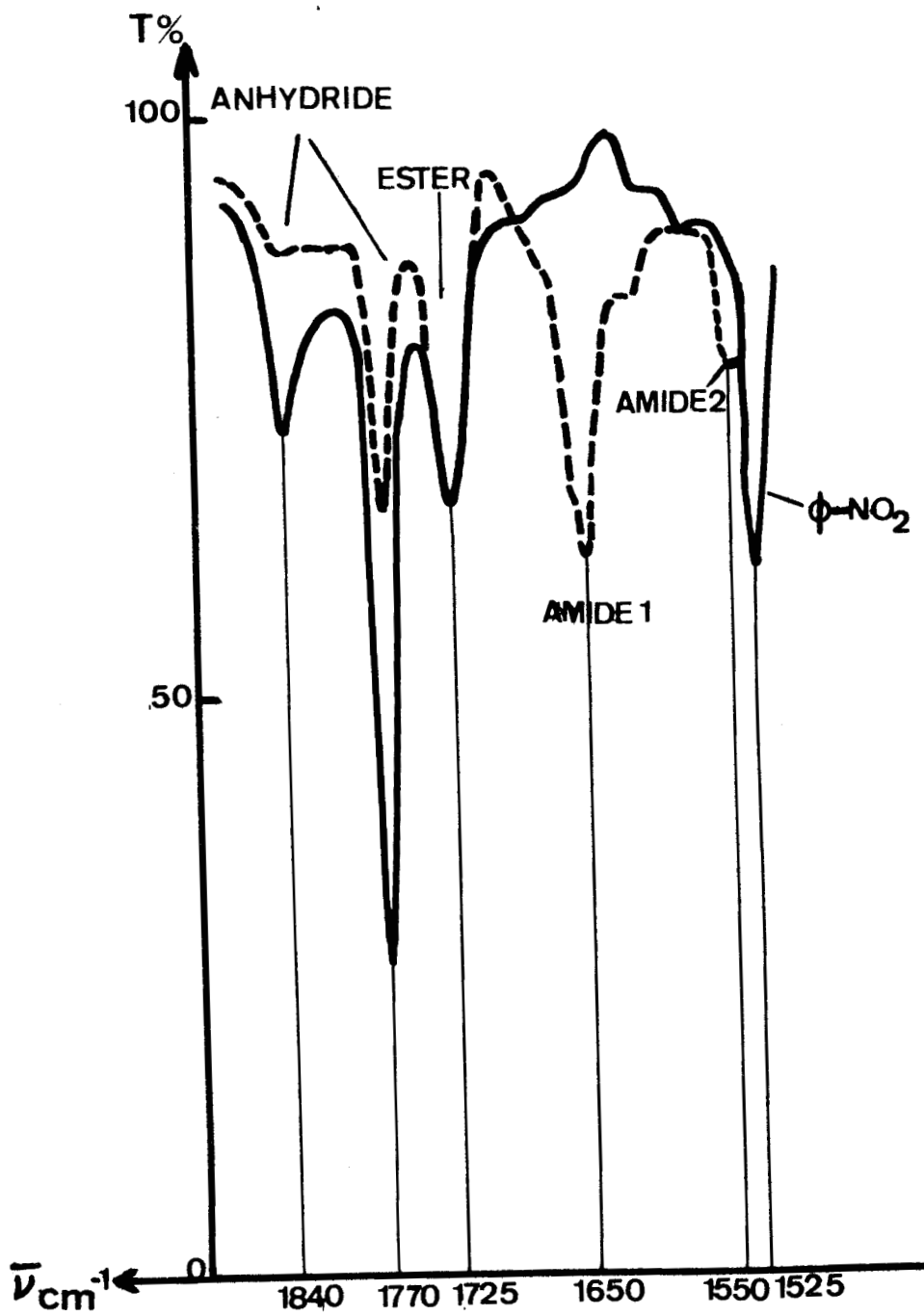
La masse moléculaire des échantillons préparés a été déterminée d'une manière approximative en mesurant la viscosité intrinsèque (η) d'une solution dans l'acide dichloracétique (ADC) des trois polyglutamates.

La viscosité intrinsèque d'une solution diluée de macromolécules est la limite lorsque la concentration tend

vers zéro du rapport $\frac{\eta_{sp}}{c}$

$$(\eta) = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$$

.../...



— $t = 0\text{ h}$
 - - - $t = 62\text{ h}$

POLYMERISATION DU NCA(oNB)

Figure III



$\eta_{spé}$, la viscosité spécifique de la solution, est définie par la relation :

$$\eta_{spé} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0}$$

η : viscosité de la solution.

η_0 : viscosité du solvant.

Dans un viscosimètre du type Ubbelohde, la viscosité d'une solution de macromolécules est proportionnelle au temps d'écoulement d'un volume déterminé de cette solution; on a donc :

$$\eta_{spé} = \frac{t - t_0}{t_0}$$

t : temps d'écoulement de la solution.

t_0 : temps d'écoulement du solvant.

Dans le cas de macromolécules synthétiques, la viscosité intrinsèque est reliée à la masse moléculaire moyenne par la relation semi-empirique de MARK-HOUWINK :

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

dans laquelle K et α sont deux paramètres qui dépendent du solvant, de la température et du polymère considéré.

La courbe d'étalonnage $\log [\eta] = \alpha \log M + \log K$ n'est pas connue pour les polyglutamates de nitro benzyle; aussi, nous avons fait une approximation en utilisant la courbe d'étalonnage correspondant au polyglutamate de benzyle en solution dans l'acide dichloracétique ⁽⁴⁾.

Nous nous sommes servis du viscosimètre automatique VISCOMAT FICA.

diamètre du tube capillaire : 0,6mm
température : 25°C.

RESULTATS :

TABLEAU I

(:	PG(oNB)	:	PG(mNB)	:	PG(pNB))
(---	---	---	---	---	---)
((η) ml g ⁻¹	103,5	:	51,7	:	28,4)
(---	---	---	---	---	---)
(\bar{M}_w	180000	:	77000	:	30000)
(---	---	---	---	---	---)
(\bar{DP}_w	680	:	292	:	114)
(---	---	---	---	---	---)



PARTIE EXPERIMENTALE

1) GLUTAMATE DE CUIVRE (5)

On dissout à ébullition sous reflux 14,7g (0,1 mole) d'acide glutamique dans 1 litre d'eau.

Lorsque la dissolution est totale, on ajoute en une seule fois 20g (0,1 mole) d'acétate de cuivre monohydraté en agitant.

On fait bouillir de nouveau à reflux, un précipité apparaît au bout de quelques minutes. On fait bouillir pendant 15mn encore, en continuant d'agiter.

Quand la solution est revenue à température ambiante, on filtre, ce qui donne un précipité bleu turquoise qu'on sèche sous vide, pendant 24 heures à 45°C. On obtient 20,15g de glutamate de cuivre; soit un rendement de 82,5% si on suppose que le glutamate de cuivre cristallise avec quatre molécules d'eau.

2) GLUTAMATE DE CUIVRE ET DE SODIUM (5)

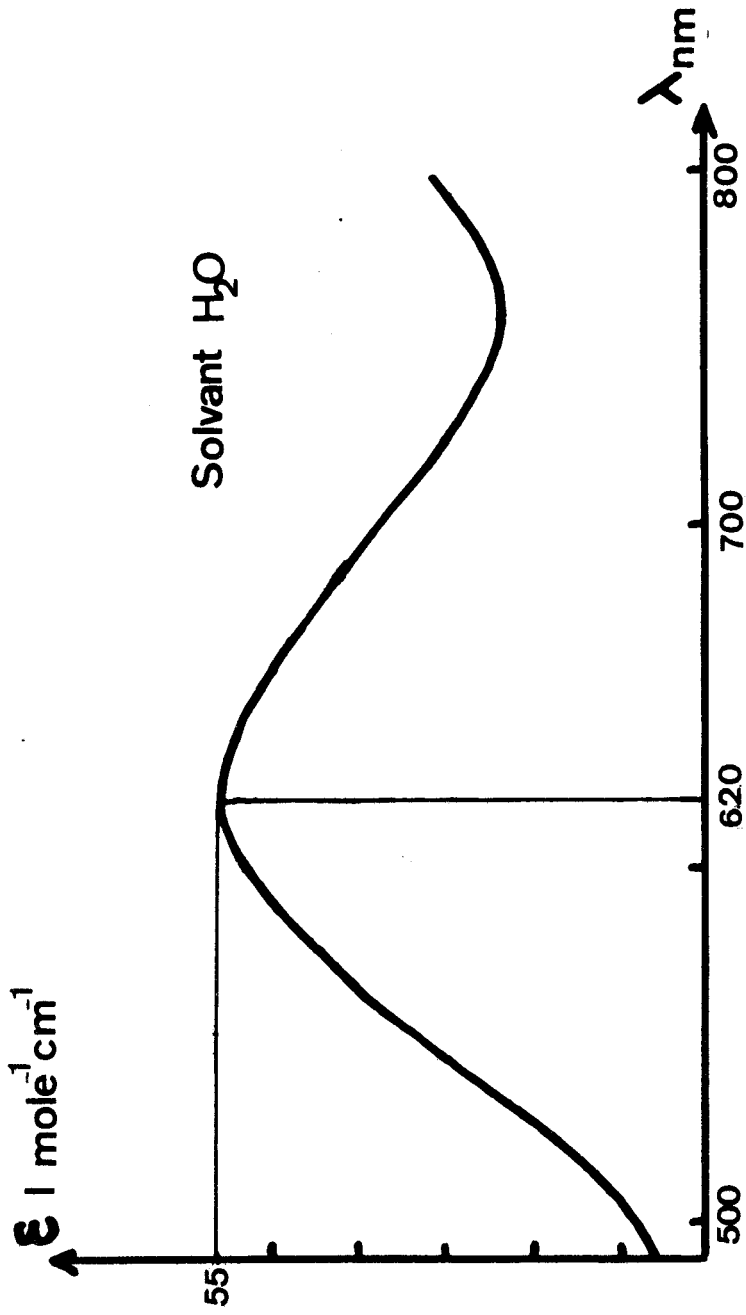
Dans un erlenmeyer de 2 litres muni d'un barreau aimanté et d'un agitateur magnétique, on dissout 23,5g (0,16 mole) d'acide glutamique dans 1 litre d'une solution 0,32 molaire de soude. On ajoute petit à petit 48,80g (0,1mole) de glutamate de cuivre. On agite pendant 2 heures à température ambiante, puis on filtre le glutamate de cuivre qui n'a pas réagi.

On concentre ensuite le filtrat sous vide jusqu'à diminution de volume de moitié, puis on précipite le glutamate de cuivre et de sodium en ajoutant goutte à goutte de l'alcool éthylique. On laisse 12 heures à 5°C pour terminer la précipitation, on filtre et on sèche sous vide à 40°C. Le produit obtenu est broyé finement, et de nouveau séché sous vide à 100°C.

On obtient 57,5g de glutamate de cuivre et de sodium, poudre bleue non hygroscopique.
Rendement 90%.

Le GCN est caractérisé par son spectre dans le visible (Figure IV).

.../...



GLUTAMATE DE CUIVRE ET DE SODIUM

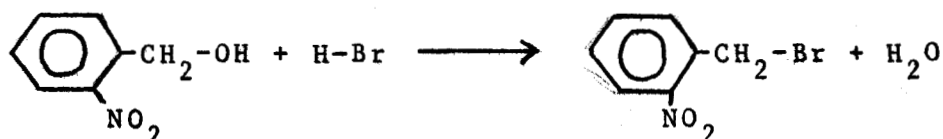
Figure IV



$$\epsilon_{620 \text{ nm}} = 55 \text{ cm}^{-1} \text{ mole}^{-1}$$

3) BROMURES DE NITRO BENZYLE (6)

a) Bromure d'ortho nitro benzyle.



Lorsqu'on chauffe lentement 15,30g (0,1mole) d'alcool 2 nitro benzylique avec 33,88ml d'acide bromhydrique azéotropique ($d=1,49$), l'alcool se dissout à $T = 50^\circ\text{C}$.

A 75°C la solution se trouble, le bromure se rassemble au fond du ballon. On chauffe encore pendant 1h30 à 75°C , puis on laisse le mélange revenir à température ordinaire.

Le bromure cristallise alors, on le filtre, le lave à l'acide chlorhydrique concentré pour éliminer l'alcool qui n'a pas réagi.

On obtient 17,65g de bromure de 2 nitro benzyle. Soit un rendement de 81,5%.

Point de fusion $F = 45^\circ\text{C}$.

b) Bromure de méta nitro benzyle.

La méthode de préparation est identique à celle indiquée pour le bromure d'ortho nitro benzyle. Mais dans le cas présent, la température de séparation entre la phase aqueuse et le bromure, est de 83°C .

On obtient un rendement de 80%

Point de fusion $F = 58^\circ\text{C}$.

c) Bromure de para nitro benzyle.

Nous avons utilisé le produit commercial FLUKA.

Tous ces produits sont très lacrymogènes, et brunissent à la lumière.

.../...

4) GLUTAMATES DE CUIVRE ET DE NITRO BENZYLEa) Processus expérimental.

On dissout 40g (0,1mole) de GCN dans 100ml d'eau, et 43,20g (0,2mole) de bromure de nitro benzyle dans 100ml de DMF.

La solution aqueuse et la solution organique sont ensuite mélangées dans un erlenmeyer de 250ml. Le glutamate de cuivre et de nitro benzyle précipite; on agite énergiquement le mélange pendant 48 heures à une température de 35°C.

On ajoute de l'acétone distillée, on filtre, on lave à l'acétone pour éliminer le bromure qui n'a pas réagi. On lave jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. On sèche sous vide à 40°C.

b) Résultats.TABLEAU II

	GC(oNB)	GC(mNB)	GC(pNB)
Masse obtenue	37,27 g	35,35 g	44 g
Rendement	50%	56,5%	70,2%

5) GLUTAMATES DE NITRO BENZYLE.a) Processus expérimental.α) Préparation de la solution de sel disodique de l'EDTA.

Dans une fiole jaugée de 2 litres, remplie à moitié d'eau permutée, on dissout 16g (0,4mole) de soude pure,

.../...

puis 58,4g (0,2mole) d'EDTA. On complète à 2 litres la solution par de l'eau. On vérifie le pH au moyen d'un papier indicateur de pH (pH= 4,5).

β) Obtention des glutamates de nitro benzyle.

On fait bouillir à reflux 6,255g (0,01mole) de glutamate de cuivre et de nitro benzyle en suspension dans 250ml de sel disodique d'EDTA à pH = 4,5.

Lorsque le glutamate de cuivre et de nitro benzyle est dissous, on filtre à chaud. Le filtrat est ensuite refroidi et gardé à 4°C pendant 12 heures pour accélérer la précipitation.

On filtre, on lave à l'eau et on sèche sous vide pendant 12 heures à 30°C.

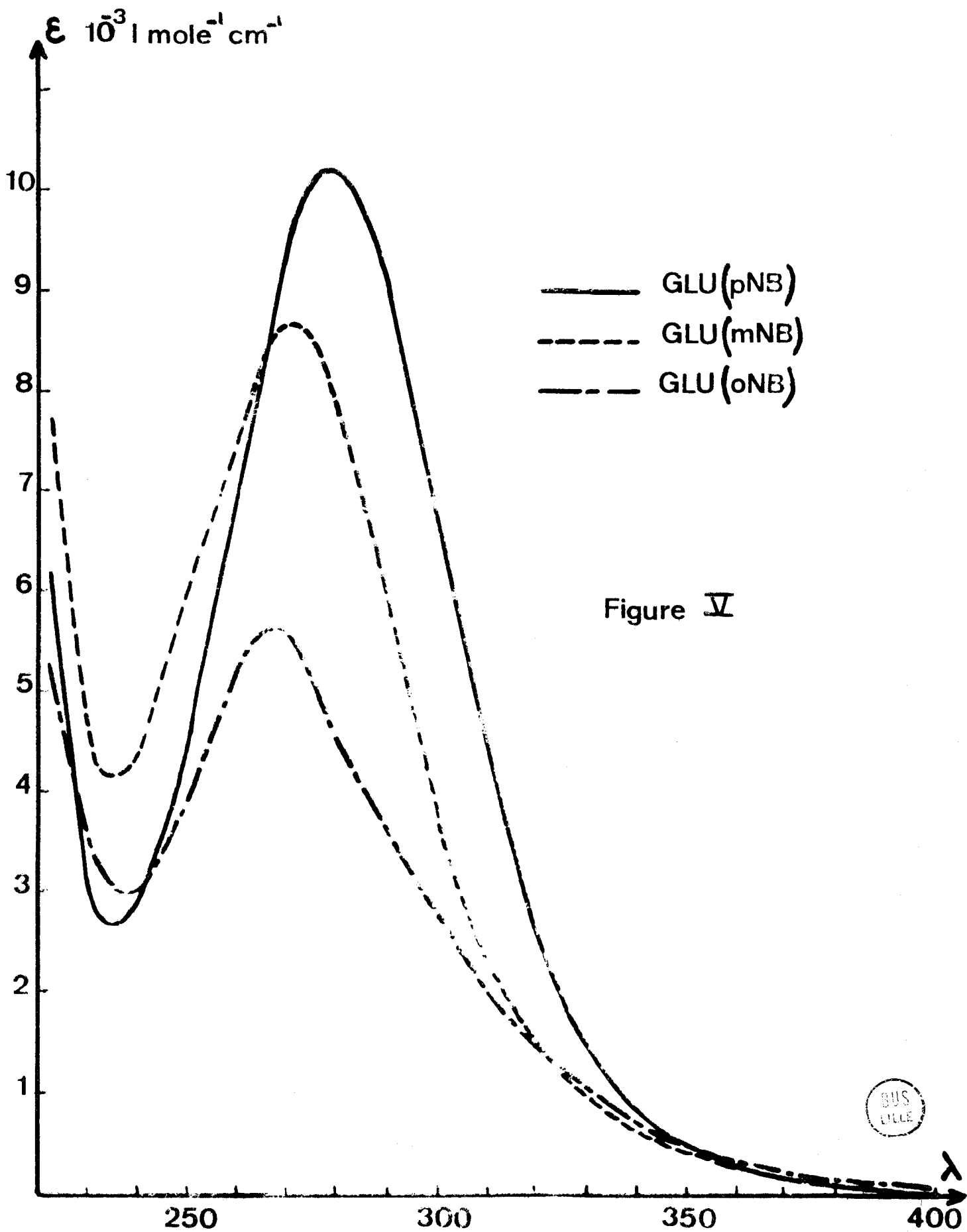
b) Résultats.

TABLEAU III.

	(Glu(oNB))	(Glu(mNB))	(Glu(pNB))
Masse obtenue	17,07g	16,75g	18,85g
Rendement	60,50%	59,43%	66,80%
Analyse élémentaire			
C 51,068	51,00	51,11	51,10
% calculé H 4,964	5,07	5,10	5,05
N 9,929	10,21	9,88	10,21
O 34,042	33,64	34,04	33,89
Spectre U.V. dans Na OH $\frac{N}{10}$	$\lambda_{\max} = 2675$	$\lambda_{\max} = 270$	$\lambda_{\max} = 278$
Figure V	$\epsilon_{\max} = 5630$	$\epsilon_{\max} = 8673$	$\epsilon_{\max} = 10233$
Spectre I.R.	C = O vers 1725 cm ⁻¹	C = O vers 1725 cm ⁻¹	C = O vers 1725 cm ⁻¹
Point de Fusion.	163,5°C	167°C	176°C

SPECTRE UV DES GLUTAMATES DE NITRO BENZYLE DANS

NaOH $\frac{N}{10}$



BUS
ETIENNE

Il peut advenir que le glutamate de para nitro benzyle obtenu soit légèrement vert. On le recristallise alors dans le sel disodique de l'EDTA.

6) PREPARATION DES NCA'S DE GLUTAMATE DE NITRO BENZYLE.

a) Processus expérimental.

28,2g (0,1mole) de glutamate de nitro benzyle sont mis en suspension dans 500ml de dioxanne parfaitement anhydre, fraîchement distillé.

On purge le milieu réactionnel d'oxygène au moyen d'un courant d'azote pendant 15 mn. On porte le tout à 40°C au moyen d'un bain marie.

On remplace alors le courant d'azote par un courant de phosgène, et ce jusqu'au moment où on obtient une solution limpide de NCA dans le dioxanne.

Lorsque la réaction est terminée, on chasse le phosgène qui n'a pas réagi par un courant d'azote sec. On élimine alors le dioxanne et le phosgène résiduel en distillant sous vide de telle manière que la température ne dépasse pas 60°C dans le ballon réactionnel.

Le NCA prend brusquement en masse, on le dissout alors avec le minimum d'acétate d'éthyle deux fois distillé, conservé sur tamis moléculaire. On le précipite par de l'heptane.

Il peut arriver que le NCA reste sous forme d'une huile visqueuse à l'issue de la distillation sous vide. Il n'existe alors pas de méthode universelle pour le faire recristalliser. Généralement le malaxage de cette huile avec de l'heptane sec a pour effet de la faire durcir un peu. Il suffit donc dans ce cas de maintenir le NCA sous vide poussé, pour le voir précipiter.

Il est souvent nécessaire de recristalliser le NCA deux ou trois fois, en le dissolvant dans l'acétate d'éthyle et en le précipitant par l'heptane, pour obtenir un produit capable de polymériser en un polypeptide de haute masse moléculaire.

Le NCA est filtré sous atmosphère d'azote et enfin séché sous vide à température ambiante.

Le produit est conservé à l'abri de l'humidité à 4°C.

TABLEAU IV

	(NCA(oNB))	(NCA(mNB))	(NCA(pNB))
(Masse obtenue)	: 26,25g	: 9,92g	: 29,95g
(Rendement)	: 85,2%	: 32,1%	: 97,2%
(Analyse élémentaire)	:	:	:
(C 50,649)	: 50,56	: 50,86	: 50,63
(H 3,896)	: 4,05	: 4,11	: 3,94
(% calculé N 9,091)	: 9,19	: 9,22	: 9,12
(O 36,363)	: 36,20	: 36,35	: 36,25
(Spectres I.R.)	: Bandes anhydride à 1840 cm ⁻¹ et		
	: 1770 cm ⁻¹ .		
	: C=O ester à 1725 cm ⁻¹ .		

7) DETERMINATION DU CHLORURE DANS LES

NCA'S.

a) Préparation du dithizonate d'argent.

La dithizone est purifiée par lavage au chloroforme rectifié. Pour cela, on agite pendant 15 mn 1g de dithizone dans un litre de chloroforme, puis on filtre rapidement.

On ajoute alors au filtrat 100cm³ d'une solution N/10 de nitrate d'argent acidifiée à pH = 3 par l'acide nitrique. On agite encore pendant 15 mn, on sépare et lave abondamment la couche organique à l'eau acidifiée par l'acide nitrique (pH = 3).

Le chloroforme est ensuite évaporé à température ordinaire sous pression réduite. Le dithizonate d'argent cristallise au fond du ballon. Le dithizonate d'argent ainsi préparé présente un maximum d'absorption à 465 nm.

.../...

$$\epsilon_{465} = 15000 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

b) Dosage des ions contenus dans les NCA's.

Préparation des réactifs.

Acétate d'éthyle : on dissout 2 ml d'acide phosphorique 85% dans 150ml d'acétate d'éthyle.

Dithizonate d'argent : on dissout 10 mg de dithizonate d'argent dans 100ml de chloroforme.

Méthode

Dans une fiole jaugée de 10ml, on pèse 10mg de NCA que l'on dissout dans 5 ml du réactif acétate d'éthyle. On ajoute ensuite 2 ml de la solution de dithizonate d'argent. On ajuste au trait en ajoutant de l'acétate d'éthyle.

On lit enfin la densité optique à 607 nm.

La calibration se fait avec une solution 0,0005N de chlorure de sodium.

8) POLYMERISATION.

a) Processus expérimental (7) et (8)

3,08g (0,1mole) d'anhydride N carboxy aminé sont dissous dans 308g (300 cm³) de dioxanne anhydre, fraîchement distillé, ce qui réalise une concentration de 1 pour cent en poids de NCA dans le milieu.

Après dissolution complète du NCA, on ajoute l'initiateur.

Le récipient servant à la polymérisation est alors surmonté d'une colonne desséchante de chlorure de calcium et mis au bain marie à 35°C pendant 3 jours.

Remarque: La verrerie utilisée doit être d'une très grande propreté, et parfaitement anhydre.

Le mode de récupération du polymère varie selon qu'il est soluble ou insoluble dans le milieu réactionnel.

.../...

Le PG (oNB) soluble dans le dioxanne, est précipité en versant goutte à goutte la solution au moyen d'une ampoule à brome dans un bécher de 2 l contenant environ 1,5l de méthanol distillé.

Le PG(oNB) est ensuite filtré, lavé à l'éther éthylique anhydre et séché sous vide à température ambiante.

Quant aux PG(mNB) et PG(pNB) insolubles dans le dioxanne, ils sont filtrés, lavés au méthanol puis à l'éther éthylique, et enfin séchés sous vide à température ambiante.

L'initiateur est préparé de la manière suivante : on dissout 1 cm³ de triéthylamine fraîchement distillée dans du benzène trois fois distillé sur sodium. On complète la solution à 100 cm³ par le benzène. La concentration en initiateur dans la solution est donc : $c = 7,2 \cdot 10^{-2} \text{ mole.l}^{-1}$.

b) Résultats.

Si on appelle A le nombre de moles de NCA introduites et I le nombre de moles d'initiateur mises en jeu dans la polymérisation, on peut alors caractériser le mélange réactionnel de départ par le rapport A/I.

Les conditions opératoires et les principales caractéristiques des polymères sont rassemblées dans le tableau V.

TABLEAU V.

	(PG(oNB))	(PG(mNB))	(PG(pNB))
A/I	50	33	75
Volume d'initiateur ajouté	2,78ml	4,17ml	1,85ml
Masse obtenue	2,44g	2,137g	2,17g
Rendement	92,4%	81%	82,25%
Masse moléculaire	180 000	77 000	30 000
Analyse élémentaire			
C	54,455	54,31	54,21
H	4,545	4,76	4,78
% calculé			
O	30,303	30,08	29,78
N	10,608	10,25	10,10
Spectres IR.	Une étude détaillée des spectres IR est faite au chapitre III.		

CHAPITRE II

ETUDE DE L'ACTIVITE OPTIQUE
DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE

RAPPELS THEORIQUES

I ORIGINE PHENOMENOLOGIQUE.

En 1812, Biot découvrait que des cristaux de quartz font tourner le plan de polarisation d'une lumière linéairement polarisée. Par la suite, cette observation s'est généralisée à d'autres substances comme les terpènes et les sucres, aussi bien à l'état solide, liquide qu'à l'état gazeux. De telles substances ont été appelées substances optiquement actives.

Une première tentative de mise en équation du phénomène d'activité optique a été faite par Fresnel ⁽⁹⁾ et dérive directement des lois de l'électromagnétisme. En effet, une onde électromagnétique se propageant dans le vide est caractérisée par un vecteur champ électrique \vec{E} , et un vecteur excitation magnétique \vec{H} vibrant à angle droit perpendiculairement à la direction de propagation de l'onde.

Lorsque l'onde électromagnétique est linéairement polarisée, le vecteur champ électrique peut être décomposé en deux vecteurs \vec{E}_G et \vec{E}_D tournant autour de la direction de propagation avec des vitesses égales en valeur absolue, mais de signes contraires (Figure VI).

$$\omega_G = - \omega_D$$

On décompose ainsi une onde linéairement polarisée en deux ondes polarisées circulairement.

Si l'onde traverse un milieu optiquement actif, la vitesse de rotation de l'onde circulairement polarisée droite est différente de la vitesse de rotation de l'onde circulairement polarisée gauche. Le vecteur champ électrique résultant, est toujours linéairement polarisé, mais a tourné d'un angle φ (Figure VII).

La vitesse de propagation d'une onde électromagnétique dans un milieu donné étant liée à l'indice de réfraction de ce milieu par la relation :

.../...

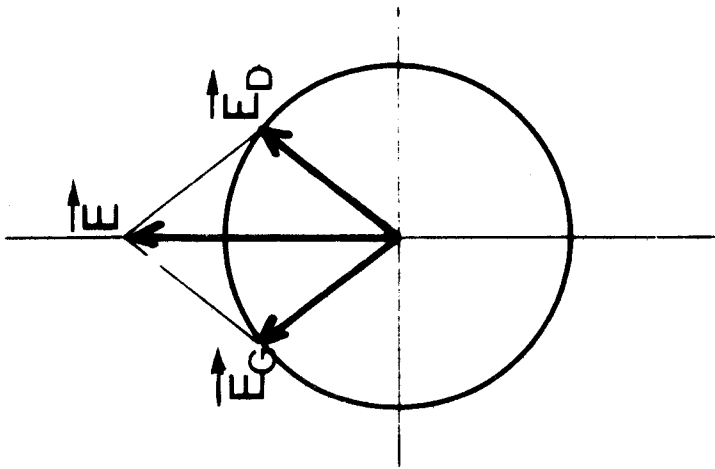


Figure VI

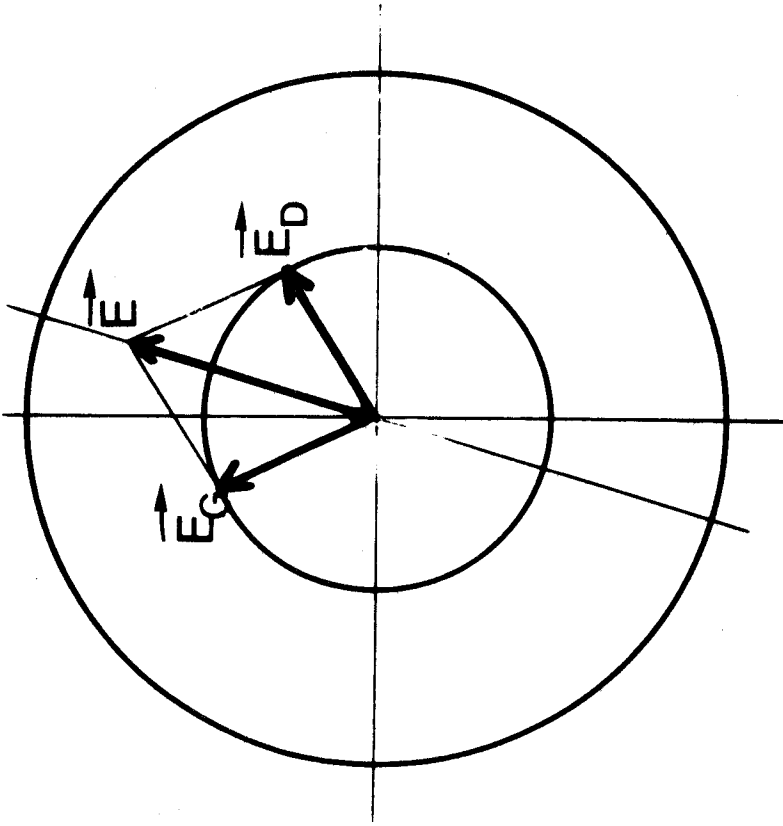


Figure VII



$$v = \frac{c}{n}$$

dans laquelle:

v : vitesse de propagation de l'onde dans le milieu.

c : célérité de l'onde dans le vide.

n : indice du milieu.

On peut dire qu'il y a activité optique lorsque les indices sont différents ($n_G \neq n_D$) pour la lumière circulairement polarisée droite, et la lumière circulairement polarisée gauche; il y a donc biréfringence circulaire.

Fresnel relie la rotation φ à la différence d'indice ($n_G - n_D$) par la relation :

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda} (n_G - n_D) l \quad (1)$$

λ : longueur d'onde dans le vide.

l : épaisseur du milieu optiquement actif (l et λ sont exprimés dans les mêmes unités).

φ : rotation en radians.

II GRANDEURS MACROSCOPIQUES LIEES A L'ACTIVITE OPTIQUE.

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.

a) Rotation spécifique.

La rotation spécifique est définie par la relation⁽¹⁰⁾

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

φ : angle de rotation mesuré, exprimé en degrés.

l : trajet optique exprimé en dm.

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

.../...

b) Rotation molaire ou pouvoir rotatoire moléculaire
(m).

Dans le cas des macromolécules, on s'intéresse plutôt à la rotation par unité monomère, qu'à la rotation spécifique. Pour cela, on substitue dans la relation définissant la rotation spécifique, la concentration molaire \mathcal{C} (en mole pour 100 cm^3) à la concentration C en g cm^{-3} $[\text{m}] = \frac{\varphi}{l\mathcal{C}}$

Si M_o désigne la masse moléculaire (en grammes) du résidu, on a :

$$\mathcal{C} = \frac{100 C}{M_o}$$

d'où

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

La concentration molaire \mathcal{C} est exprimée en mole pour 100 cm^3 afin d'avoir les valeurs de (m) et de (α) du même ordre de grandeur.

c) Rotation molaire effective (m').

Pour corriger l'influence du champ interne, on introduit le facteur de Lorentz $\frac{3}{n^2+2}$, terme correctif semi-empirique :

$$(\text{m}') = \frac{3}{n^2 + 2} (\text{m})$$

par conséquent :

$$(\text{m}') = \frac{3}{n^2 + 2} \frac{M_o}{100} \frac{\varphi}{1 C}$$

III DISPERSION DU POUVOIR OPTIQUE ROTATOIRE.

Pendant très longtemps, on s'est limité à mesurer la rotation spécifique des substances à une longueur d'onde déterminée, celle de la raie jaune de la lampe au sodium : $\lambda = 589\text{nm}$. Ce n'est que vers 1930, grâce à des progrès technologiques, qu'on s'est intéressé à l'étude de l'activité optique en fonction de la longueur d'onde, c'est à dire à la dispersion du pouvoir optique rotatoire.

Deux types de courbes de dispersion optique rotatoire peuvent être observés :

- Lorsqu'il n'y a pas de groupement chromophore optiquement actif dans la région spectrale envisagée, on obtient une courbe de dispersion optique rotatoire normale ou monotone.

Figure VIII.

- Si la molécule possède un groupement chromophore optiquement actif dans le domaine spectral envisagé, il y a alors brusque variation des indices n_G et n_D , et la courbe présente deux extrêma. Figure IX. C'est ce qu'on appelle l'effet Cotton.

Loin de la région spectrale où il existe un effet Cotton, Drude rend compte de l'allure des courbes de dispersion du pouvoir optique rotatoire par l'équation :

$$(\alpha) = \sum_i \frac{A_i}{\lambda^2 - \lambda_i^2} \quad (11)$$

dans laquelle A_i est une constante, et λ_i la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption le plus proche.

IV LE DICHROISME CIRCULAIRE.

a) Définitions.

Lorsqu'une lumière linéairement polarisée traverse un milieu dans lequel il existe un groupement chromo-

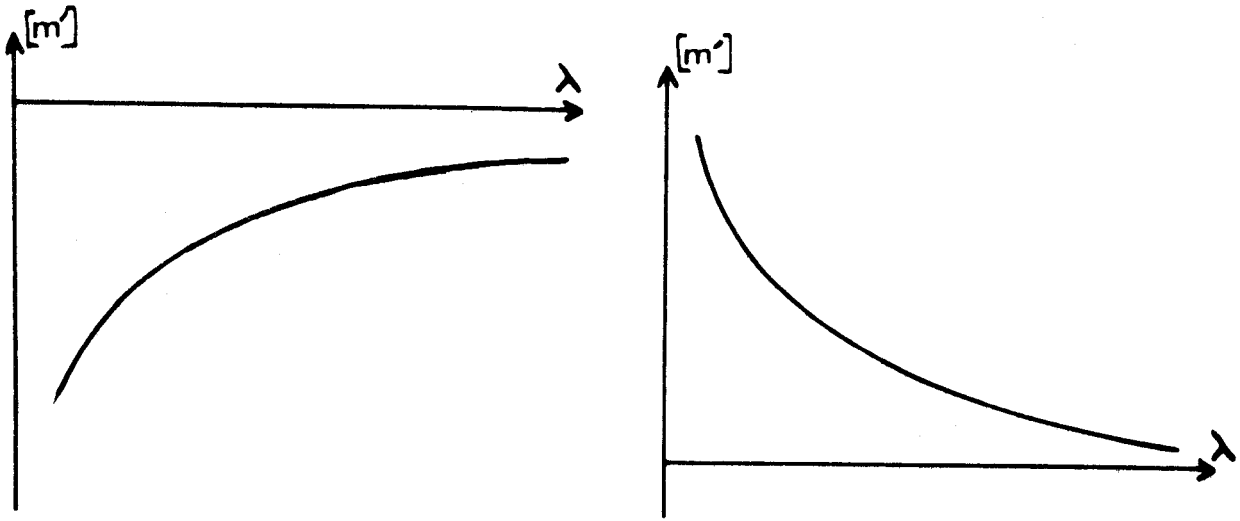


Figure VIII

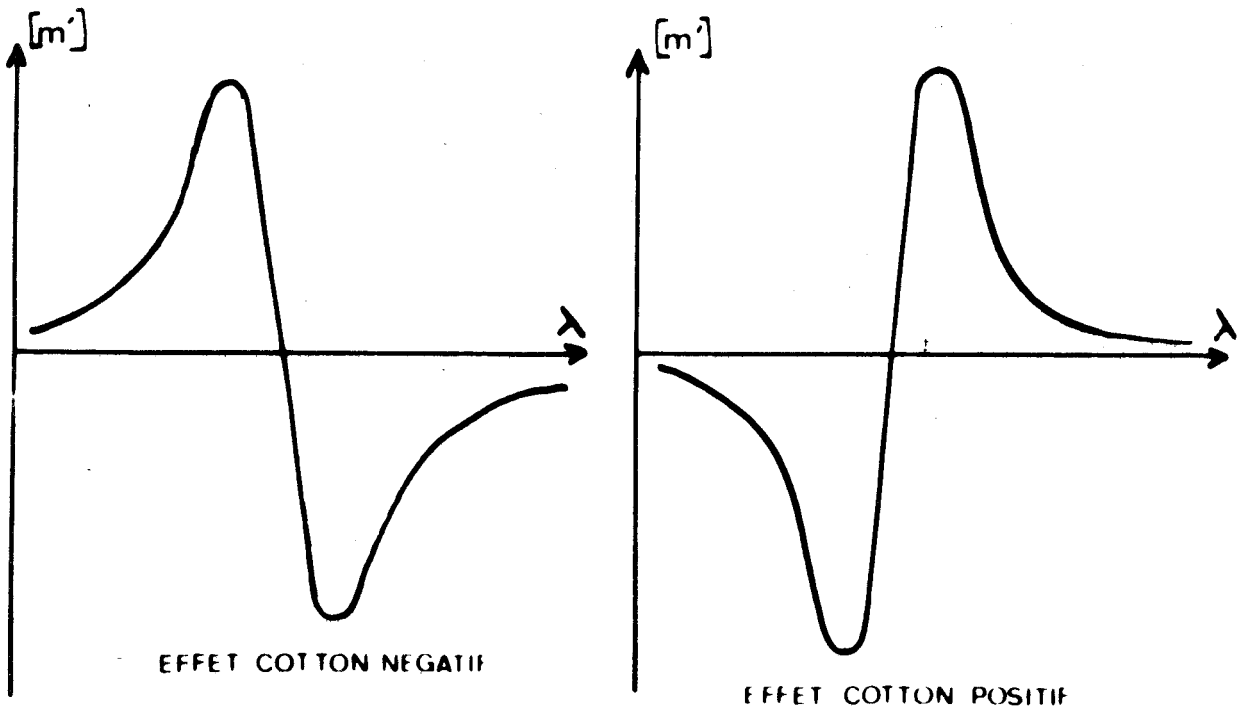


Figure IX

COURBE DE DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE



phore optiquement actif, en plus de la biréfringence circulaire, on assiste à un phénomène de dichroïsme circulaire, c'est à dire que la lumière polarisée circulairement droite est absorbée différemment de la lumière polarisée circulairement gauche ($\epsilon_D \neq \epsilon_G$). L'extrémité du vecteur \vec{E} décrit alors une ellipse. La lumière qui était primitivement polarisée est devenue elliptiquement polarisée. Figure X.

En fait, le dichroïsme circulaire accompagne toujours la biréfringence circulaire, même dans une région transparente. Il est plus correct de parler de rotation du grand axe de l'ellipse, plutôt que de rotation du plan de polarisation de la lumière. Cette distinction ne devient en fait significative que dans la proximité d'une bande d'absorption, là où l'ellipticité est mesurable.

b) Les coefficients d'absorption en spectroscopie.

Avant de définir les grandeurs macroscopiques liées au phénomène de dichroïsme circulaire, nous allons rappeler quels sont les différents coefficients d'absorption utilisés en spectroscopie :

- Le coefficient d'absorption k , défini par la relation $I = I_0 e^{-kl}$.

- L'indice d'absorption K défini par la relation :

$$I = I_0 e^{-\frac{4\pi K}{\lambda} l}$$

- Le coefficient d'absorption molaire ϵ défini par la relation $I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon c l}$

où

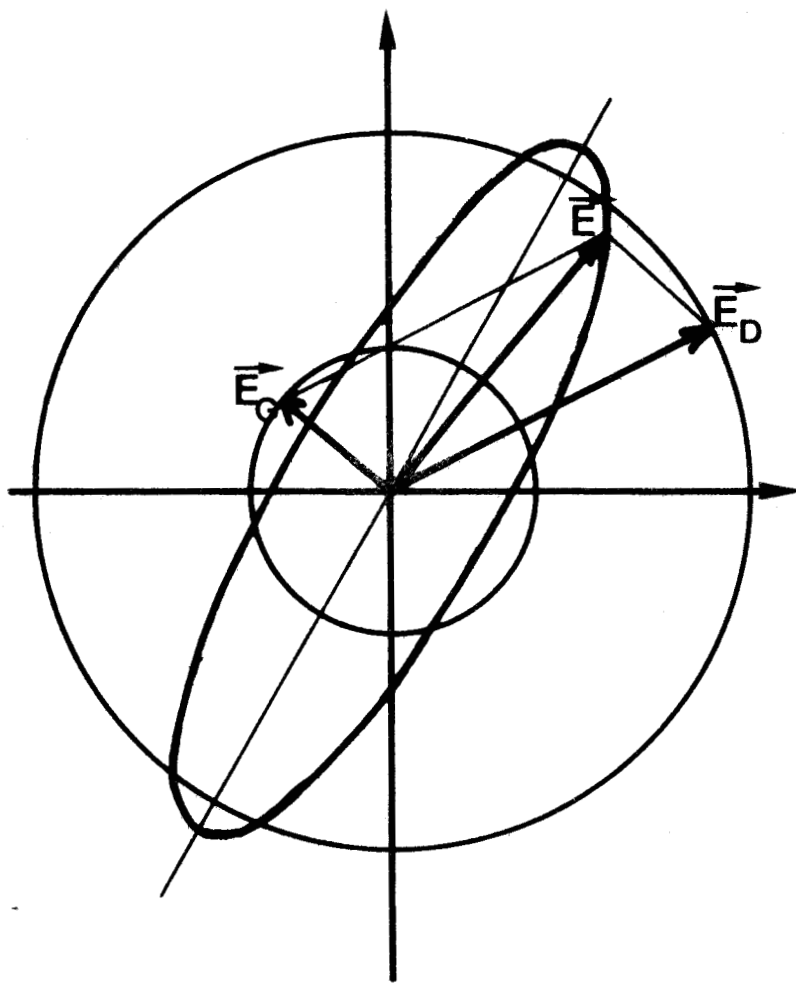
I_0 : intensité du rayon incident.

I : intensité du rayon émergent.

l : épaisseur du milieu, exprimée en cm.

c : concentration en mole par litre du soluté.

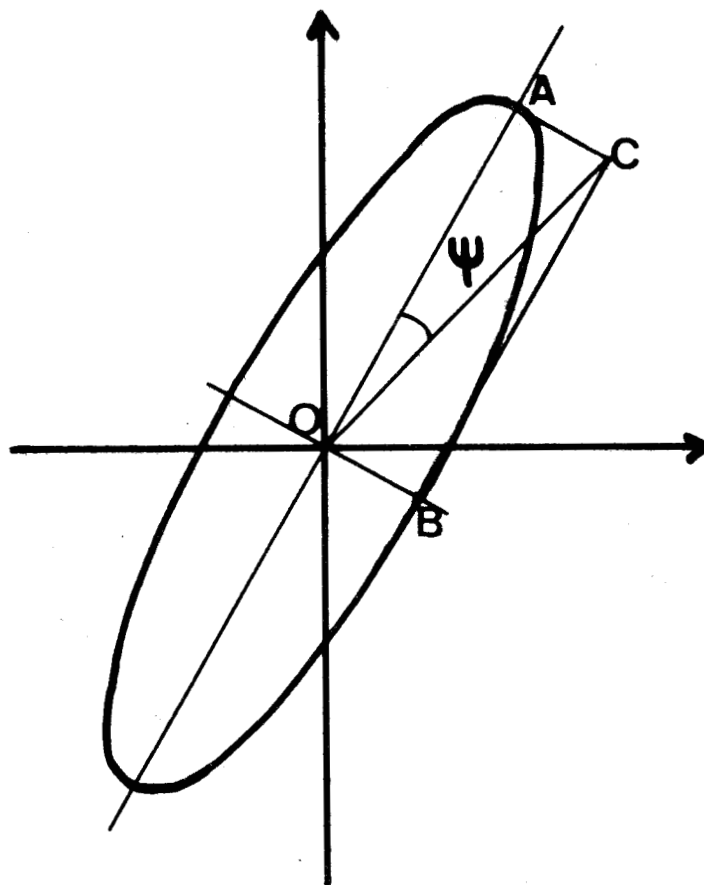
.../...



DICHRÔISME

CIRCULAIRE

Figure X



BUS
LILLE

c) Grandeurs fondamentales caractérisant le dichroïsme.

Dans la Figure XI, l'angle $\psi = (\vec{OC}, \vec{OA})$ est appelé ellipticité; calculons-en la tangente.

$$\operatorname{tg} \psi = \frac{AC}{OA}$$

mais

$$AC = E_G - E_D = E_{OG} e^{-\frac{2\pi K_G l}{\lambda}} - E_{OD} e^{-\frac{2\pi K_D l}{\lambda}}$$

$$OA = E_G + E_D = E_{OG} e^{-\frac{2\pi K_G l}{\lambda}} + E_{OD} e^{-\frac{2\pi K_D l}{\lambda}}$$

or $E_{OG} = E_{OD}$

et

$$\operatorname{tg} \psi = \frac{e^{-\frac{2\pi K_G l}{\lambda}} - e^{-\frac{2\pi K_D l}{\lambda}}}{e^{-\frac{2\pi K_G l}{\lambda}} + e^{-\frac{2\pi K_D l}{\lambda}}} = \operatorname{th} \frac{\pi l}{\lambda} (K_G - K_D)$$

ψ est généralement petit, et on peut assimiler $\operatorname{tg} \psi$ à ψ en exprimant ψ en radians.

Il advient que :

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

expression à rapprocher de la relation (1)

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

Par analogie avec les grandeurs macroscopiques reliées à la biréfringence circulaire, on définit trois grandeurs exprimant l'ellipticité d'une solution, à savoir : (12)

.../...

- L'ellipticité spécifique (ψ)

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

ψ : exprimé en degré

l : épaisseur du milieu en dm.

C : concentration en $g\ cm^{-3}$.

l'indice d'absorption est relié au coefficient d'absorption molaire par la relation :

$$K = \text{Log } 10 \frac{\lambda}{4\pi} \epsilon e = 2,303 \frac{\lambda}{4\pi} \epsilon e$$

donc :

$$\psi = \frac{180}{4\pi} \times 2,303 l e (\epsilon_G - \epsilon_D) \quad (\psi \text{ en degrés}).$$

et

$$(\psi) = 2,303 \times \frac{180}{4\pi} \frac{(\epsilon_G - \epsilon_D) 1000 C}{10 M_o C}$$

$$(\psi) = \frac{18}{4\pi} \frac{2303}{M_o} (\epsilon_G - \epsilon_D) = \frac{3300 (\epsilon_G - \epsilon_D)}{M_o}$$

$\epsilon_G - \epsilon_D = \Delta\epsilon$ est appelé absorption différentielle dichroïque

- L'ellipticité molaire (θ) $(\theta) = M_o (\psi)$

$$(\theta) = 3300 \Delta\epsilon$$

$\Delta\epsilon$ étant exprimé en $l\ mole^{-1}\ cm^{-1}$

- L'ellipticité molaire corrigée du facteur de Lorentz

(θ')

$$(\theta') = \frac{3}{n^2 + 2} (\theta)$$

.../...

V LE THEOREME DE KRONIG ET KRAMERS.

a) Pouvoir rotatoire complexe.

On peut exprimer simultanément la biréfringence et le dichroïsme en introduisant la notion de pouvoir rotatoire complexe ϕ :

$$\phi = \varphi - i\psi$$

c'est à dire :

$$\phi = \frac{\pi l}{\lambda} \left[(n_G - i K_G) - (n_D - i K_D) \right]$$

$$\phi = \frac{\pi l}{\lambda} (\mathcal{N}_G - \mathcal{N}_D)$$

relation dans laquelle \mathcal{N} désigne l'indice de réfraction complexe

$$\mathcal{N} = n - iK$$

b) Le théorème de Kronig et Kramers (13,14)-

Les relations de Kronig et Kramers sont un ensemble très général de transformations intégrales qui trouvent une grande application dans les problèmes physiques.

Si certaines conditions analytiques et d'intégrabilité sont respectées, la partie réelle u , et la partie imaginaire v d'une fonction complexe $f(z) = u + iv$ sont liées entre elles.

Supposons qu'un système subisse une perturbation fonction du temps $A(t)$ représentée par l'intégrale de Fourier:

$$A(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} A_0(\nu) e^{2\pi i \nu t} d\nu$$

ν : fréquence.

Supposons de plus que $A(t)$ engendre une réponse $B(t)$ de la forme :

.../...

$$B(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} X(\nu) A_0(\nu) e^{2\pi i \nu t} dt =$$

$$\int_{-\infty}^{+\infty} [X_1(\nu) - i X_2(\nu)] A_0(\nu) e^{2\pi i \nu t} dt$$

Les coefficients $X_1(\nu)$ et $X_2(\nu)$ sont liés entre eux par les relations suivantes qui portent le nom de relations de Kronig et Kramers :

$$X_1(\nu) - X_\infty = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\nu' X_2(\nu')}{\nu'^2 - \nu^2} d\nu'$$

$$X_2(\nu) = - \frac{2\nu}{\pi} \int_0^\infty \frac{X_1(\nu') - X_\infty}{\nu'^2 - \nu^2} d\nu'$$

Néanmoins un certain nombre de conditions doivent être respectées :

- Le système doit être linéaire
- Le principe de causalité doit être vérifié, c'est à dire que si $A(t) = 0$ pour $t < 0$ alors $B(t) = 0$ pour $t < 0$.
- Quand $\nu \rightarrow \infty$ alors $X_1 \rightarrow X_\infty$ et $X_2 = 0$.
- X_1 est pair, X_2 est impair.

Si on applique le théorème de Kronig et Kramers au problème de l'activité optique, on montre qu'on peut exprimer la rotation φ en fonction de l'ellipticité ψ , et inversement.

$$\varphi(\nu) = \frac{2\nu^2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\psi(\nu')}{\nu'(\nu'^2 - \nu^2)} d\nu'$$

$$\psi(\nu) = - \frac{2\nu^3}{\pi} \int_0^\infty \frac{\varphi(\nu')}{\nu'^2(\nu'^2 - \nu^2)} d\nu'$$

.../...

Des relations identiques peuvent être écrites avec la rotation molaire, et l'ellipticité molaire.

Il est donc théoriquement possible de retrouver le spectre de dispersion du pouvoir optique rotatoire à partir du spectre dichroïque d'une substance, et inversement. Figure XI bis.

VI LA THEORIE DE ROSENFELD.

a) Exposé de la théorie.

La théorie phénoménologique de Fresnel n'explique pas l'origine de la différence entre les indices n_G et n_D d'une part et entre les coefficients d'absorption K_G et K_D d'autre part, d'un milieu optiquement actif.

C'est Rosenfeld⁽¹⁵⁾ qui le premier a élaboré, en 1928, la théorie quantique de l'activité optique d'une substance en solution. Les résultats obtenus ne sont valables que dans une région du spectre où il n'y a pas de groupement chromophore.

Supposons que les molécules soient disposées sur un plan, et que les électrons des molécules se déplacent sur une hélice sous l'action du champ électromagnétique incident; supposons de plus que les axes des hélices soient parallèles à la direction du vecteur excitation magnétique \vec{H} . Il apparaît alors un dipôle électrique \vec{p}_H induit suivant l'axe de l'hélice tel que :

$$\vec{p}_H = - \frac{\beta}{c} \frac{\partial \vec{H}}{\partial t}$$

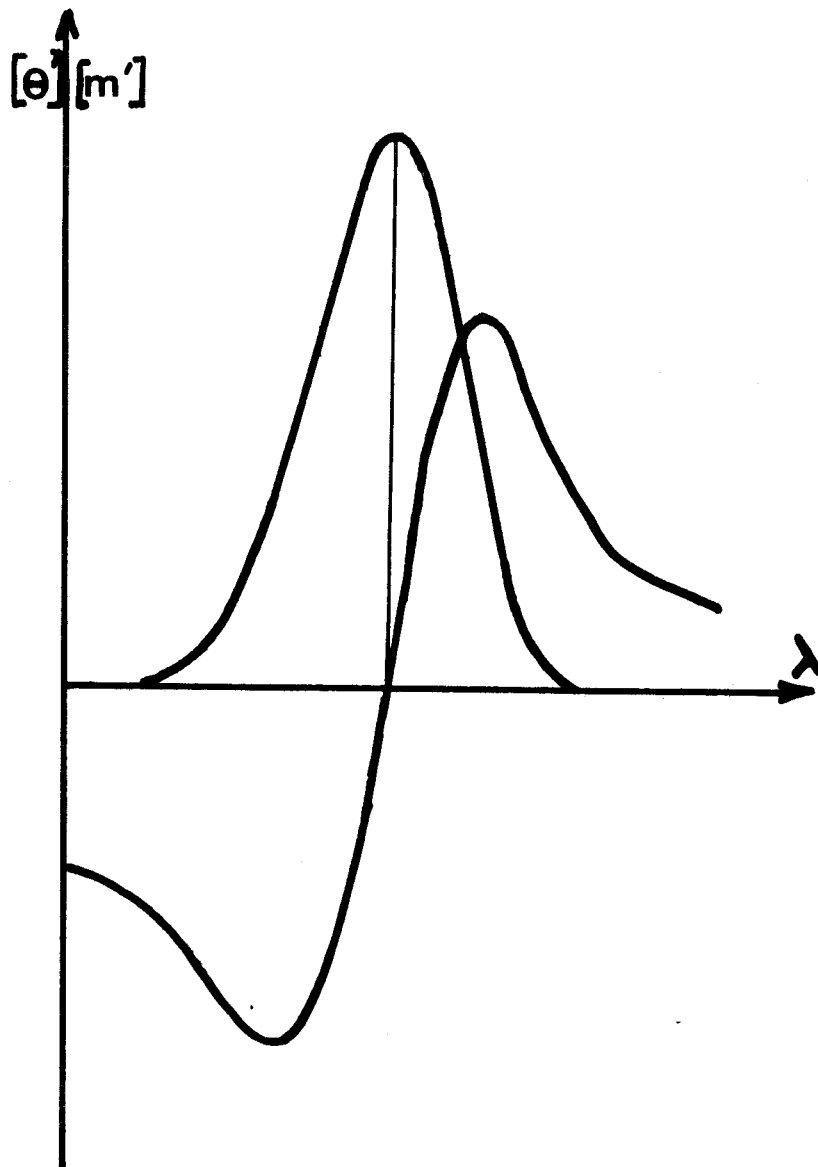
\vec{p}_H s'ajoute au moment dipolaire induit $\vec{p}_E = \alpha \vec{E}$ pour donner le dipôle induit résultant \vec{p} .

$$\vec{p} = \vec{p}_H + \vec{p}_E = \alpha \vec{E} - \frac{\beta}{c} \frac{\partial \vec{H}}{\partial t}$$

α : polarisabilité de la molécule.

Ces deux dipôles oscillants donnent naissance à deux champs électriques \vec{E} et \vec{E}_1 , dont la résultante tourne d'un angle φ par rapport à \vec{E} .

.../...



SPECTRES DICHROIQUE ET DE DISPERSION OPTIQUE
ROTATOIRE CORRESPONDANTS

Figure **XI**bis

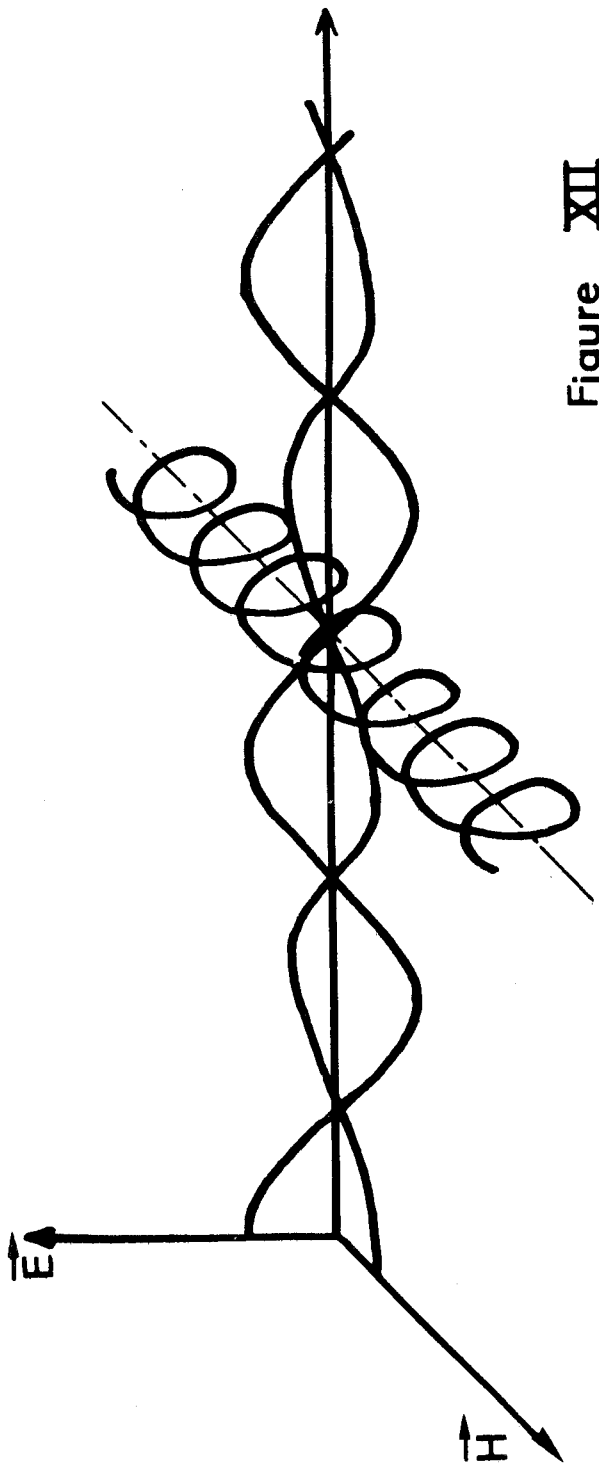


Figure XII

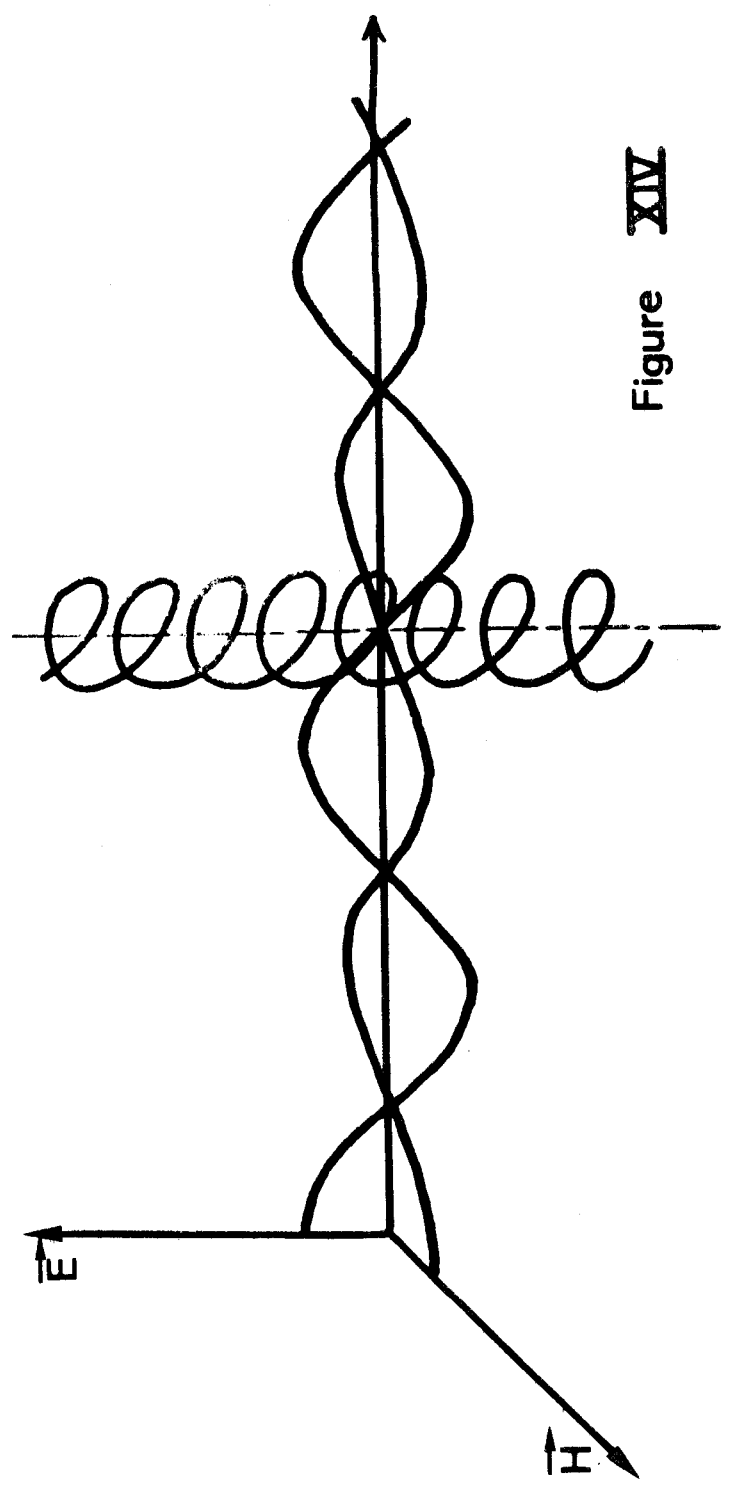


Figure XIV

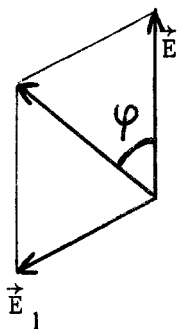


Figure XIII

Si on suppose maintenant que les axes des hélices sont parallèles à la direction du champ électrique incident \vec{E} , Figure XIV, le déplacement des électrons le long de l'hélice dans un champ électrique variable donne naissance à un moment dipolaire magnétique parallèle à \vec{E} , $\vec{\mu}_m$.

$$\vec{\mu}_m = \frac{\beta}{c} \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}$$

Le moment dipolaire induit par unité de volume, encore appelé polarisation, a pour expression :

$$\vec{P} = N_1 \vec{p}$$

N_1 : nombre de molécules par unité de volume.

De même, la magnétisation \vec{M} , ou moment dipolaire magnétique induit par unité de volume, sera définie par

$$\vec{M} = N_1 \vec{\mu}_m$$

Rosenfeld relie les grandeurs microscopiques aux grandeurs macroscopiques en introduisant les équations matérielles :

$$\vec{D} = \vec{E} + 4\pi\vec{P}$$

$$\vec{B} = \vec{H} + 4\pi\vec{M}$$

Si on remplace \vec{P} et \vec{M} par leur valeur on trouve :

$$\vec{D} = (1 + 4\pi N_1 \alpha) \vec{E} - \frac{4\pi N_1 \beta}{c} \frac{\partial \vec{H}}{\partial t}$$

.../...

$$\vec{B} = \vec{H} + 4\pi N_1 \frac{\beta}{C} \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}$$

On pose $1 + 4\pi N_1 \alpha = \epsilon$ et $\frac{4\pi N_1 \beta}{C} = g$

où ϵ est la permittivité de la substance.

$$\vec{D} = \epsilon \vec{E} - g \frac{\partial \vec{H}}{\partial t}$$

$$\vec{B} = \vec{H} + g \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}$$

La résolution des équations de Maxwell conduit alors aux expressions suivantes des indices de réfraction n_G et n_D .

$$n_G = \sqrt{\epsilon - 2\pi\nu g}$$

$$n_D = \sqrt{\epsilon + 2\pi\nu g}$$

d'où

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda} (4\pi\nu g) l$$

$$\boxed{\varphi = \frac{4\pi^2 C}{\lambda^2} g}$$

En fait le champ électrique qui intervient au niveau de la molécule n'est pas le champ \vec{E} de l'onde électromagnétique incidente mais un champ local effectif \vec{E}' , qu'il est difficile de déterminer.

Lorentz propose : $\vec{E}' = \vec{E} + \frac{4\pi}{3} \vec{p}$

La polarisation et la permittivité de la substance s'expriment au moyen de la relation de Clausius Mosotti :

$$\epsilon - 1 = 4\pi N_1 \alpha \frac{(\epsilon + 2)}{3}$$

.../...

or $\epsilon = n^2$

d'où

$$\epsilon - 1 = 4\pi N_1 \alpha \frac{(n^2 + 2)}{3}$$

g s'écrit alors :

$$g = \frac{4\pi N_1 \beta}{c} \frac{n^2 + 2}{3}$$

Rosenfeld calcule les valeurs moyennes de α et β sur toutes les directions que peut prendre la molécule par rapport à l'onde électromagnétique incidente; il trouve que :

$$\alpha = \frac{2}{3h} \sum_j \frac{\nu_j}{\nu_j^2 - \nu^2} \langle \psi_a | \vec{p} | \psi_j \rangle \langle \psi_j | \vec{p} | \psi_a \rangle$$

$$\alpha = \frac{2}{3h} \sum_j \frac{\nu_j}{\nu_j^2 - \nu^2} \left(\langle \psi_a | \vec{p} | \psi_j \rangle \right)^2$$

$$\beta = \frac{c}{3\pi h} \sum_j \frac{\text{Im} \left\{ \langle \psi_a | \vec{p} | \psi_j \rangle \langle \psi_j | \vec{\mu}_m | \psi_a \rangle \right\}}{\nu_j^2 - \nu^2}$$

expressions dans lesquelles ψ_a et ψ_j sont les fonctions d'onde respectivement associées à l'état fondamental, et à l'état excité j .

$\langle \psi_a | \vec{p} | \psi_j \rangle$ est le moment de transition de la $j^{\text{ième}}$ transition électronique. On appelle force dipolaire D_j l'expression :

$$D_j = \left(\langle \psi_a | \vec{p} | \psi_j \rangle \right)^2$$

D_j peut être calculé d'une manière approximative si on considère que la bande d'absorption est une courbe de Gauss, Figure XV, par la relation :

.../...

$$D_j \approx 1,63 \cdot 10^{-38} \frac{\varepsilon_j^{\circ} \Delta_j}{\lambda_j}$$

La quantité $\text{Im} \left\{ \langle \psi_a | \vec{p} | \psi_j \rangle \langle \psi_j | \vec{\mu}_m | \psi_a \rangle \right\}$ est appelée force rotationnelle de la $j^{\text{ième}}$ transition : R_j .

Si on remplace β par sa valeur dans l'expression de φ , on trouve :

$$\varphi = \frac{16 \pi^3 N_1 C}{C^2 x 3 \pi h} \sum_j \frac{R_j v^2}{v_j^2 - v^2}$$

$$\varphi = \frac{16 \pi^2 N_1}{3 h C} \sum_j \frac{R_j v^2}{v_j^2 - v^2}$$

b) Propriétés de la force rotationnelle.

- Alors que la force dipolaire est une quantité toujours positive, la force rotationnelle peut être positive ou négative.

- Kuhn et Condon ont démontré que la somme des forces rotationnelles correspondant à toutes les transitions possibles d'une molécule est identiquement nulle :

$$\sum_j R_j = 0$$

- La force rotationnelle est une grandeur importante : elle permet de mesurer l'interaction d'un chromophore avec son environnement asymétrique et elle chiffre la contribution d'une transition électronique à la dispersion optique rotatoire et au dichroïsme circulaire.

- La force rotationnelle est proportionnelle à l'intégrale

$$\int_0^{\infty} \frac{\theta(v)}{v} dv ;$$

plus précisément, on montre que la force rotationnelle se met sous la forme :

.../...

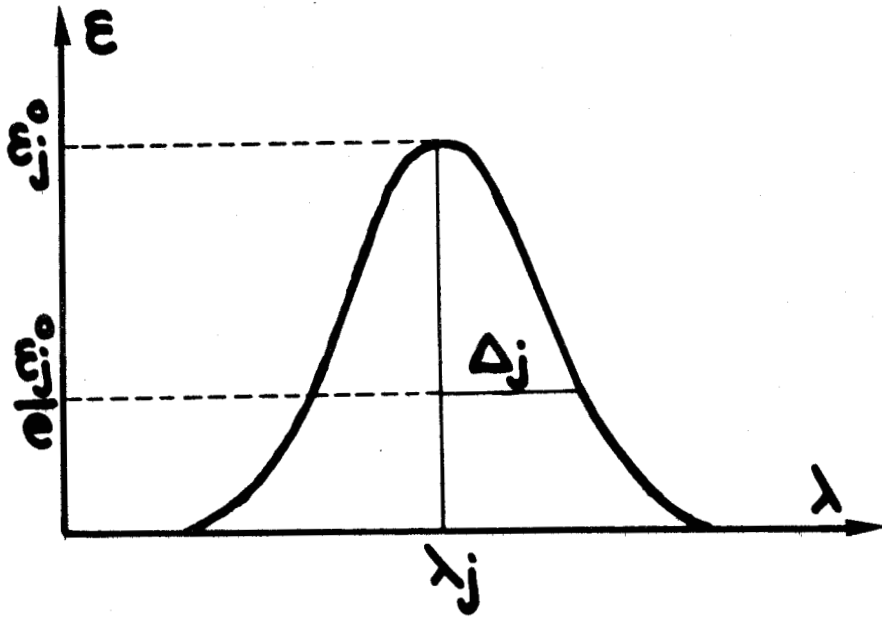


Figure **XV**

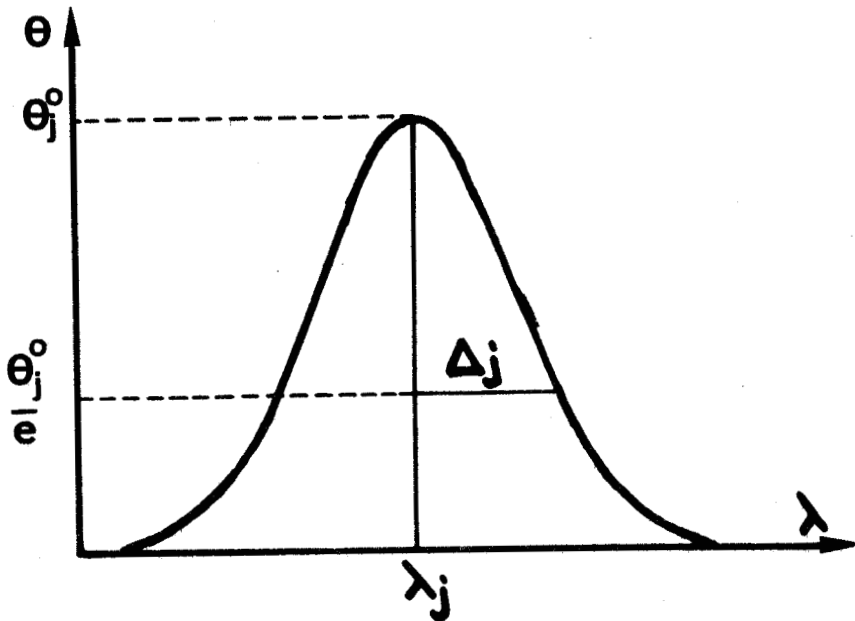


Figure **XVI**



$$R_j = \frac{3hc}{32\pi^3 N} \times 2303 \int_0^\infty \frac{\epsilon_G - \epsilon_D}{\nu} d\nu$$

L'expression précédente se simplifie lorsqu'on suppose que la bande dichroïque est une courbe de Gauss dont le maximum a pour abscisse λ_j , et pour valeur $(\theta)_j^0$ et dont la demi-largeur de bande est Δ_j . Figure XVI.

alors

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

Δ_j et λ_j sont exprimés dans la même unité.

$(\theta)_j^0$ est exprimé en degré cm^2 décimole⁻¹.

R_j en erg cm^{-2} radian.

- La force rotationnelle est nulle dans deux cas :

. lorsque la molécule a un centre ou un plan de symétrie; dans ce cas, un des moments induits est nul; on distingue ainsi les transitions dipôle magnétique permises, dipôle électrique interdites, ou dipôle électrique permises, dipôle magnétique interdites.

. lorsque les deux moments dipolaires sont perpendiculaires, leur produit scalaire étant alors nul.

Moscowitz classe les chromophores en deux catégories :

- Les chromophores intrinsèquement dissymétriques pour qui les forces rotationnelles ne sont jamais nulles.

- Les chromophores intrinsèquement symétriques, pour qui il est impossible d'avoir simultanément les transitions dipôle électrique et dipôle magnétique permises en même temps; dans ce cas, une activité optique pourra être induite si une perturbation non symétrique des électrons du chromophore peut se produire sous l'action d'un environnement dissymétrique.

Cette remarque est particulièrement importante en ce qui concerne notre étude, puisque le groupement nitro benzylique est un chromophore intrinsèquement symétrique.

.../...

c) Anisotropie d'une transition.

L'anisotropie g_j d'une transition est définie comme étant le quotient de la force rotationnelle par la force dipolaire :

$$g_j = \frac{R_j}{D_j}$$

g_j chiffre l'importance du moment de transition dipôle magnétique.

VII AUTRES THEORIES MOLECULAIRES DU POUVOIR ROTATOIRE.

Un certain nombre de théories du pouvoir rotatoire ont été énoncées depuis 1928.

-Condon, Altar et Eyring (1937) proposent le modèle à un électron : un champ magnétique asymétrique (lié à l'asymétrie de la molécule) perturbe l'excitation électronique dans la molécule; (16)

-Kirkwood couple deux moments électriques de transition voisins (1937); (17)

- Schellman propose le modèle du potentiel extérieur (1966) : un potentiel statique extérieur provoque l'activité optique d'un chromophore, s'il contient un terme qui appartient à la représentation pseudo-scalaire du groupe de symétrie du chromophore; (18).

APPLICATION DE LA DISPERSION DU POUVOIR OPTIQUE ROTATOIRE ET DU DICHROISME CIRCULAIRE AUX POLYPEPTIDES

La détermination sur des bases théoriques de la structure moléculaire à partir des données de l'activité optique, nécessite la connaissance d'un grand nombre de paramètres; en particulier la position de toutes les bandes d'absorption, les moments électriques et magnétiques de transition, la polarisabilité des différents groupes, dont les valeurs pour les molécules complexes ne sont pas connues.

Lorsqu'en 1961, les premières mesures de dispersion du pouvoir optique rotatoire ont été effectuées dans l'ultra-violet lointain, il est apparu que les différentes conformations que peuvent adopter les polypeptides et les protéines, à savoir l'hélice α , la chaîne β ou la pelote statistique sont caractérisées par des courbes de dispersion optique rotatoire très différentes. (19).

Il devient alors possible, sans faire appel à des notions théoriques très poussées, de déterminer la structure secondaire des polypeptides et des protéines par comparaison à des modèles, la difficulté étant de définir correctement ces modèles.

I SPECTRE ULTRA-VIOLET DE LA LIAISON PEPTIDIQUE.

Tous les polypeptides possèdent dans leur squelette le groupement peptidique $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{N}$. Nous allons donc dans un premier temps nous intéresser au spectre d'absorption UV de ce groupement.

Lorsque le groupement peptidique se trouve dans une molécule simple comme une amide, les transitions suivantes existent : (20)

.../...

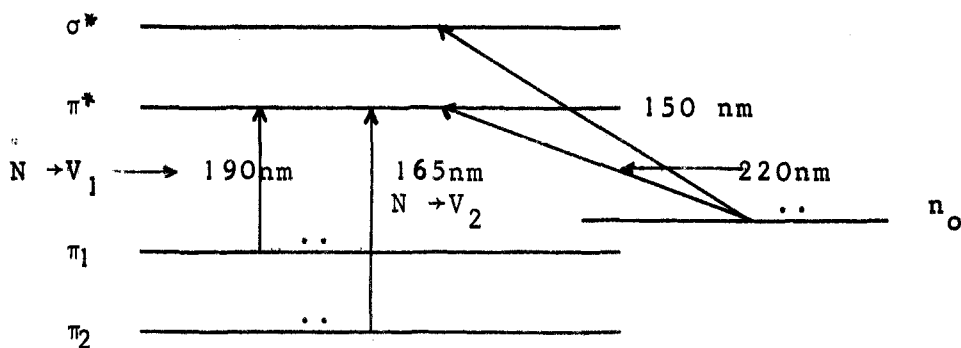


Figure XVII.

La formation à partir de chromophores peptidiques d'un enchaînement polypeptidique peut entraîner deux sortes de perturbations des spectres d'absorption :

- des perturbations excitoniques dues à des interactions entre mêmes états excités des différents groupements peptidiques;
- des perturbations dues à des interactions non résonnantes entre un chromophore dans un état excité donné et tous les autres chromophores dans un état excité différent.

Lorsqu'on a affaire à des polypeptides hélicoïdaux, il existe un dédoublement excitonique des transitions $N \rightarrow V_1$ et $N \rightarrow V_2$. En particulier la transition $N \rightarrow V_1$ est constituée d'une composante polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice, et de deux composantes dégénérées polarisées perpendiculairement à l'axe de l'hélice.

Ceci a été vérifié expérimentalement en enregistrant les spectres d'absorption dans l'UV lointain de l'acide polyglutamique et de la polylysine en fonction du pH. (21 et 22).

Lorsque ces polypeptides sont sous forme α hélicoïdale, le spectre ultra-violet présente un maximum d'absorption vers 190 nm et un épaulement à 205 nm; si les polypeptides sont sous forme de pelote statistique l'épaulement à 205 nm disparaît. On attribue le maximum centré à 190nm à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ polarisée perpendiculairement, et l'épaulement situé à 205 nm à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ polarisée parallèlement. Figure XVIII.

On n'observe pas de dédoublement excitonique pour la bande $n \rightarrow \pi^*$.

II SPECTRES DICHROIQUES DES POLYPEPTIDES .

Les spectres dichroïques de l'hélice α droite, bien connus, sont caractérisés par une bande positive centrée à 190 nm correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ polarisée perpendiculairement, et deux bandes négatives situées à 207 nm et 222 nm correspondant respectivement à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ polarisée parallèlement, et à la transition $n \rightarrow \pi^*$. (23). Figure XIX.

Le signe et l'intensité de la bande centrée à 222 nm sont reliés au sens d'enroulement de l'hélice α , et la teneur en hélice α du polypeptide. En effet :

- Si $(\theta)_{222} < 0$ on a une hélice α droite;
- Si $(\theta)_{222} > 0$ on a une hélice α gauche;
- Enfin on admet que pour une structure parfaitement hélicoïdale

$$\left| (\theta)_{222} \right| = 40\ 000 \quad (23)$$

Il est plus difficile de parler du spectre dichroïque de la pelote statistique car il n'est pas commode de trouver un modèle complètement désordonné. (23,24,25).

Birsthein⁽²⁶⁾ a déterminé théoriquement le spectre dichroïque d'un polypeptide sous forme de chaîne statistique: ses résultats ne lui permettent pas d'interpréter d'une manière certaine les spectres dichroïques expérimentaux.

Jusqu'à ces dernières années, le spectre dichroïque de l'acide poly α -L-glutamique en milieu basique présentant une faible bande positive à 218 nm et une bande négative importante vers 200 nm, (23), avait été admis comme étant le spectre de référence de la chaîne statistique. En fait, il apparaît que des répulsions électrostatiques viennent perturber la chaîne statistique pour donner une chaîne étendue.

Tiffany et Krimm proposent comme modèle de chaîne statistique la solution du PLGA dans le perchlorate de lithium 4,5M chauffée à 50°C puis refroidie. On observe sur le spectre dichroïque une seule bande négative centrée vers 207 nm et d'intensité moyenne, ce qui s'explique si la macromolécule est complètement désordonnée. (24). Figure XX.

.../...

SPECTRE UV ET DICHROIQUE D'UN POLYPEPTIDE EN
HELICE α

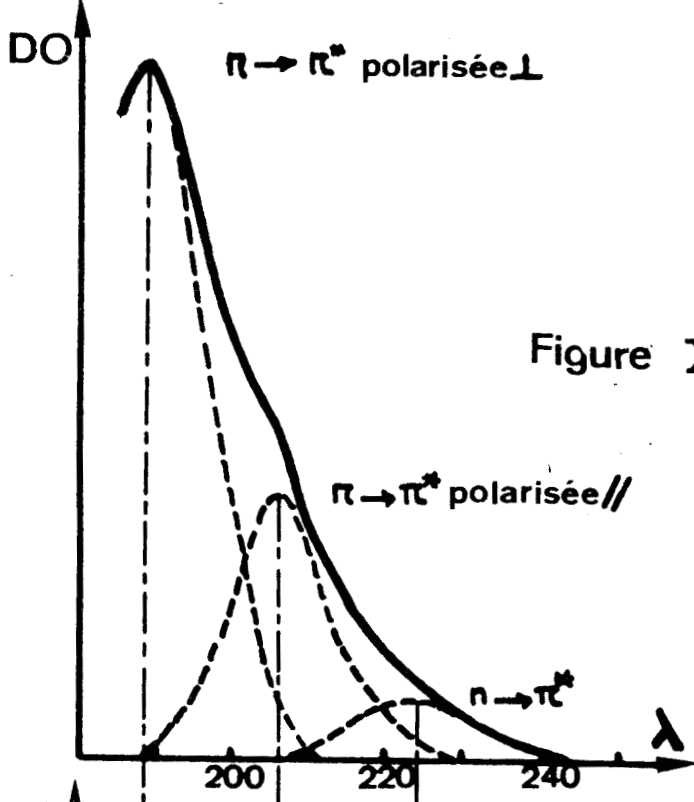


Figure XVIII

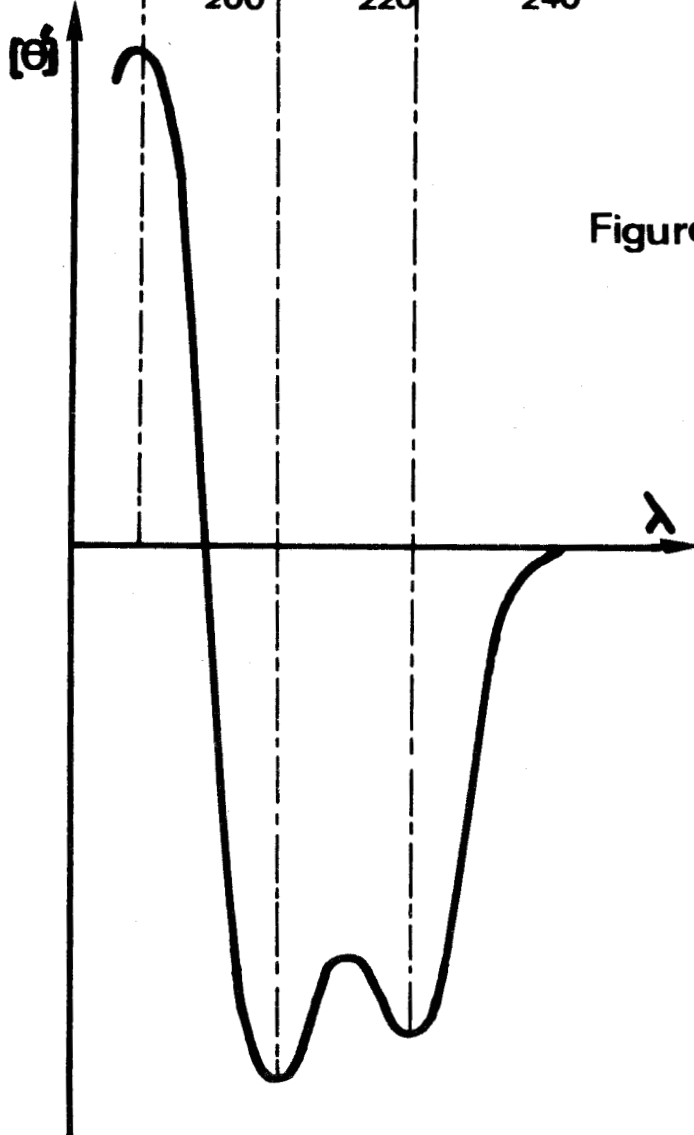
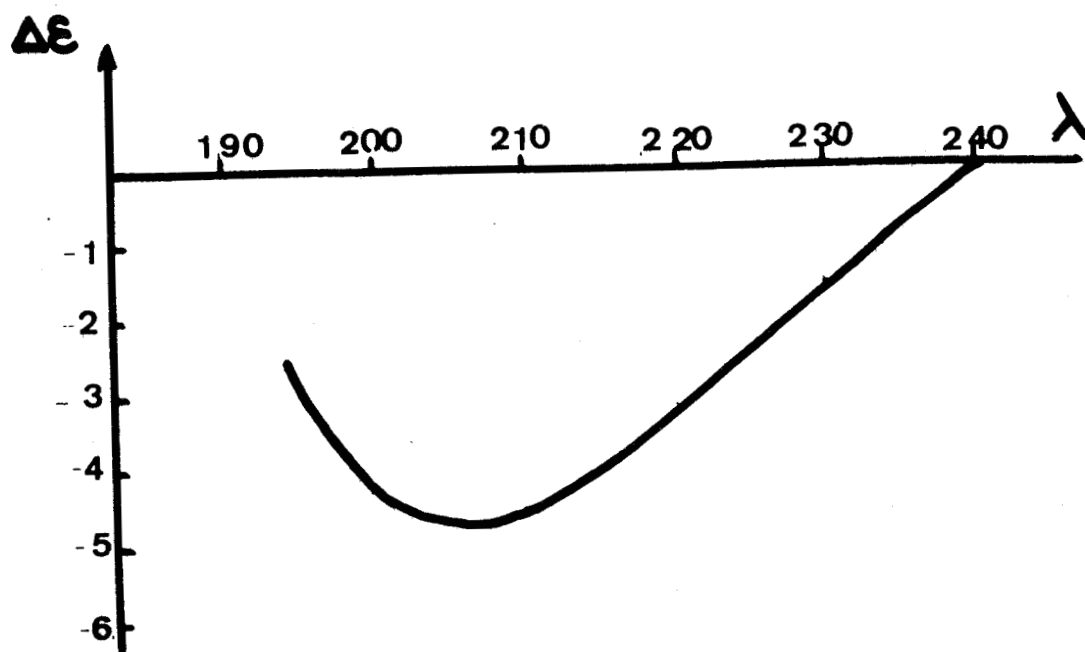


Figure XIX





SPECTRE DICHROÏQUE DU PGA DANS LiClO₄ 45M

Figure XX

III COURBES DE DISPERSION DU POUVOIR OPTIQUE ROTATOIRE DES POLYPEPTIDES.

a) Equation de Moffitt-Yang.

En traitant l'activité optique des polypeptides α hélicoïdaux en termes d'oscillateurs couplés, Moffitt exprime la rotation molaire effective (m') en fonction de trois paramètres : a_0 , b_0 et λ_0 , en ne tenant compte que de la contribution à la rotation des transitions $N \rightarrow V_1$ et $N \rightarrow V_2$.

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

Cette relation porte le nom d'équation de Moffitt-Yang. (26)
Les valeurs des paramètres λ_0 et b_0 sont des propriétés intrinsèques du squelette polypeptidique, tandis que la valeur du paramètre a_0 dépend de la nature du solvant et des chaînes latérales.

Pour déterminer expérimentalement les paramètres de l'équation de Moffitt-Yang, il suffit de porter (m') $(\lambda^2 - \lambda_0^2)$ en fonction de $\frac{1}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$ et d'ajuster la valeur de λ_0 de telle manière qu'on obtienne une droite dans un domaine spectral aussi grand que possible.

Pour les polypeptides α hélicoïdaux d'enroulement droit les valeurs expérimentales admises sont :

$$\begin{aligned} \lambda_0 &= 212 \text{ nm} \\ b_0 &= -650 \end{aligned} \quad (27)$$

Etant donné que λ_0 est défini empiriquement, la valeur 212 nm est sujette à caution.

Cohen et Szent-Gyorgyi (28) ont suggéré de représenter la dispersion du pouvoir optique rotatoire d'un polypeptide par une équation de Moffitt-Yang dans laquelle la valeur du paramètre λ_0 serait invariablement fixée à 212 nm; et puisque la dispersion du pouvoir optique rotatoire d'une pelote statistique peut s'exprimer au moyen d'une équation de Drude à un

.../...

terme du type :

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

équation dans laquelle il se trouve que λ_c est voisin de 212nm : la valeur du paramètre b pourra donc chiffrer le contenu hélicoïdal d'un polypeptide.

- . Si $b_o = 0$ on a une pelote statistique
- . Si $b_o = -650$ on a une hélice α droite
- . Si $b_o = 650$ on a une hélice α gauche

d'où le pourcentage d'hélicité :

$$\% \text{ hélicité} = - \frac{100b_o}{+ 650}$$

En fait, le bon accord entre les valeurs théoriques de b_o et λ_o , et les valeurs observées expérimentalement est entièrement fortuit, puisque Moffitt a négligé certains termes dans le traitement de l'activité optique des polypeptides α hélicoïdaux. Un traitement ultérieur de l'activité optique par Moffitt, Fitt et Kirkwood (29) conduit à montrer que la somme des contributions à l'activité optique des termes négligés est nulle. Néanmoins aucune signification théorique ne peut être attachée aux paramètres a_o et λ_o .

b) Equation de Drude à 2 termes

Les différents paramètres des effets Cotton sont fonction de la nature des chaînes latérales, du solvant, de l'environnement des groupements peptidiques, de la distribution des différentes régions structurales ; or l'équation de Moffitt-Yang ne rend pas compte de ces influences. C'est pour cette raison que Shechter et Blout ont développé une nouvelle méthode d'analyse de la dispersion du pouvoir optique rotatoire dans le visible et le proche U.V., en représentant la DOR d'une hélice par une équation de Drude à deux termes.

$$[m'] = \frac{A_{193} \lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2} + \frac{A_{225} \lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}$$

En principe, pour une hélice α , la courbe de DOR devrait être représentée par une équation de Drude à trois termes centrés respectivement à 192-193nm, 206-208nm et 223-224nm environ. Il s'est révélé impossible de déterminer simultanément les 3 paramètres A_{193} , A_{206} et A_{223} ; Shechter et Blout ont alors pensé représenter la courbe de DOR par une équation de Drude à 2 termes. (30). Fixant un terme à 193nm (correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ polarisée perpendiculairement); ils ont recherché la position du 2ème terme qui permette la meilleure reproduction dans un domaine de longueur d'onde aussi étendu que possible de la courbe de DOR. Cette meilleure reproduction est obtenue lorsque le second terme est centré sur 225nm.

Ce second terme représente la contribution de toutes les transitions électroniques autres que la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ polarisée perpendiculairement.

Les deux paramètres A_{193} et A_{225} se déterminent graphiquement en portant

$$(m') \frac{\lambda^2 - \lambda_{193}^2}{\lambda_{193}^2} \text{ en fonction de } \frac{\lambda_{225}^2 (\lambda^2 - \lambda_{193}^2)}{\lambda_{193}^2 (\lambda^2 - \lambda_{225}^2)}$$

A_{193} est l'ordonnée à l'origine et A_{225} la pente de la droite ainsi obtenue à partir des résultats expérimentaux de (m') .

Cette équation peut également représenter la dispersion du pouvoir optique rotatoire d'une pelote statistique; dans ce cas, le paramètre A_{225} devient négligeable.

A partir d'un grand nombre de résultats expérimentaux, Shechter et Blout montrent que si on porte les valeurs de A_{193} en fonction de A_{225} pour les polypeptides et les protéines en solution dans des solvants organiques, on obtient une droite d'équation :

$$A_{225} = -0,55 A_{193} - 280$$

De même, si on trace le même graphe pour les polypeptides et les protéines en solution dans les solvants aqueux,

.../...

on obtient également une droite parallèle à la première et d'équation $A_{225} = - 0,55 A_{193} - 430$ (30)

Les paramètres A_{193} et A_{225} sont reliés au contenu hélicoïdal des polypeptides en solution dans les solvants organiques par les relations : (30)

$$H(\%)_{193} = \frac{A_{193} + 600}{36,2}$$

$$H(\%)_{225} = - \frac{A_{225}}{19,0}$$

L'équation de Drude à deux termes est uniquement valable lorsqu'on est en présence d'un des 3 cas suivants :

- . 100% d'hélice α ;
- . 100% de pelote statistique ;
- . mélange de structure α hélicoïdale et de pelote statistique.

Donc l'utilisation d'une équation de Drude à deux termes permet de différencier les polypeptides possédant une structure organisée uniquement α hélicoïdale, des polypeptides possédant une structure organisée différente. L'équation de Moffitt Yang ne permet pas de faire cette distinction.

c) Comparaison de l'équation de Drude à deux termes et de l'équation de Moffitt.

L'équation de Drude à deux termes et l'équation de Moffitt Yang représentent la dispersion du pouvoir optique rotatoire des polypeptides et des protéines dans des régions spectrales comparables.

Ces deux équations sont donc mathématiquement équivalentes comme le montre un développement limité autour de λ_0 . En admettant que $\lambda_0 = 212\text{nm}$ Shechter montre qu'il existe les relations suivantes entre les paramètres des deux équations : (31)

$$a_0 = 0,829 A_{193} + 1,13 A_{225}$$

$$b_0 = -0,142(A_{193} - A_{225})$$

.../...

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.

L'étude des polypeptides portant dans leur chaîne latérale un groupement nitro benzylique a déjà été entreprise par plusieurs équipes de chercheurs. En 1963, Goodman et ses collaborateurs (32) publient une première série de résultats concernant l'activité optique du poly aspartate de para nitro benzyle, et du polyglutamate de para nitro benzyle ainsi que des copolymères aspartate de benzyle- aspartate de para nitro benzyle, ainsi que des copolymères glutamate de benzyle -glutamate de para nitro benzyle en solution dans le chloroforme, le diméthylformamide et l'acide trifluoracétique. Il apparaît alors que l'introduction de groupement nitro benzylique dans la chaîne latérale ne provoque aucune inversion du sens de l'hélice. Il n'en est pas de même du polyaspartate de benzyle dont le sens d'enroulement de l'hélice α change lorsque le groupement nitro est ajouté en para du cycle benzénique.

TABLEAU VI.

	Solvant	b_o
PGB	DMF	-614
PG(pNB)	DMF	-584
PAB	CH Cl ₃	+598
PA(pNB)	DMF	-1160

Goodman et ses collaborateurs mentionnent alors l'existence d'un effet Cotton à 370nm attribué au groupement nitroaromatique pour le PA(pNB) en solution dans le DMF, et ils interprètent la valeur de -1160 trouvée pour le paramètre de Moffitt en supposant que les chaînes latérales s'organisent en hélice autour de l'hélice du squelette polypeptidique, formant ainsi une "super hélice". Le paramètre b_o représenterait donc la somme des contributions de

ces deux hélices.

Par contre, ils ne retrouvent pas l'effet Cotton à 370nm pour le polyglutamate de para nitro benzyle. Ils concluent alors que l'addition d'un groupement méthylène, diminue la rigidité de la chaîne latérale du poly glutamate de nitro benzyle.

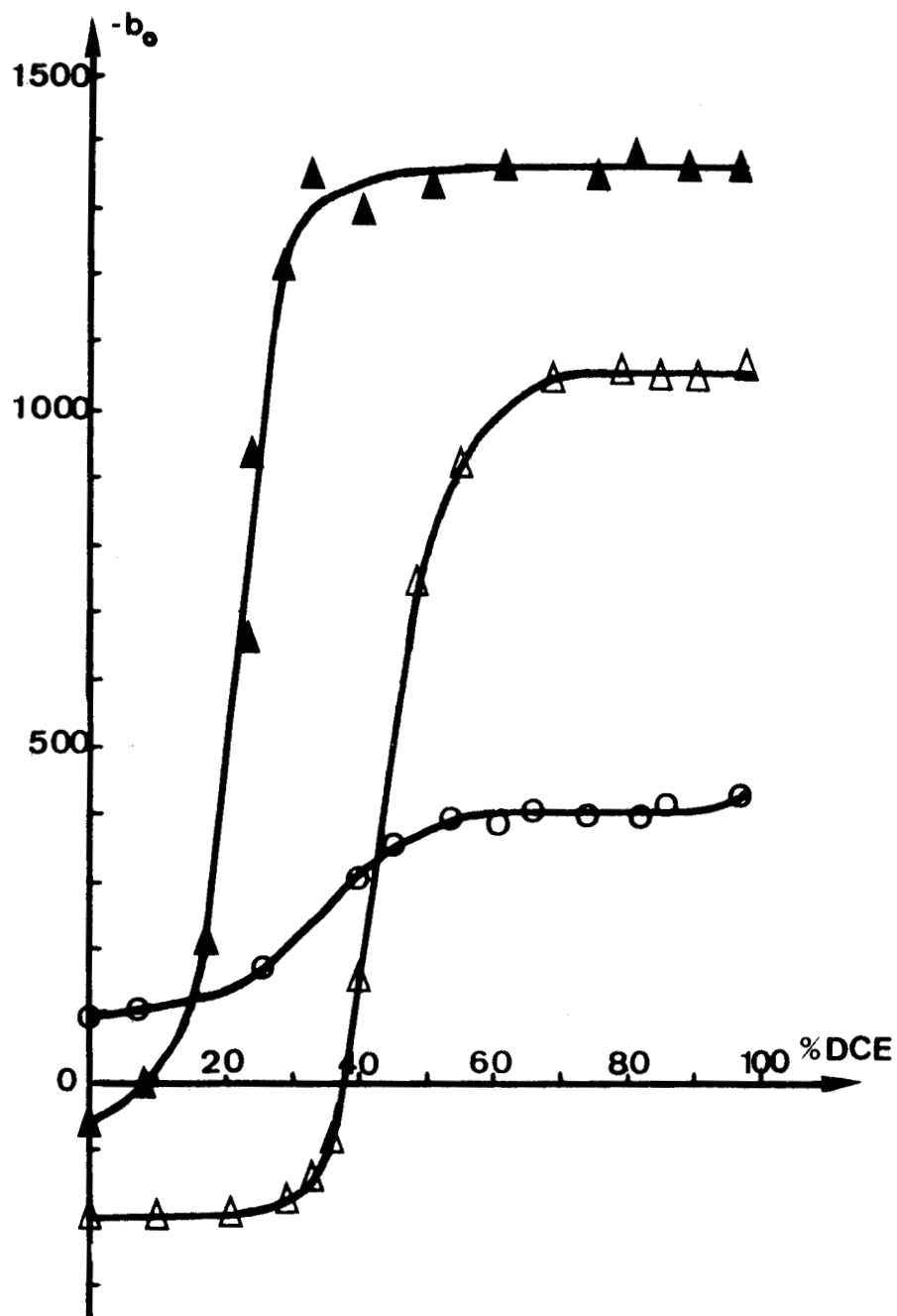
En 1967, Fraser et ses collaborateurs ⁽³³⁾ publient une série de résultats concernant en particulier la stabilité de l'hélice α des polyglutamates d'ortho, de méta et de para nitro benzyle; ils étudient la transition hélice-chaîne de ces trois polypeptides dans le solvant binaire acide dichloracétique-1,2 dichloréthane au moyen de la dispersion du pouvoir optique rotatoire.

Là encore, des valeurs anormalement importantes de $-b_0$ sont trouvées, et attribuées à un arrangement régulier des chromophores couplés des chaînes latérales. Figure XXI.

Cet effet " nitro aromatique", mal expliqué, a donc renforcé notre désir d'étudier les polyglutamates de nitro benzyle.

Outre l'interprétation qualitative déjà donnée, aucune explication n'est proposée pour justifier la valeur absolue élevée de b_0 . Il nous a semblé que calculer le paramètre b_0 à partir d'une courbe de dispersion optique rotatoire présentant un effet Cotton extrinsèque pouvait conduire à un résultat entaché d'erreur.

De plus, aucun des auteurs précédemment cités ne donne l'origine des effets Cotton extrinsèques. Une première tentative d'explication est faite par M-H.LOUCHEUX et S.GRAFF ⁽³⁴⁾ qui mettent en évidence en étudiant une série de copolymères de glutamate de benzyle et de glutamate de para nitro benzyle l'existence d'interactions entre les différents groupements nitro benzyliques portés par la chaîne latérale.



- ▲ PG(oNB)
- PG(mNB)
- △ PG(pNB)

VARIATION DE b_0 AVEC LA COMPOSITION
DU SOLVANT BINAIRE ADC-DCE

Figure **XXI**

I ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE PAR DICHROISME CIRCULAIRE.

Nous avons retenu comme solvants deux solvants transparents dans l'ultra-violet lointain favorisant la structure hélicoïdale, à savoir l'hexafluoroisopropanol (HFIP) et le 1,2 dichloréthane (DCE), et deux solvants favorisant la structure en pelote statistique, non transparents dans l'ultra-violet lointain: l'acide dichloracétique (ADC) et l'acide trifluoracétique (ATF). Le polyglutamate de para nitro benzyle n'est pas soluble dans le DCE et l'ATF.

Avant chaque série de manipulations, ces solvants sont séchés et purifiés par distillation.

a) Spectres ultra-violet des poly glutamates de nitro benzyle.

a) Propriétés spectroscopiques du groupement nitro benzylique.

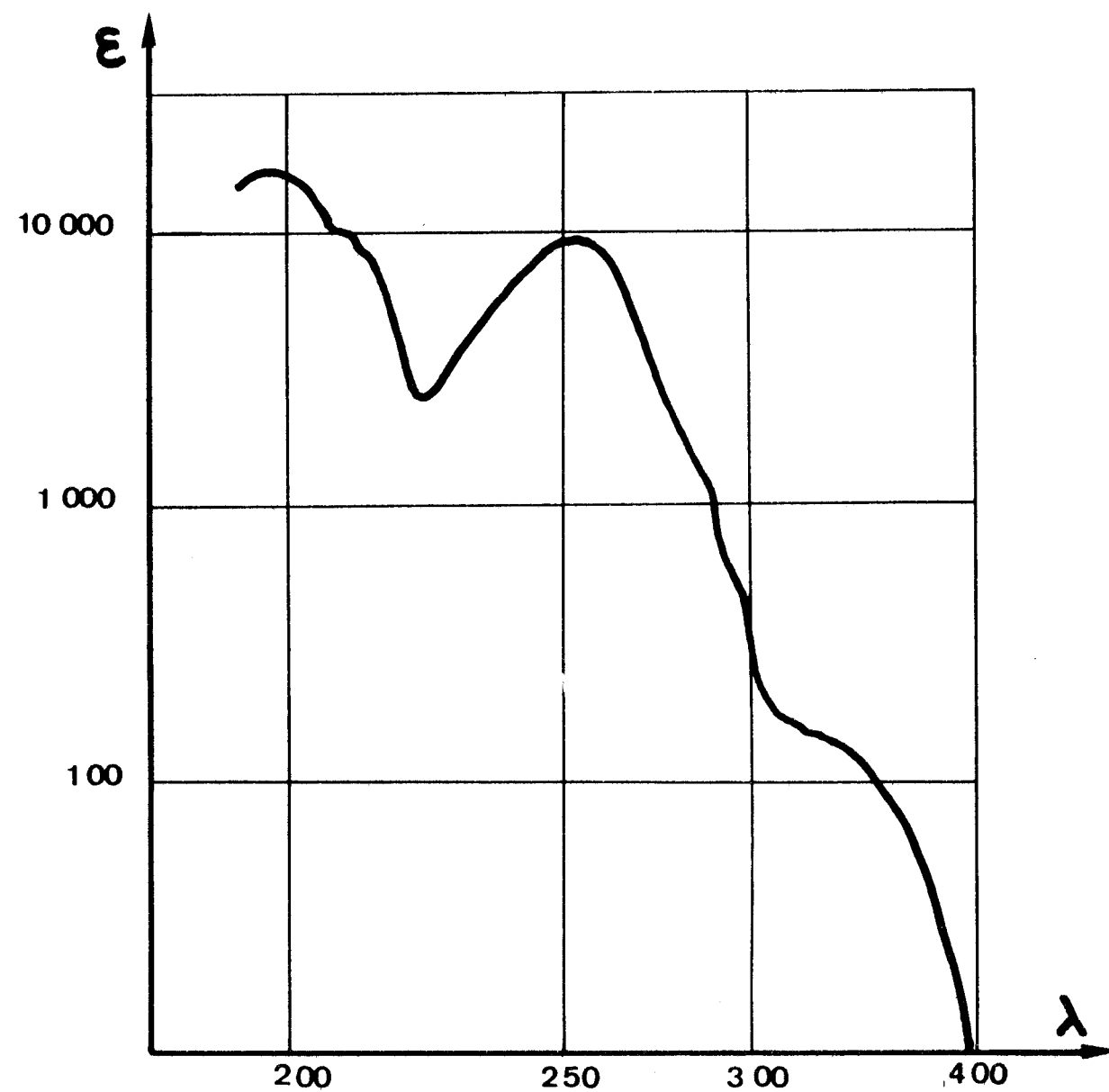
Le nitrobenzène en solution dans l'éther de pétrole présente les bandes d'absorption suivantes :

- une bande à 322 nm qui correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$
- un épaulement vers 290nm 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 (Figure XXII).

β) Résultats

Dans le spectre ultra-violet des polyglutamates de nitro benzyle, les bandes ont deux origines, l'une due au groupement peptidique, l'autre due au groupement nitro benzylique.

.../...



SPECTRE UV DU NITRO BENZENE

Figure XXII



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

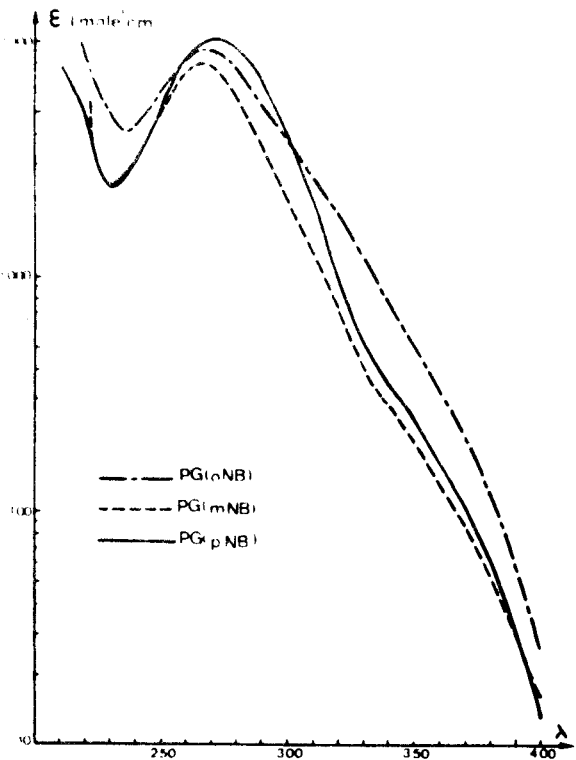
Dans le tableau suivant, le coefficient d'extinction molaire ϵ est exprimé en $l \text{ mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Il n'a été calculé que pour la bande à transfert de charge et la bande $n \rightarrow \pi^*$ du groupe peptidique, les autres bandes étant trop mal définies. (Figure XXIII).

Il n'est pas possible d'atteindre des longueurs d'onde inférieures à 250 nm lorsqu'on utilise l'acide dichloracétique ou l'acide trifluoracétique comme solvant.

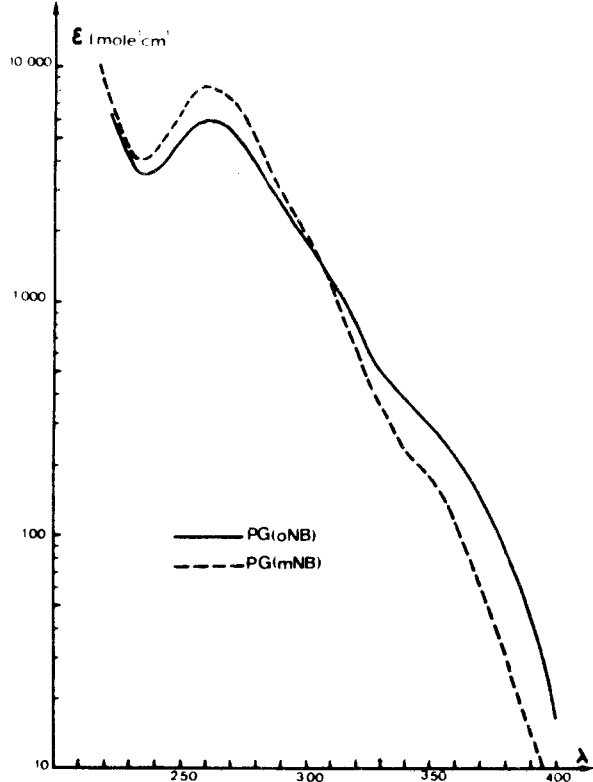
TABLEAU VII.

		(Transfert de charge)		($n \rightarrow \pi^*$)	
		()		($\begin{array}{c} \text{-C-N-} \\ \quad \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$)	
		()		()	
		($\lambda \text{ nm}$)	(ϵ)	($\lambda \text{ nm}$)	(ϵ)
(HFIP)	(PG(oNB))	(267,5)	(8820)	(222)	(7520)
	(PG(mNB))	(265)	(8040)	(222)	(5600)
	(PG(pNB))	(271)	(11420)	(222)	(3830)
(DCE)	(PG(oNB))	(262)	(5960)	(222)	(6460)
	(PG(mNB))	(263)	(8500)	(222)	(8630)
(ADC)	(PG(oNB))	(266,5)	(6720)		
	(PG(mNB))	(268)	(7720)		
	(PG(pNB))	(271)	(10000)		
(ATF)	(PG(oNB))	(265)	(6740)		
	(PG(mNB))	(265,5)	(7880)		

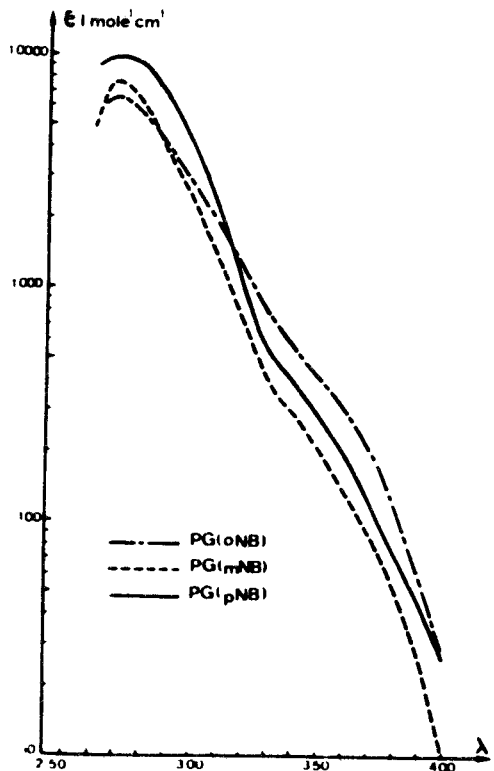
.../...



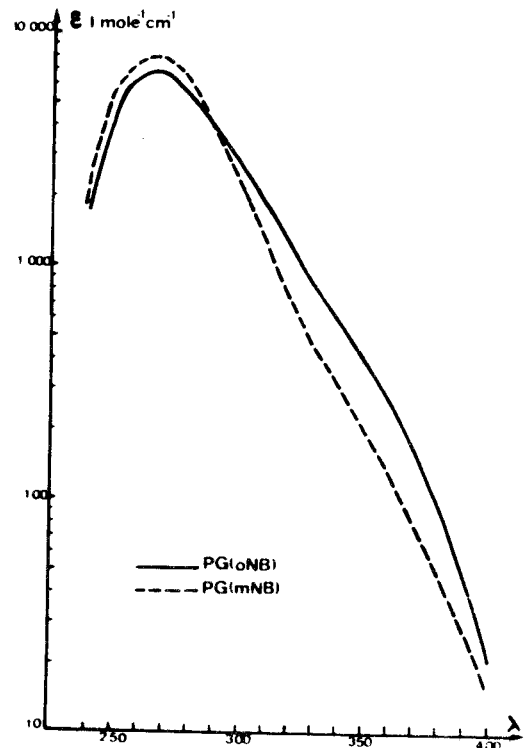
SPECTRES UV - SOLVANT HFIP



SPECTRES UV - SOLVANT DCE



SPECTRES UV - SOLVANT ADC



SPECTRES UV - SOLVANT AT



b) Courbes de dichroïsme circulaire enregistrées.

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 : 1cm, 5mm, 1mm, 0,5mm, 0,2mm et 0,1mm.

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. Aussi avons nous choisi la concentration des différentes solutions en fonction des épaisseurs de cuves mises à notre disposition et des spectres UV précédemment obtenus de telle manière que la densité optique de la solution étudiée soit égale à 1,2 pour chaque région du spectre où une bande dichroïque existe.

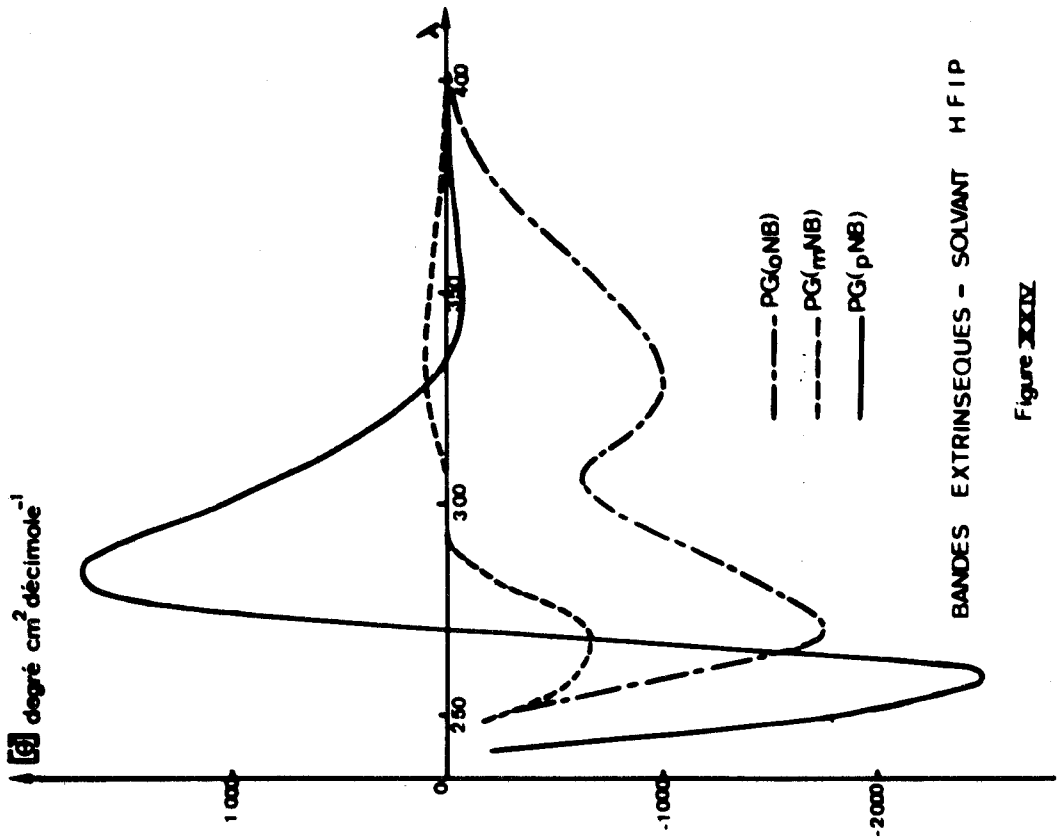
α) Résultats obtenus dans l'hexafluoroisopropanol.

TABLEAU VIII.

	λ_i	$(\theta')_i$	Δ_i	$R_i \cdot 10^{40}$
PG(oNB)	329	-1002	39,25	-1,47
	272	-1755	17	-1,35
	222	-31900	12,25	-21,71
PG(mNB)	326	+111,6	48	+0,20
	267,5	-655	13,5	-0,40
	222	-30380	12,5	-21,09
PG(pNB)	352,5	-73	23,5	-0,060
	290	+1950	14	+1,16
	259	-2515	+7,5	-0,898
	221,5	-32303	13	-23,38

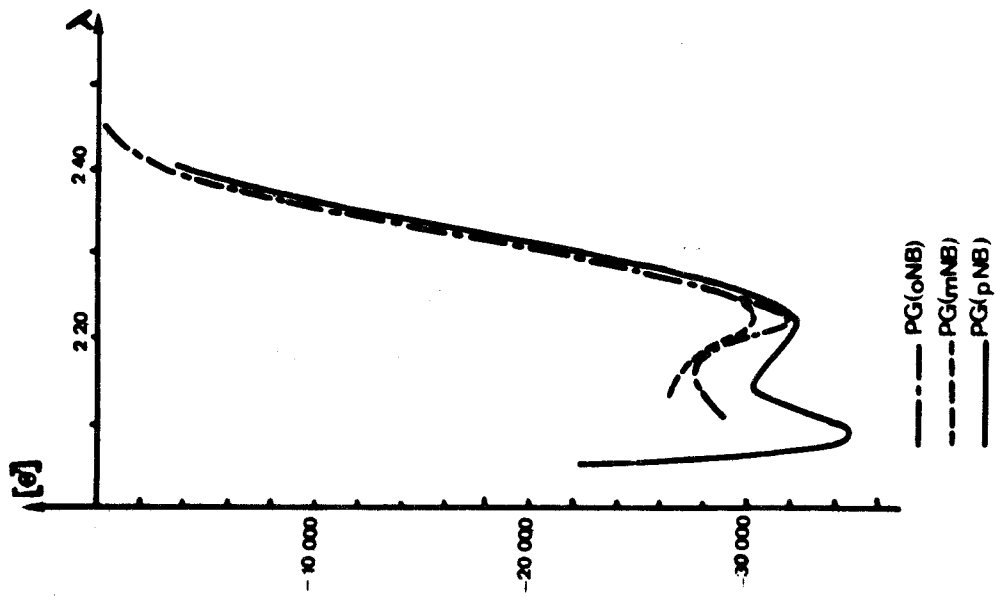
cf Figure XXIV.

.../...



BANDES EXTRINSEQUES - SOLVANT HFIP

Figure XXXIV



BANDES $\pi \rightarrow \pi^*$ - SOLVANT HFIP



β) Résultats obtenus dans le 1,2 dichloréthane.

TABLEAU IX .

	λ_i	$(\theta')_i$	Δ_i	$R_i \cdot 10^{40}$
PG(oNB)	335	-344	41,25	-0,52
	285,5	-320	11	-0,15
	252,5	+764,5	17,75	+0,66
	222	-27830	12,25	-18,93
PG(mNB)	337,5	92	39,5	0,132
	223	-28150	12	-18,67

cf Figure XXV.

γ) Résultats obtenus dans l'acide dichloracétique.

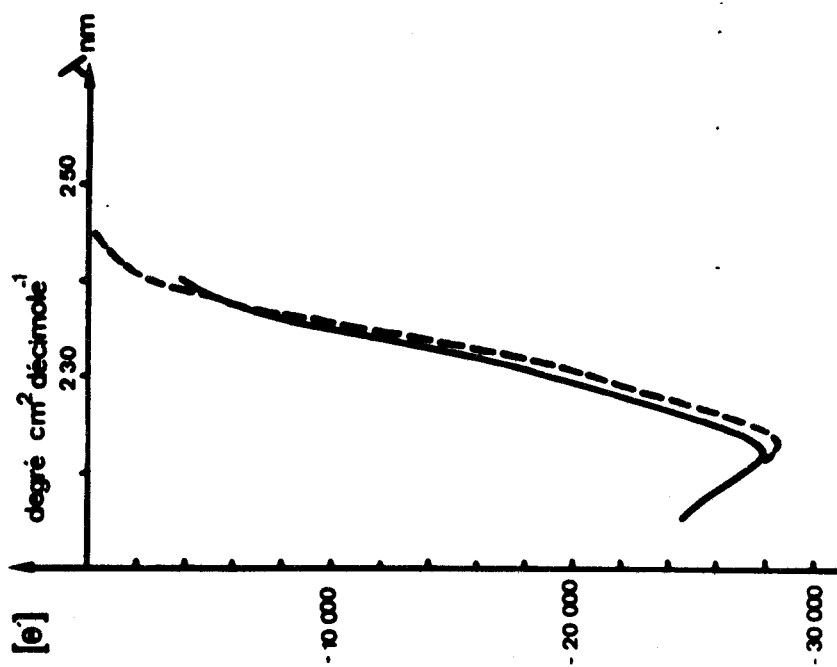
TABLEAU X.

	λ_i	$(\theta')_i$	Δ_i	$R_i \cdot 10^{40}$
PG(oNB)	353	+31	18	0,019
	310	+84	8	0,027
	260	-280	21	-0,28
PG(mNB)	330	-88	16	-0,052
	290	+115	13	+0,063
	260	+154	7	+0,051
PG(pNB)	339	+29	36	0,038
	278	+660	16	0,47
	250	+580	8	0,23

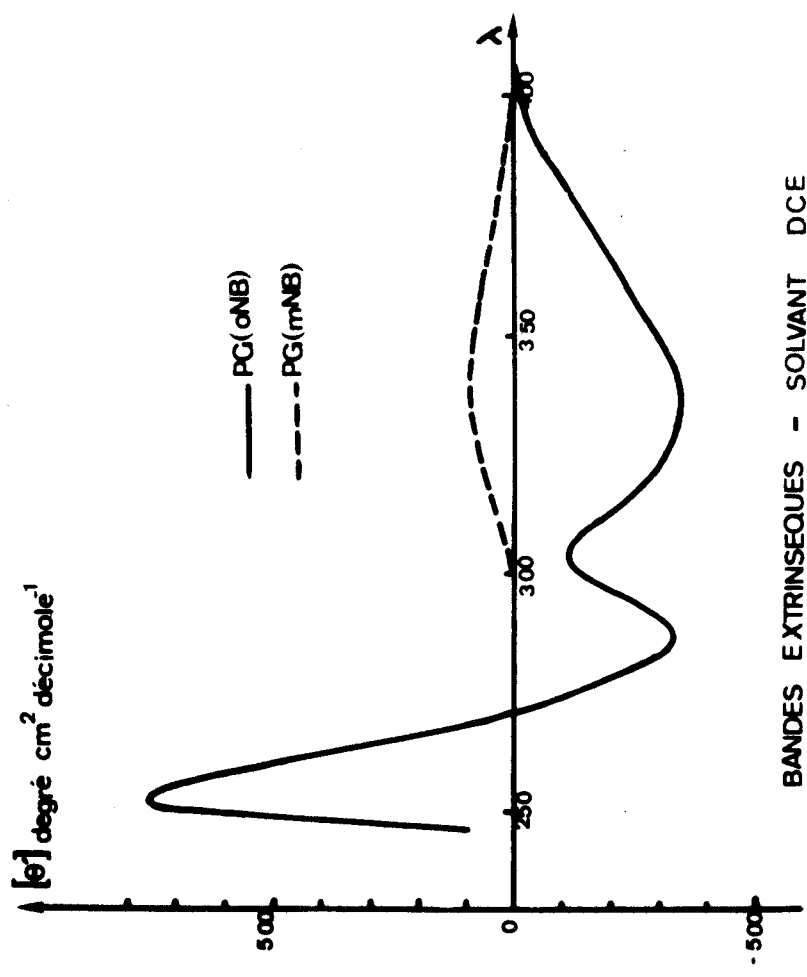
cf Figure XXVI.



.../...

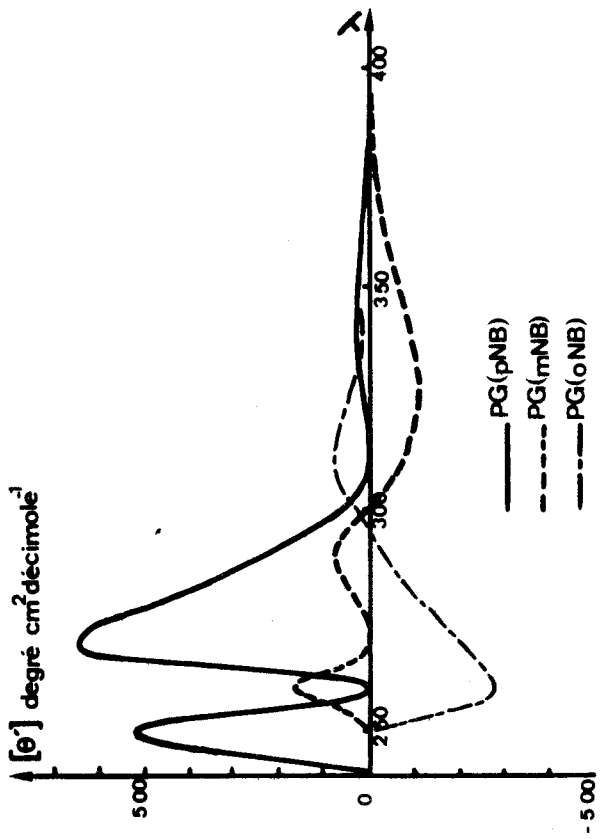


BANDES $\pi \rightarrow \pi^*$ - SOLVANT DCE



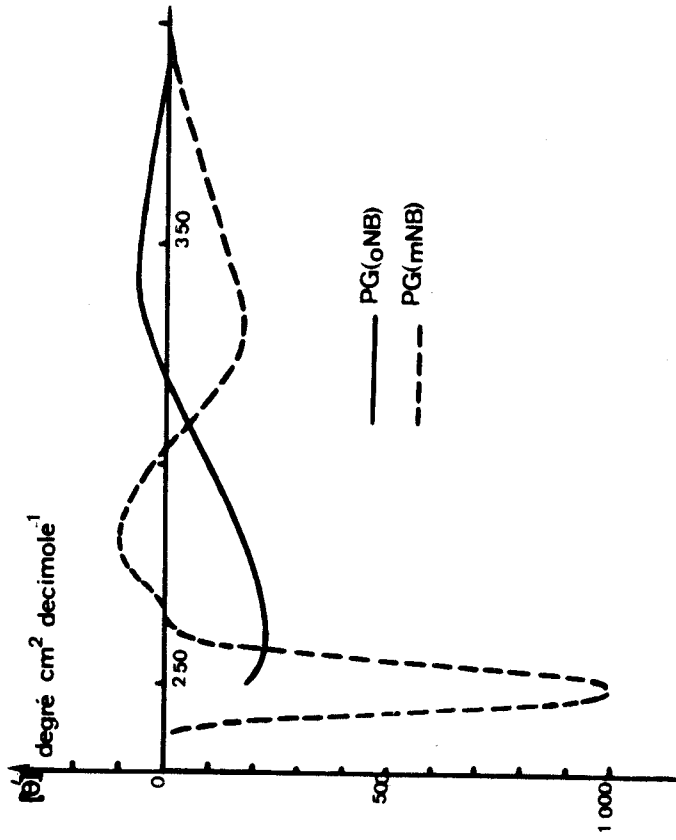
BANDES EXTRINSEQUES - SOLVANT DCE

Figure XXX



BANDES EXTRINSEQUES - SOLVANT ADC

Figure XXXI



BANDES EXTRINSEQUES SOLVANT ATF

Figure XXXII



δ) Résultats obtenus dans l'acide trifluoroacétique.

TABLEAU XI.

	λ_i	$(\theta')_i$	Δ_i	$R_i \cdot 10^{40}$
PG(oNB)	341	+70	16	0,040
	260	-233	33	-0,36
PG(mNB)	330	-172	19	-0,12
	281	+210	8	+0,07
	260	-1040	8	-0,39

cf Figure XXVII.

Dans les tableaux précédents, R_i est exprimé en erg cm^{-2} radian.

c) Exploitation des résultats obtenus par dichroïsme circulaire.

α) Considérations sur le signe et l'intensité de la bande peptidique.

Dans l'hexafluoroisopropanol et le 1,2 dichloréthane, les polyglutamates donnent un spectre dichroïque dans la région 200-240 nm caractéristique d'une hélice α droite. Les valeurs de l'ellipticité molaire (θ) non corrigées du facteur de Lorentz sont les suivantes :

TABLEAU XII.

	HFIP			DCE	
	PG(oNB)	PG(mNB)	PG(pNB)	PG(oNB)	PG(mNB)
(θ)	-38547	-36710	-39034	-37918	-38354

.../...

On considère que les valeurs de (θ) obtenues sont entachées de 5% d'erreur (c'est à dire ± 1800 degré cm^2 décimole $^{-1}$). Dans ces conditions, les différences observées ne sont pas significatives d'une variation de stabilité de conformation en hélice α de nos trois isomères en solution dans HFIP ou DCE.

Si nous prenons la valeur $(\theta) = -40\ 000$ degré cm^2 décimole $^{-1}$ comme caractéristique de l'intensité de la bande $n \rightarrow \pi^*$ d'un polypeptide 100% hélicoïdal(23), si de plus nous supposons qu'à 222 nm l'ellipticité de la pelote statistique est négligeable puisqu'elle est de + 1300 (24), ce qui est du même ordre de grandeur que l'erreur expérimentale, nous pouvons alors calculer le contenu hélicoïdal de nos macromolécules par la relation

$$\% H = - \frac{(\theta) \times 100}{40\ 000}$$

TABLEAU XIII.

	HFIP			DCE	
(
(
(PG(oNB)	PG(mNB)	PG(pNB)	PG(oNB)	PG(mNB)
(
($(\theta)\%H$	96,3%	91,7%	97,5%	94,7% : 95,8%
(

Ces pourcentages sont connus avec une précision de $\pm 4\%$.

Il a été impossible d'atteindre la région caractéristique du chromophore peptidique lorsque nous avons utilisé l'ADC et l'ATF comme solvants.

β) Les bandes dichroïques extrinsèques.

Les résultats présentés dans les tableaux VIII, IX, X et XI entraînent un certain nombre de remarques :

- des bandes dichroïques extrinsèques ont été mises en évidence dans les solvants favorisant la forme hélicoïdale. Des bandes dichroïques extrinsèques ont également été mises en évidence dans les solvants favorisant la forme pelote, mais elles sont beaucoup moins intenses.

- quels que soient le polypeptide et le solvant considérés, on retrouve toujours la bande correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Il en est de même de la bande à transfert de charge, sauf

pour le PG(mNB) en solution dans le DCE.

- la bande correspondant à la transition $n \rightarrow \pi^*$ n'apparaît pas systématiquement.

TABLEAU XIV.

		$\pi \rightarrow \pi^*$		$n \rightarrow \pi^*$		transfert de charge	
		λ_i	$(\theta')_i$	λ_i	$(\theta')_i$	λ_i	$(\theta')_i$
	HFIP	329	-1002			272	-1755
PG(oNB)	DCE	335	-344	285,5	-320	252,5	+764,5
	ADC	353	+31	310	+84	260	-280
	ATF	341	+70			260	-233
	HFIP	326	+111,6			267,5	-655
PG(mNB)	DCE	337,5	+92				
	ADC	330	-88	290	+115	260	+154
	ATF	330	-172	281	+210	260	-1040
	HFIP	352,5	-73	290	+1950	259	-2515
PG(pNB)	ADC	339	+29	278	+660	250	+580

- Il n'apparaît aucune relation simple entre le signe des bandes extrinsèques et la structure secondaire d'une part, l'intensité des bandes extrinsèques et le contenu hélicoïdal d'autre part, comme le montre le tableau XIV.

-néanmoins, en ce qui concerne la bande correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ on peut faire les remarques suivantes :

. en valeur absolue, la rotation molaire correspondant au PG(oNB) en solution dans les solvants hélicogènes est beaucoup plus grande que pour les autres polymères;

. pour un solvant donné, la bande a le même signe pour le PG(oNB) et le PG(pNB), le signe contraire pour le PG(mNB), et ceci quelque soit le solvant.

.../...

γ) Comparaison des spectres dichroïques des polyaspartates de nitro benzyle avec le spectre dichroïque des polyglutamates de nitro benzyle.

Il est intéressant de comparer nos résultats, avec ceux obtenus par Jeferson B.Aragao sur les polyaspartates de nitro benzyle (35).

TABLEAU XV.

		Bande $\pi \rightarrow \pi^*$		Bande $n \rightarrow \pi^*$		Bande de transfert de charge		
		λ	θ'	λ	θ'	λ	θ'	
HFIP	PG(oNB)	96,3	329	-1002		272	-1755	
	PA(oNB)	31,2	335	-900		258	+1100	
	PG(mNB)	91,7	326	+111,6		267,5	-655	
	PA(mNB)	49,4	340	+50	280	-600	263	-700
	PG(pNB)	97,5	352,5	-73	290	1950	259	-2515
	PA(pNB)	69,0	328,5	-600			258	+900
ADC	PG(oNB)		353	+31	310	84	260	-280
	PA(oNB)		339	-200	solvant non transparent			
	PG(mNB)		330	-88	290	115	260	154
	PA(mNB)		338	+30	solvant non transparent			
	PG(pNB)		339	+29	278	660	250	580
	PA(pNB)		338	-80	solvant non transparent			

Dans HFIP, seule la bande correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ se trouve avec le même signe pour les aspartates et les glutamates.

Dans l'ADC, les signes de la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ sont systématiquement contraires.

.../...

II ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE PAR DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE.

a) Résultats expérimentaux.

Les spectres de dispersion du pouvoir optique rotatoire ont été enregistrés sur le spectropolarimètre FICA, en utilisant des cellules en quartz de 1cm, 1mm et 0,1mm d'épaisseur. Figure XXVIII.

La structure secondaire d'un polypeptide est généralement déterminée en exploitant les résultats de la DOR par les équations de Moffitt-Yang et de Shechter-Blout : celles-ci ne sont applicables que si le chromophore peptidique est seul optiquement actif. Par conséquent, ces équations sont inutilisables dans notre cas puisque nous avons mis en évidence des effets Cotton dûs au groupement nitro benzylique par dichroïsme circulaire; il est donc impossible de déduire directement des spectres la valeur des paramètres a_0 , b_0 d'une part et A_{193} , A_{225} d'autre part.

Par conséquent, il faut retrancher de la courbe de dispersion optique rotatoire expérimentale, la contribution due aux chaînes latérales; on obtient alors une courbe de dispersion optique rotatoire uniquement due au squelette polypeptidique, courbe sur laquelle les paramètres précédents peuvent être calculés. Ces calculs sont développés dans le paragraphe suivant.

b) Calculs de Kronig et Kramers.

α) Méthode de Moscowitz.

Moscowitz a montré⁽³⁶⁾ que les relations de Kronig et Kramers se simplifiaient lorsqu'on assimilait les bandes dichroïques à des courbes de Gauss; dans ce cas, trois paramètres suffisent pour définir une bande dichroïque: la demi-largeur de la bande Δ_i prise à l'ordonnée $\frac{(\theta')_i^0}{e}$, la longueur d'onde de l'extrémum λ_i , la valeur de l'extrémum $(\theta')_i^0$

.../...

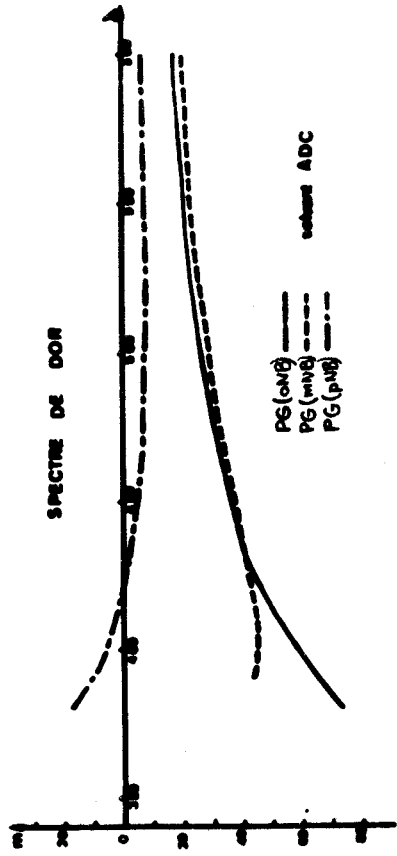
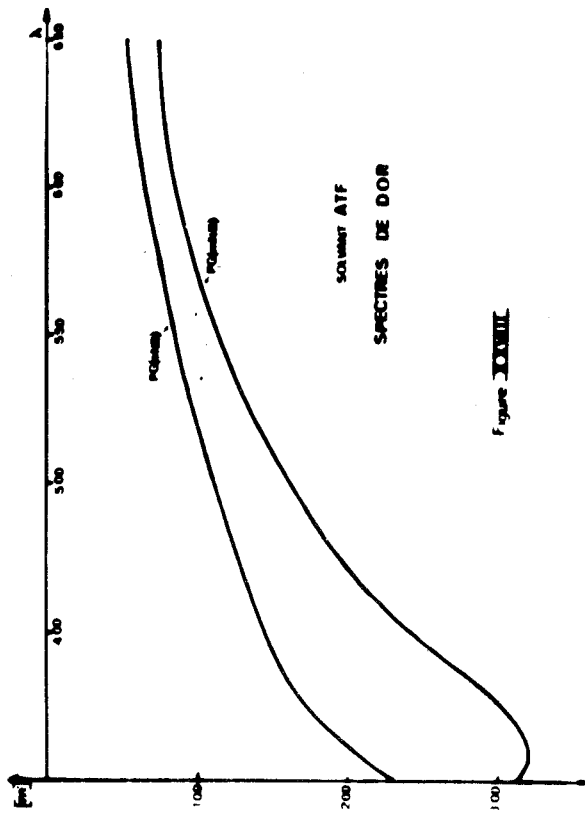
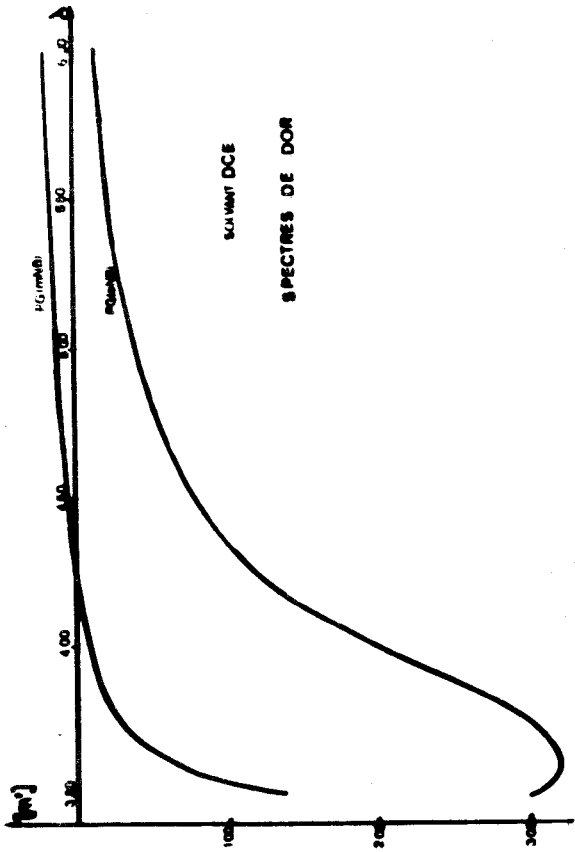
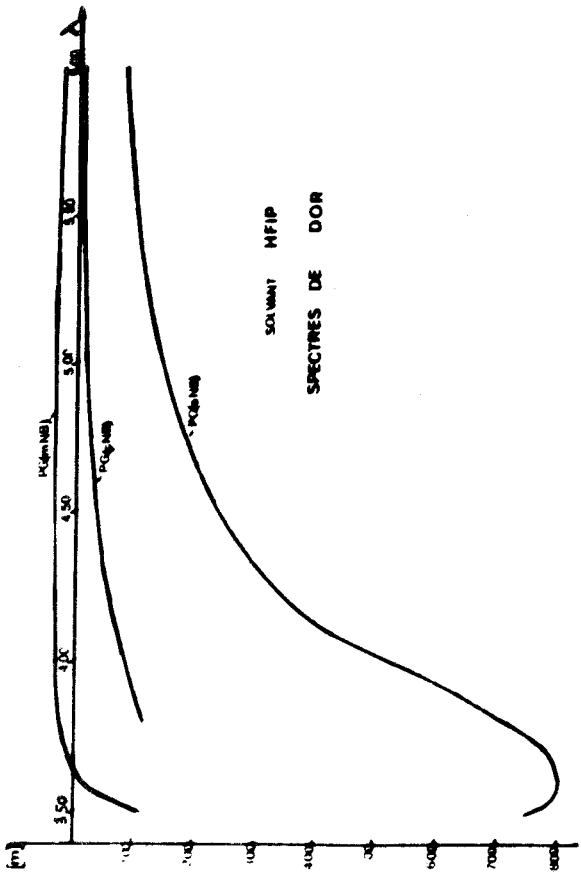


Figure XXVIII



$$(\overline{m'})_{\lambda} = \frac{2 (\theta')_i^0}{\sqrt{\pi}} \left[e^{-\left(\frac{\lambda - \lambda_i}{\Delta i}\right)^2} \int_0^{\frac{\lambda - \lambda_i}{\Delta i}} e^{y^2} dy - \frac{\Delta i}{2\lambda + \lambda_i} \right]$$

La valeur des paramètres a_0 , b_0 et A_{193}, A_{225} obtenus à partir de la courbe de DOR corrigée des effets Cotton extrinsèques est donnée dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI.

		b_0	a_0	A_{193}	A_{225}
	PG(oNB)	-917	+330	+3720	-2500
HFIP	PG(mNB)	-767	+339	+3768	-2435
	PG(pNB)	-900	-218	+2789	-2175
DCE	PG(oNB)	-860	+126	+3717	-2615
	PG(mNB)	-800	+191	+2675	-1837
ADC	PG(oNB)	≈ 0	-130'	-165	0
	PG(mNB)	≈ 0	-131	-170	0
	PG(pNB)	≈ 0	-153	-190	0
ATF	PG(oNB)	≈ 0	-364	-440	0
	PG(mNB)	≈ 0	-565	-565	0

Les points (A_{193}, A_{225}) se placent correctement sur la droite de Shechter-Blout comme le montre la figure XXIX. Le tableau XVI appelle 2 remarques:

1) Il est difficile d'interpréter d'une manière certaine le pourquoi de la valeur absolue élevée de b_0 dans les solvants favorisant la forme hélice.

L'intensité de la bande dichroïque centrée à 222nm nous apprend que les polyglutamates de nitro benzyle sont pratiquement hélicoïdaux dans HFIP et DCE; on s'attendrait donc à

.../...

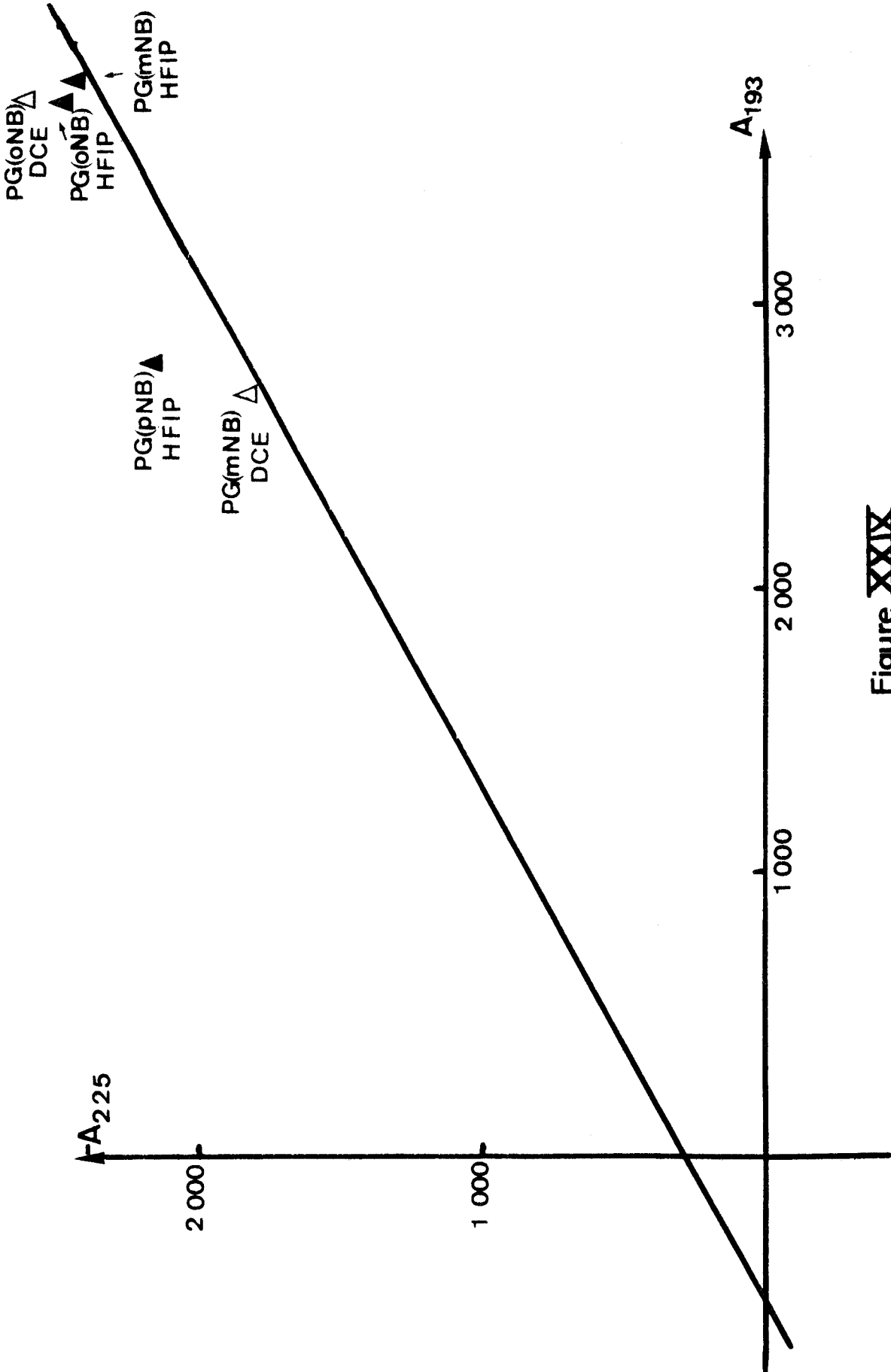


Figure XXIX



trouver $b_0 \approx - 630$.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats :

- dans le cas de nos polypeptides, la valeur du paramètre $\lambda_0 = 212\text{nm}$ de l'équation de Moffitt et Yang ne convient pas;

- il peut exister une bande dichroïque extrinsèque située à une longueur d'onde inférieure à 190 nm, inaccessible à l'expérience et dont on n'a pas tenu compte pour "calculer" la courbe de DOR due au squelette seul. Or il semble que si une telle bande n'affecte pas beaucoup la valeur de (m') dans le domaine 350-600nm, elle a une très grande influence sur la valeur de b_0 .

- enfin nous avons supposé pour faire les transformations de Kronig et Kramers que les bandes dichroïques étaient des courbes de Gauss. Ceci est toujours une approximation, d'autant plus grande que la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ extrinsèque n'a jamais l'allure d'une gaussienne. Les calculs réalisés en décomposant cette bande dichroïque en plusieurs gaussiennes donnent des valeurs de b_0 comparables.

Pour pouvoir interpréter nos résultats, il est donc nécessaire de compléter ce travail en effectuant la transformation de Kronig et Kramers point par point afin d'obtenir une meilleure courbe de DOR calculée du squelette.

2) Les polyglutamates de nitro benzyle en solution dans l'acide dichloracétique et l'acide trifluoracétique sont sous forme de pelote statistique, puisque d'une part le paramètre b_0 est pratiquement nul, et d'autre part les points (A_{193} , A_{225}) sont à proximité de la droite de Shechter et Blout.

Par conséquent, l'existence d'effets Cotton extrinsèques (Tableaux X et XI) dans l'ADC et l'ATF s'expliquent mal.

Deux causes peuvent être à l'origine de ces effets Cotton:

. une interaction entre chaînes latérales voisines.

. la possibilité pour la chaîne latérale de venir à proximité du carbone asymétrique.

.../...

La connaissance des spectres dichroïques des glutamates de nitro benzyle en solution dans l'ADC et l'ATF doit permettre de trancher. En effet, les solutions sont suffisamment diluées pour admettre que les interactions intermoléculaires sont inexistantes; par conséquent l'absence de bandes dichroïques pour les glutamates de nitro benzyle tendra à prouver que l'interaction entre les chaînes latérales des polyglutamates de nitro benzyle est à l'origine des effets Cotton extrinsèques.

β) Transformation de Kronig et Kramers point par point.

Les calculs de Kronig et Kramers point par point ont été effectués au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay.

Dans la région 240nm -410nm, les valeurs de l'ellipticité corrigée du facteur de Lorentz ont été données tous les 2nm.

Nous avons calculé b_o selon la manière décrite précédemment.

Dans le tableau XVII sont rassemblées les valeurs de b_o obtenues en faisant les transformations de Kronig et Kramers d'une part selon la méthode de Moscovitz et d'autre part en effectuant le calcul point par point.

TABLEAU XVII.

		(b_o)	(b_o)
		(Calcul selon Moscovitz)	(Transformations point par point)
HFIP	: PG(oNB)	: -917	: -1215
	: PG(mNB)	: -767	: -686
	: PG(pNB)	: -900	: -882
DCE	: PG(oNB)	: -860	: -861
	: PG(mNB)	: -800	: -757

Les courbes de dispersion optique rotatoire calculées selon la méthode de Moscovitz et par les transformations de Kronig et Kramers point par point sont voisines comme le montre la figure XXXIV.

.../...

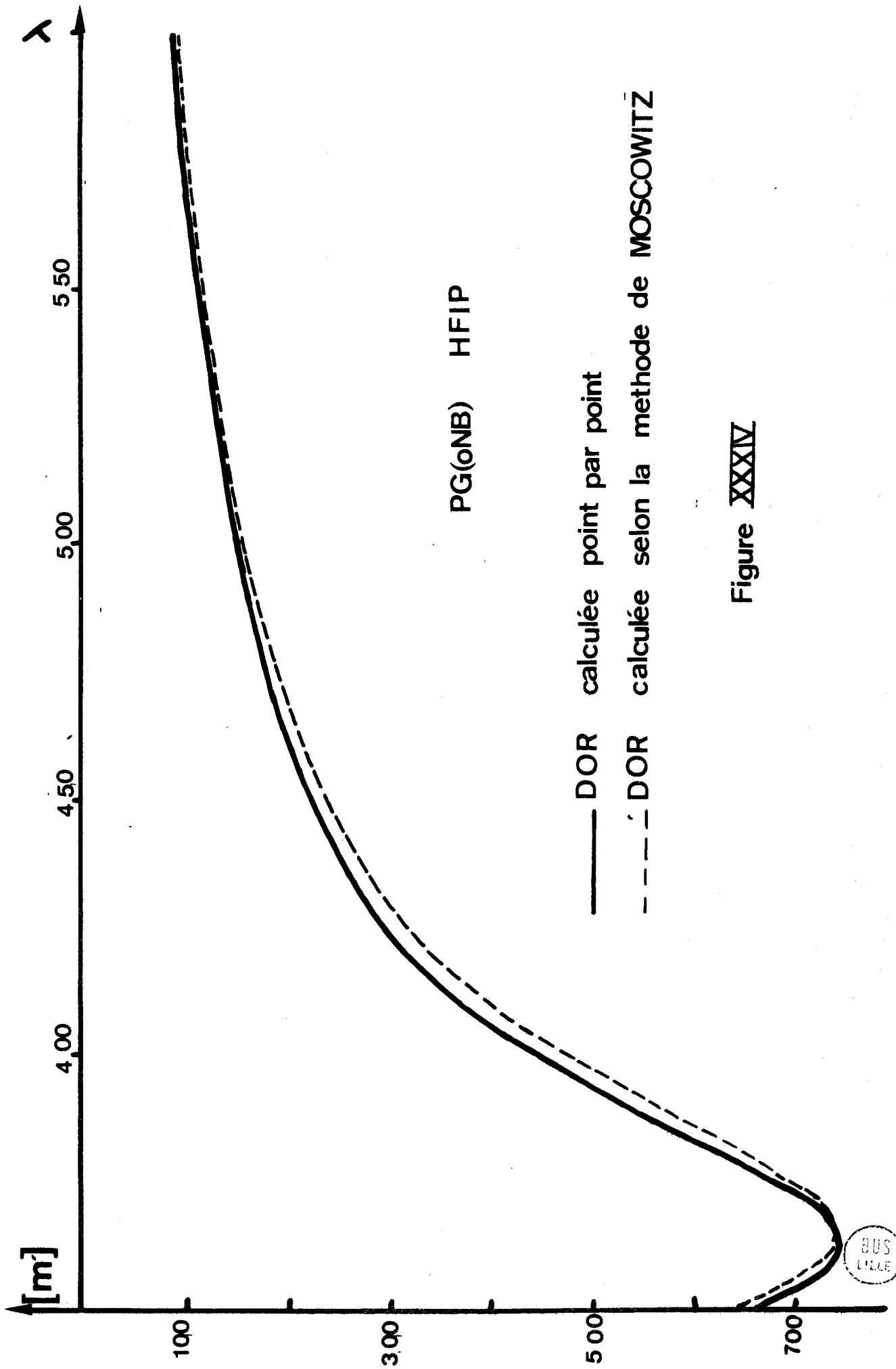


Figure XXXIV

BUS
LILLE

Les nouvelles valeurs de b_0 obtenues sont du même ordre de grandeur que celles calculées utilisant la méthode de Moscovitz, sauf pour le PG(oNB) en solution dans HFIP, et restent supérieures à -630.

Les effets Cotton extrinsèques pour le PG(oNB) en solution dans HFIP, contribuent pour la quasi totalité à la courbe de dispersion optique rotatoire (Figure XXX). Il n'en est pas de même du PG(mNB) (Figure XXXI) et du PG(pNB).

La courbe de DOR différence est donc dans ce cas entachée de plus de 50% d'erreur. Il est illusoire dans ces conditions de calculer b_0 pour le PG(oNB) en solution dans HFIP. (Figure XXXIII).

La valeur $\lambda_0 = 212\text{nm}$ semble bien convenir pour les polyglutamates de nitro benzyle, puisque, lorsqu'on porte (m') $(\lambda^2 - \lambda_0^2)$ en fonction de $\frac{1}{\lambda - \lambda_0}$, on obtient une droite comme le montre la

figure XXXII.

Il apparaît donc que l'on puisse expliquer la valeur absolue élevée de b_0 par l'existence d'une transition optiquement active due au groupement nitro benzylique, située à une longueur d'onde inférieure à 190nm.

Pour avoir une idée de l'influence d'une telle bande sur la détermination de b_0 , nous avons calculé quelle serait la contribution à la rotation molaire entre 350 et 600 nm d'une bande dichroïque située entre 200 et 150 nm, d'intensité 2000 degré cm^2 décimole⁻¹ et de demi-largeur 15nm; on peut voir dans le tableau XVII que cette contribution est importante dans la région 350nm-600nm : elle est de l'ordre de grandeur et même parfois supérieure à la rotation molaire due au squelette polypeptidique.

.../...

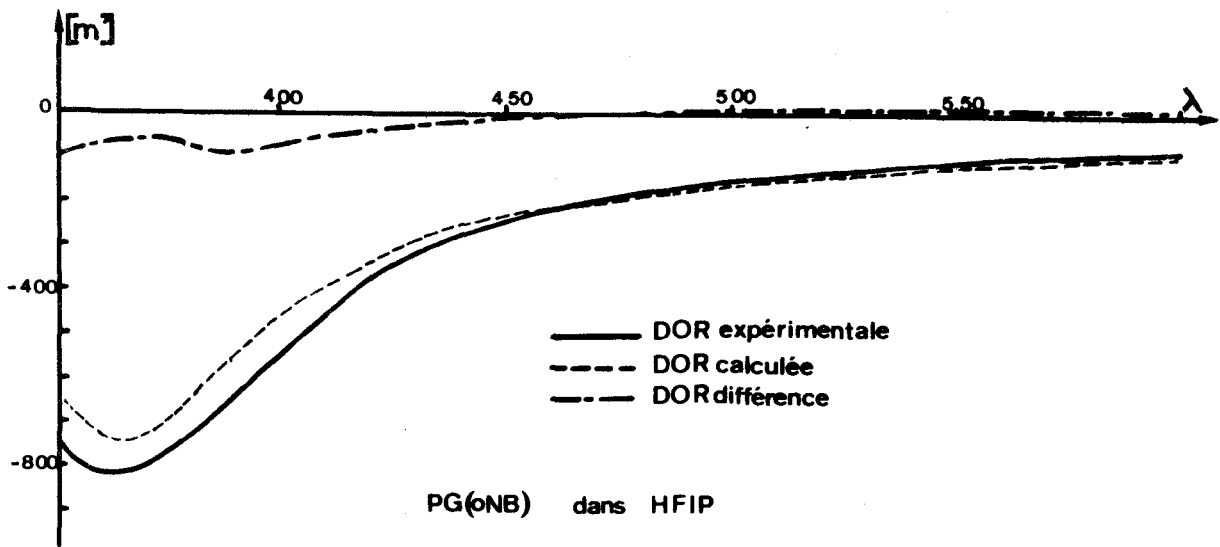


Figure ~~XXX~~

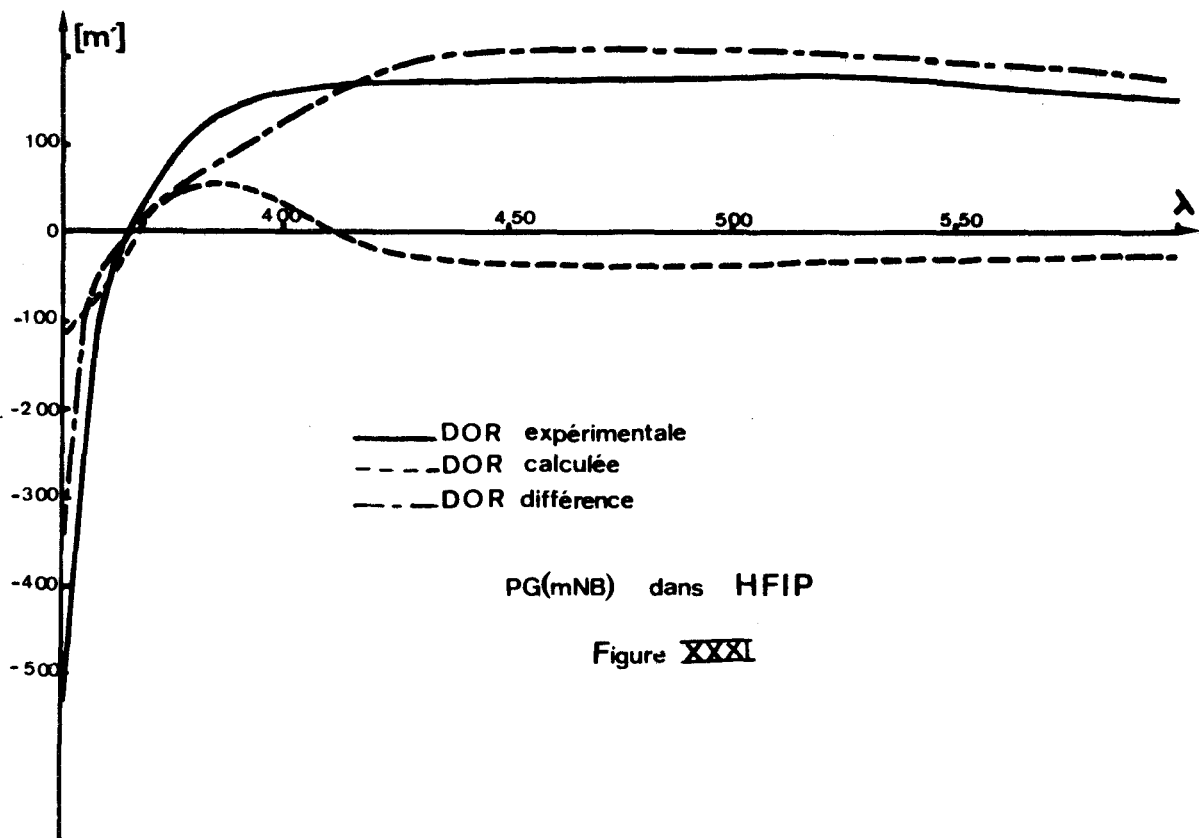
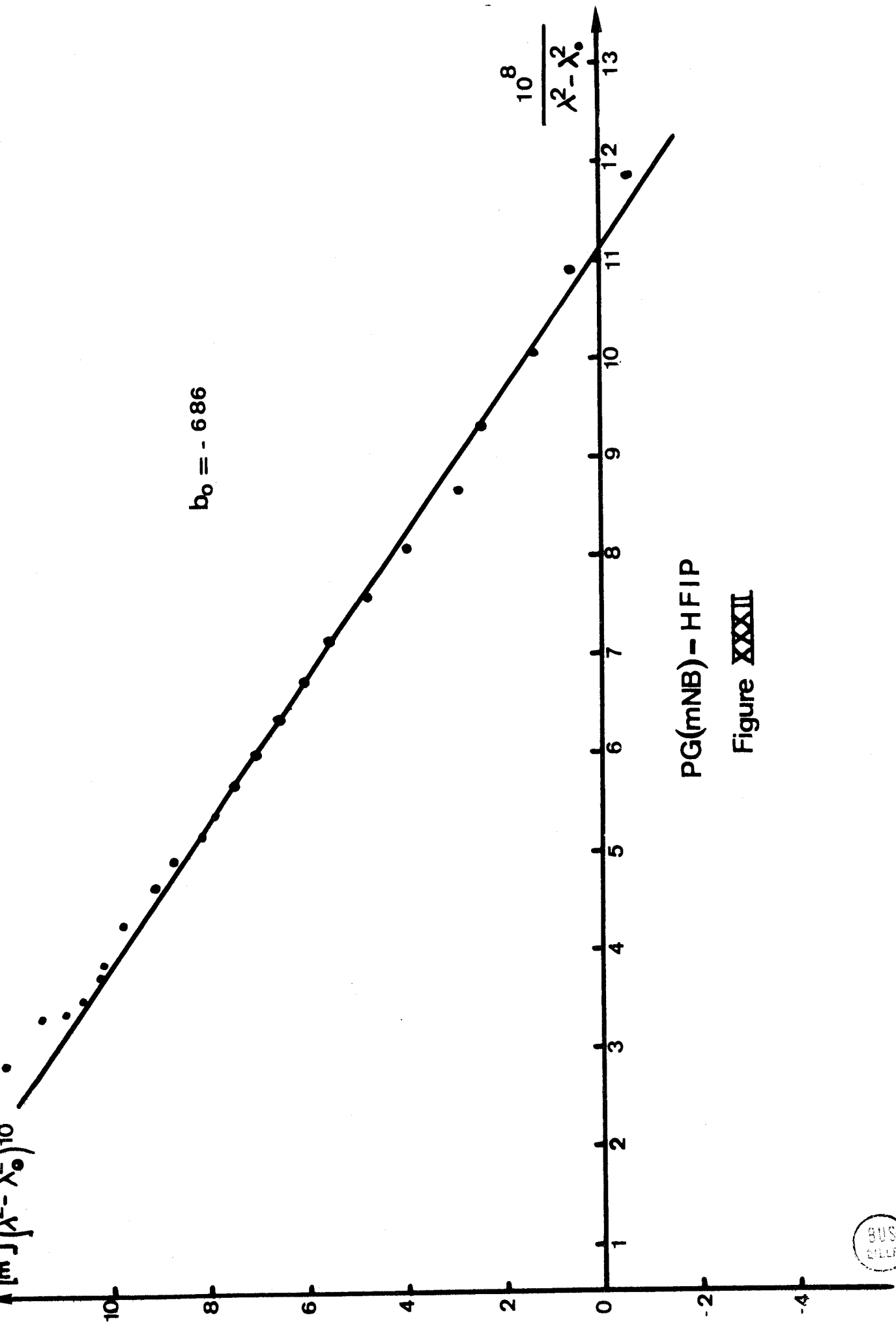


Figure ~~XXXI~~





PG(mNB) - HFIP

Figure XXXII



PG(O_NB) - HFIP

Figure XXXIII

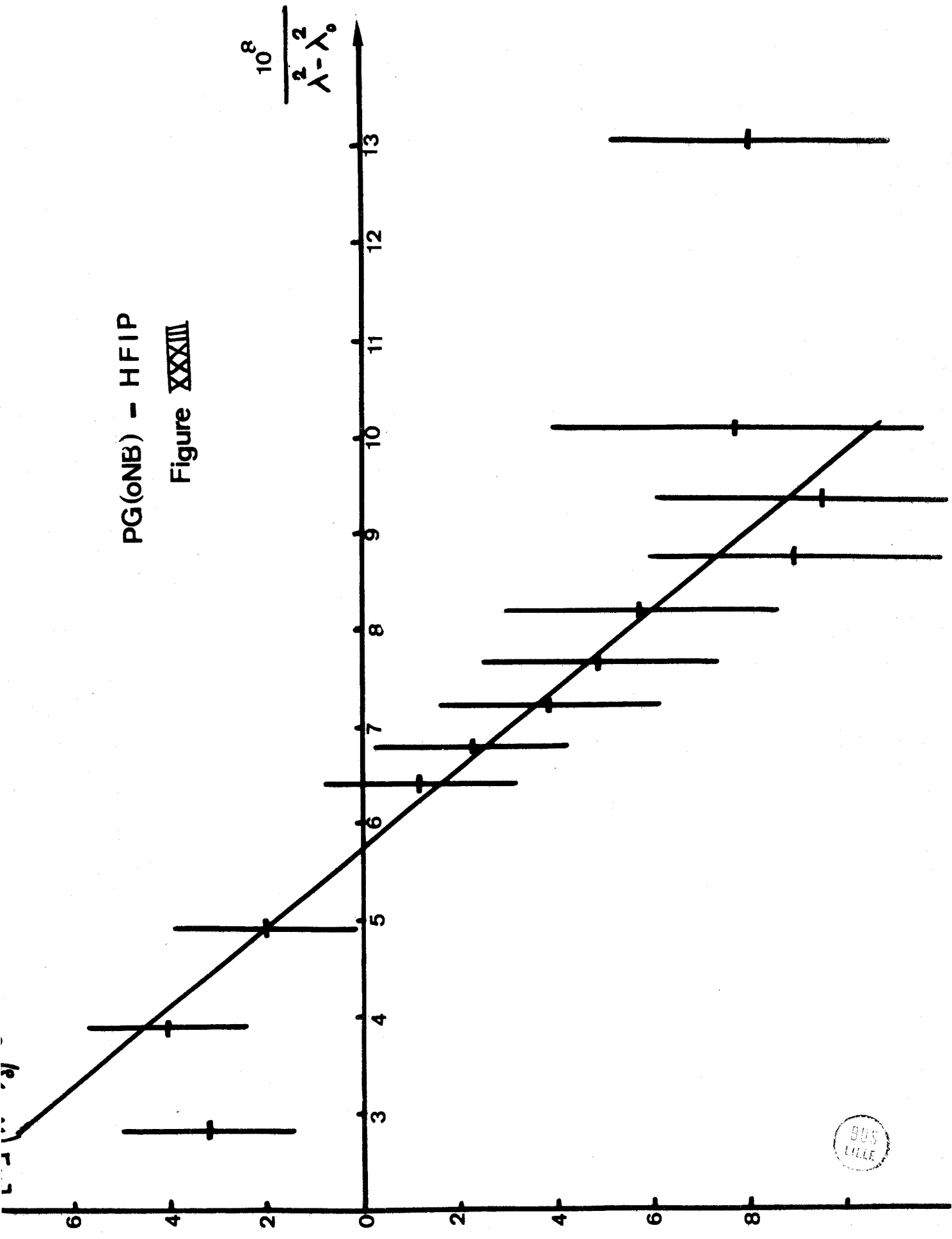


TABLEAU XVII.

({ m' } calculé à)						
(λ_i)	350nm	400nm	450nm	500nm	550nm	600nm
(200)	82,6	56,6	41,8	32,3	25,8	21,2
(190)	74,9	52,1	38,7	30,1	24,2	19,8
(180)	68	47,9	35,9	28	22,6	18,6
(170)	61,8	44	33,2	26	21	17,4
(160)	56,4	40,4	30,7	24,2	19,6	16,2
(150)	51	37	28,3	22,3	18,1	15

Nous avons calculé b_0 pour le PG(mNB) en solution dans le DCE en faisant intervenir une bande extrinsèque à 180nm et en effectuant les calculs de Kronig et Kramers selon la méthode de Moscovitz. Si on porte $(m')(\lambda^2 - \lambda_0^2)$ en fonction de $\frac{1}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$ (avec $\lambda_0 = 212\text{nm}$) on obtient encore une droite, qui fournit $\lambda_0^{-2} - 760$ pour valeur de b_0 .

Ce résultat met donc en doute l'intérêt de la connaissance de b_0 comme paramètre structural, puisqu'à partir de deux séries de valeurs de (m') différentes on obtient des résultats de b_0 comparables.

γ) Spectres dichroïques des glutamates de nitro benzyle.

Les spectres dichroïques des glutamates de nitro benzyle ont été enregistrés dans les mêmes conditions que les spectres dichroïques des polyglutamates de nitro benzyle.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVIII.

.../...

TABLEAU XVIII.

	Bande $\pi \rightarrow \pi^*$		Bande $n \rightarrow \pi^*$		Bande à transfert de charge	
	λ	$[\theta']$	λ	$[\theta']$	λ	$[\theta']$
ADC	Glu(oNB)	338 : -90			260	+515
	PG(oNB)	353 : +31	310	+84	260	-280
	Glu(mNB)					
	PG(mNB)	330 : -88	290	+115	260	-280
	Glu(pNB)		298	75	260	294
	PG(pNB)	339 : +29	278	660	250	580
ATF	Glu(oNB)	333 : -305			360	+470
	PG(oNB)	341 : +70			260	-233
	Glu(mNB)					
	PG(mNB)	330 : -172	281	+210	260	-1040

Il est surprenant de constater que le signe des bandes dichroïques extrinsèques est opposé lorsqu'on compare le monomère au polymère en solution dans le même solvant. De plus la valeur absolue de l'intensité des bandes dichroïques extrinsèques est généralement beaucoup plus grande pour le glutamate de nitro benzyle que pour le polyglutamate de nitro benzyle correspondant.

On peut penser que plusieurs causes sont à l'origine des effets Cotton extrinsèques dans les polyglutamates de benzyle.

Nous n'avons pas mis en évidence d'effets Cotton pour le glutamate de méta nitro benzyle aussi bien dans l'ATF que l'ADC. On peut dire que vraisemblablement, des interactions entre chaînes latérales voisines sont la cause principale des effets Cotton extrinsèques qui existent dans le PG(mNB).

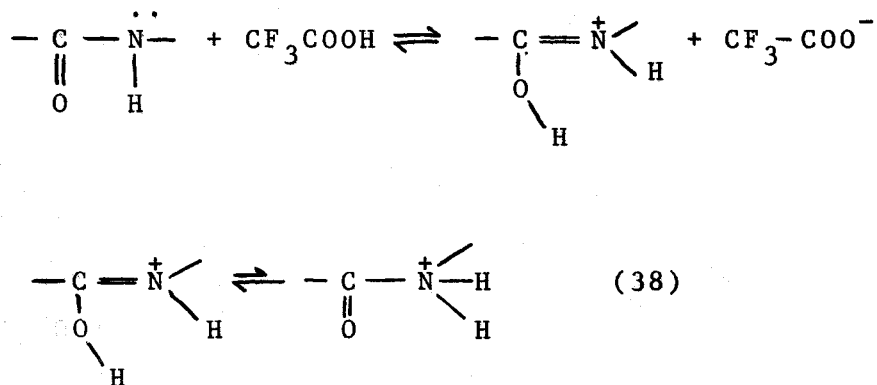
.../...

III ETUDE DE LA STABILITE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES POLY-
GLUTAMATES DANS LES SOLVANTS BINAIRES.

Les polyglutamates de nitro benzyle apparaissent donc sous forme hélicoïdale dans des solvants comme HFIP et DCE, et sous forme pelote statistique dans un solvant comme l'ADC; il est donc intéressant d'étudier la stabilité de la structure secondaire de nos polypeptides dans les solvants binaires ADC-HFIP et ADC-DCE.

De plus, il y a actuellement une controverse quant à l'existence de charges portées par le squelette d'un polypeptide en solution dans un acide "fort" comme l'acide dichloracétique ou l'acide trifluoracétique (37-46). Nous avons nous-même observé des effets polyélectrolytiques en faisant des mesures de viscosité d'une solution de polyglutamate d'ortho nitro benzyle dans l'acide dichloracétique.

Il se produit la réaction suivante :



Bradbury et Fenn (47) ont montré que cet effet polyélectrolytique pouvait être supprimé en ajoutant quelque pour cent (en volume) d'eau dans l'acide.

Il y aurait alors formation des ions H_3O^+ et CF_3COO^- grâce à l'équilibre :



.../...

Les anions CF_3COO^- feraient un écran électrostatique autour du groupement peptidique ce qui aurait pour effet de réduire les répulsions électrostatiques qui existent entre les groupes peptidiques chargés et par conséquent d'empêcher l'extension des chaînes lors des dilutions qu'on opère pour mesurer la viscosité intrinsèque.

On peut se demander dans quelle mesure l'addition d'eau n'entraîne pas un changement de configuration des polypeptides. C'est pour répondre à cette question que nous avons également étudié la stabilité de la structure secondaire des polyglutamates en solution dans le solvant binaire ADC-eau.

Cette étude a été faite par dichroïsme circulaire, en suivant les variations d'intensité de la bande extrinsèque $\pi \rightarrow \pi^*$.

Trois raisons ont guidé ce choix :

- cette bande est toujours présente quels que soient le polypeptide et le solvant;
- elle est très accessible à l'expérience, et donne des bandes facilement exploitables;
- enfin, c'est une bande extrinsèque sensible à la variation de structure secondaire du polypeptide;

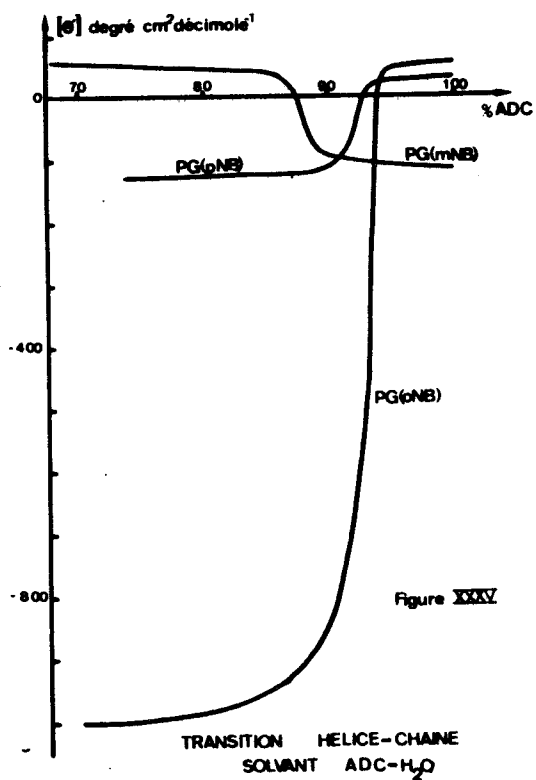
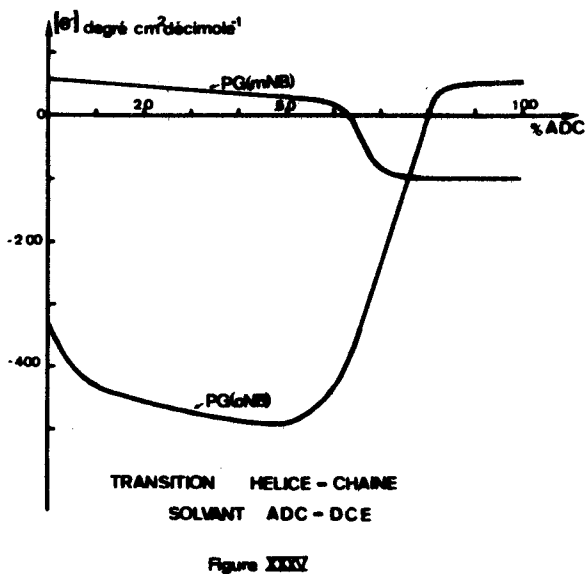
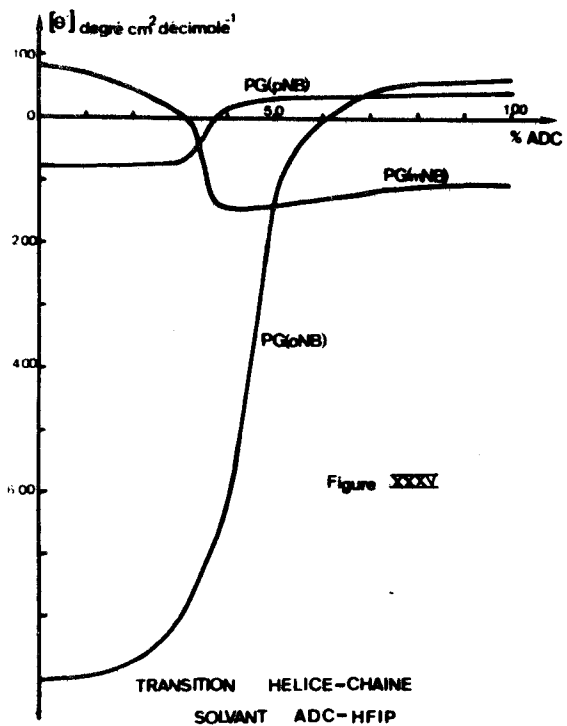
RESULTATS.

		PG(oNB)	PG(mNB)	PG(pNB)
HFIP-ADC	% ADC	46%	37%	36,5%
DCE-ADC	%ADC	72%	64%	Précipite avant la transition
H ₂ O-ADC	% ADC	92,5%	88%	91,5%

cf Figure XXXV.

L'hélice du PG(oNB) apparaît toujours la plus stable quel que soit le solvant binaire.

.../...



La quantité d'eau correspondant à la transition, est supérieure à celle qu'il est nécessaire d'ajouter à une solution dans l'ADC pour détruire l'effet polyélectrolytique.

INTERPRETATION DES RESULTATS

On peut s'attendre à ce que la plus grande stabilité pour l'hélice du polymère d'ortho nitro benzyle soit due à une plus grande interaction entre les chaînes latérales. Or nous avons vu précédemment que l'intensité des bandes dichroïques extrinsèques ne pouvait être considérée de façon simple. Mais pour les trois polymères considérés, la bande dichroïque extrinsèque correspondant à la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est plus intense pour le dérivé ortho que pour les deux autres polymères. Ceci pourrait donc vouloir dire que la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ à 350nm est surtout due aux interactions entre les groupements chromophores extrinsèques.

CHAPITRE III

ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE
NITRO BENZYLE

PAR SPECTROPHOTOMETRIE INFRA ROUGE

I ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES POLYPEPTIDES PAR SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE.

a) Historique.

La spectroscopie infra-rouge a été employée depuis plusieurs années comme une technique de recherche dans la chimie des protéines; elle a commencé avec les premières études de STAIR et COBLINZ en 1935 (48). Les déplacements de bandes observés lorsque la nature de la protéine changeait, étaient généralement ignorés, bien que KLOTZ (49) suggéra alors que les petites variations dans la position des bandes dues au groupement peptidique, reflétaient des différences de conformation spécifiques du squelette.

Un léger progrès fut réalisé lorsqu'on essaya de relier les résultats obtenus sur les polypeptides par spectroscopie IR à ceux obtenus par diffraction des rayons X (50).

Quatre bandes ont alors été identifiées.

- une bande intense vers 3300 cm^{-1} : la bande amide A
- une faible bande vers 3100 cm^{-1} : la bande amide B
- une bande intense vers $1630-1660 \text{ cm}^{-1}$: la bande amide I
- une bande intense vers $1520-1550 \text{ cm}^{-1}$: la bande amide II.

La première indication que la spectroscopie infra-rouge put apporter, quant à l'orientation des groupements peptidiques dans les différentes conformations des chaînes peptidiques, résulte des travaux d'AMBROSE et HANBY en IR polarisé sur le polyglutamate de méthyle et l' α kératine (50).

Ces études furent ensuite étendues par AMBROSE et ELLIOTT (51) à la région des bandes amide I et II; ils concluent que la direction de la liaison N-H est parallèle à l'axe de la fibre étudiée dans le polyglutamate de méthyle dont la structure secondaire en hélice α a été identifiée depuis (52) et qu'elle

est perpendiculaire à la direction de la fibre dans la structure β .

TABLEAU XIX.

	Fréquence		Dichroïsme	
	Hélice α	Structure β	Hélice α	Structure β
N-H vibration de valence	3300	3300	//	\perp
C=O vibration de valence (Amide I).	1660	1640	//	\perp
N-H déformation (Amide II).	1545	1525	\perp	//

Parallèlement, MIZUSHIMA et ses collaborateurs entreprennent l'étude du spectre infra-rouge des amides et des amides deutérées qui sont des modèles simples de polypeptides et de protéines. Ils montrent que le groupement peptidique possède la conformation trans dans les polypeptides et les protéines (53).

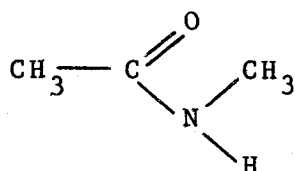
Ce travail est à la base de l'étude théorique et de l'interprétation des spectres infra-rouges des polypeptides faites par MIYAZAWA en vue d'atteindre la structure secondaire des polypeptides (54-55).

b) Bandes d'absorption du groupement peptidique.

Dans la région $4000 \text{ cm}^{-1} - 200 \text{ cm}^{-1}$ les polypeptides et les amides de bas poids moléculaire possèdent 9 bandes caractéristiques qui ont été identifiées comme étant des modes complexes de vibration du groupe $-\text{C}-\text{N}-$ (54-55).



Les résultats obtenus sur la N méthyle acétamide



sont indiqués ci-après :

.../...

	- bande amide A	$\bar{\nu} = 3\ 280\ \text{cm}^{-1}$	forte
	- bande amide B	$\bar{\nu} = 3\ 090\ \text{cm}^{-1}$	faible
Vibration dans le plan	- bande amide I	$\bar{\nu} = 1\ 653\ \text{cm}^{-1}$	
	- bande amide II	$\bar{\nu} = 1\ 567\ \text{cm}^{-1}$	
	- bande amide III	$\bar{\nu} = 1\ 299\ \text{cm}^{-1}$	
	- bande amide IV	$\bar{\nu} = 627\ \text{cm}^{-1}$	
Vibration hors du plan	- bande amide V	$\bar{\nu} = 725\ \text{cm}^{-1}$	
	- bande amide VI	$\bar{\nu} = 600\ \text{cm}^{-1}$	
	- bande amide VII	$\bar{\nu} = 206\ \text{cm}^{-1}$	

BADGER et PULLIN (56) ont suggéré que les bandes amide A et amide B étaient la conséquence d'un phénomène de résonance de FERMI, il y aurait en effet interaction entre la vibration de valence du groupement NH lorsqu'il existe des liaisons hydrogène ($\bar{\nu} = 3\ 236\ \text{cm}^{-1}$) et la seconde harmonique de la bande amide II ($\bar{\nu} = 2 \times 1\ 567\ \text{cm}^{-1} = 3\ 134\ \text{cm}^{-1}$). Cette hypothèse a été vérifiée par MIYAZAWA (57).

Les propriétés dichroïques rassemblées dans le tableau ~~XIX~~ sont utiles que pour une détermination rapide de conformation.

En fait, les moments de transition, et les énergies de modes de vibration des groupements peptidiques individuels, ne sont pas seulement influencés par les liaisons hydrogène, mais aussi par des phénomènes de couplage intra et inter moléculaire qui dépendent principalement de la conformation de la chaîne polypeptidique.

En sélectionnant les bandes amide I et amide II, MIYAZAWA (58-59) calcule les variations de fréquence dues aux couplages précédemment définies.

Dans une conformation régulière de polypeptide, la fréquence naturelle $\bar{\nu}_0$ d'un mode de vibration donné, d'un groupement peptidique lié à des groupements voisins par des liaisons hydrogène, est perturbée par le couplage avec la même vibration des groupes voisins. Il y a deux sortes de couplage :

.../...

- le couplage intrachaine, par l'intermédiaire de carbone C_{α} ou, par l'intermédiaire de la liaison hydrogène intramoléculaire.

- le couplage interchaîne grâce aux liaisons hydrogène.

La fréquence perturbée résultante, dont la phase est δ par rapport au mouvement de ses voisins les plus proches, est donnée par:

$$\bar{\nu}(\delta) = \bar{\nu}_0 + \sum_s D_s \cos(s\delta) + \sum_{s'} D_{s'} \cos(s'\delta')$$

relation dans laquelle :

D_s est la constante de couplage qui caractérise les interactions intrachaines avec le $s^{\text{ième}}$ voisin adjacent.

$D_{s'}$ est la constante de couplage qui caractérise les interactions interchaines.

Les mouvements permis dans ces conditions de couplage sont gouvernés par des règles de sélection qui dépendent de la géométrie de la structure.

Dans le cas d'une chaîne β , on observe deux types de transitions permises :

- les moments de transition sont en phase, et leur vecteur somme est parallèle à l'axe de la chaîne ;

- les moments de transition sont en opposition de phase, et leur vecteur somme est perpendiculaire à l'axe de la chaîne.

Les fréquences correspondantes sont :

$$\bar{\nu}_{\parallel}(0) = \bar{\nu}_0 + D_1$$

$$\bar{\nu}_{\perp}(\pi) = \bar{\nu}_0 - D_1$$

De plus, les groupements peptidiques forment des liaisons hydrogène avec d'autres groupes peptidiques appartenant à une chaîne adjacente, également sous forme β . Il y a alors dédoublement des bandes perpendiculaire et parallèle, d'où quatre combinaisons possibles de phases.

.../...

. pour une structure β anti parallèle, on a :

$$\bar{\nu}_{//}(0,0) = \bar{\nu}_0 + D_1 + D'_1$$

$$\bar{\nu}_{\perp}(\pi,0) = \bar{\nu}_0 - D_1 + D'_1$$

$$\bar{\nu}_{//}(0,\pi) = \bar{\nu}_0 + D_1 - D'_1$$

$$\bar{\nu}_{\perp}(\pi,\pi) = \bar{\nu}_0 - D_1 - D'_1$$

La bande $\bar{\nu}_{//}(0,0)$ est inactive en infra-rouge.

. lorsqu'on a affaire à une structure β parallèle, les transitions $\bar{\nu}_{//}(0,\pi)$ et $\bar{\nu}_{\perp}(\pi,\pi)$ sont inactives il reste donc :

$$\bar{\nu}_{//}(0,0) = \bar{\nu}_0 + D_1 + D'_1$$

$$\bar{\nu}_{\perp}(\pi,0) = \bar{\nu}_0 - D_1 + D'_1$$

Dans le cas d'une hélice, la phase de la vibration des groupements peptidiques d'une même macromolécule peut en principe avoir n'importe quelle valeur. En fait, deux valeurs de la phase conduisent à une somme non nulle des moments de transition :

$\delta = 0$ ce qui donne un moment de transition parallèle à l'axe de l'hélice.

$\delta = \alpha$ ce qui donne un moment de transition perpendiculaire à l'axe de l'hélice.

α étant l'angle de rotation autour de l'axe de l'hélice, qui permet de passer d'un motif monomère au suivant :

$$\text{On a } \alpha = \frac{2\pi}{n}$$

n : nombre de motifs monomère par tour d'hélice.

Pour l'hélice α de PAULING et COREY; il y a 3,6 unités monomère par tour d'hélice

$$\alpha = \frac{2\pi}{3,6} \quad \alpha = 100^\circ.$$

.../...

Selon MIYAZAWA, dans une hélice α , un groupement peptidique interagit avec son voisin et son troisième voisin. On a donc :

$$\bar{\nu}_{//}(0) = \bar{\nu}_0 + D_1 + D_3$$

$$\bar{\nu}_{\perp}(0) = \bar{\nu}_0 + D_1 \cos 100^\circ + D_3 \cos 300^\circ$$

$$\bar{\nu}_{\perp}(0) = \bar{\nu}_0 - 0,17 D_1 + 0,50 D_3$$

Le calcul de $\bar{\nu}_0$, D_s et D_s , a été fait ensuite par MIYAZAWA et BLOUT (59) en supposant que la valeur de ces grandeurs n'était pas affectée par la nature de la structure secondaire du polypeptide et qu'elles étaient indépendantes de l'encombrement de la chaîne latérale. Trois macromolécules modèles ont été prises pour faire ce calcul : le nylon 6-6 pour les termes D' , la polyglycine II (structure β) et le polyglutamate de benzyle partiellement deutéré (hélice α).

Ces calculs ont été revus par la suite par KRIMM(60) qui fixe $\bar{\nu}_0 = 1\,520\text{ cm}^{-1}$ pour la valeur amide II non perturbée, et fait intervenir un terme en D_2 , primitivement négligé par MIYAZAWA? (Tableaux XX et XXI).

c) Exploitation des spectres expérimentaux. Rappels théoriques.

A partir des spectres expérimentaux sur des films orientés, on peut déterminer les rapports dichroïques qui permettent d'atteindre l'angle θ que font les moments de transition d'un groupement avec la direction d'orientation du film.

TSUBOI (61) a déterminé l'orientation des moments de transition des bandes amide sur des films de polyglutamate de benzyle; il obtient des valeurs en bon accord avec celles prédites pour une hélice α . De plus, il a pu déterminer la position des moments de transition des chaînes latérales.

Les différences observées reflètent les erreurs inhérentes aux mesures expérimentales, à la mauvaise orientation des échantillons, aux hypothèses faites pour calculer les rapports

.../...

TABLEAU XX.

STRUCTURE SECONDAIRE	AMIDE I		AMIDE II	
	MIYAZAWA BLOUT	KRIMM	MIYAZAWA BLOUT	KRIMM
Pelote statistique:	$\bar{\nu}_0 = 1658\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_0 = 1658\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_0 = 1535\text{cm}^{-1}$	$\bar{\nu}_0 = 1520\text{cm}^{-1}$
Hélice α	$D_1 = 10$	$D_1 = 8$	$D_1 = -21$	$D_1 = 10$
	$D_3 = -18$	$D_2 = 2$ $D_3 = -18$	$D_3 = 2$	$D_2 = -24$ $D_3 = +10$
Chaîne β parallèle	$D_1 = 8$	$D_1 = 8$	$D_1 = -10$	$D_1 = -10$
	$D'_1 = -18$	$D'_1 = -18$	$D'_1 = 5$	$D'_1 = +20$
Chaîne β anti- parallèle	$D_1 = 8$	$D_1 = 8$	$D_1 = -10$	$D_1 = -10$
	$D'_1 = -18$	$D'_1 = -18$	$D'_1 = -5$	$D'_1 = -20$



dichroïques à partir des résultats expérimentaux. Cependant même des valeurs approximatives sont utiles pour donner une idée de l'orientation des chaînes latérales.

α) Intensité d'une bande d'absorption.

L'intensité I d'une bande d'absorption infra-rouge est proportionnelle au carré du produit scalaire du moment de transition entre les deux états vibrationnels l et m , \vec{R}_{lm} par le vecteur champ électrique incident.

$$\vec{R}_{lm} = \int \psi_l^* \vec{\mu} \psi_m d\tau$$

ψ_l et ψ_m étant les fonctions d'onde associées respectivement aux états vibrationnels l et m ;

ψ_l^* désigne la fonction d'onde conjuguée de ψ_l .

$\vec{\mu}$ moment dipolaire.

$$I = K (\vec{E} \cdot \vec{R}_{lm})^2$$

$$I = K E^2 R_{lm}^2 \cos^2 \alpha$$

$$\alpha = (\vec{E}, \vec{R}_{lm})$$

Lorsqu'on a affaire à un échantillon orienté, l'amplitude de la bande est donc maximum lorsque le moment de transition est parallèle au vecteur champ électrique incident; elle est nulle lorsque le moment de transition est perpendiculaire au vecteur champ électrique.

β) Définition du rapport dichroïque R

On dit qu'il y a dichroïsme linéaire lorsque l'intensité et la position de la bande d'absorption sont fonction de l'orientation relative du vecteur champ électrique incident et de la direction d'orientation de l'échantillon.

.../...

On définit pour un mode de vibration déterminé le rapport dichroïque R par la relation :

$$R = \frac{\int_0^{\infty} \epsilon_{//}(\nu) d\nu}{\int_0^{\infty} \epsilon_{\perp}(\nu) d\nu}$$

ν fréquence

$\epsilon_{//}(\nu)$ coefficient d'extinction molaire lorsque la radiation incidente est parallèle à la direction d'orientation.

$\epsilon_{\perp}(\nu)$ coefficient d'extinction molaire lorsque la radiation incidente est perpendiculaire à la direction d'orientation.

γ) Rapport dichroïque expérimental.

On définit un rapport dichroïque expérimental R' :

$$R' = \frac{D_{//}(\nu_0)}{D_{\perp}(\nu'_0)} = \frac{\log \left(\frac{I_0}{I} \right)_{//}}{\log \left(\frac{I_0}{I} \right)_{\perp}}$$

$D_{//}$ densité optique mesurée lorsque \vec{E} est parallèle à la direction d'orientation.

D_{\perp} densité optique mesurée lorsque \vec{E} est perpendiculaire à la direction d'orientation.

ν_0, ν'_0 fréquences d'absorption maximum.

On a montré (62) que si une bande d'absorption peut être représentée par une équation du type de Lorentz

$$\epsilon(\nu) = \frac{a^2}{(\nu - \nu_0)^2 + b^2} \quad (2)$$

alors

$$R = \frac{\epsilon_{//}(\nu_0)}{\epsilon_{\perp}(\nu'_0)}$$

.../...

La mesure de la densité optique au maximum d'absorption est donc justifiée à condition que l'équation (2) soit vérifiée. R' s'identifie alors à R.

δ) Causes d'erreur sur la détermination du rapport dichroïque.

De nombreuses causes d'erreur viennent fausser les valeurs expérimentales de rapports dichroïques :

- le recouvrement partiel de deux bandes voisines.
- les pertes par diffusion et réflexion.
- une polarisation imparfaite du polariseur.
- une polarisation parasite par le spectrophotomètre.
- la biréfringence.
- l'orientation imparfaite de l'échantillon.

Toutes ces causes d'erreur impliquent donc de travailler sur un appareil d'excellente qualité avec un film le mieux orienté et le plus transparent possible.

ε) Relation entre le rapport dichroïque et les caractéristiques de l'échantillon.

Lorsque l'on prépare un film orienté de polypeptides sous forme hélice α , les chaînes polypeptidiques tendent à se placer suivant la direction de l'étirement. cf Figure XXXVI.

Supposons que l'axe \vec{OZ} soit la direction d'orientation du film, et que le moment de transition \vec{R} fasse un angle θ avec \vec{OZ} :

- Si le film est parfaitement orienté, alors l'extrémité du vecteur \vec{R} se trouve sur un cône de demi-angle au sommet θ :

$$R(\theta) = \frac{\epsilon_{//}}{\epsilon_{\perp}} = \frac{\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \cos^2 \theta \, d\phi}{\frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \sin^2 \theta \sin^2 \phi \, d\phi} = \frac{\cos^2 \theta}{\frac{\sin^2 \theta}{2}}$$

$$R(\theta) = \frac{2}{\operatorname{tg}^2 \theta}$$

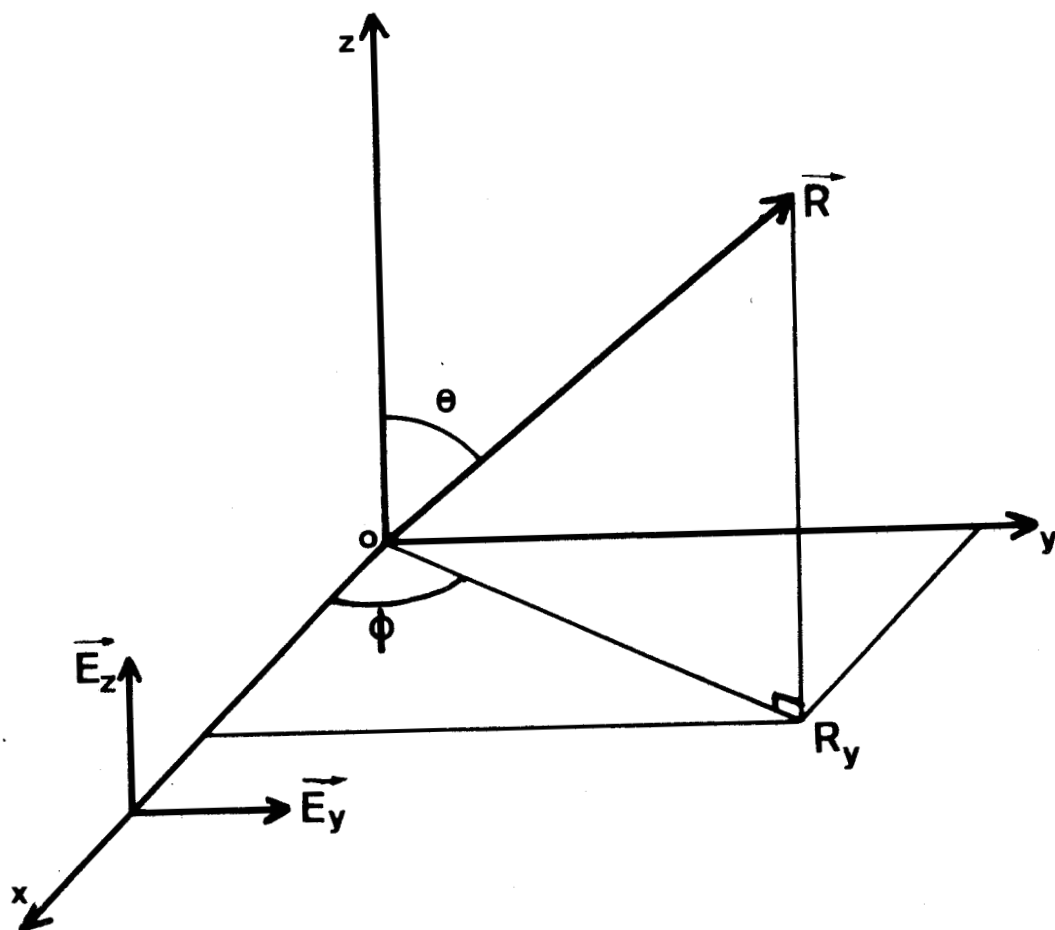


Figure ~~XXXVI~~

En pratique, l'orientation des chaînes polypeptidiques n'est jamais parfaite et on peut considérer que l'échantillon contient une fraction f de chaînes orientées, le rapport dichroïque devient alors :

$$R(\theta, f) = \frac{f \cos^2 \theta + (1-f) \frac{\int_0^\pi 2\pi \sin \theta \cos^2 \theta d\theta}{\int_0^\pi 2\pi (1-\cos \theta) d\theta}}{f \frac{\sin^2 \theta}{2} + (1-f) \frac{\int_0^\pi \pi \sin^3 \theta d\theta}{\int_0^\pi 2\pi (1-\cos \theta) d\theta}}$$

$$R(\theta, f) = \frac{f \cos^2 \theta + \frac{1}{3} (1-f)}{f \frac{\sin^2 \theta}{2} + \frac{1}{3} (1-f)}$$

si on pose $g = \frac{2}{3} \frac{1-f}{f}$, alors

$$R(\theta, g) = \frac{2 \cos^2 \theta + g}{\sin^2 \theta + g} \quad (3)$$

La difficulté est de déterminer f .

ζ) Détermination de f

1. Calcul selon TSUBOI. (61)

Etant donnée la valeur de l'angle θ pour la transition amide II, la bande observée est très faible, lorsque le vecteur champ électrique est parallèle à la direction d'orientation.

A partir d'un grand nombre d'échantillons de polyglutamate de benzyle TSUBOI sélectionne ceux pour lesquels la bande à 1549 cm^{-1} est la plus faible, et il admet dans ce cas $g = 0$; il trouve un rapport dichroïque de 0,016 pour la bande amide II; donc dans ce cas :

.../...

$$0,016 = \frac{2}{\operatorname{tg}^2 \theta}$$

Il en déduit ainsi la valeur de θ pour la bande amide II; il est alors aisé par la suite de calculer g pour un autre échantillon, en utilisant l'équation (3)

2. Calcul selon Fraser et ses collaborateurs.

Fraser s'intéresse à la vibration amide A; connaissant l'angle θ pour cette vibration, il en déduit une valeur R_o du rapport dichroïque qu'aurait le film s'il était parfait (63).

$$R_o = \frac{2}{\operatorname{tg}^2 \theta}$$

f serait alors relié à R_o par la relation :

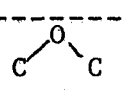
$$f = \frac{(R-1)(R_o+2)}{(R_o-1)(R+2)}$$

R étant le rapport dichroïque expérimental correspondant à la bande amide A. Nous avons vérifié que ces deux possibilités de calcul conduisaient au même résultat pour le PGB.

II ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE PAR SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE EN LUMIERE NATURELLE.

Les spectres infra-rouges obtenus en lumière naturelle ont été enregistrés sur le spectrophotomètre Perkin-Elmer PE 257 à partir des films non orientés des polypeptides. Les fréquences des vibrations amide A, amide B, C=O ester, amide I et ϕ -NO₂ sont rassemblées dans le tableauXXII pour les trois polyglutamates de nitro benzyle.

TABLEAU XXII.

	PG(oNB)	PG(mNB)	PG(pNB)
Amide A ①	3295	3290	3310
Amide B ②	3070	3075	3080
-CH ₂ - ③	2945	2940	2950
-CH- 	2870	2880	2870
C=O ester ④	1740	1737	1740
Amide I ⑤	1660	1657	1657
Amide II ⑥	1550	1545	1545
φNO ₂ ⑦	1530	1530	1525
-CH ₂ - et ⑧	1450	1450	1450
C=C (φ)			
φNO ₂ ⑨	1345	1355	1350
 ⑩	1165	1170	1165
Substitut. ⑪	860 790 730	895 810 735	860 810 740

$\bar{\nu}$ en cm⁻¹ . cf Figure XXXVII.

La détermination des fréquences des vibrations est faite à ± 5 cm⁻¹.

Les valeurs des fréquences caractéristiques des différentes structures secondaires sont très voisines et se superposent même comme le montre le tableau XXI; il n'est donc pas possible, étant donnée la précision de nos mesures, de déterminer avec certitude la configuration de nos polypeptides à partir des seuls résultats obtenus par spectrophotométrie infra-rouge en lumière naturelle. Il est impératif de compléter cette étude en faisant des mesures de dichroïsme linéaire infra-rouge sur des films orientés.

.../...

SPECTRE I.R. DU PG(ONB)

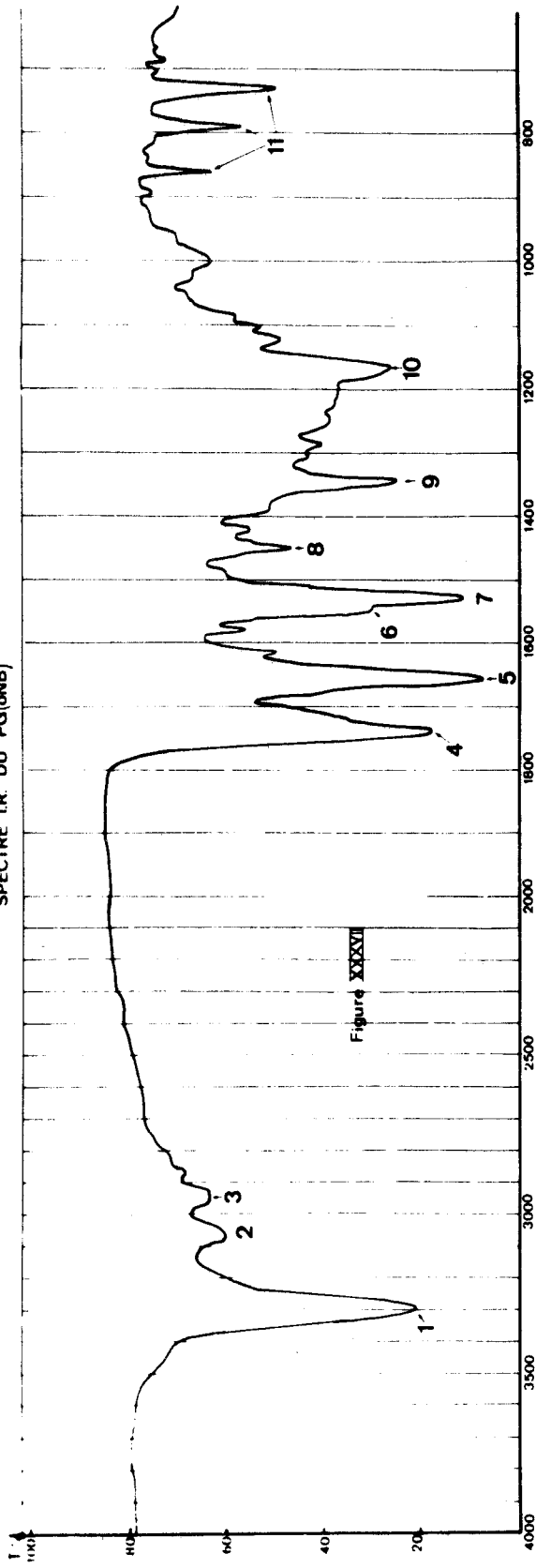


Figure XXXVII

SPECTRE I.R. DU PG(mNB)

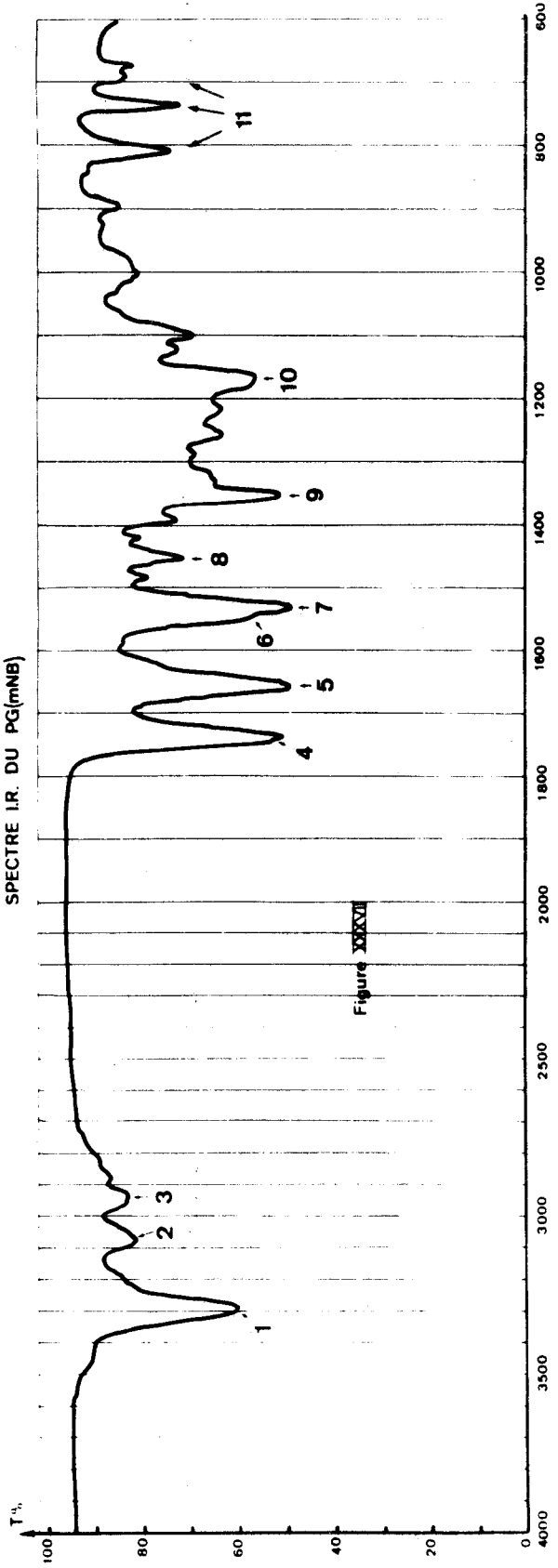
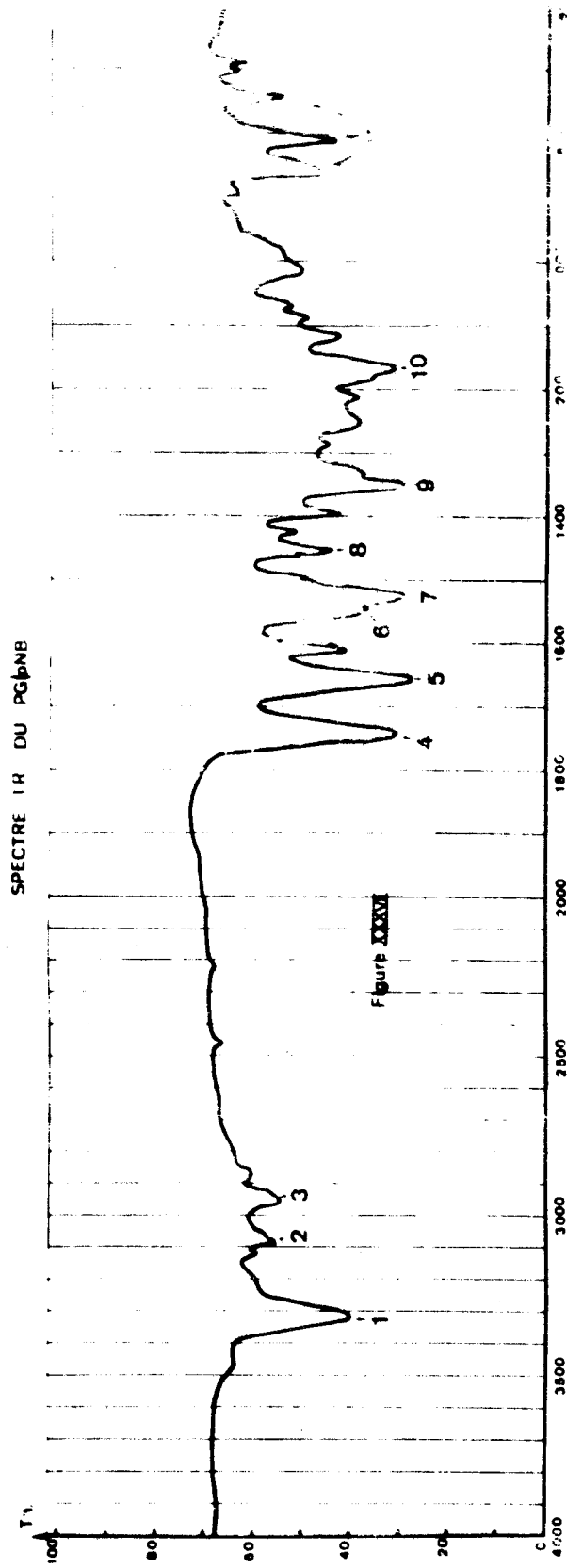


Figure XXXVIII





III ETUDE DES POLYGLUTAMATES DE NITRO BENZYLE PAR SPECTROPHOTOMETRIE INFRA-ROUGE EN LUMIERE POLARISEE.

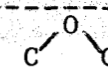
a) Préparation des films orientés.

Les films ont été obtenus à partir de solutions concentrées de polyglutamates de nitro benzyle dans l'hexafluoroisopropanol : on dépose quelques gouttes de la solution sur un cylindre de verre que l'on fait tourner à une vitesse d'environ 60 tours par minute; on applique ensuite une plaque de verre sur le cylindre, ce qui donne un film enroulé et orienté autour du cylindre. Puis le film est décollé en utilisant une lame de rasoir, et disposé sur un support plan. Nous avons sélectionné les meilleurs films en utilisant un microscope polarisant.

b) Résultats expérimentaux.

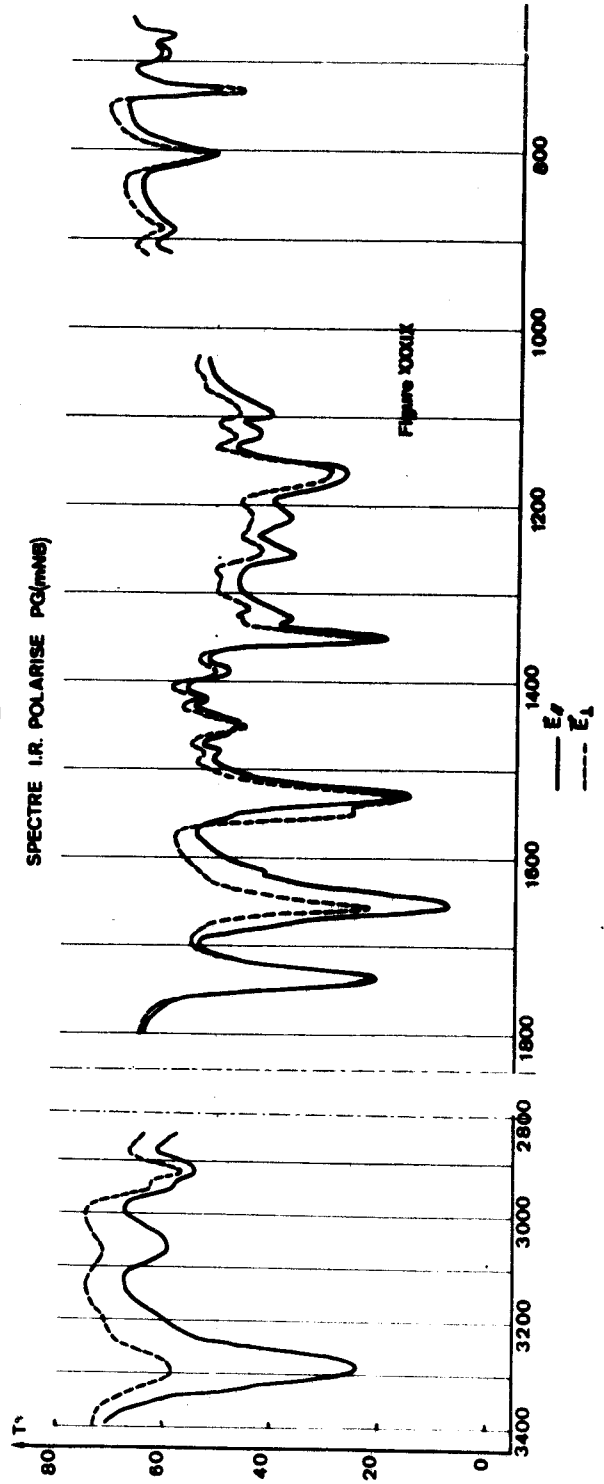
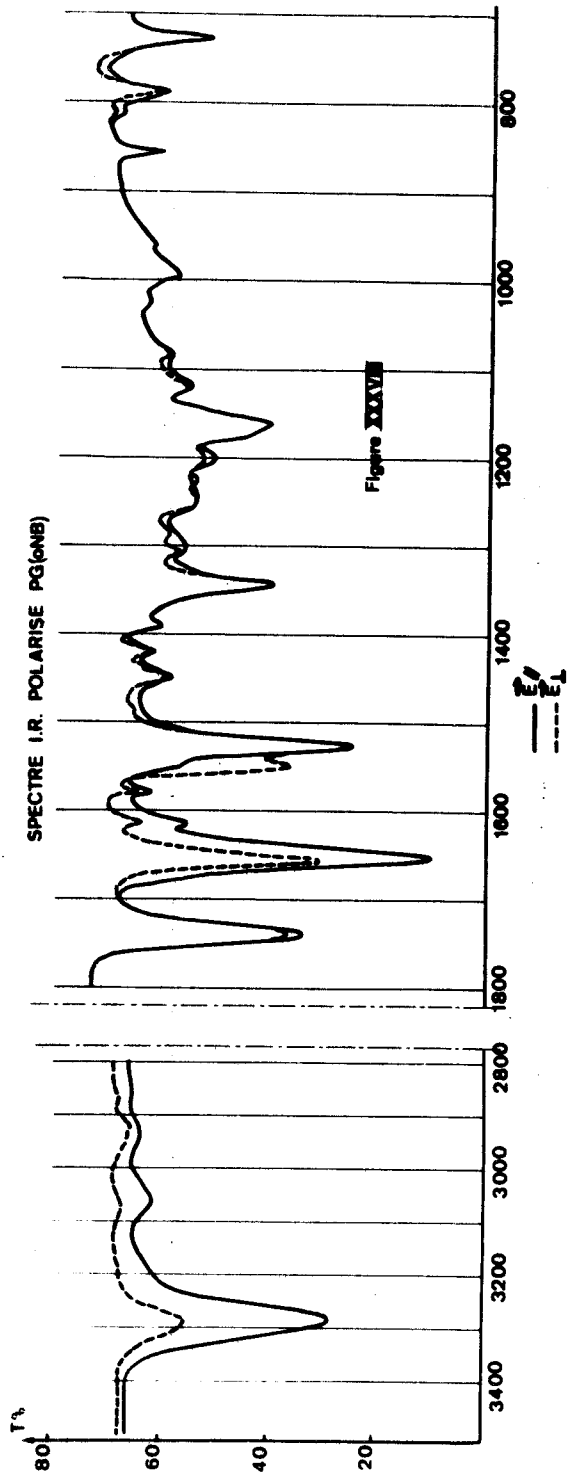
Nous avons utilisé le spectrophotomètre Perkin-Elmer PE 225, la direction d'orientation du film faisant un angle de 45° avec la verticale.

Les fréquences observées pour nos trois échantillons et pour le polyglutamate de benzyle (61) sont données dans le tableau XXIII.

	PG(oNB)	PG(mNB)	PG(pNB)	PGB
Amide A	:3287:3285	: 3285:3295	: 3310:3310	:3292:3294
Amide B	:3062:3075	: 3067:3070	: 3065:3080	:
C=O ester	:1740:1738	: 1737:1735	: 1738:1739	:1734:1733
Amide I	:1652:1656	: 1655:1657	: 1658:1657	:1652:1655
Amide II	:	:	:	:1518:1549
ϕ -NO ₂	:	: 1350:1351	: 1350:1348	:
	:	: 1151:1150	: 1165:1162	:
substitut.	:	:	: 855: 845	:
substitut.	:	:	: 808: 804	:
substitut.	:	:	: 788: 787	:

.../...

TABLEAU XXIII. cf Figures XXXVIII,XXXIX et XL.



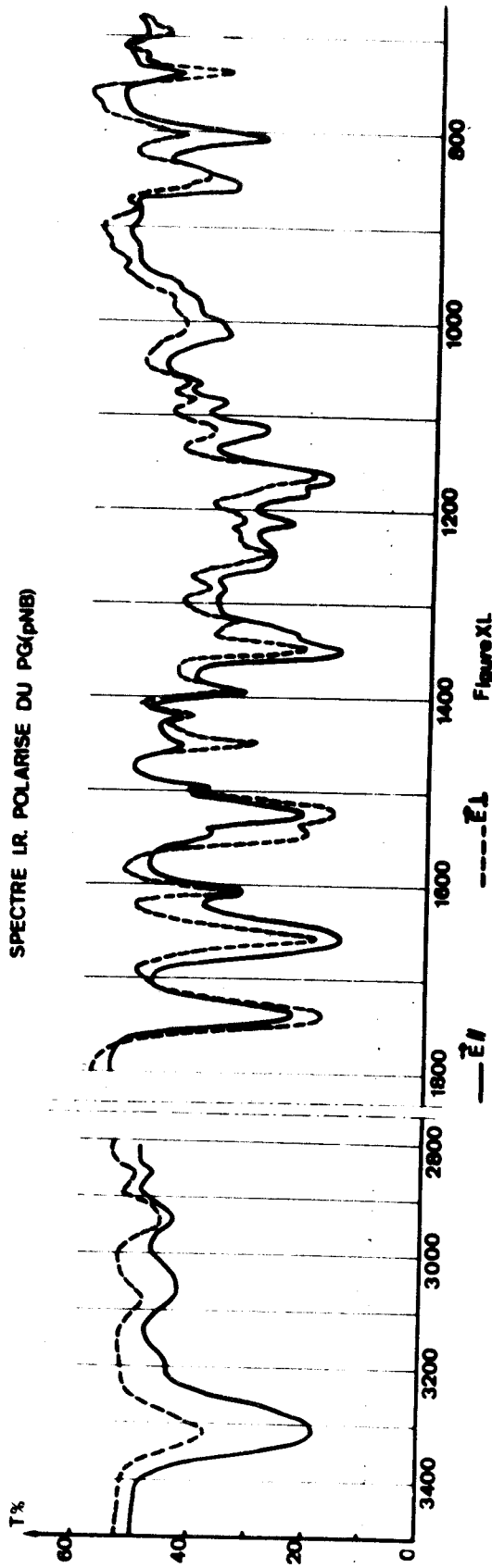


Figure XI



En examinant les spectres infra-rouges, on s'aperçoit qu'il y a recouvrement de la bande Amide II et de la bande due au groupement nitro benzylique dans la région 1560 cm^{-1} - 1500 cm^{-1} . Il est donc impossible de calculer les rapports dichroïques pour chacune de ces bandes.

Nous avons rassemblé dans le tableau XXIV les rapports dichroïques évalués pour chacune des bandes des trois polyglutamates de nitro benzyle.

	PG(oNB)	PG(mNB)	PG(pNB)
Amide A	3,99	4,32	2,90
Amide B	2,60	3,05	1,39
CO ester	1,16	1,06	0,746
Amide I	2,41	2,235	1,18
$\phi\text{-NO}_2$	1	1,15	1,405
CO	1	1,03	0,946
substitution	1	1	1,14
substitution	1	1	2,09
substitution	1	1	0,38

Pour les bandes amide A, amide I et amide II, les rapports dichroïques sont plus faibles pour le polyglutamate de para nitro benzyle que pour les deux autres polymères. Cela est peut-être relié au fait que le taux d'orientation, f , est plus faible pour le polymère correspondant au dérivé para, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. Mais elles présentent toutes trois un dichroïsme parallèle et cela est en accord avec l'existence d'un enchaînement hélicoïdal.

Examinons maintenant les bandes d'absorption dues à la chaîne latérale : la bande C=O ester, aux environs de 1740 cm^{-1} ainsi que celle correspondant à la vibration d'étirement du groupement C-O-C présentent un dichroïsme très faible, ou même inexistant pour les polymères d'ortho et méta nitro glutamates de benzyle, mais un dichroïsme perpendiculaire pour le polymère du dérivé para : cela signifie donc que, dans le polyglutamate

.../...

de para nitro benzyle les chaînes latérales ont une orientation préférentielle, ce qui n'est pas le cas des deux autres polyglutamates. De même, les bandes correspondant au noyau aromatique ne présentent de dichroïsme que dans le cas du polyglutamate de para nitro benzyle, ce qui est en accord avec l'existence d'une orientation des chaînes latérales.

c) Détermination de la direction des moments de transition.

Puisque la bande amide II se superpose à une des bandes du groupement nitro benzylique, nous avons utilisé la méthode de Fraser(63) pour déterminer la fraction f de chaînes correctement orientées.

Nous avons pris pour angle du moment de transition de la vibration de valence Amide A avec la direction d'orientation la valeur donnée par Bradbury pour le polyglutamate de benzyle, soit $\theta = 28^\circ$. Ceci conduit à $R_0 = 7,07$. D'où des valeurs de f et g pour les polyglutamates de nitro benzyle.

TABLEAU XXV.

	(PG(oNB)	:	PG(mNB)	:	PG(pNB)
f	: 0,746	:	0,785	:	0,58
g	: 0,2271	:	0,1825	:	0,482

A partir de ces résultats θ a été calculé au moyen de l'expression :

$$\sin^2 \theta = \frac{2 + g(1-R)}{R+2}$$

déduite de la relation (2).

	PG(oNB)	PG(mNB)	PG(pNB)	PGB
(Amide B	36° 40'	34° 30'	46° 55'	
(C=O ester	33° 30'		61° 30'	53°
(Amide I	35° 30'	40° 10'	51° 40'	39°
(ϕ NO ₂		52° 10'	43° 35'	
(C-O			56° 06'	
(substitut.			51° 30'	
(substitut.			36° 50'	
(substitut.			79° 20'	

Les valeurs de θ obtenues sur les polyglutamates de nitro benzyle ont été rassemblées dans le tableau XXVI, ainsi que celles données par Tsuboi pour le polyglutamate de benzyle (61).

Les taux dichroïques des bandes ester peuvent être utilisés pour déterminer l'orientation approximative des moments de transition associés aux vibrations correspondantes avec l'axe de l'hélice.

Les angles entre les deux moments des vibrations du groupe ester ont été évalués à partir d'une étude en lumière infra-rouge polarisée du poly subérate d'éthylène (64). Le moment de transition de la vibration C=O ester fait un angle d'environ 19° avec la liaison C=O, dans la direction de la bissectrice de cette liaison et de la liaison adjacente C γ -C δ , tandis que le moment de transition de la vibration d'étirement C-O-C se trouve pratiquement dans la même direction que la liaison C δ -C ϵ .

On voit donc, d'après nos résultats, que la chaîne latérale du polyglutamate de para nitro benzyle fait un angle d'environ 56° avec l'axe de l'hélice. Ce résultat est en contradiction avec les calculs de Scheraga et de ses collaborateurs (65) qui prévoient, pour les polymères de glutamates qui adoptent la configuration en hélice α droite, une conformation "longitudinale" c'est à dire une conformation dans laquelle les chaînes latérales

se placeraient parallèlement à l'axe de l'hélice. Cette disposition favoriserait à la fois les interactions inter et intra moléculaires.

Quoi qu'il en soit, le comportement des trois polyglutamates de nitro benzyle est différent. Les chaînes latérales n'ont une orientation préférentielle que pour le polymère correspondant au dérivé para. L'existence de dichroïsme linéaire dans les bandes correspondant aux vibrations du groupement ϕ -NO₂ le confirme.

d) Comparaison entre l'hélice des polyglutamates de nitro benzyle et l'hélice du polyglutamate de benzyle.

A partir des résultats rassemblés dans le tableau XXII il est possible de comparer la longueur des liaisons hydrogène intramoléculaires qui existent dans les polyglutamates de nitro benzyle, à la longueur des liaisons hydrogène qu'on trouve dans le polyglutamate de benzyle.

En effet, la fréquence ν_{N-H} de la vibration de valence de la liaison N-H non perturbée est liée à la distance L entre N et O par la relation de PIMENTEL et SEDERHOLM.

$$\nu_{NH}^0 - \nu_{NH} = 548 (3,21 - L).$$

dans laquelle ν_{NH}^0 est la fréquence de la vibration NH lorsqu'il n'y a pas de liaison hydrogène.

ν_{NH}^0 n'est pas connu avec suffisamment de précision pour permettre le calcul de L. Mais les différences $\Delta\nu_{N-H}$ entre la valeur de ν_{NH} trouvée pour le polyglutamate de benzyle et les valeurs ν_{NH} trouvées sur des polyglutamates de benzyle substitués peuvent être utilisées pour estimer les variations de ν_{N-H} quand on passe d'un polyglutamate à un autre.

ΔL , variation de la longueur des liaisons hydrogènes intramoléculaires est déterminée par la relation :

$$\Delta L = \frac{\Delta\nu_{NH}}{548}$$

Or, ν_{NH} peut être calculée à partir de la relation suivante :

$$\nu_{NH} = \nu_A + \nu_B - 2 \nu_{II}$$

- ν_A fréquence de la vibration amide A
 ν_B fréquence de la vibration amide B
 ν_{II} fréquence de la vibration amide II.

Fraser⁽³³⁾ a relié qualitativement ΔL aux caractéristiques de l'hélice; selon lui, lorsque ΔL est positif, on a une augmentation du pas de l'hélice α , inversement, lorsque ΔL est négatif, on a une diminution du pas de l'hélice α .

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau XXVII.

	ν_A	ν_B	ν_{II}	ν_{NH}	$\Delta\nu_{NH}$	ΔL (Å)
PGB	3291	3065	1549	3258		
PG(oNB)	3292	3070	1550	3262	4	0,007
PG(mNB)	3292	3075	1545	3277	19	0,034
PG(pNB)	3310	3080	1545	3300	42	0,076

Etant donnée que chaque fréquence est déterminée à $\pm 5\text{cm}^{-1}$, on a une erreur absolue de $\pm 20\text{cm}^{-1}$ sur l'évaluation de $\Delta\nu_{NH}$.

On ne peut donc conclure d'une manière certaine que pour le polyglutamate de para nitro benzyle, puisque $\Delta\nu_{NH} = +42$. L'hélice du polyglutamate de nitro benzyle aurait donc un pas légèrement plus grand que celui de l'hélice α , comme l'ont montré les premiers clichés de Rayons X effectués sur des fibres orientées de polyglutamate de para nitro benzyle. (66).

C O N C L U S I O N

Les polyglutamates d'ortho, de méta et de para nitro benzyle ont été préparés par l'intermédiaire d'un complexe cuivrique afin d'obtenir une estérification sélective de la fonction acide située en position γ dans l'acide glutamique.

L'étude de l'activité optique des polyglutamates de nitro benzyle, a permis de montrer que ces polypeptides sont pratiquement 100% sous forme d'hélice α dans HFIP et DCE et en pelote statistique dans ADC et ATF. De plus, nous avons mis en évidence des effets Cotton extrinsèques dans les quatre solvants utilisés, mais nous n'avons pas pu relier l'intensité et le signe de ces effets Cotton avec la structure secondaire des polyglutamates de nitro benzyle.

Nous avons calculé la courbe de dispersion optique rotatoire due uniquement au squelette polypeptidique en utilisant les transformations de Kronig et Kramers, à partir de cette courbe de DOR, nous avons calculé le paramètre b_0 de l'équation de Moffitt et Yang. Dans les solvants qui favorisent la forme hélice comme HFIP et DCE, la valeur absolue de b_0 est supérieure à celle admise pour une hélice α droite. Nous avons expliqué cela, en supposant l'existence d'une bande dichroïque extrinsèque dans l'ultra violet lointain qui perturbe fortement la courbe de DOR dans le visible.

L'étude de la stabilité des hélices de polyglutamates de nitro benzyle dans les solvants mixtes, a permis de mettre en évidence la plus grande stabilité du PG(oNB), stabilité qui pourrait être due à des interactions plus importantes entre les chaînes latérales dans l'isomère "ortho".

Enfin l'étude du dichroïsme linéaire des films orientés de polyglutamates de nitro benzyle par spectrophotométrie infrarouge, a permis de conclure à l'existence d'une structure hélicoïdale à l'état solide, l'hélice étant légèrement déformée dans le cas du PG(pNB) par rapport à l'hélice α .

.../...

Nous avons pu mettre en évidence une orientation préférentielle des chaînes latérales pour le PG(pNB).

Il est actuellement difficile d'obtenir des informations supplémentaires sur la chaîne latérale des polyglutamates de nitro benzyle, en étudiant l'activité optique de leurs solutions. Par contre, on peut envisager la détermination absolue de la structure en utilisant la technique de diffraction des rayons X par des fibres orientées.

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

- (1) F.H.C.STEWART, R.LEDGER, Aust.J.Chem.(1965),18,1477.
- (2) Z.BOHAk, E.KATCHALSKI, Biochemistry.(1963),2,228.
- (3) J.C.PARIAUD, P.ARCHINARD, Rec.Trav.Chim.(1952),71, 634.
- (4) P.DOTY, E.M.BRADBURY, HOLTZEN, J.A.C.S. (1956),78,947.
- (5) M.H.LOUICHEUX, J.PARROD,C.R.Acad.Sci.Paris.(1968),267,614.
- (6) J.A.C.S.(1916),38,1077.
- (7) M.GOODMAN, J.HUTCHISON, J.A.C.S.(1966),88,3627.
- (8) M.SZWARC, Adv.Polymer.Sci. (1965),4,1.
- (9) FRESNEL, Ann.Chim.Phys. (1825),28,147.
- (10) C.TANFORD,"Physical Chemistry of Macromolecules" John Wiley (1967),p121.
- (11) DRUDE, "Lehrbuch der Optik" Leipzig,1900,Traduction anglaise, Dover,New-York.(1959).
- (12) S.BEYCHOK, " Poly Amino Acids " G.D.FASMAN (1967),2,545.
- (13) H.A.KRAMERS,Atti Congr.Intern.dei Fisici,Como (1927),2,545.
- (14) R.de L.KRONIG, J.Opt.Soc.Am (1926),12,547.
- (15) L.ROSENFELD,Z.Physik (1928),52,161.
- (16) E.V.CONDON, W.ALTAR, H.EYRING, J.Chem.Phys (1937),5,753.

.../...

- (17) J.KIRKWOOD, J.Chem.Phys.(1937),5, 479.
- (18) J.A.SCHELLMAN, J.Chem.Phys.(1966),44,55.
- (19) E.SHECHTER Thèse (Strasbourg) (1967).
- (20) D.L.PETERSON, W.T.SIMPSON, J.A.C.S. (1953),79,2375.
- (21) K.IMAHORI, P.DOTY, Proc.Natl.Acad.Sci.US.(1961),47,1775.
- (22) K.ROSENMECK, P.DOTY, Proc.Natl.Acad.Sci.US (1961),47,1775.
- (23) G.HOLZWARTH, P.DOTY, J.A.C.S.(1965),87,218.
- (24) M.L.TIFFANY, S.KRIMM, Biopolymers (1969), 8, 347.
- (25) F.QUADRIFOGLIO, D.W.URRY.J.A.C.S.(1968),90 ,2760.
- (26) V.A.ZUBKOV, T.M.BIRSHTAIN, S.MILEVSKAYA,M.V.VOLKENSTEIN
Biopolymers (1971),10, 2051.
- (27) W.MOFFITT, J.T.YANG, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.(1956),42,596.
- (28) C.COHEN, A.G.SZENT-GYORGYI, J.A.C.S.(1957),79, 248.
- (29) W.MOFFITT, D.D.FITTS,J.C.KIRKWOOD Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.
(1957),43, 723.
- (30) E.SHECHTER, E.R.BLOUT, Proc.Natl.Acad.Sci.(1964),51,695.
- (31) E.SHECHTER,J.P.CARVER,E.R.BLOUT, Proc.Natl.Acad.Sci.(1964),
51, 1029 .
- (32) M.GOODMAN, A.M.FELIX, C.M.DEBER,A.R.BRAUSE, G.SCHWARTZ,
Biopolymers (1963),1, 371.
- (33) R.D.B.FRASER,B.S.HARRAP, R.LEDGER, T.P.MACRAE, F.H.C.STEWART
E.SUZUKI, Biopolymers,(1967),5, 797.

- (34) M.H.LOUCHEUX, S.GRAFF, C.R.Acad.Sci.Paris (1969),269,1509.
- (35) J.B.ARAGAO Thèse (Strasbourg) 1969.
- (36) A.MOSCOWITZ Tetrahedron (1961),13, 48.
- (37) IM.KLOTZ, S.F.RUSSO, S.HANLON,M.A.STAKE, J.Chem.Soc. (1964)
86, 4774.
- (38) M.A.STAKE, I.M.KLOTZ Biochemistry (1966),5, 1726.
- (39) W.E.STEWART,L.MANDELKERN,R.E.GLICK Biochemistry (1967),6, 143.
- (40) W.E.STEWART, L.MANDELKERN,R.E.GLICK Biochemistry (1967),6,150.
- (41) J.STEIGMAN, E.PEGGION, A.COSANI, J.A.C.S.(1969),91,1822.
- (42) J.STEIGMAN,A.S.VERDINI, C.MONTAGNER,L.STRASORIER, J.A.C.S.
(1969),91,1829.
- (43) J.A.FERRATI, B.W.NINHAM, MACROMOLECULES (1970),3, 30.
- (44) J.H.BRADBURY, B.E.CHAPMAN,J.Macromol.Sci.Chem.A4 (1970),5,1137.
- (45) J.H.BRADBURY,H.H.H.YUAN, Biopolymers (1972),11,661.
- (46) P.COMBELAS,G.GARRIGOU-LAGRANGE C.R.Acad.Sci.Paris (1971),272;
153.
- (47) J.H.BRADBURY,M.D.FENN, J.Mol.Biol.(1968),36,231.
- (48) R.STAIR, W.COBLENTZ,J.Res.Nat.Bur.Std (1935),15,295.
- (49) I.M.KLOTZ, P.GRISWOLD,D.M.GRUEN,J.A.C.S.(1949),71, 1615.
- (50) E.J.AMBROSE, HANBY, Nature (1949),163,483.
- (51) E.J.AMBROSE, A.ELLIOTT, Proc.Roy.Soc.(London) (1951),A 205 ,
47.

- (52) L. PAULING, R. B. COREY, Proc. Natl. Acad. Sci. US. (1951), 37, 235.
- (53) S. MIZUSHIMA, Structure of Molecules and internal rotation (Academic Press, New York, 1954).
- (54) T. MIYAZAWA, T. SHIMANOUCI, S. MIZUSHIMA, J. Chem. Phys. (1956), 24, 408.
- (55) T. MIYAZAWA, T. SHIMANOUCI, S. MIZUSHIMA, J. Chem. Phys. (1958), 29, 611.
- (56) R. M. BADGER, A. D. E. PULLIN, J. Chem. Phys. (1954), 22, 1142.
- (57) T. MIYAZAWA, J. Mol. Spectr. (1960), 4, 155.
- (58) T. MIYAZAWA J. Chem. Phys. (1960), 32, 1647.
- (59) T. MIYAZAWA, E. R. BLOUT J. A. C. S. (1961), 83, 712.
- (60) S. KRIMM J. Mol. Biol (1962), 4, 528.
- (61) M. TSUBOI, J. Poly. Sci. (1962), 59, 139.
- (62) A. VALLACE JONES Ph.D. Thesis. Cambridge (1949).
- (63) R. D. B. FRASER, J. Chem. Phys. (1956), 28, 1113.
- (64) E. M. BRADBURY, A. ELLIOTT, R. D. B. FRASER, Trans. Faraday. Soc. (1960), 56, 1117.
- (65) J. F. YAN, G. VANDERKOOI, H. A. SCHERAGA. J. Chem. Phys. (1968), 6, 2713.
- (66) COLONNA, Résultats non publiés.