Nº d'ordre 395

50376 1973 135

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE 3° CYCLE

par

Catherine DUFLOT-DEWAELE



CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'INFLUENCE DES CHAINES LATÉRALES SUR LA CONFORMATION DES POLYPEPTIDES

ÉTUDE DE POLYMÈRES D'ASPARTATE DE NITROBENZYLE, PAR DICHROISME CIRCULAIRE ET RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

Soutenue le

1973 devant la Commission d'examen :

M. C. LOUCHEUX, Mme M.-H. LOUCHEUX, M. A. LABLACHE-COMBIER, examinateur M. Michel DAUNE,

président rapporteur membre invité

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES

MM. H. LEFEBURE, PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. LIEBAERT, MARTINO-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. DEFRETIN René

Professeur de Biologie Marine

PROFESSEURS TITULAIRES

| М. | BACCHUS Pierre | Astronomie et Calcul Numérique |
|-------|----------------------|--|
| М. | BEAUFILS Jean-Pierre | Chimie Générale |
| Μ. | BECART Maurice | Physique |
| М. | BLOCH Vincent | Psychophysiologie |
| М. | BIAYS Pierre | Géographie et Aménagement Spa tial |
| М. | BONNEMAN Pierre | Chimie Industrielle |
| | BONTE Antoine | Géologie Appliquée |
| М. | BOUGHON Pierre | Mathématiques |
| Μ. | | Botanique |
| М. | CAPET Marcel-Francis | Institut de Préparation aux Affaires |
| Μ. | CELET Paul | Géologie Générale |
| Μ. | CONSTANT Eugène | Physique Industrielle |
| М. | CORSIN Pierre | Paléobotanique |
| | DECUYPER Marcel | Mathématiques |
| | DEDECKER Paul | Mathématiques Mathématiques |
| | DEFRETIN René | Biologie Animale. Directeur de l'Institut de |
| Ivt • | DEIRETTIN KEPLE | Biologie Maritime de Wimereux |
| М. | DELATTRE Charles | |
| M. | DURCHON Maurice | Géologie Générale |
| M. | FOURET René | Zoologie Générale et Appliquée |
| м. | | Physique |
| | GABILLARD Robert | Radio-Electricité et Electronique |
| М. | GEHU Jean-Marie | Institut Agricole |
| М. | GLACET Charles | Chimie Organique |
| М. | GONTIER Gérard | Mécanique des Fluides |

Μ. GUILLAUME Jean Biologie Vegetale HEUBEL Joseph Μ. Chimie Minerale Mme LENOBLE Jacqueline Physique Experimentale (Optique Atmospherique) LOMBARD Jacques Μ. Sociologie М. MONTARIOL Frederic Chimie Appliquée Μ. MONTREUIL Jean Chimie Biologie

POUZET Pierre Μ. Informatique Mme SCHWARTZ Marie-Helène Mathématiques TILLIEU Jacques Physique Théorique

TRIDOT Gabriel Chimie Minérale Appliquée Μ.

VAILLANU Jean Μ. Mathématiques VIDAL Pierre Μ. Automatique Μ. VIVIER Emile Biologie Animale

Μ. WATERLOT Gorard Géologie et Minéralogie Μ.

WERTHEIMER Raymond Physique Générale

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Μ. BOUISSET Simon Physiologie Animale DELHAYE Michel Chimie Physique et Minérale 1er Cycle Μ. FLATRES Pierre Géographie Μ. LEBRUN André Electronique Μ. LINDER Robert Botanique LUCQUIN Michel Μ. Chimie Physique Μ. PARREAU Michel Mathématiques M. PRUDHOMME Rému Sciences Economiques Μ. SAVARD Jean Chimie Générale Μ. SCHALLER François Zoologie Μ. SCHILTZ René Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Μ. BELLET Jean Physique Μ. BODARD Marcel Biologie Végétale BOILLET Pierre Μ. Physique DERCOURT Jean-Michel Μ. Géologie DEVRAINNE Pierre Μ. Chimie Minérale Mle MARQUET Simone Mathématiques PROUVOST Jean Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

Μ. ADAM Michel Economie Politique Μ. ANDRE Charles Mathématiques et Statistiques Μ. Géographie ANGRAND Jean-Pierre Μ. AUBIN Thierry Mathématiques Pures Μ. BEGUIN Paul Mécanique des Fluides М.

BILLARD Jean Physique Mathématiques Μ. BKOUCHERudolphe BOILLY Benoni Zoologie

Μ. BONNEMAN Jean-Louis Biologie Végétale BONNOT Ernest Biologie Végétale Μ. BRIDOUX Michel Chimie Μ. Géographie et Aménagement Spatial Μ. BRUYELLE Pierre Μ. Biologie Animale CAPURON Alfred Analyse Numérique Μ. CARREZ Christian CHOQUET Mareel Biologie Appliquée Μ. CORDONNIER Vincent Informatique Μ. Μ. CORTOIS Jean Physique COULON Jean-Paul Μ. Electrotechnique DEBRABANT Pierre Instrumentation Physique Μ. Physique ESCAIG Bertrand Μ. Mme EVRARD Micheline Chimie Μ. FAIDHERBE Jacques Psychophysiologie FONTAINE Jacques Génie Electrique Μ. FROELICH Daniel Chimie Μ. Μ. GAMBLIN André Géographie GOBLOT Rémi Μ. Mathématiques Μ. GOSSELIN Gabriel Sociologie Μ. GOUDMAND Pierre Chimie Μ. GRANELLE Jean-Jacques Sciences Economiques Μ. GRUSON Laurent Mathématiques Μ. GUILBAULT Pierre Physiologie Animale Μ. HERMAN Maurice Physique Μ. HUARD DE LA MARRE Pierre Mathématiques Appliquées Μ. JOLY Robert Biologie (Amiens) JOURNEL Gérard Μ. Physique Appliquée Mle KOSMANN Yvette Mathématiques Μ. LABLACHE-COMBIER Alain Chimie Générale Μ. LACOSTE Louis Biologie Végétale LANDAIS Jean Μ. Chimie Organique LAURENT François Μ. Automatique Μ. LAVAGNE Pierre Gestion Mle LEGRAND Solange Mathématiques Μ. LEHMANN Daniel Mathématiques LEHMANN Josiane Mathématiques Μ. LENTACKER Firmin Géographie et Aménagement Spatial Μ. LEROY Jean-Marie Chimie Μ. LEROY Yues Electronique Μ. LHENAFF René Géographie Μ. LOCQUENEUX Robert Physique Μ. LOUAGE Francis Mesures Industrielles Μ. LOUCHEUX Claude Chimie Macromol**écula**ire Μ. MAES Serge Physique Mme MAILLET Monique Automatique М. MALAUSSENA Jean-Louis Sciences Economiques М. MESSELYN Jean Physique Μ. MIGEON Michel Instrumentation Chimique М. MONTEL Marc Physique MONTUELLE Bernard Biologie Végétale MUSSCHE Guy Economie et Sociologie d'Entreprises Μ. NICOLE Jacques Chimie Analytique M. OUZIAUX Roger Construction Mécanique М. PANET Marius Physique Industrielle Р. PAQUET Jacques Géotechnique

Géologie

Mathématiques

PARSY Fernand Μ. PONSOLLE Louis POUVY Jean-Claude М. RACZY Ladislas Μ. Mme RENVERSEZ Françoise M. ROUSSEAU Jean-Paul M. ROYNETTE Ber**n**ard Μ. SALMER Georges SEGUIER GLY Μ. SIMON Michel М. SMET Pierre M. SOMME Jean Mle SPIK Geneviève THOMAS Daniel TOULOTTE Jean-Marc TREANTON Jean-René Μ. M. VANDORPE Bernard VILETTE Michel M. WATERLUI Michel Μ. Mme ZINN JUSTIN Nicole

Mathematiques Appliquees Chimie (Valenciennes) Automatique non lineaire Physique Industrielle et Radioelectricité Sciences Economiques Physiologie Animale Mathématiques Radio-Eléctricité et Electronique Electronique Psychologie Physique Géographie Chimie Biologie Chimie Minérale Appliquée Informatique Psychologie Chimie Minérale Génie Mécanique

Monsieur le Professeur C.LOUCHEUX a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire de chimie macromolècu-laire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille où ce travail a été réalisé.

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

Qu'il en soit remercié ici.

Madame M.H.LOUCHEUX, Maître de Recherches au CNKS, m'a proposé ce sujet. Son aide constante, ses nombreux conseils et surtout son soutien moral m'ont permis de mener à terme ce travail.

Je souhaite avoir su lui montrer ma profonde gratitude.

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

Qu'il veuille accepter mes respectueux remerciements.

Je remercie vivement Monsieur M. DAUNE, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, qui a eu la gentillesse de me permettre d'effectuer dans son laboratoire, les spectres de Dichroïsme Circulaire.

Je le remercie également de participer au jury de cette thèse.

Je suis très reconnaissante à MessieursC.CHACHATY et A.FORCHIONI du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay d'avoir bien voulu réaliser les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire.

J'associe dans une même pensée tous mes camarades de laboratoire qui, de près ou de loin, m'ont aidéedans l'élaboration de ce travail.

Je voudrais remercier tout particulièrement Monsieur DAUPHIN qui m'a aidé avec beaucoup de gentillesse dans la mise au point des programmes de calculs.

GLOSSAIRE

| PLAB | Polyaspartate de benzyle. |
|---------------------|---------------------------------------|
| P(LAB,LApNB) | Copolymères d'aspartate de benzyle et |
| | d'aspartate de para nitrobenzyle. |
| P(LAB, LAONB) | Copolymères d'aspartate de benzyle et |
| | d'aspartate d'ortho nitrobenzyle. |
| AC | Aspartate de cuivre |
| ACN | Aspartate de cuivre et de sodium. |
| EDTA | Ethylène diamine tétracétique. |
| NCA | Anhydride d'acide N carboxyaminé ou |
| | anhydride de Leuchs. |
| | |
| HFIP | hexafluoroisopropanol |
| CHC1 ₃ | Chloroforme |
| CDC13 | Chloroforme deutéré |
| DMF | Diméthylformamide |
| NB | Nitrobenzène |
| TFA | Acide trifluoracétique |
| | |
| [⊕] | ellipticité molaire |
| [a] | pouvoir rotatoire spécifique |
| [m] | rotation molaire |

Les aspartates et les polyaspartates possèdent tous une conformation L.

TABLE DES MATIERES

GLOSSAIRE

INTRODUCTION

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES (p2).

I.ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CONFORMATION DES ESTERS EN β DE L'ACIDE POLYASPARTIQUE.

II. CALCULS CONFORMATIONNELS.

III. ORIENTATION DES CHAINES LATERALES

- 1) Travaux théoriques.
- 2) Travaux expérimentaux.

CHAPITRE II: SYNTHESE DES POLYPEPTIDES (p9).

- PREPARATION DES POLYMERES.

I.PREPARATION DES ASPARTATES.

- 1) L-aspartate de benzyle
- 2) L-aspartate de para nitrobenzyle et d'ortho nitrobenzyle.

II. PREPARATION DES ANHYDRIDES DE LEUCHS.

III. POLYMERISATION.

-PARTIE EXPERIMENTALE.

I.PREPARATION DES ASPARTATES.

- 1) L-aspartate de benzyle.
- 2) L-aspartate de para nitrobenzyle et d'ontho nitrobenzyle.
 - a) Complexe cuivrique de l'acide aspartique
 - b) Sel de lithium du complexe cuivrique.
 - c) halogénures de benzyle substitués.
 - d) ester du complexe cuivrique.
 - e) action de l'EDTA sur le complexe.

.../...

II.PREPARATION DES ANHYDRIDES DE LEUCHS.

- 1) Mode opératoire.
- 2) Caractérisation.

III. POLYMERISATION.

- 1) Mode opératoire.
- 2) Caractérisation.

CHAPITRE III: ETUDE PHYSICO CHIMIQUE (p.22).

_DICHROISME CIRCULAIRE ET DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE

I.RAPPELS THEORIQUES

- 1) Dichroïsme circulaire et Dispersion optique rotatoire.
- 2) Pouvoir optique rotatoire des hélices chromophores intrinsèques.
- 3) Chromophores extrinsèques

II. ETUDE DES COPOLYMERES (LAB, LAPNB) et (LAB, LAONB) par dichroïsme circulaire.

- 1) Propriétés optiques des chromophores.
- 2) Conditions expérimentales.
 - a) Choix du solvant
 - b) Mode opératoire
- 3) Résultats.
 - a) Copolymères P(LAB,LAPNB)
 bandes dûes au chromophore peptidique
 bandes dûes au chromophore nitrobenzyle.
 bande à environ 350nm
 bande à environ 280nm
 bande à environ 260nm
 - b) Copolymères P(LAB,LAONB)

 bandes dûes au chromophore peptidique

 bandes dûes au chromophore nitrobenzyle.

. . . / . .

III. ETUDE DES COPOLYMERES (LAB, LAPNB) et (LAB, LAONB) par dispersion optique rotatoire.

_RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

I.RAPPELS.

Spectre de la pelote statistique. Spectre de la structure hélicoïdale.

II. ETUDE DES COPOLYMERES P(LAB, LAPNB) et P(LAB, LAONB)

- 1) Partie expérimentale.
- 2) Résultats
 - a) copolymères d'aspartate de benzyle et d'aspartate de para nitrobenzyle
 1.Chaîne principale.
 Stabilité des polymères
 - Comparaison D.C. et R.M.N. 2.Chaîne latérale.

protons $\beta CH_{\underline{2}}$

protons CH₂ benzyle

- b) copolymères d'aspartate de benzyle et d'aspartate d'ortho nitrobenzyle
 - 1. Chaîne principale
 - 2.Chaîne latérale

protons βCH₂

protons CH₂ benzyle

_CONCLUSION DE CETTE ETUDE PHYSICO CHIMIQUE

CONCLUSION GENERALE BIBLIOGRAPHIE.

-=00 0 00=-

INTRODUCTION

Les acides aminés sous forme L donnent le plus souvent des polypeptides ayant une conformation en hélice α droite. Les polymères de l'acide aspartique constituent cependant une exception. En effet, le polyaspartate de benzyle peut se présenter sous forme hélice α gauche tandis que les polyaspartates de chloro et de nitrobenzyle par exemple se présentent sous forme hélice α droite. Ces deux configurations possibles sont caractérisées par une énergie libre différente.

Il semble donc que les chaînes latérales jouent un rôle important dans le sens d'enroulement de l'hélice.

Beaucoup d'études théoriques ont été entreprises à ce sujet, mais les résultats sont encore incertains. Plusieurs hypothèses de structures ont été avancées quant à la position des chaînes latérales par rapport au squelette peptidique.

Actuellement, des études expérimentales qui utilisent des méthodes confirmées permettent de déterminer aisément l'enchaînement d'un polypeptide. En ce qui concerne l'étude des chaînes latérales le problème est plus difficile à résoudre.

Le but de ce travail était d'étudier simultanément la chaîne principale et les chaînes latérales des polyaspartates présentant les deux formes hélicoïdales possibles, par l'utilisation des techniques comme le dichroïsme circulaire et la dispersion optique rotatoire d'une part, la résonance magnétique nucléaire d'autre part.

Aussi dans un premier temps nous avons réalisé la préparation des copolymères d'aspartate de benzyle et de para nitrobenzyle et des copolymères d'aspartate de benzyle et d'ortho nitrobenzyle. Puis nous avons analysé leur activité optique dans différents solvants par dichroïsme circulaire et dispersion optique rotatoire, leur étude par Résonance magnétique nucléaire s'effectuant dans le mélange chloroforme deutéré- acide trifluoroacétique.

CHAPITRE I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Dans le présent chapitre, nous passerons en revue les travaux théoriques et expérimentaux réalisés sur différents polyaspartates.

I ETUDE EXPERIMENTALE DE LA CONFORMATION DES ESTERS EN 8 DE L'ACIDE POLYASPARTIQUE.

La détermination de la structure secondaire des polyaspartates a été réalisée en utilisant les techniques sui-vantes :

- la dispersion optique rotatoire, qui grâce à l'utilisation du coefficient b de Moffitt-Yang (1) permet de donner le sens d'enroulement de l'hélice. Cette méthode n'est utilisable que s'il n'existe pas de chromophores extrinsèques.
- le dichroïsme circulaire, qui utilise la bande dichroïque à 222 nm (2).
- la résonance magnétique nucléaire, qui a pu être utilisée car un grand nombre de polyaspartates sont solubles dans le chloroforme deutéré.

Nous avons rassemblé dans le tableau suivant les résultats donnant le sens d'enroulement en hélice gauche ou droite pour les différents polyaspartates étudiés jusqu'ici.

. . . / . . .

| Groupement X | Sens de l'hélice | Solvant | Références |
|---|------------------|---|---|
| H : | droit | eau pH 4,3 | Spach (3) |
| Е НО- | ganche | CHC13 CHC13 HFIP | Bradbury (4) Goodman (5) Bovey (6) |
| -cH ₂ -cH ₃ | droit | снсіз | n qp |
| сн снз | droit | С НС I 3 | Bradbury (4) |
| -сн ₂ -сн сн ₂ сн ₃ | droit | Dioxanne | Goodman (7) |
| -CH2- | gauche | снс13 | Bovey (6) Hashimoto (8,9) Goodman (10,11) Blout (12,13) Bradbury (14,15,16, |
| | | Dichloro- méthane | Feretti (18) Bamford (17) Blout (19) Bradbury (14) |
| $-c_{\rm H_2} \left\langle \begin{array}{c} \\ \\ \end{array} \right\rangle - {\rm No_2}$ | droit | снс13 | Goodman (10,11,20, 21,22) Hashimoto (8) |
| $-c_{\mathrm{H}_2}$ | droit | CHC1 ₃ DMF | Hashimoto (8,9, 23,24) Hashimoto (9) |
| -сн ₂ -сн ₃ | droit | CHC1 ₃ | Hashimoto $(8,9,23,24)$ |
| | | • [] [] [] [] [] [] [] [] [] [| |



| (- C) - OCH ₃ | droit | hexafluoro- acétone 3 H ₂ O | Goodman (25) |
|---------------------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|
| (-CH ₂ -CH ₂ - | droit | CHC1 | Hashimoto (24) Bradbury (4) |
| (-CH ₂ -(| gauche | CHC13 | Loucheux (26) |
| (-CH ₂ : | gauche ou hélice ω | CHC1 ₃ | Loucheux (26) |

II CALCULS CONFORMATIONNELS

Durant les dix dernières années, les calculs conformationnels sur les polypeptides se sont beaucoup développés
(27,28,29-34). Ils sont basés sur l'hypothèse que les conformations les plus probables sont celles qui possèdent l'énergie
libre la plus faible. Pour obtenir ces minima, les énergies
libres de toutes les conformations possibles sont calculées
en tenant compte du fait que l'énergie libre d'un système polypeptide-solvant représente la somme de trois termes.

- les énergies potentielles résultant des interactions intramoléculaires.
 - l'énergie libre des vibrations intramoléculaires.
- l'énergie libre résultant des interactions soluté-solvant.

La plupart des études théoriques réalisées jusqu'ici ne tiennent compte que du premier de ces termes, qui renferme les interactions non liantes, les interactions électrostatiques et celles dues aux liaisons hydrogène.

En particulier, Scheraga et al ont réalisé des calculs conformationnels sur les polyaspartates (35), mais dans ce cas, ils supposent la macromolécule dans le vide, ce qui les oblige à introduire un facteur empirique pour tenir compte du solvant. Cette approximation explique, entr'autre, les différences que l'on trouve parfois entre expérience et théorie.

Pour les polyaspartates, les interactions dipôledipôle entre la fonction ester latérale et le groupement
amide du squelette polypeptidique sont répulsives, mais pour
le polyaspartate de benzyle, elles sont moins répulsives pour
l'hélice gauche que pour l'hélice droite, d'où le sens d'enroulement gauche adopté par le polyaspartate de benzyle. Quand
la chaîne latérale augmente, il faut tenir compte des forces
de torsion qui sont prépondérantes par rapport aux interactions
dipôle-dipôle. Les résultats suivants ont été obtenus pour
différents polyaspartates.

Les conformations en hélice α ayant la plus basse énergie se trouvent adopter le sens d'enroulement gauche pour les polyaspartates de méthyle, d'éthyle et de benzyle, et le sens d'enroulement droit pour les polyaspartates de n propyle, isopropyle, phénéthyle, et pour les polyaspartates de benzyle substitués en para du cycle aromatique par les groupements suivants : CH₃, CEN, NO₂, Cl.

L'accord entre les calculs et l'expérience est bon en général. Il faut toutefois citer le cas du polyaspartate d'étuyle. Bradbury (4) avait attribué à partir d'étude par dichroïsme circulaire, et dans le chloroforme, une structure en hélice α droite tandis que Scheraga (35) avait calculé que sa conformation la plus probable devait être en hélice α gauche. Mais l'introduction d'un coefficient empirique dans les calculs a permis de lever cette indétermination.

Il a été possible, d'après ces résultats, de classer les polyaspartates en deux groupes suivant la longueur des chaînes latérales :

- les chaînes latérales courtes donneraient une hélice α gauche.
- π les chaînes latérales longues donneraient une hélice α droite.

Lorsque la chaîne est aliphatique, la distinction entre chaînes latérales "courtes" et "longues" se ferait pour le groupement éthyle. Il est à remarquer que dans cette classification, le groupement benzyle appartiendrait aux chaînes

" courtes" mais que l'introduction d'un groupement en para du cycle lui donne un comportement de chaînes "longues".

III ORIENTATION DES CHAINES LATERALES.

Les différentes études réalisées sur les polyaspartates ont mis en évidence l'importance de la nature de la
chaîne latérale sur la structure secondaire. Certains auteurs
ont donc cherché à connaître quelle pouvait être la conformation de ces chaînes latérales pour mieux déterminer les
interactions qui pouvaient exister soit entr'elles, soit en
faisant intervenir d'autres groupements.

Les travaux théoriques ont, dans ce cas, précédé les déterminations expérimentales.

1) Travaux théoriques.

Scheraga (35) avait été amené à penser que les chaînes latérales du polyaspartate de méthyle ou de benzyle sous forme d'hélice α gauche pouvaient adopter deux conformations préférentielles.

- l'une, transverse, dans laquelle les chaînes latérales sont enroulées tangentiellement autour du squelette peptidique, à angle droit de l'axe de l'hélice.
- l'autre, parallèle, dans laquelle les chaînes latérales sont orientées parallèlement à l'axe de l'hélice.

Mais Scheraga lui-même (36), puis Bradbury (37) ont trouvé à l'aide de mesures de Résonance Magnétique Nucléaire que ces configurations n'existaient pas dans l'hélice α gauche du polyaspartate de benzyle. Par contre, Bradbury a mis en évidence, le fait, que effectivement, deux conformations préférentielles (37) existent dans les chaînes latérales du PLAB sous forme d'hélice gauche, mais elles ne correspondent pas aux caractéristiques données par Scheraga.

On voit donc que les calculs n'ont pu fournir de renseignements précis quant à la conformation des chaînes latérales: Par contre, il a été possible d'affirmer, à partir de ces mêmes calculs conformationnels que ce sont les interactions chaîne latérale-chaîne principale qui jouent un rôle prédominant (38) sur la stabilité de l'hélice et non les interactions chaîne latérale-chaîne latérale.

2) Travaux expérimentaux.

L'étude expérimentale de la conformation des chaînes latérales est délicate. Plusieurs techniques peuvent être employées, mais aucune n'apporte de résultats parfaitement satisfaisants. En toute rigueur, la technique de diffraction des rayons X devrait permettre une telle étude mais le nombre d'atomes intervenant dans un cliché est tellement grand qu'une interprétation quantitative s'avère actuellement impossible.

Le dichroïsme circulaire et la dispersion optique rotatoire ont été trés utilisés pour la détermination de la structure secondaire, mais leur utilisation à l'étude des chaînes latérales est beaucoup plus délicate : elle suppose, d'une part, que les chaînes latérales possèdent des bandes d'absorption dans un domaine de longueurs d'onde que l'on peut atteindre expérimentalement, mais elle suppose aussi que ces bandes ne se superposent pas à celles du chromophore -CO-NH. De plus, l'origine de l'activité optique induite dans un chromophore latéral est encore mal connue (39). L'interprétation quantitative des résultats n'est, en général, pas possible surtout lorsque la chaîne latérale possède une certaine longueur. Seul, le cas de la polytyrosine a pu être résolu exactement (40).

La Résonance Magnétique Nucléaire est une technique extrêmement précieuse dans la détermination de conformation de molécules n'ayant pas une trop grande dimension. Mais, dans le cas des polymères, les bandes obtenues ont une largeur du même ordre de grandeur que les constantes de couplage et par conséquent ne permettent pas la détermination de la conformation exacte.

L'infra-rouge polarisé paraît être actuellement la meilleure méthode pour déterminer une orientation éventuelle des chaînes latérales. Elle a déjà été utilisée dans notre laboratoire à l'étude de l'influence des chaînes latérales sur la structure secondaire d'un polypeptide (41).

.../...

Si l'exploitation de cette technique est facile d'un point de vue qualitatif, il n'en est pas de même du point de vue quantitatif. En effet, l'interprétation en termes de conformation du dichroïsme linéaire observé, suppose que soient parfaitement connues les directions des moments de transition, ce qui n'est généralement pas le cas.

Peu d'études ont été réalisées en vue d'étudier la conformation des chaînes latérales de différents polyaspartates. La plupart ont trait à l'étude du polyaspartate de benèzyle. Dans le tableau suivant on a donné une revue bibliographique des travaux effectués dans ce domaine, en mentionnant la technique utilisée.

| Groupement X: | Sens de l'hélice | En solution ou solide | Références ' | rechniques) |
|------------------------------------|------------------|--------------------------|--|-----------------------|
| (-CH ₃ : | gauche | CDC13 | Scheraga(36) | R.M.N.) |
| CH ₂ -CH ₂ - | gauche | CDC1 ₃ | Scheraga(36) Bradbury(42) Bradbury(43) | R.M.N.) |
| (-cH ₂ - | droit | : CDC1 ₃ | : :Bradbury(44) : | : |
| (-CH ₂ - | gauche | : : solide : | : :Bradbury(45) : | :R.M.N.) :) |
| (-CH ₂ -Cl: | droit | : solide | : :Tsuboi(46) : | : R.X.) : R. X.) |

CHAPITRE 11

SYNTHESE DES POLYPEPTIDES

PREPARATION DES POLYMERES

Les esters de l'acide poly-L-aspartique peuvent se préparer de plusieurs façons :

- en partant de l'acide poly-L-aspartique et en estérifiant les fonctions acides latérales. Mais cette méthode présente deux inconvénients. La masse obtenue n'est pas très élevée, et l'estérification risque d'être incomplète.
- en polymérisant le N carboxyanhydride (NCA) de l'aspartate correspondant.

C'est suivant cette seconde méthode qu'a été réalisée la préparation des poly-L-aspartates de benzyle (PLAB), de para nitrobenzyle (PLA pNB), et d'ortho nitrobenzyle (PLA oNB), fig I.

Les copolymères statistiques du L-aspartate de para nitrobenzyle ou d'ortho nitrobenzyle (fig II) ont été préparés de la même façon à partir de mélanges des NCA's correspondants.

PLAB
$$R = -CH_2 -$$

PLA pNB $R = -CH_2 -$

PLA oNB $R = -CH_2 -$

NO₂

Fig I

P(LAB, LA pNB)
$$R_{1} = -CH_{2} -$$

$$R_{2} = -CH_{2} - -NO_{2}$$

$$P(LAB, LA oNB)$$

$$R_{1} = -CH_{2} - -$$

$$R_{2} = -CH_{2} - -$$

$$NO_{2}$$

Fig II

I PREPARATION DES ASPARTATES .

Le composé de départ est l'acide L-aspartique

1. L-aspartate de benzyle.

Il y a peu de différence entre les réactivités des fonctions acides en α et en β. Néanmoins, cette réaction est possible avec l'alcool benzylique. L'estérification sélective de la fonction OH en β de l'acide L-aspartique est préconisée par Bradbury et al (14). Elle se fait par action directe de l'alcool benzylique sur l'acide L-aspartique en présence d'acide chlorhydrique sec. Le rendement est peu élevé.

2. L-aspartates de para nitrobenzyle et d'ontho nitrobenzyle.

Une telle estérification directe ne se fait pas avec l'alcool nitrobenzylique. Il est nécessaire de protéger la fonction acide en α pour pouvoir estérifier la fonction en β. On utilise pour cela la méthode de complexation de Ledger et Stewart (47) qui bloque les fonctions amine et acide en α d'une même molécule (fig III).

acide L- aspartique

L-aspartate de cuivre AC

ester du complexe cuivrique

--> 2 NH₂-CH-COOH ester du complexe cuivrique



L-aspartate de benzyle substitué

On fait d'abord réagir le sel de lithium du complexe cuivrique de l'acide L-aspartique sur le bromure de para ou d'ortho nitrobenzyle. Puis on élimine le cuivre en traitant le complexe par le sel de sodium de l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) à pH 4,5 à ébullition.

II PREPARATION DES ANHYDRIDES DE LEUCHS.

L'anhydride de Leuchs est obtenu suivant la méthode devenue classique de Karlson et Blout(48) et Fuchs et Farthing (49)qui consiste à faire réagir le phosgène à l'état gazeux sur le L-aspartate en milieu dioxanne parfaitement anhydre.

III POLYMERISATION.

La polymérisation des NCA's est réalisée le plus souvent en utilisant comme initiateur, soit une amine (primaire, secondaire, ou tertiaire), soit une base (méthanolate de sodium par exemple). Les masses moléculaires obtenues varient suivant l'initiateur utilisé, et l'expérience montre que l'utilisation de la triéthylamine conduit à des résultats intéressants.

De plus, pour obtenir des masses élevées, il est néces saire que les NCA's de départ et les polymères formés soient solubles dans le milieu réactionnel.

.../...

Par conséquent, toutes les polymérisations ont été effectuées à partir d'une solution de NCA, en présence de triéthylamine, à concentration et dans un solvant convenablement choisis. Dans certains cas, il a été nécessaire d'utiliser un mélange de deux solvants différents pour que le polymère reste soluble.

Les copolymères statistiques sont préparés de la même façon, par polymérisation d'un mélange des NCA's correspondants dans une proportion identique à celle que l'on veut obtenir dans le copolymère. Ceci implique que la réactivité de tous les NCA's est la même. L'expérience montre que l'on peut effectivement l'admettre en première approximation.

La composition exacte des copolymères en groupements nitrobenzyle a été déterminée en utilisant deux méthodes différentes :

- la première à partir des résultats de l'analyse élémentaire sur le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote.
- la deuxième à partir de la spectrophotométrie ultraviolette. En effet, le groupement nitrobenzyle possède une bande d'absorption dont le maximum est situé à 270nm. Il y correspond un coefficient d'extinction molaire ε_{270} = 10.000 pour le dérivé para , ε_{270} = 5.000 pour le dérivé ontho, ε_{270} = 200 pour le groupement benzyle ne portant pas de substituant. Si on néglige l'absorption dûe au chromophore CO-NH à 270nm, il est possible de déterminer la teneur en chacun des constituants à partir de la lecture de la densité optique à 270nm. On vérifie en faisant le calcul pour des homopolymères que cette approximation est justifiée.

Les résultats obtenus par ces deux méthodes sont tout à fait comparables.

•ε exprimé en l.mole 1.cm. 1.

Les copolymères suivants ont été préparés et caractérisés.

Série para

| Numéro | Pourcentage en moles en |
|-------------|----------------------------|
| (d'ordre : | groupement nitrobenzylique |
|) I | O PLAB |
| (II | 15 |
| , III : | 26 |
| (IV | 28 |
| (v : | 42 |
| (AI | 46 |
|) vii : | 67 |
| (VIII | 100 PLA pNB |

Série ortho

| Numéro d'ordre | Pourcentage en moles en groupement nitrobenzylique |
|-------------------|---|
| (IX : | 13 |
| (X | 28 |
|) xı : | 38 |
| (XII | 57 |
| XIII : | 63 |
| (XIV | 100 PLA ONB |



PARTIE EXPERIMENTALE

I PREPARATION DES ASPARTATES.

1. L-aspartate de benzyle.

On met en suspension 20g (0,150mole) d'acide L-aspartique dans 200 cm³ d'alcool benzylique. Le mélange est saturé avec de l'acide chlorhydrique sec et chauffé à 100°C jusqu'à obtention d'une solution claire. Le L-aspartate de benzyle est précipité par addition d'un excès de triéthylamine, lavé à l'éthanol et recristallisé par l'eau chaude.

Rendement: 10,5g 30%

 $\epsilon_{270} = 197 \text{ (NaOH N/10)}$

Point de fusion : 223°C (lit.(14): 223°C)

2. L-aspartates de para nitrobenzyle et d'ortho nitrobenzyle.

a) Complexe cuivrique de l'acide L-aspartique.

On agite 51,9g (0,39 mole) d'acide L-aspartique dans 5,2l d'eau et on chauffe jusqu'à dissolution complète. On ajoute alors lentement 97,5g (0,54 mole) d'acétate de cuivre dissous dans 1,5l d'eau à 50°C.

La réaction se poursuit pendant une heure, puis toujours sous agitation, on laisse revenir à température ambiante. On filtre, on lave à l'eau jusqu'à ce que les eaux de lavage soient incolores puis à l'alcool. On obtient un solide bleu turquoise que l'on sèche sous vide à 110°C.

Rendement: 88g soit 91% si l'on admet que l'aspartate de cuivre cristallise avec six molécules d'eau (50).

b) Sel de lithium du complexe cuivrique.

On dissout 27,4g de LiOH (0,63mole) dans 6,251 d'eau puis on ajoute 42,3g (0,32 mole) d'acide L-aspartique. D'autre part on dissout 88g (0,177mole) de complexe de cuivre obtenu dans l'étape précédente dans 3,9l d'eau. Le mélange de ces deux solutions est agité pendant 6 heures à température ambiante. On laisse décanter et on filtre l'insoluble restant. Le filtrat est évaporé à sec au bain marie sous vide.

On reprend alors par le minimum d'eau et on précipite par l'alcool éthylique versé goutte à goutte.

Le précipité bleu obtenu est séché tout d'abord à 40°C, broyé finement puis séché de nouveau sous vide à 110°C.

Poids : 90,8g

Rendement: 84%

c) Halogénures de benzyle substitués.

- bromure d'ortho nitrobenzyle (17).

On dissout 40 g (0,262 mole) d'alcool ontho nitrobenzylique (Fluka) dans 88,8ml (1,556 mole) d'acide bromhydrique (densité d=1,49) maintenu à 35°C. On augmente lentement la température et lorsqu'elle atteint 75°C, le bromure formé se rassemble au fond du ballon sous forme d'huile. On continue la réaction pendant 1h30, à 75°C puis on laisse le mélange revenir à température ambiante. Le bromure cristallise à 5°C. On le filtre, on le lave à l'acide chlorhydrique concentré pour éliminer l'alcool qui n'a pas réagi.

On obtient 35g de bromure d'onthonitrobenzyle, soit un rendement de 61%.

Point de Fusion : 45°C.

- bromure de para nitrobenzyle.

Nous avons utilisé le produit commercial Fluka tel quel.

Tous ces produits sont très lacrymogènes et brunissent à l'air.

d) Ester du complexe cuivrique.

L'halogénure de benzyle dissous dans le diméthylsulfoxide (DMSO) et le complexe dissous dans l'eau sont mélangés
en proportion stoechiométrique. Le produit de la réaction est
légèrement soluble dans la DMSO, il est insoluble dans l'eau et
la plupart des solvants organiques. On obtient donc après mélange
des deux solutions, une suspension que l'on agite pendant 24 h
au minimum à 37°C. On complète ensuite la précipitation en ajoutant de l'acétone. Le précipité est séparé par centrifugation,
lavé dans les pots à centrifuger par un mélange eau-acétone (V/V),
jusqu'à ce que le liquide surnageant soit incolore. On fait le
dernier lavage à l'alcool avant de sécher le produit sous vide à
40°C. Le procédé est le même pour les dérivés nitrés en pata et
en ortho. Le tableau I rassemble les quantités mises en jeu.

| | (| para | ortho |
|-------------------------------|---|-----------------------|------------------------|
| Sel de lithium du complexe | : | 42 g (0,124 mode)) | 24,4 g (0,719 mole) |
| eau | : | 250 ml | 145 ml |
| Bromure de nitrobenzyle | : | 54 g (0,25 mole) | 31,4 g (0,145 mole) |
| DMSO | : | 250 ml | 145 ml |
| Acétone pour la précipitation | : | 625 ml | 350 ml |

Tableau I

e) Action de l'EDTA sur le complexe.

- Préparation de la solution de sel disodique de l'EDTA.

Dans une fiole jaugée de 2 litres, on introduit 58,4 g d'EDTA (0,2 mole) et 16g de Na OH. On complète avec de l'eau et on vérifie l'acidité (pH = 4,5).

. . . / . . .

- Obtention des aspartates de nitrobenzyle.

L'ester du complexe cuivrique est dissous dans une solution d'EDTA à ébullition. La solution bleue obtenue est filtrée à chaud. L'aspartate blanc, cristallise à froid.

| | (para | : ortho |
|---|----------------------|-------------------|
| Volume d'EDTA | 2100ml | 1220ml |
| Poids d'aspar- | 27g | 10,6g |
| Rendement par rapport au bro- mure engagé | : : : 37% : | : : : 24,9% |

- Caractérisation des aspartates de para nitrobenzyle et d'ortho nitrobenzyle.

Analyse élémentaire. PLAB

PLA PNB et PLA ONB

| | C | | | | | | | | | 0 | |
|-------|------|-------|-----|------|-------|--------|--------|-----|-------|------|-------|
| (a) | para | ortho | (a) | para | ortho | (a) pa | ra or | tho | (a) | para | ortho |
| 49,25 | 46,3 | 48,2 | 4,5 | 5,04 | 4,8 | 10,45 | 10,5 9 | 7,7 | 35,82 | 36,9 | 37,22 |

(a): calculé (b): trouvé

Spectres UV

 $\epsilon_{270}^{\text{PLAB}}$:200 $\epsilon_{270}^{\text{PLA}p\text{NB}}$: 10.200 $\epsilon_{270}^{\text{PLA}o\text{NB}}$: 5500

II PREPARATION DES ANHYDRIDES DE LEUCHS

1. Mode opératoire

le L-aspartate est mis en suspension dans du dioxanne fraîchement distillé. On purge le milieu réactionnel d'oxygène en faisant passer un courant d'azote sec pendant 15 minutes. Puis la température est élevée graduellement et on fait barboter le phosgène sous agitation jusqu'à ce que la solution soit limpide. L'excès de phosgène estéliminé en faisant de nouveau passer l'azote pendant deux heures. Le dioxanne est ensuite distillé sous vide en restant à une température inférieure à 40°C. Le NCA obtenu prend en masse. Il est alors ,soigneusement,

Tableau II

| Amino Acide engagé | | Aspartate de para nitrobenzyle | Aspartate d'ortho nitrobenzyle |
|---|------------------|-----------------------------------|--|
| Quantité de départ | 15g | 10g | 7,5g |
| Dioxanne | 300ml | 250ml | : 200ml |
| Durée de passage de COC1 ₂ | 1/2 heure | 1 heure | : : 1 heure : |
| Température de réaction | 35°C | 50°C | 50°C |
| Durée de passage de l'azote | 2 heures | 2 heures | 2 heures |
| Température de distillation sous vide du dioxanne | 40°C | 40°C | : : 40°C : |
| Recristallisation solvant | Acétate d'éthyle | (peu soluble─→ | : :Acétate d'éthyle(sous :agitation pendant 12h :au bain marie à 30°C) : |
| Précipitant | heptane | heptane | : heptane |
| Poids obtenu Rendement | 14,8g 90% | 9,1g 80% | : 7,1g : 86% |

repris par l'acétate d'éthyle et recristallisé par addition d'heptane. Plusieurs recristallisations peuvent être nécessaires. On le filtre sous azote et on le sèche sous vide à température ambiante. Le produit est conservé à l'abri de l'humidité à 4°C. Le tableau II indique les quantités de réactifs mises en jeu pour chacun des trois aspartates.

2. Caractérisation.

Les NCA's sont caractérisés par leurs spectres infrarouge : nous observons les bandes anhydride à 1840 et 1790 cm $^{-1}$ et les bandes C=0 ester à 1730 cm $^{-1}$.

III POLYMERISATION.

1. Mode opératoire.

On dissout le NCA ou le mélange de NCA's dans un solvant approprié anhydre, fraîchement distillé. On ajoute l'initiateur et le tout est conservé à température constante pendant plusieurs jours. La verrerie utilisée doit être parfaitement sèche et propre.

Le polymère est précipité en faisant tomber goutte à goutte le mélange réactionnel dans un excès de méthanol. Dans certains cas, en fin de polymérisation, le polymère se présente sous forme d'un gel. Dans ce cas, on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique N pour "casser" le gel avant de le précipiter dans le méthanol. (Tableaux III, et IV,).

2. Caractérisation.

Les polymères ainsi préparés ont été caractérisés par analyse élémentaire et spectroscopie ultra-violette. Voir tableaux ${\rm III}_2$ et ${\rm IV}_2$.

TABLEAU III $_{l}$: Préparation

| I 2000 | | •• | | :théorique : | du solvant | en mg |
|--------------------|------|------|------|--------------|------------------------------------|-------|
| i | | | | 0 | CHCl ₃ 90ml DMF 10ml | 1560 |
| | 6,6 | 517 | 1,7 | 14,65 | CHCl ₃ 70ml DMF 50ml | 1710 |
| III 1331 | 5,3 | 500 | 1,6 | ħ2 | CHCl ₃ 45ml DMF 25ml | 950 |
| (IV 1992 | 8 | 1008 | η, κ | 29 | DMF 50ml | 1750 |
| , v ; 1834 1834 | 7,3 | 1166 | | 35,4 | DMF 50ml | 1840 |
| VI : 895 | 3,59 | 680 | 1,97 | 35,5 | DMF 25ml | 1000 |
| VII :1083 | 4,3 | 1917 | 6,5 | 60,18 | DMF 50ml | 1930 |
| VIII | • •• | 3000 | 10,2 | 100 | DMF 50ml | 2150 |

les cas A/I=35, la température de polymérisation est de 30°C. [C] NCA totale=4% en poids. L'initiateur est la triéthylamine en solution à 1% dans le benzène. Dans tous

Synthétisé par Aragão.(50).

TABLEAU III_2 : Caractérisation.

| | | - | | - - - - | | | | ; ; ; ; | |
|-----------------------------|----------------|-----------------|---------------------|------------------------------------|-----------|---|----------------|------------------|--------------|
| % NO adopté ² | 1 | 0 | 15 | 26 | 28 | 2 4 | 9† | 29 | 100 |
| 2 :: | T | 9 | | 26 : | 28 | | 45 : | 99 | 100: |
| % en fonction NO | Z | 0 | 13,4 | 30 | 58 | 333:422 | 45 | 65 | 100 |
| | _E | 0 | ا ا جہ ا | 16 | 50 | l t | ω ! 1 1 | 56 | 7927 |
| | 1 5 | 0 | 19,8 | 33 | 35 | 41,4 | † † | 70 | 100 |
| | ΔΩ | 0 | 15 | . 26 | 28 | t 2 | 148 | 19 | 00 |
| | (q) | 24,07 | 25,12 | 26 | 26,28 | 26,92 | 27,16 | 28,79 | |
| 0% | (&) | 23,41 | 21,15 | 25,99 | 26,17 | 26,8 | 26,79 | 28,95 | 32 |
| % N | : (a) : : : | 6,71 | 7,33 | 8,43 | 8,34 | 8,59 | 8,93 | 9,50 | 1129 |
| | (B) | 6,83 | 7,54 | 8,12 | 8,23 | 8,58 | 8,58 | 9,65 | 11,2 |
| | (a) | 5,67 | 5,3 | 5,12 | 5,09 | 4,85 | 88 4 | 4,63 | 4,35 |
| %H | (B) | 5,36: | 5,13 | 5,96 | 4,93 | 4,83 | 4,81 | 84,4 | : 00° t |
| % D | (a) | 64,39:63,86: | 61,7 | 60,91:60,36: | 7,6 | ,75,59,02 | 8,6 | | 51,86: |
| | в | 64,39 | 62,38 | 60,91 | | 59,75 | η Ζ, 65 | 6,87 | 8 |
| o N | | H | | | · AI) | > : : : : : : : : : : : : : : : : : : : | I A) | | : IIIA) : |

(a) calculé à partir du % NO₂ d'après l'UV.

(b) trouvé



Préparation et caractérisation des PLAB, PLAONB et des copolymères (LAB, LAONB)

TABLEAU IV, : Préparation.

| No | NCA mg | LAB mmole | NCA mg | LAONB: mmole | % NO ₂ : théorique : en mole | Composition du solvant | Poids obtenu en mg |
|------|-----------|---------------|-----------|-----------------|--|---------------------------|-----------------------|
| IX | 769 | 3,08 | 114 | 0,39 | 11 | NB (:::16ml DMF 4ml | . - 25 40 |
| Х | 763 | 3 , 06 | 300 | : :1,02 : | 25 | NB 20ml DMF 5ml | 630 |
| ΧI | 791 | 3,18 | 450 | 1,53 | 32 | NB 25ml DMF 6ml | 720 |
| XII | 321 | 1,29 | 538,4 | :1,83 | 58 | NB 16ml DMF 4ml | 400 |
| XIII | 533 | 2,1 | 1467 | 5 | 73,3 | NB 40ml DMF 10ml | 1500 |
| XIV | | | 3000 | | 100 | NB 15ml DMF 60ml | 2120 |

L'initiateur est la triéthylamine en solution à 1% dans le benzène. Dans tous les cas A/I=35, la température de polymérisation est de 30°C. Le solvant est un mélange DMF/nitrobenzène, [C] NCA totale =4% en poids.



TABLEAU IV_2 : Caractérisation.

| %NO | adopté | 13 | 28 | 38 | 57 | 63 | 100 |
|---------|--------------|--------------|-------|---------|--------------|-------------|-------|
| | 0 | - | 23 | 31 | 57 | 63 | 100 |
| rès | Z | - | 19 | 21 | 55 | 49 | 7.86 |
| d'après | H | -1 | 56 | | 54 | 62 | 98,6 |
| NO % | _ c | 16 | 29 | 34 | 62 | 73 | 66 |
| 1 5% | _uv_ | 13 | 23 | | 57 | 63 | 100 |
| g g | (p) | 54,45 | 25,66 | 26,15 | 27,90 | 30,74 | 33,45 |
| %0 | : (a) : : | :24,43: | 26,62 | :27,69: | 28,65 | 30,02 | .32,0 |
| % N | (q) | 7,49 | 8,12 | 1 | 9,37 | 9,83 | 11,06 |
| | (a) | 7,37 | 8,43 | 86,8 | 09,6 | 10,18 | 0 |
| %н | (p) | 5,31 | 5,06 | 5,03 | 4,62 | 4,48 | 60,4: |
| | : (a) | 5,16 | 4,91 | | 4,52 | 4,34 | т, оз |
| % C% | (q) : | :62,14 :5,16 | 60,58 | :60,00 | 57,35 | 55,49 | .52,3 |
| | : (a) | 62,6 | 60,66 | :59,19 | 57,23 | 55,46 | .52,8 |
| 0 N | | (IX () | × | XI (XI | (XII (XII | (XIII () | (XIV |

(a) calculé à partir du $\%{
m NO}_2$ d'après l'UV.

(b) trouvé



CHAPITRE 111

ETUDE PHYSICOCHIMIQUE

DICHROISME CIRCULAIRE (DC) et DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE (DOR).

I RAPPELS THEORIQUES.

1) Dichroïsme circulaire (DC) et dispersion optique rotatoire (DOR).

Les bases de l'activité optique ne sont pas rappelées ici : on rappelle seulement que :

DOR et DC sont directement liés aux différences des parties réelles n et imaginaires K de l'indice de réfraction d'un milieu pour la lumière circulairement polarisée gauche et la lumière circulairement polarisée droite.

$$\Upsilon = \frac{\pi \nu}{c} \left[n_{G} - n_{D} \right] 1$$

$$tg \ \psi = th \left[\frac{K_{G} - K_{D}}{4} \right] 1$$

- v fréquence de la lumière incidente
- c vitesse de la lumière
- l épaisseur du milieu
- ho angle de rotation du plan de polarisation.
- ψ ellipticité de la lumière transmise.

Pour les solutions, on définit :

- la rotation molaire

$$[m] = \frac{18}{\pi} \cdot 10^3 \cdot \alpha \cdot \frac{M}{\alpha}$$

- l'ellipticité molaire

$$[\theta] = \frac{18}{\pi} \quad 10^3 \quad \theta \quad \frac{M}{c}$$

On lui préfère la différence des absorptions molaires pour les lumières circulairement polarisées droite et gauche

$$\Delta \varepsilon = (\varepsilon_{G} - \varepsilon_{D}) = \frac{4\pi}{18} - \frac{1}{2303} [\theta] = \frac{1}{3300} [\theta]$$

[m] et [θ] sont reliées par une relation de Kronig-Kramers :

$$[m]_{(v)} = \frac{2v}{\pi} \int_{0}^{\infty} \frac{\theta_{(v')}}{v'(v'^2 - v^2)} dv'$$

Loin des bandes d'absorption, [m] $_{(\nu)}$ se réduit à une somme de termes pris sur les bandes d'absorption de la forme :

$$(m) \quad (v) = \frac{2v}{\pi} \quad \frac{\sum_{\text{bande i}} \frac{\theta(v')}{v'} dv'}{\sum_{\text{i}} v^2 - v^2} = \frac{2v}{v^2}$$

$$\frac{2\nu}{\pi} \stackrel{\Sigma}{i} \frac{R_{i}}{\nu_{i}^{2} - \nu^{2}} = \frac{\sum KR_{i}\lambda_{i}^{2}}{\lambda_{i}^{2} - \lambda_{i}^{2}}$$

C'est une somme de termes de Drude où apparaît pour chaque transition :

- sa fréquence vi.
- sa force rotatoire R;

que l'on calcule à partir de la bande de dichroïsme circulaire.

$$R_{i} = \frac{3 \text{ hc}}{32 \pi^{3} \text{N}} 2303 \int_{0}^{\infty} \frac{\varepsilon_{\text{D}} - \varepsilon_{\text{G}}}{v} dv$$

La force rotatoire d'une transition entre l'état fondamental et un état excité α s'exprime en fonction des moments de transition dipolaires électrique μ α et magnétique m α .

. . . / . . .

$$R_{o\alpha} = I_{m} \left[\langle o | \mu | \alpha \rangle \langle \alpha | m | o \rangle \right]$$
 (8)

où I indique la partie imaginaire du produit scalaire.

On constate, d'après l'équation 5 qu'il est possible de calculer la contribution d'une transition observable, au pouvoir optique rotatoire jusque dans la bande d'absorption elle-même. Si la bande de dichroïsme circulaire possède une forme gaussienne, elle est caractérisée par trois paramètres:

- la longueur $\lambda_{\mbox{max}}$ correspondant au maximum de la bande dichro $\overline{\mbox{i}}$ que.
 - l'amplitude au maximum $\{\theta\}_{max}$.
- la demi- largeur de bande $\Delta\lambda$ mesurée à 1/e de la hauteur maximum.

Dans ce cas, Moscowitz (52) a mis l'expression 5 sous une forme analytique susceptible d'une intégration rapide sur ordinateur. C'est le programme qu'il a mis au point que nous avons utilisé.

Dans le cas des polyaspartates de nitrobenzyle, le polymère possède des chromophores de deux origines différentes:

- le chromophore peptidique CO-NH qui appartient à la chaîne principale du polypeptide.
- le chromophore nitrobenzyle qui fait partie des chaînes latérales du polymère.

Pour exprimer le fait que l'activité optique du chromophore CO-NH est directement reliée à la structure secondaire du polypeptide, les effets Cotton qui y correspondent sont appelés "intrinsèques". Par contre, les effets Cotton qui sont induits dans les chaînes latérales sont appelés "extrinsèques".

A partir de la relation (5), on pourra calculer la contribution à la rotation molaire des transitions optiquement actives des chromophores extrinsèques.

Par soustraction de la dispersion optique rotatoire observée, on obtient la contribution des transitions du chromophore intrinsèque dans l'intervalle ultra-violet-visible.

On peut alors chercher si cette différence entre les rotations molaires calculées et mesurées est en accord soit avec une loi de Moffitt-Yang (1) soit avec une expression de Drude à deux termes (53). A partir des résultats obtenus, on pourra obtenir des informations sur la structure secondaire du polypeptide ou sur l'existence de transitions optiquement actives dans l'ultra-violet lointain qui ne peuvent être observées expérimentalement.

L'expression 8 de la force rotatoire indique que si le chromophore considéré possède un plan ou un centre de symétrie, la force rotatoire sera identiquement nulle, μ_{0} et m_{0} ne pouvant être simultanément non nuls.

2) Pouvoir optique rotatoire des hélices chromophores "intrinsèques".

Dans le cas d'une hélice, on a affaire à un motif structural optiquement actif qui se répète suivant un arrangement hélicoïdal. Les anomalies d'activité optique observées peuvent être attribuées :

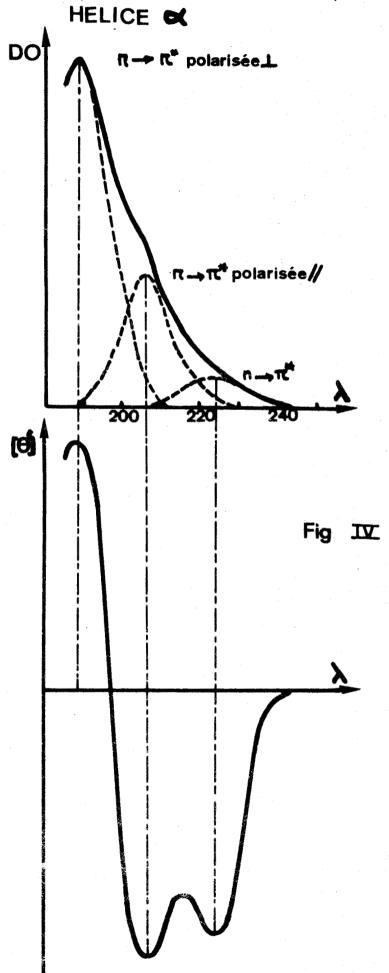
- soit à la modification de la géométrie du motif structural, figé par la configuration hélicoïdale.
- soit à l'interaction entre les chromophores voisins dans la géométrie nécessairement asymétrique imposée par la chiralité de l'hélice. C'est cette seconde approche qui s'est révélée être la plus fructueuse. Fig IV.

3) Chromophores "extrinsèques".

L'introduction d'un effet Cotton "extrinsèque" dans un chromophore symétrique lié à une structure en hélice a été longtemps considérée comme ayant deux origines possibles :

- l'interaction entre chromophores se déduisant par symétrie hélicoïdale, le squelette polypeptidique servant uniquement à fixer leur géométrie respective.
- l'asymétrie du champ interne créé par l'hélice au niveau d'un chromophore qui lui est rigidement lié.

SPECTRE UV ET DICHROIQUE D'UN POLYPEPTIDE EN





Mais depuis, on a mis en évidence le fait que la chiralité du carbone asymétrique C_{α} pouvait, à lui seul, induire une activité optique dans un chromophore extrinsèque, même quand la chaîne latérale est longue, comme dans le cas d'un glutamate par exemple (41).

L'interprétation quantitative d'effets Cotton "extrinsèques" n'est actuellement pas possible. Une telle étude impliquerait la connaissance exacte des fonctions d'onde du chromophore étudié, ce qui n'est pas le cas du groupement nitrobenzyle.

II ETUDE DES COPOLYMERES (LAB, LA pNB) et (LAB, LA oNB), par dichroïsme circulaire

1) Propriétés optiques des chromophores.

Nous ne rappelerons pas ici les propriétés optiques du groupement peptidique qui ont été maintes fois citées.

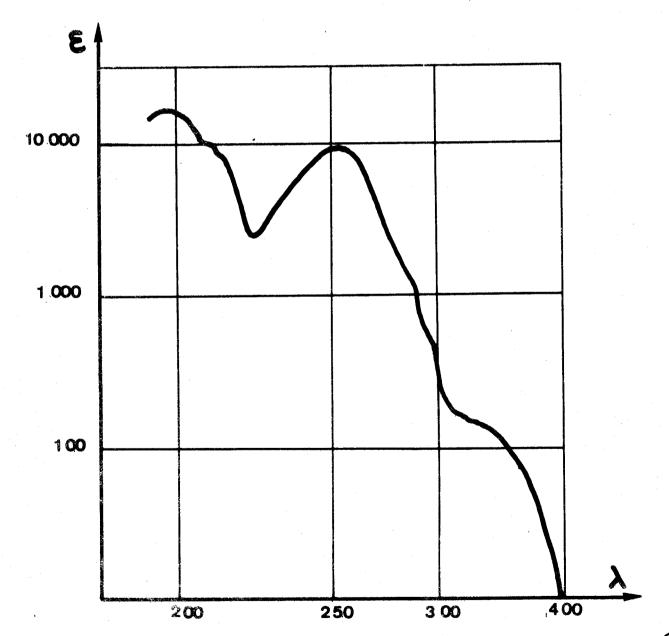
On peut consulter à ce sujet les travaux de Holwarth et Doty
(2).

le chromophore nitrobenzyle.

Pour étudier les propriétés optiques du chromophore nitrobenzyle, on prend comme référence la molécule de nitrobenzène. Cette molécule, caractérisée par le fait que le groupement NO2 se trouve situé dans le plan du cycle aromatique, possède dans l'éther de pétrole le spectre ultra-violet montré dans la figure V . On y voit les bandes suivantes :

- à 330nm, une large bande (ε_{max} = 140).
- à 280nm, un épaulement ($\epsilon_{\text{max}}^{\text{mex}} = 280$)
- à 250nm, une bande d'intensité moyenne (ε_{max} = 8700)
- à 200nm, une bande intense (ϵ_{max} = 15 500).

L'origine de ces bandes d'absorption est difficile à établir. Platt (54) suggère que la bande à 330nm est dûe à une transition $n \to \pi^*$, mais d'autres auteurs pensent que cette bande



SPECTRE UV DU NITRO BENZENE



Fig V

est plutôt dûe à une transition $\pi \to \pi^*$ (55). En fait, nous croyons, avec Susuki (56) que c'est une bande $n \to \pi^*$ dûe à une transition électronique de l'oxygène vers le groupement nitro. La bande à 280 nm correspond à celle du benzène et serait dûe à la transition entre un état fondamental et un état excité. Mais cette explication n'est pas acceptée par certains auteurs, qui attribuent l'absorption à 280nm à une transition $\pi \to \pi^*$ du groupement nitro (57). La bande à 250 nm est toujours interprétée comme une bande de transfert de charge intramoléculaire (56,57).

Les spectres des polyaspartates de paranitrobenzyle et d'ortho nitrobenzyle dans le mélange CHCl₃/HFIP (80V/20V) montrent ces mêmes bandes. Figure VI.

- aux environs de 270nm, la bande de transfert de charge.
 - deux épaulements à 330 et 280nm.

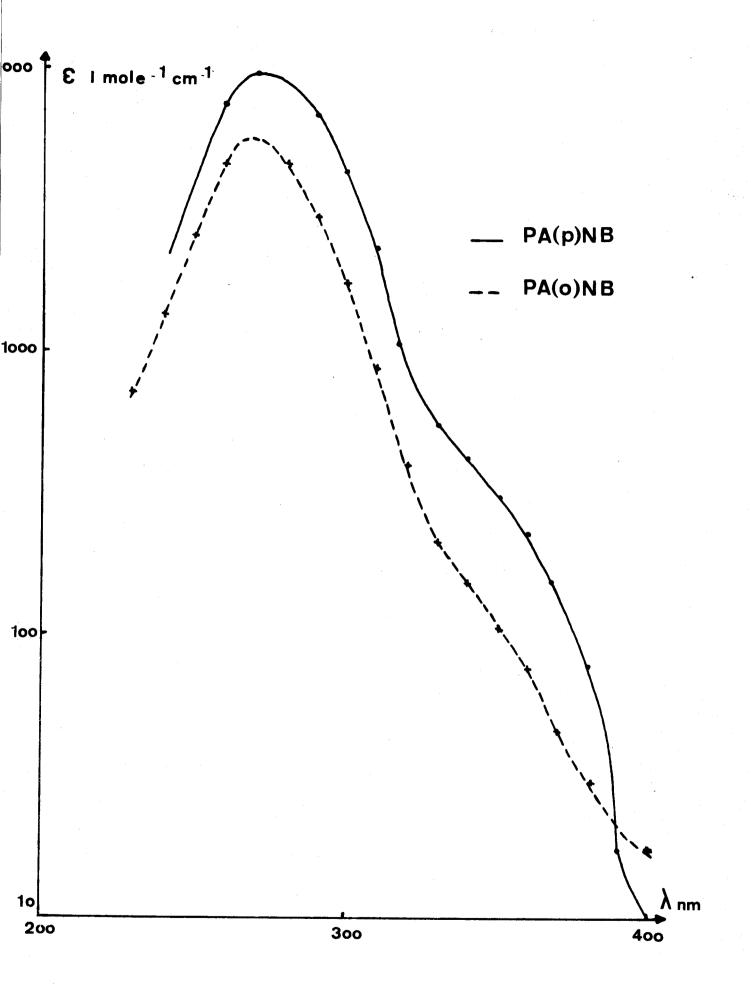
Le chromophore nitrobenzyle est un chromophore intrinsèquement symétrique qui ne sera optiquement actif que s'il est perturbé de façon dissymétrique. Nous avons vu précédemment que l'origine de cette activité optique est souvent difficile à définir. De plus, les effets Cotton résultant de chacune des transitions peuvent être d'intensité différente.

Mais quoi qu'il en soit, nous avons constaté à partir d'une étude sur les polyghutamates de para nitrobenzyle que d'une part la bande située aux environs de 200nm n'était jamais active et que d'autre part, il n'y avait jamais superposition entre les bandes dûes au groupement CO-NH et celles dûes au chromophore nitrobenzyle. Ceci a toujours permis l'utilisation du maximum à 222nm de la bande dûe à la transition $n \to \pi^*$ peptidique pour l'étude de la structure secondaire.

2) Conditions expérimentales.

a) Choix du solvant.

Nous avons travaillé avec un solvant qui favorise la structure hélicoïdale : le chloroforme CHCl qui dissout les copolymères (LAB, LAPNB) contenant jusqu'à 66%



SPECTRES UV
solvant CHCL₃/HFIP
80 20



en groupements para nitrobenzyle et les copolymères (LAB, LAoNB) contenant jusqu'à 80% en groupements orthonitrobenzyle.

Pour compléter notre étude, nous avons pris un mélange chloroforme/hexafluoroisopropanol (CHCl₃/HFIP) dans une proportion 80/20 en volume. Ce mélange dissout les copolymères quelle que soit la teneur en dérivés nitro, ainsi que le PLApNB et le PLApNB.

L'hexafluoroisopropanol n'est pas un solvant hélicogène pour le polyaspartate de benzyle. En effet, il est
suffisamment acide pour détruire l'hélice peu stable des
polyaspartates. Nous pouvons donc voir, en comparant les
spectres obtenus dans CHCl₃ et CHCl₃/HFIP, l'influence de
l'addition de ce solvant sur le comportement des copolymères.

b) Mode opératoire.

Les spectres ont été réalisés sur un dichrographe Roussel-Jouan II. La concentration des solutions a été calculée à partir des spectres ultra-violet pour que la densité optique soit comprise entre 0,8 et 1,2. Nous disposions de cellules d'épaisseurs différentes (2, 1, 0,5, 0,1, 0,01 cm). Celles-ci nous ont évité des dilutions moins précises. La cellule de 0,01cm nous a permis d'obtenir la bande correspondant à la transition $n \to \pi^{\bullet}$ peptidique aux environs de 222nm. Malheureusement, nous n'avons pas pu aller audelà, car l'absorption dûe au chloroforme devient trop importante.

Il n'a donc jamais été possible d'obtenir les bandes caractéristiques de la transition $\pi \rightarrow \pi^{\bullet}$. Seule la valeur de $[\theta]_{222}$ a été utilisée pour la détermination de l'hélicité : on admet qu'à cette longueur d'onde, l'ellipticité dûe à la chaîne statistique est nulle, et qu'aucune structure, autre que l'hélice α et la pelote statistique n'est présente dans le milieu.

Si [θ] $_{222}$ est négatif, on a une hélice α droite; si [θ] $_{222}$ est positif, on a une hélice α gauche.

Pour une structure parfaitement hélicoïdale, on admet que [6]₂₂₂ = 40 000 deg.cm².décimole⁻¹. Cette valeur va nous permettre de calculer le taux d'hélicité pour chacun des copolymères. (2).

L'ellipticité [6] a été calculée à partir de la différence entre les densités optiques (A_L-A_R) lue directement sur le spectre dichro \bar{i} que.

$$[\theta] = 3300 \frac{M}{cd} (A_L - A_R) s$$

s : sensibilité de l'appareil.

 $A_{L}-A_{R}$ en mm.

M : masse du résidu en g.

c : concentration en polymère en g/l:

d : épaisseur de la cuve en cm.

Nous n'avons pas corrigé cette éllipticité du facteur de Lorentz $\frac{3}{n^2+2}$ car cette correction est de plus en plus

contestée.

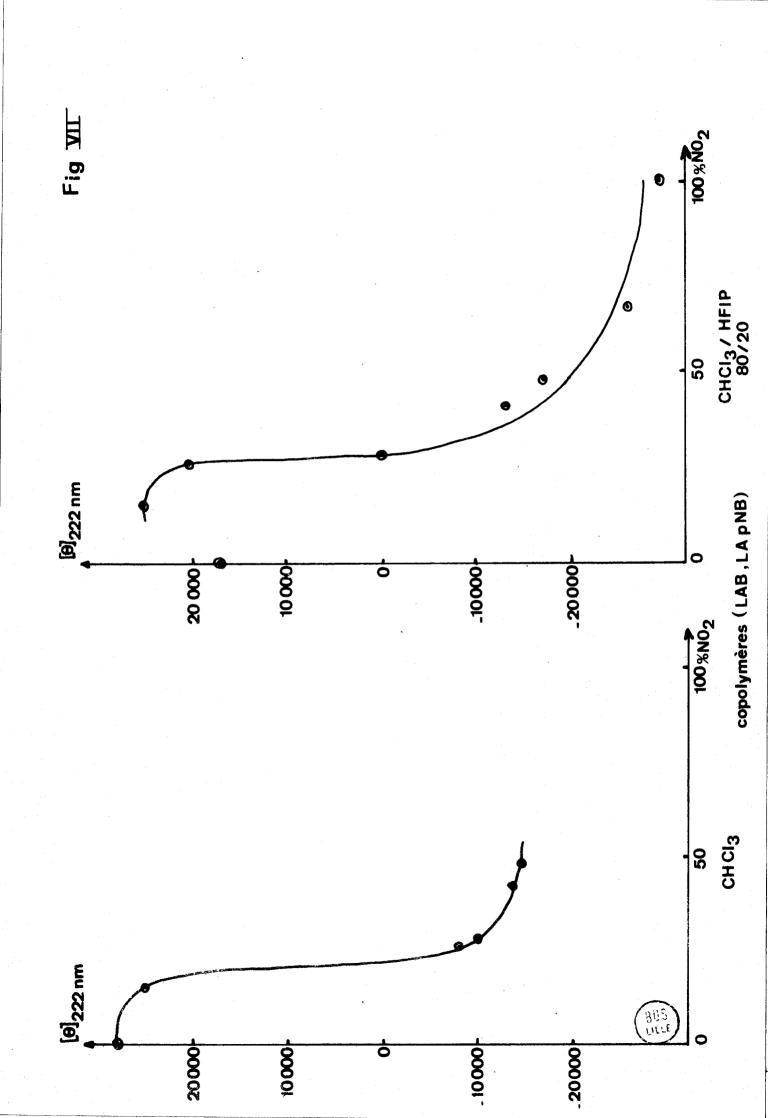
Pour calculer l'éllipticité de la bande intrinsèque, nous avons utilisé la concentration totale en polymère. Par contre, pour calculer l'éllipticité des bandes extrinsèques, nous avons considéré la concentration en résidus para nitrobenzyle ou ortho nitrobenzyle.

3) Résultats.

a) copolymères d'aspartate de benzyle, aspartate de para nitrobenzyle.P (LAB, LAPNB).

- bandes dûes au chromophore peptidique.

La figure VII nous montre l'ellipticité à 222nm pour chaque copolymère, dans CHCl₃ et dans le mélange CHCl₃/HFIP, le copolymère à 67% de dérivé nitro et le polyaspartate de para nitrobenzyle n'étant pas soluble dans le chloroforme pur.



Comme l'avait déjà montré Bradbury (14), le polyaspartate de benzyle adopte 69% d'hélice α gauche dans CHCl 3 et $[\theta]_{222}$ = + 25.000 deg.cm².décimole⁻¹. Ce taux d'hélicité est un peu faible, de l'ordre de 47% dans le mélange CHCl 3/HFIP.

Quand la teneur en groupement nitrobenzyle augmente dans les copolymères, l'ellipticité s'annule puis devient négative, ce qui est caractéristique d'une transition hélice gauche

hélice droite. Cette transition a lieu pour une teneur d'environ 25% en dérivé nitrobenzyle; nous n'avons pas attribué de signification à la différence que l'on observe sur la figure VIIentre les transitions s'opérant dans CHCl₃ ou dans le mélange CHCl₃/HFIP. Cela nous semble être de l'ordre de grandeur de l'erreur expérimentale.

De plus, on constate que l'addition d'une très petite quantité de groupement nitrobenzyle augmente la teneur en hélice α gauche dans le mélange CHCl₃/HFIP ce qui n'est pas observé dans le CHCl₃ seul.

Le polyaspartate de para nitrobenzyle adopte dans le solvant mixte $CHCl_3/HFIP$ une conformation en hélice α droite, $\left[\theta\right]_{222} = -28.000$ ce qui correspond à un taux d'hélicité de 75%. Il y a donc transition hélice α gauche \rightarrow hélice α droite lorsque l'on ajoute des groupements para nitrobenzyle dans la chaîne latérale.

Il est intéressant de noter que le copolymère à 28% dans le mélange CHCl₃/HFIP possède une ellipticité nulle. Cela correspond-il à une structure en pelote statistique ou à un mélange d'hélices de sens contraire présentes en égales quantités? Le dichroïsme circulaire ne nous permet pas de résoudre ce problème, mais nous verrons dans la suite de ce travail comment la Résonance Magnétique Nucléaire peut répondre à cette question.

- bandes dûes auchtromophore nitrobenzyle.

D'après le spectre ultra-violet du groupement nitrobenzyle, nous pouvons nous attendre à observer entre 250nm et 400nm des bandes dichroïques extrinsèques.

Nous avons d'abord réalisé un spectre dichroïque sur l'aspartate de para nitrobenzyle dans le mélange CHCl₃/HFIP (fig VIII) et nous avons constaté l'existence de bandes dichroïques correspondant aux différentes transitions.

Ces effets Cotton sontdus à la présence du carbone asymétrique en d, mais leur intensité est faible; aussi nous les avons négligés lors de l'interprétation des résultats obtenus sur les polymères et les copolymères.

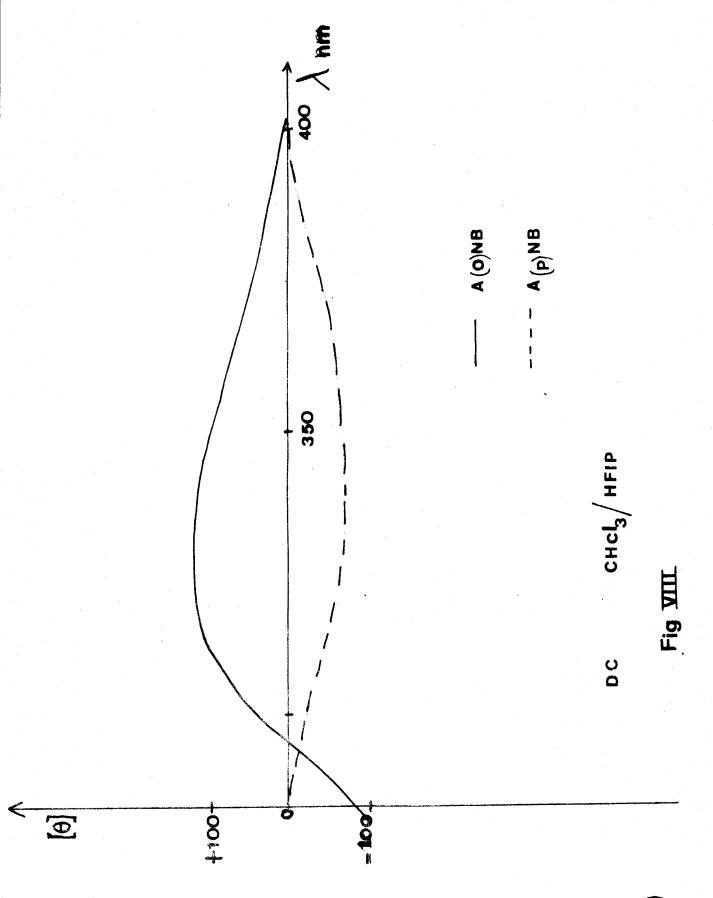
Les figures IX et X représentent les spectres dichroïques entre 250 et 400nm tracés à partir des copolymères (LAB,LApNB) dans CHCl₃ et dans le mélange CHCl₃/HFIP. On observe trois bandes aux longueurs d'onde attendues :

La première présente un maximum vers 330nm. Elle est, quand on l'observe, très large et toujours négative.

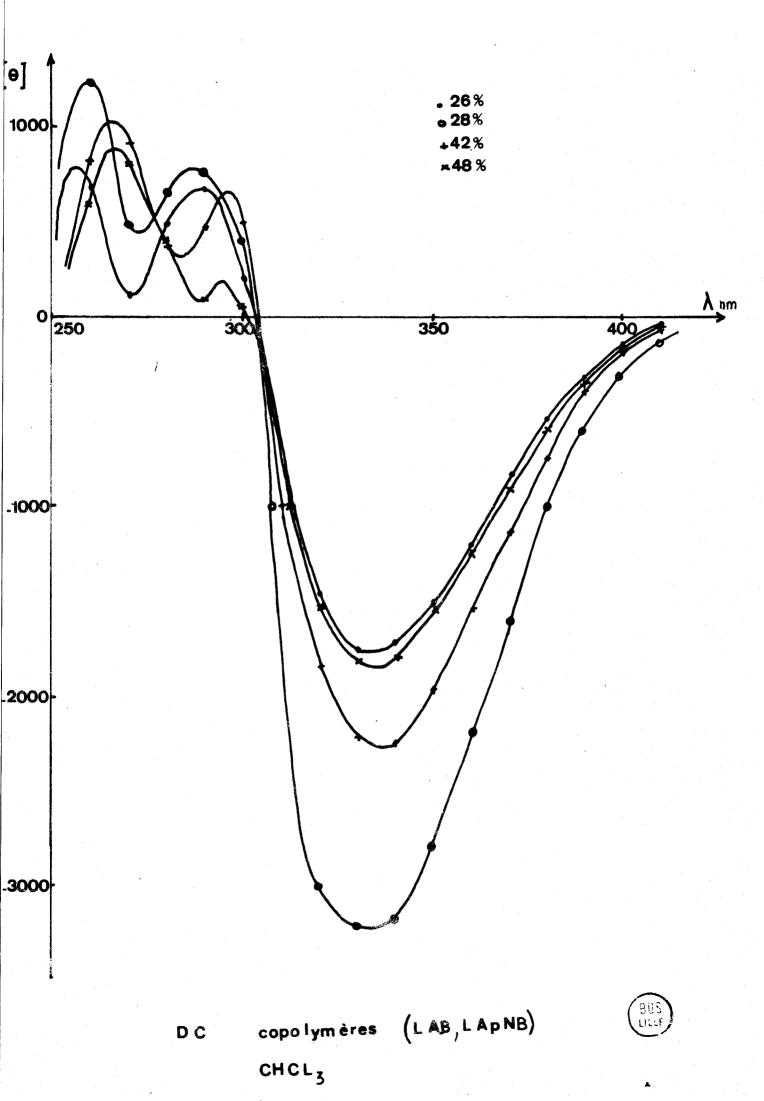
Les deux autres ont leur maximum respectivement à 290nm et 250nm. Elles sont toujours positives. Le fait qu'à ces deux dernières bandes d'absorption correspond un coefficient d'extinction molaire élevé, nous oblige à utiliser des cellules très minces. Le signal dichroïque sera très affaibli et la précision quant au tracé des courbes sera nettement moins bonne que pour la bande à 330nm. Sur les figures XI et XII, nous avons porté les variations de l'éllipticité aux maxima des bandes dichroïques extrinsèques en fonction de la teneur en dérivé nitro des copolymères; puis reporté la valeur de [0]₂₂₂, pour relier la variation de l'intensité des bandes extrinsèques à la structure secondaire.

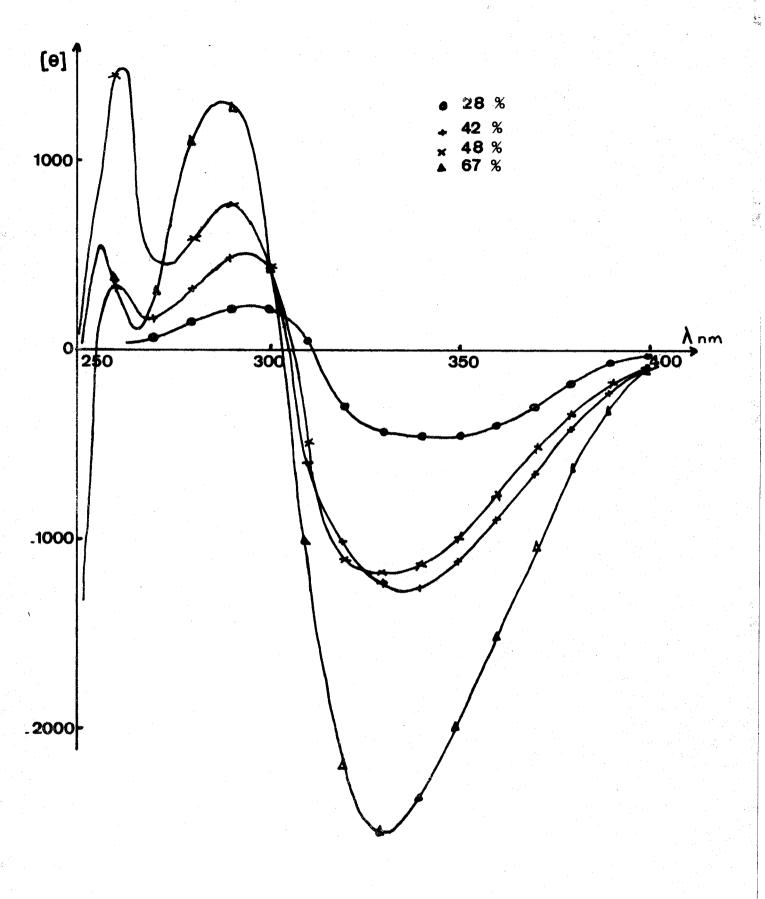
- bande à environ 330nm [6] 350.

Pour les copolymères dont la teneur en dérivé nitro est de 25% environ, l'éllipticité est nulle, devient négative, puis augmente en valeur absolue avec la teneur en dérivé nitro.



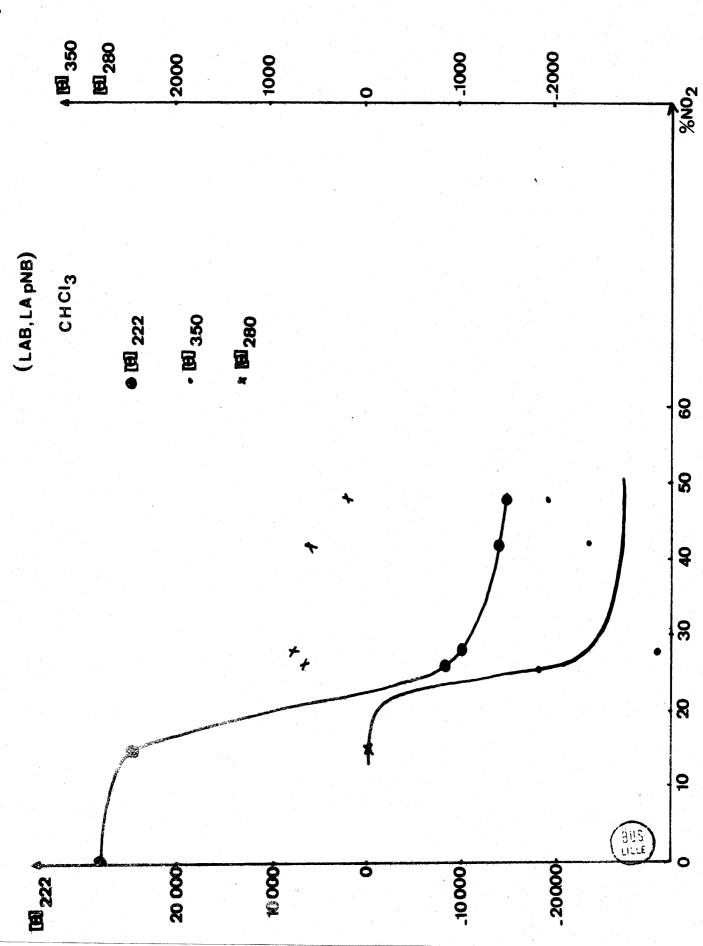
BUS





BUS

copolymères (LAB, LApNB)
CHCL/HFIP



BUS

Elle présente un point d'inflexion pour une valeur à peu près identique à celle obtenue à partir de la courbe de transition $[\theta]_{222}$ hélice gauche \rightarrow hélice droite. Cette similitude entre les variations de $[\theta]_{350}$ et $[\theta]_{222}$ est trouvée aussi bien dans CHCl₃ que dans le mélange CHCl₃/HFIP. Il semblerait donc que cette bande extrinsèque puisse servir à suivre une transition de la structure secondaire. Il est toutefois surprenant que l'éllipticité $[\theta]_{350}$ soit nulle lorsque le polymère adopte une conformation en hélice α gauche.

Etant donné que la transition a lieu pour une teneur en dérivé nitro inférieure à 25%, il est difficile de dire si l'activité optique de cette bande est dûe à l'interaction entre le chromophore nitrobenzyle et le champ asymétrique de l'hélice, ou aux interactions chaîne latérale-chaîne latérale.

En effet, si ces dernières existent, elles se font lorsque le polymère est sous forme d'hélice α , entre les $n^{\mbox{i\`eme}}$ et $(n+3)^{\mbox{i\`eme}}$ ou $(n+4)^{\mbox{i\`eme}}$ groupements chromophores, ce qui statistiquement ne peut avoir lieu dans nos copolymères.

- Bande à 280nm environ [6]

L'éllipticité $[\theta]_{280}$ ne suit pas une loi de variation comparable à celle de $[\theta]_{350}$. Dans CHCl $_3$, il n'a pas été possible de tracer une courbe de $[\theta]_{280}$ en fonction de la teneur en groupement nitro, mais il semblerait cependant que dans le mélange CHCl $_3$ /HFIP, une loi linéaire puisse être obtenue.

- Bande à 260 nm environ $[\theta]_{260}$

Dans ce cas, le signal dichroïque est trop faible et la densité optique trop élevée pour qu'une mesure suffisamment précise de l'éllipticité soit réalisable.

Nous constatons l'existence d'une bande dichroïque correspondant à cette transition mais nous ne l'avons pas exploitée.

b)_copolymères_d'aspartate_de_benzyle,_aspartate_d'ontho_nitrobenzyle.P(LAB,LASNB).

- chromophore peptidique.

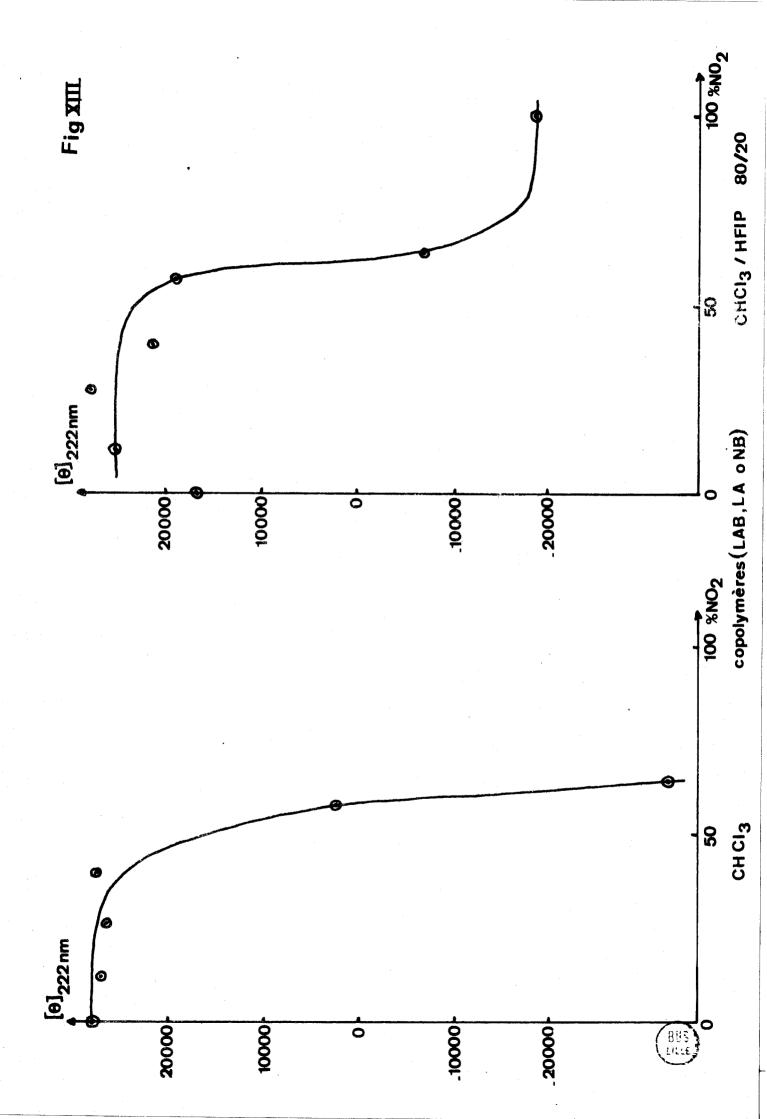
Comme dans le cas des dérivés "para", nous avons étudié la variation $\left[\theta\right]_{222}$ en fonction de la teneur en groupements nitrobenzyle, en utilisant CHCl₃ et le mélange CHCl₃/HFIP comme solvant. Fig XIII.

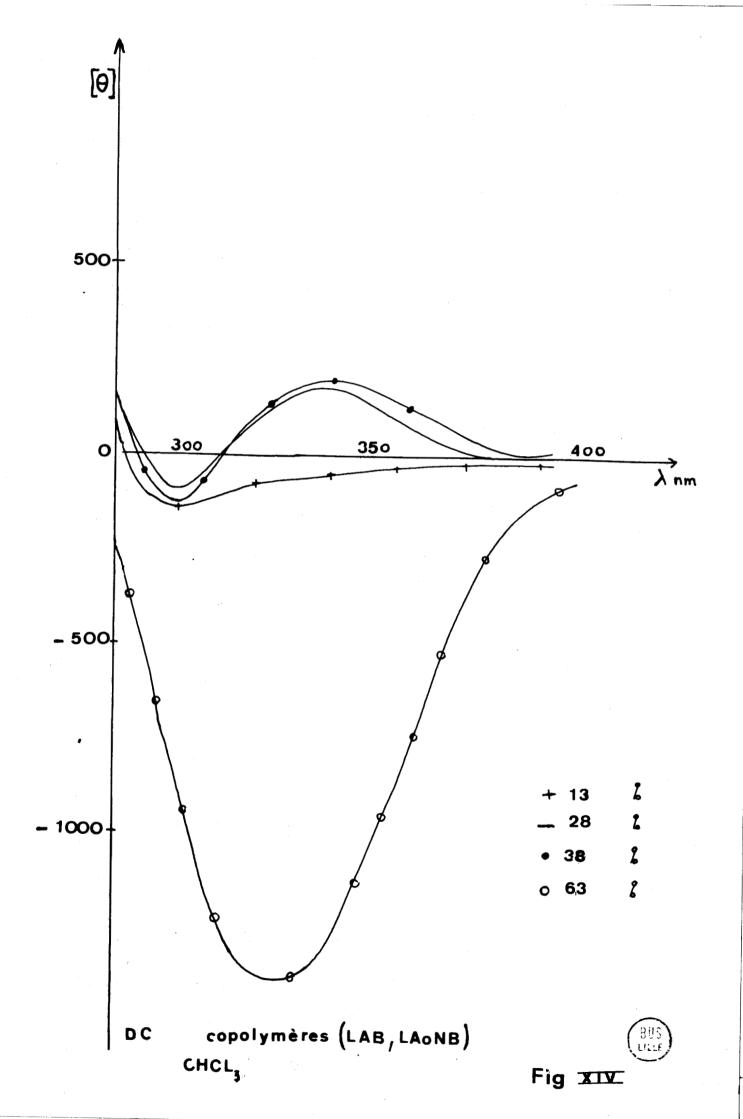
On constate que pour une teneur en groupements nitro inférieure à 60% environ, [0] $_{222}$ est positif, ce qui correspondrait à une hélice α gauche. De nouveau, pour le mélange CHCl $_3$ /HFIP, l'éllipticité des copolymères à faible teneur en groupement nitrobenzyle est supérieure à celle de l'aspartate de benzyle, ce qui signifierait que, même en faible quantité les groupements nitrobenzyle stabilisent la structure secondaire en hélice α .

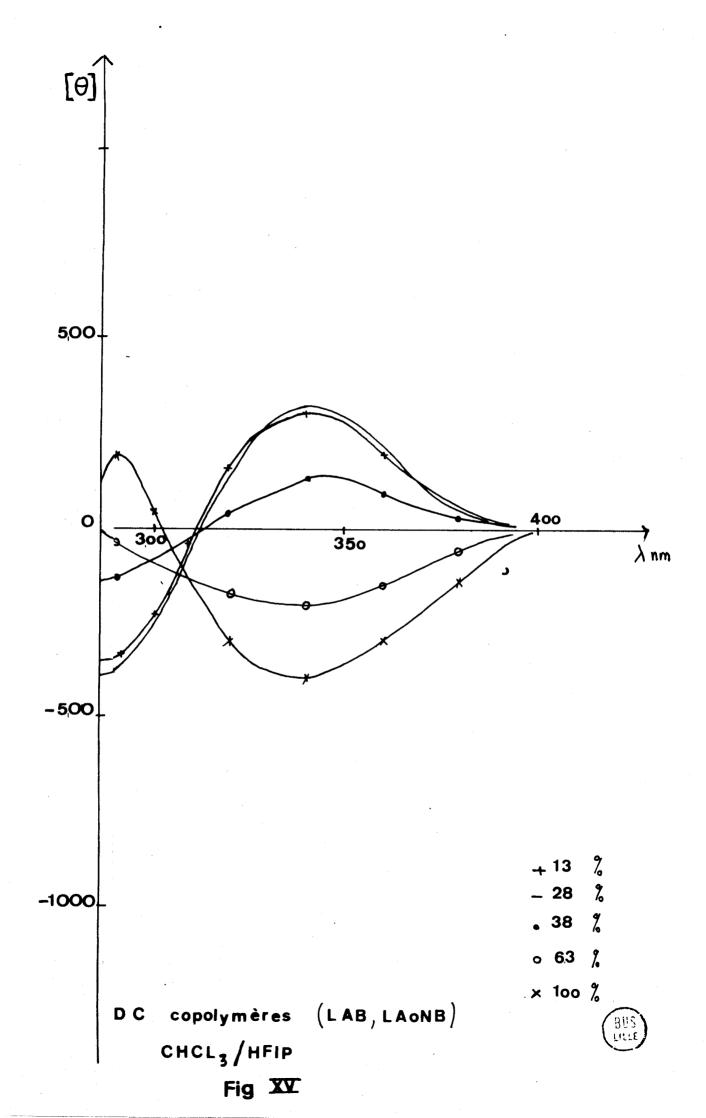
Aux erreurs d'expérience près, la transition est obtenue dans CHCl₃ et CHCl₃/HFIP pour une même teneur en dérivés nitro soit 60% environ. Cette valeur est supérieure à celle obtenue lors de l'étude des dérivés para, qui, rappelons-le, était de 25%. De plus, dans le mélange CHCl₃/HFIP, le polyaspartate d'ontho nitrobenzyle a une valeur [θ] ₂₂₂ de 18.000 deg.cm². décimole , ce qui correspondrait à une teneur en hélice droite de l'ordre de 50%. Dans les mêmes conditions le polyaspartate de para nitrobenzyle avait une teneur en hélice α droite d'environ 70%. Ces deux observations seraient en accord avec le fait que l'hélice α droite formée par le polyaspartate de para nitrobenzyle est plus stable que l'hélice α droite formée par le polyaspartate d'ontho nitrobenzyle.

-chromophore nitrobenzylique.

Les figures XIV et XV montrent l'ellipticité calculée à partir de la concentration en résidus ontho nitrobenzyle dans le domaine de longueurs d'onde compris entre 300 et
400nm. La bande à 330nm est toujours bien visible, et son signe
varie suivant la concentration en groupements nitro des copolymères.







Son intensité, en valeur absolue, est inférieure à celle des dérivés para correspondants.

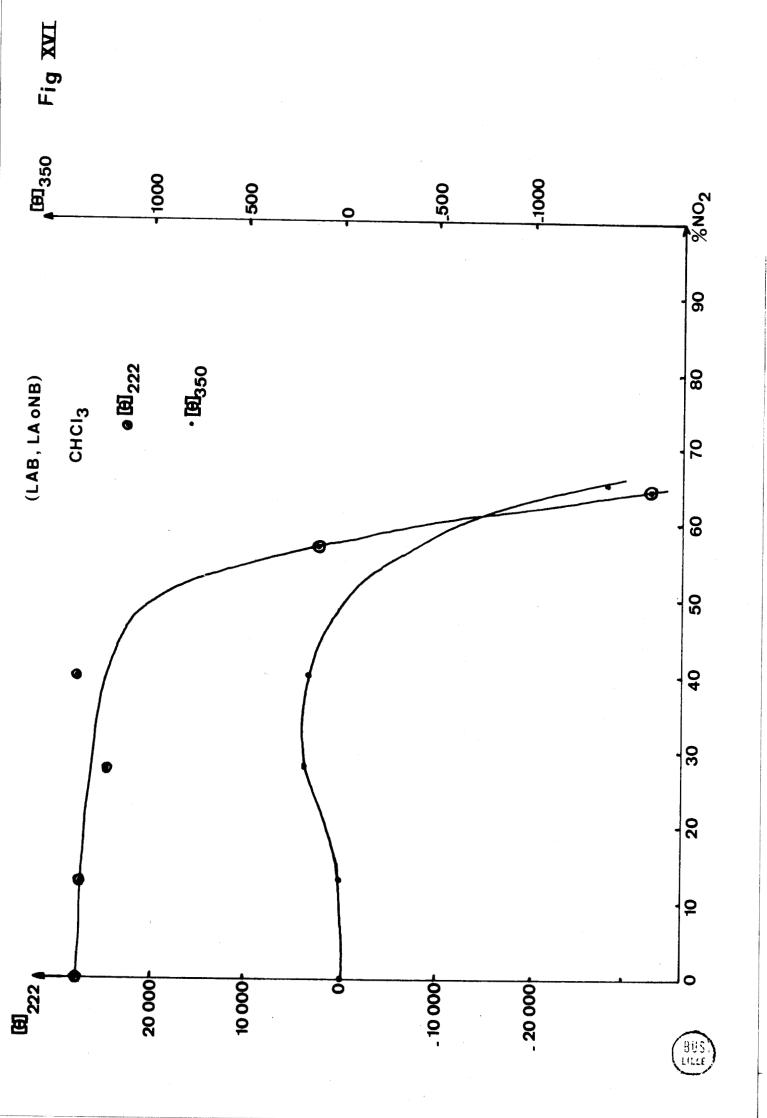
A 290nm et 250nm, le signal dichoîque est tellement faible que les solutions utilisées doivent être très concentrées; étant donné le coefficient d'extinction molaire de ces bandes, le signal lumineux n'est plus suffisant et l'erreur faite sur la détermination de l'ellipticité est trop importante pour que l'on puisse exploiter les mesures.

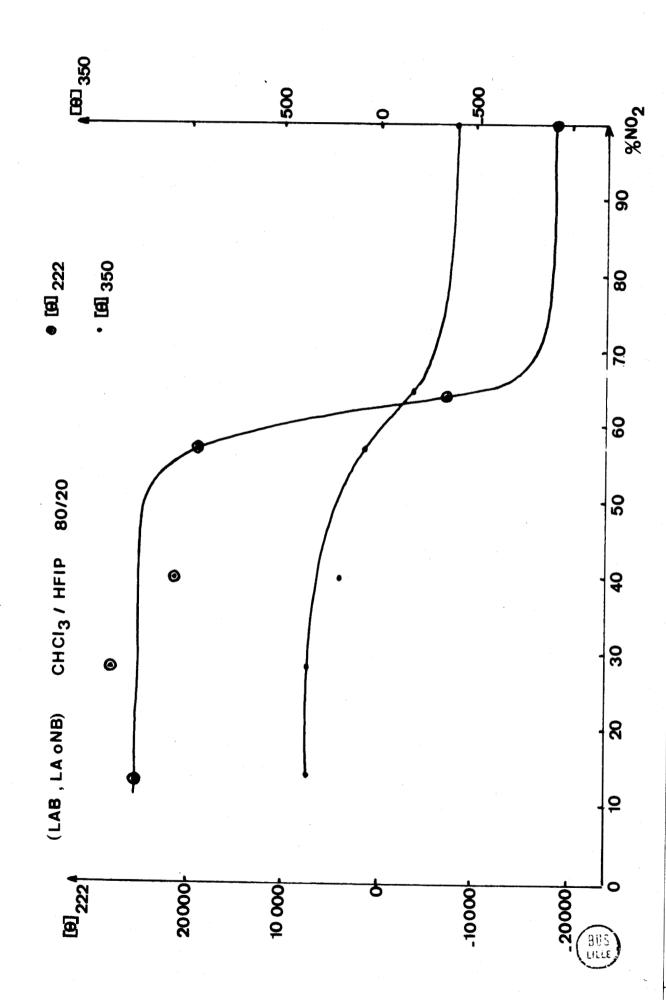
La variation du maximum de la bande à 350nm a été portée en fonction de la teneur en groupements nitrobenzyle dans le copolymère.— pour le CHCl $_3$ (fig XVI) et pour le mélange CHCl $_3$ /HFIP (fig XVII)— et comparée à la variation de [θ] $_{222}$. On constate, comme dans le cas du dérivé para que les points d'inflexion des deux courbes se situent approximativement à une même valeur du pourcentage de NO $_2$, c'est à dire 60% environ.

Pour des teneurs inférieures à cette valeur, c'est à dire lorsque les copolymères adoptent une conformation en hélice α gauche, la valeur de $[\theta]_{350}$ est positive, puis devient négative quand les copolymères adoptent une conformation en hélice α droite; mais dans ce cas, la valeur absolue de $[\theta]_{350}$ est plus importante.

Pour les copolymères dont la teneur est supérieure à 60% de groupements ortho nitrobenzyle, l'hélice droite est moins stable dans le mélange CHCl₃/HFIP que dans CHCl₃ pur (fig XIII). Parallèlement on peut noter que l'ellipticité[0]₃₅₀ est moins importante pour un même copolymère dans le premier cas que dans le second. Cela signifierait que la bande dichroïque extrinsèque ne deviendrait optiquement active que lorsque l'hélice est stable.

Dans le cas des dérivés "para" comme dans le cas des dérivés "ortho", une transition hélice gauche -> hélice droite a été observée. En ce qui concerne les bandes "extrinsèques", les effets sont nettement moins importants pour les copolymères en "ortho" que pour les copolymères en "para". Néanmoins, ces bandes permettent là aussi dans les deux cas de suivre le changement de conformation.





III ETUDE DES COPOLYMERES P(LAB, LAPNB) et P(LAB, LAONB) par dispersion optique rotatoire.

L'utilisation de la courbe de dispersion optique rotatoire et du b_o de Moffitt-Yang à la détermination de la structure secondaire des polymères et des copolymères de nitrobenzyle, n'est pas possible à cause de l'existence des effets Cotton extrinsèques.

Pour qu'une telle détermination soit réalisable, il est nécessaire de retrancher à la courbe de DOR obtenue expérimentalement, la contribution à la rotation molaire des chromophores extrinsèques. Cette dernière est obtenue à l'aide d'une transformation de Kronig et Kramers à partir de la courbe dichroïque correspondant aux groupements nitrobenzyle.

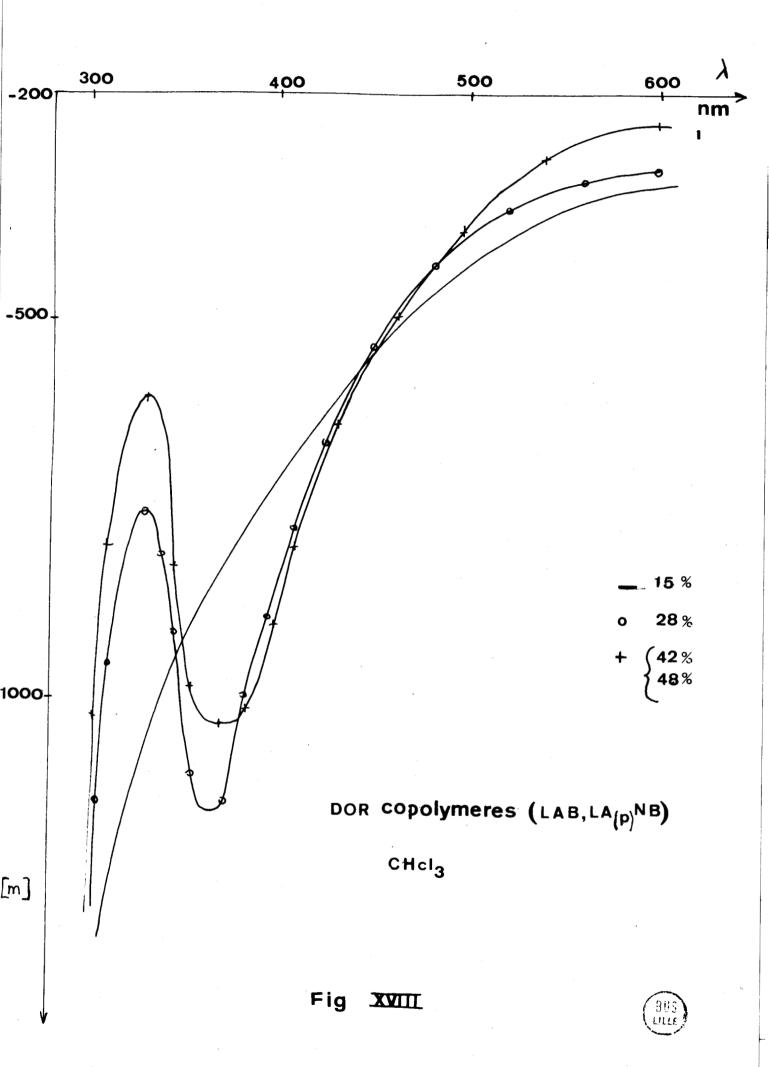
Pour faire cette transformation, nous avons utilisé l'approximation de Moscowitz (52) qui assimile chaque bande dichroïque à une gaussienne.

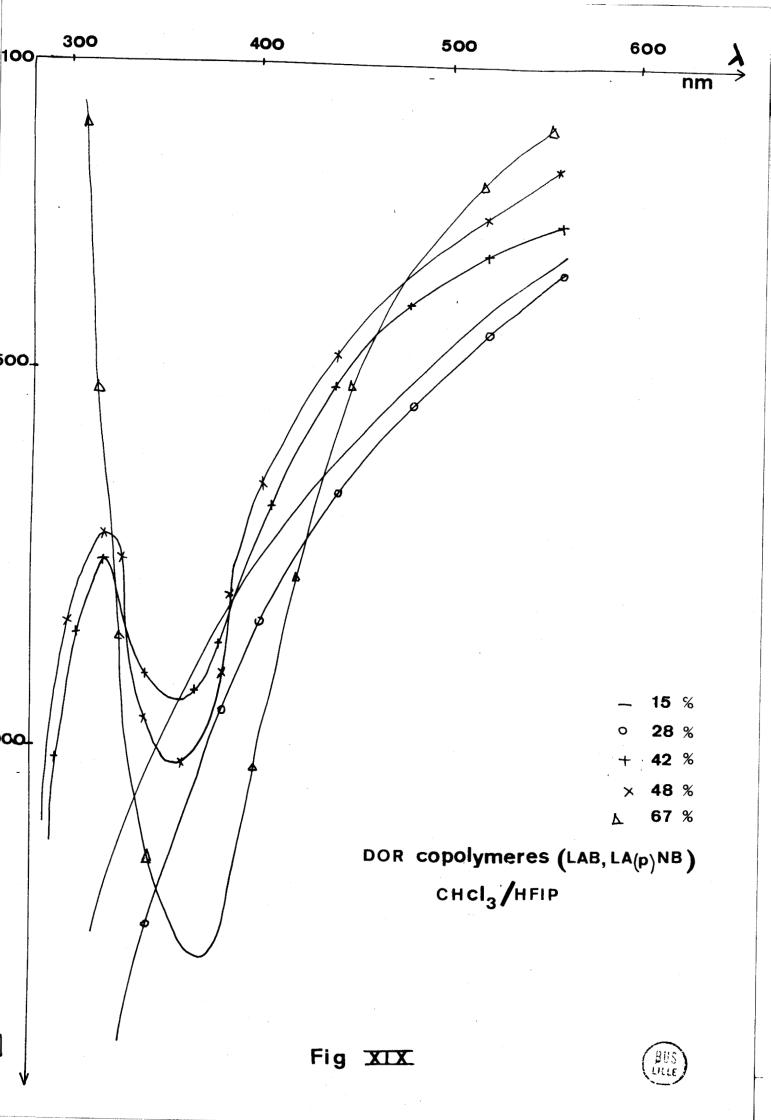
S'il n'existe aucune bande dichroïque extrinsèque inférieure à 190nm, la courbe de DOR obtenue représentera la seule contribution du chromophore CO-NH et la loi de Moffitt-Yang qu'on lui appliquera sera linéaire. On pourra donc faire le calcul de bo qui donnera une indication quant à la structure secondaire.

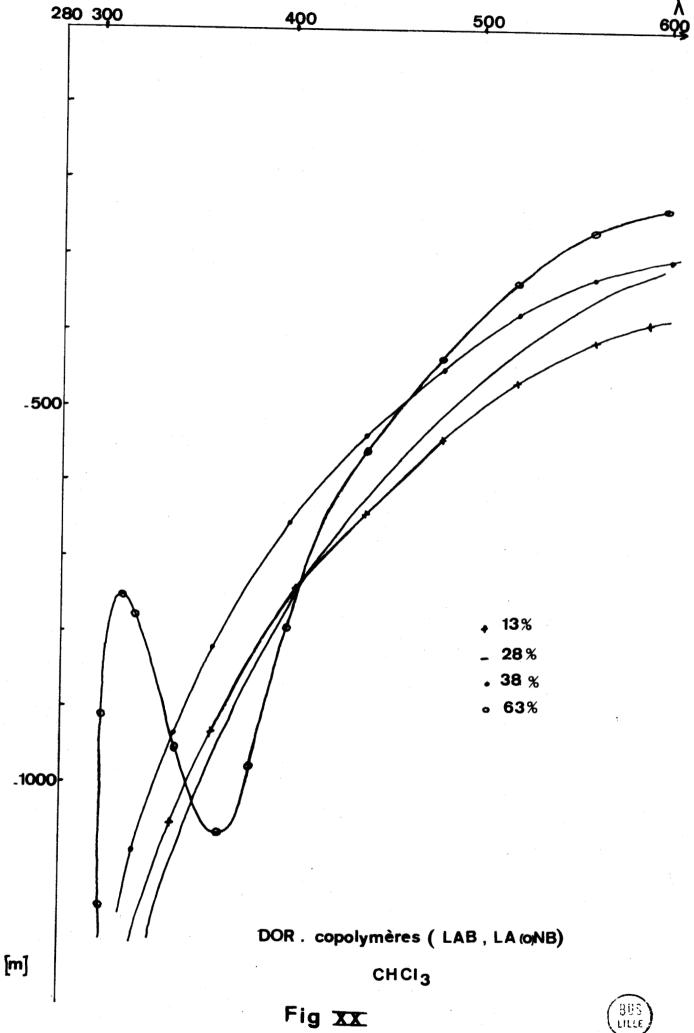
Partie expérimentale

Toutes les courbes ont été réalisées sur un polarimètre Perkin-Elmer 141 donnant le pouvoir optique rotatoire
de 600nm à 280nm. Les concentrations sont les mêmes que celles
utilisées lors de l'étude par dichroïsme circulaire. En effet,
pour la dispersion optique rotatoire, la densité optique des
solutions doit être aussi comprise entre 0,8 et 1,2. Les figures
XVIII, XIX, XX et XXI montrent les rotations molaires [m] non
corrigées du facteur de Lorentz dans CHCl₃ et dans CHCl₃/HFIP
pour chacun des copolymères P(LAB, LAPNB) et P(LAB, LAONB).

Il a été possible d'effectuer sur les courbes de DOR données par le polyaspartate de benzyle dans CHCl₃ et CHCl₃/HFIP, le calcul de Moffitt-Yang, puisque le PLAB ne possède pas de bandes dichroïques extrinsèques.Fig XXII et XXIII.







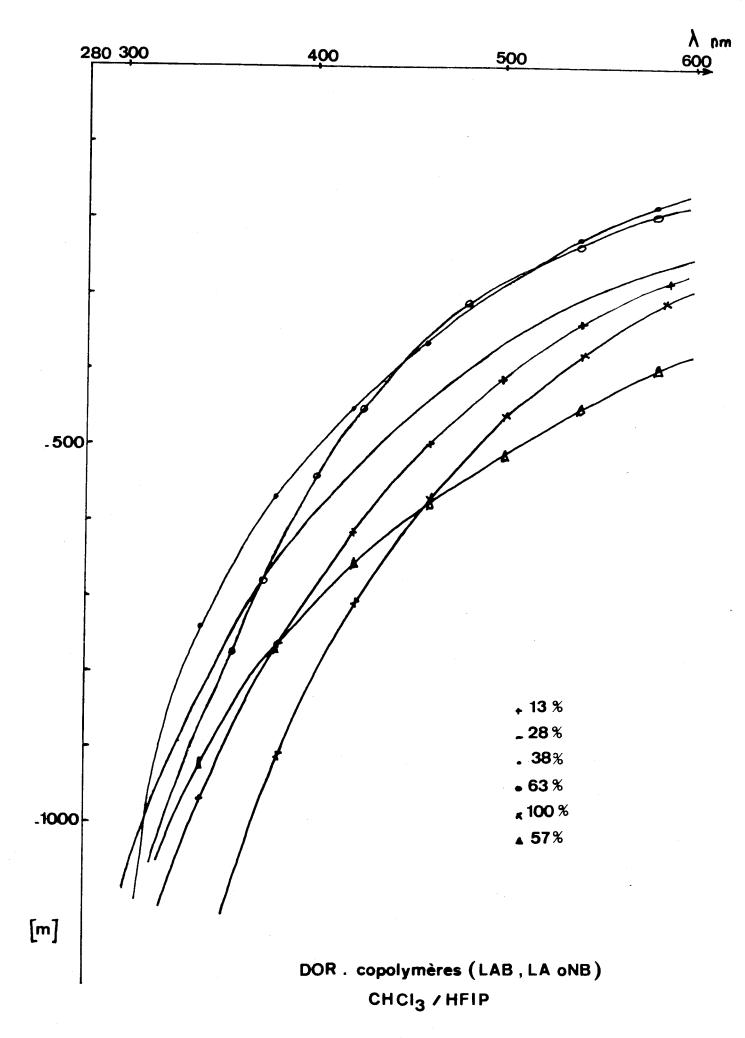
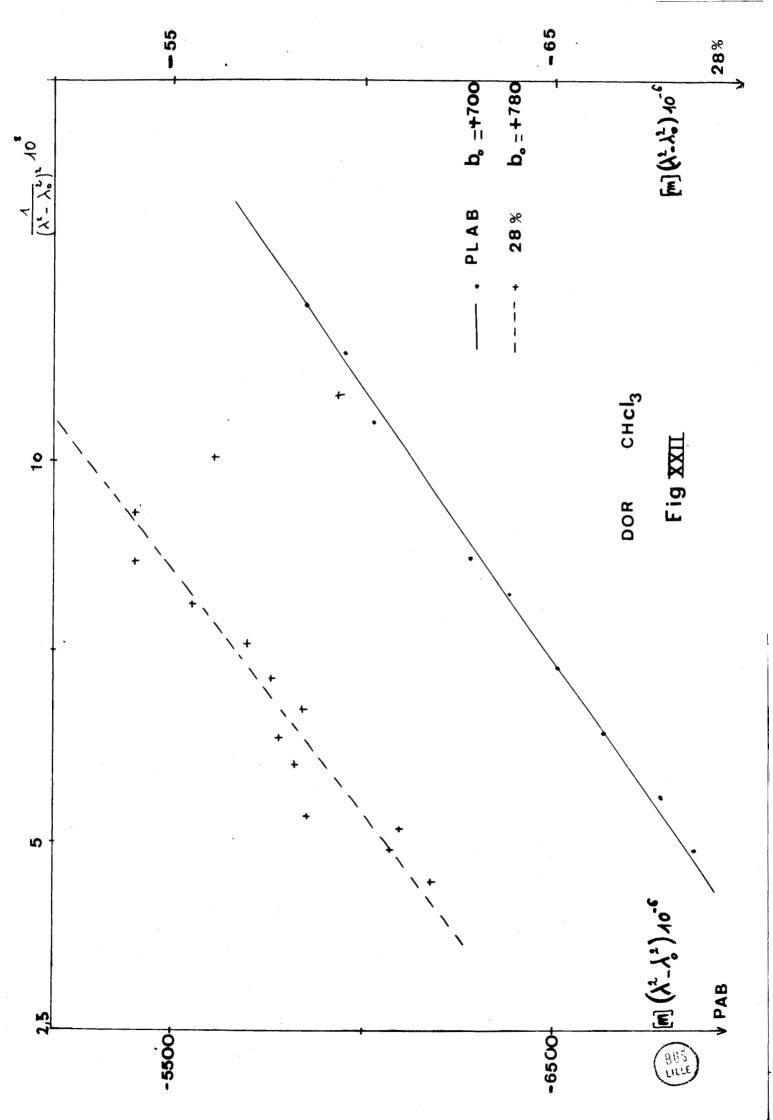
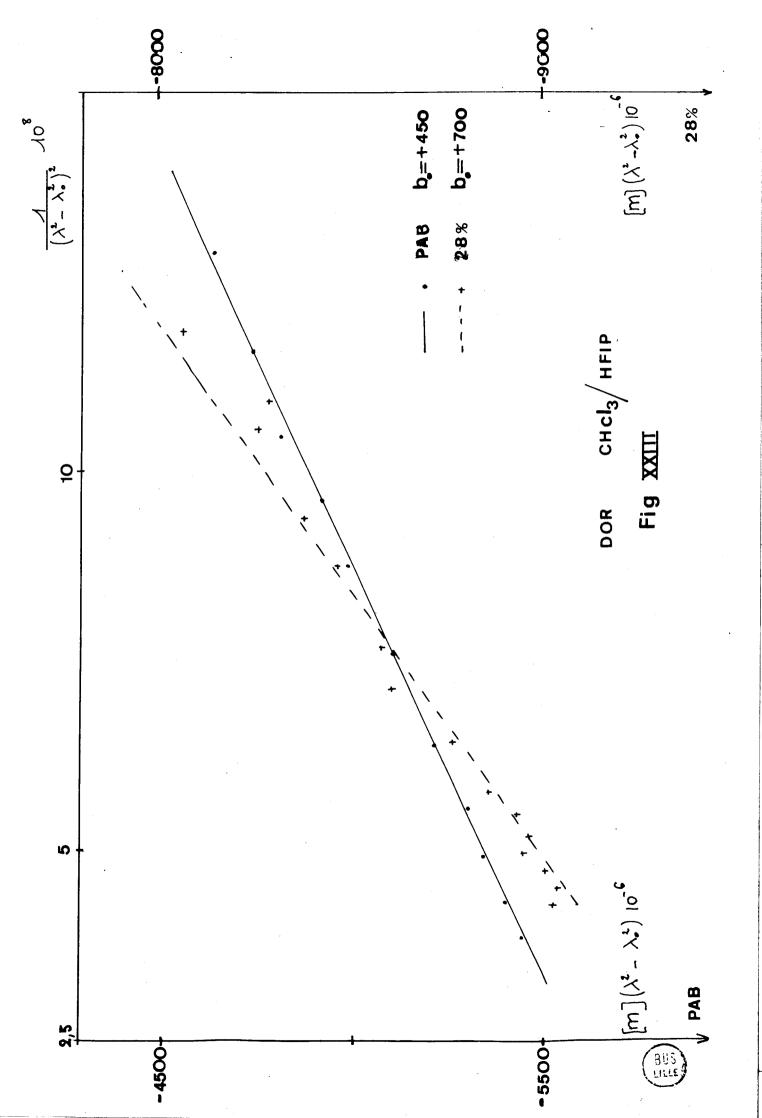




Fig XXI





Dans CHCl₃ $b_0 = +700$. Dans CHCl₃/HFIP $b_0 = +450$

On retrouve les résultats donnés par le dichroïsme. En effet, b_o étant positif, cela indique que le PLAB est sous forme d'hélice a gauche. De plus, le fait que b_o diminue quand on passe du CHCl₃ au mélange CHCl₃/HFIP montre aussi que HFIP n'est pas un solvant hélicogène pour le PLAB.

Les calculs de Moscowitz ont été appliqués à tous les copolymères étudiés par Dichroïsme circulaire et par Dispersion Optique Rotatoire. Nous avons pris comme exemple les résultats donnés par le copolymère contenant 28% en dérivés para nitrobenzyle dans le solvant pur et dans le mélange de solvants. Nous les avons reportés sur la droite de Moffitt-Yang du PLAB. Nous voyons que les points obtenus ne s'alignent pas aussi nettement. Cette incertitude augmente avec la teneur en groupements nitrobenzyle et pour les copolymères aussi bien "ortho" que "para" de plus de 30% en dérivés nitrobenzyle, le calcul de Moffitt-Yang s'avère totalement inutilisable.

Cela voudrait dire qu'il existe une bande dichroïque extrinsèque dans l'ultra-violet en dessous de 190nm qui correspondrait à une bande d'absorption à 165 nm environ déterminée par le calcul. (56)

RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN).

I RAPPELS

La résonance magnétique nucléaire est peut-être la technique spectroscopique la plus intéressante, parmi celles qui permettent les études conformationnelles en solution, car le spectre des chaînes latérales est tout à fait séparé du spectre de la chaîne principale.

Chaque résonance est caractérisée par trois paramètres :

- le glissement chimique
- la multiplicité
- les temps de relaxation.

Tous trois dépendent de la conformation mais nous ne nous occuperons que des deux premiers.

Dans le cas de polypeptides de masse relativement élevée, sous forme hélicoïdale, les différentes bandes sont assez larges. L'introduction d'une petite quantité d'un solvant comme l'acide trifluor acétique (TFA) suffit pour les affiner, car il crée dans la structure secondaire des défauts dont la diffusion le long de l'hélice assure localement une mobilité suffisante.

Les spectresRMN d'un certain nombre de poly-aspartates et de copolymères de L-aspartates avec des D-aspartates ou des L-glutamates ont mis en évidence que les déplacements chimiques correspondant aux protons $\alpha C\underline{H}$ et $N\underline{H}$ de la chaîne principale varient avec la structure secondaire du polymère.

Actuellement, les valeurs le plus souvent admises pour caractériser une hélice α gauche, une hélice α droite ou une pelote statistique sont celles de Bradbury et al (37).

| | (| N <u>H</u> : | С <u>н</u> |) |
|---------------------|---|--------------|------------|----------|
| (hélice a gauche | • | 8,75 | 4,30 | —)) |
| hélice α droite | : | 8,20 | 4,40 |) |
| (pelote statistique | : | 8,00 | 4,80 |) |

Glissements chimiques en ppm des bandes $N\underline{H}$ et $C\underline{H}$ dans le mélange $CDCl_3/TFA$.

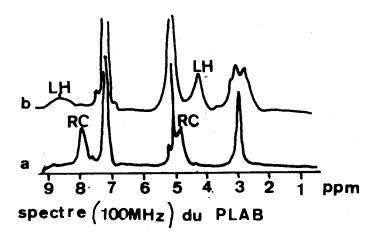
Bien que les différences de glissements chimiques soient plus importantes pour le proton $N\underline{H}$, c'est surtout à partir du $\alpha C\underline{H}$ que les différentes structures secondaires sont caractérisées: les bandes correspondant au $N\underline{H}$ sont plus larges que celles correspondant au $\alpha C\underline{H}$ et même, dans certains cas, sont totalement invisibles, comme nous le verrons plus loin après examen de nos spectres.

De plus, les valeurs données pour le glissement chimique du NH par Bradbury pour les structures en hélice α et en pelote statistique ne sont pas en accord avec celles données par Feretti (18) qui sont respectivement de 7,95 et 7,60 ppm.

La position du $\alpha C\underline{H}$ est déplacée vers les champs faibles lorsqu'on passe de la structure hélicoïdale à la pelote statistique, et cela est observé pour tous les polypeptides étudiés jusqu'ici par RMN. Par contre, la différence entre les glissements chimiques $\alpha C\underline{H}$ correspondant aux structures en hélice et en pelote varie, suivant le solvant utilisé de 0,1 à 0,5 ppm. Ceci montrerait non pas une différence intrinsèque entre les conformations mais une différence de solvatation entre les formes hélice et pelote.

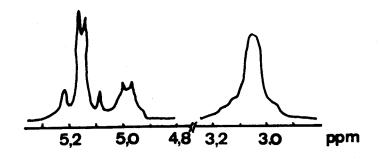
Les spectres des chaînes latérales ont été analysés à la fois en termes de glissement chimique et de constante de couplage. Une telle étude a été réalisée par Bradbury et al sur le polyaspartate de benzyle en solution dans un mélange CDCl₃ + 0,5% TFA, donc sous forme d'hélice α gauche, et dans un mélange CDCl₃ + 5% TFA, donc sous forme de pelote statistique. La figure XXIV (37) montre les spectres du poly-L-aspartate de benzyle en solution à 100MHz.

Les bandes centrées à environ 3ppm correspondent aux protons βCH_2 , celles à 5,15 ppm aux protons CH_2 benzyle, celles à 7ppm aux protons du cycle aromatique. Ce sont les deux premières qui donnent le plus de renseignements sur la conformation des chaînes latérales. On remarque de plus la position des bandes dûes au αCH et au NH respectivement à 4,3 et 8,75ppm pour l'hélice α gauche et 4,80 et 8,00 pour la pelote statistique.



- a) forme chaine dans CDcl₃-5%TFA
- b) helice gauche dans $CDcl_{3}-0.5\%TFA$

Fig XXIV



spectre (220 MHz) du PLAB dans TFA



Spectre de la pelote statistique.

Le spectre à 100MHz montre que dans la pelote statistique les protons βCH_2 et les protons CH_2 benzyle sont tout à fait équivalents. Cependant le spectre à 220MHz (Fig XXIV) permet de mettre en évidence de petites différences de glissement chimique.

La résonance des β CH $_2$ à 3,05ppm représente la partie AB d'un système ABX où X représente le α CH. Elle montre à 220MHz un Δ de 0,7ppm et une constante de couplage J = 17±1,5Hz. La différence de glissement chimique est dûe au voisinage du carbone asymétrique C_{α} . La bande est élargie à cause du couplage $J_{\alpha\beta}$.

La résonance du CH₂ benzyle centrée à 5,15ppm est un quartet AB de Δ = 0,05ppm et J=12,5Hz. Comme il n'existe aucun couplage avec d'autres protons et que le groupement est très mobile, la bande est, par conséquent, très étroite.

Spectre de la structure hélicoïdale.

Sous forme hélicoidale, la différence, A , entre les glissements chimiques des βCH_2 est d'environ 0,37ppm pour le spectre à 100MHz. Ceci montre qu'il existe un échange rapide entre les protons CH_2 correspondant à deux conformations de la chaîne latérale. La mesure des constantes de couplage devrait permettre, en principe, de déterminer les paramètres structuraux. Mais, les bandes obtenues à partir d'un polypeptide sous forme hélicoïdale étant très largés, une telle détermination est difficile. Bradbury et al ont pu quand même obtenir des renseignements intéressants à partir de spectres tracés sur des solutions dans CDCl₃ à 100°C. En particulier, grâce à l'utilisation d'une relation de type Karplus, il leur a été possible de montrer que les deux conformations préférentielles de la chaîne latérale étaient différentes des deux conformations longitudinales et des deux conformations transverses admises par Scheraga et al (35).

.../...

II ETUDE DES COPOLYMERES P(LAB, LAPNB) ET P(LAB, LAONB).

1. Partie expérimentale

A l'aide de l'appareil Thomson Cameca 250MHz, tous les spectres ont été réalisés à température ambiante, à partir des solutions dans le CDCl à 5%, auxquelles des quantités croissantes de TFA (non deutéré) ont été ajoutées. On a utilisé des tubes de 4,2mm et une solution de tétraméthylsilane (TMS)à 1% comme témoin interne de référence.

Les transitions hélice - chaîne pour chacun des copolymères ont été suivies, aussi bien sur la série "para" que sur la série "ontho".

2. Résultats

a) <u>copolymères d'aspartate de benzyle et</u>
<u>d'aspartate de para nitrobenzyle</u>.

Seuls les copolymères à 15%, 28%, 42% et 48% en groupements nitrobenzyle ont été étudiés. Une teneur plus élevée en groupements nitrobenzyle interdisant toute solubilité dans le CDCl₃. Nous examinerons successivement les bandes dûes à la chaîne principale et celles dûes à la chaîne latérale.

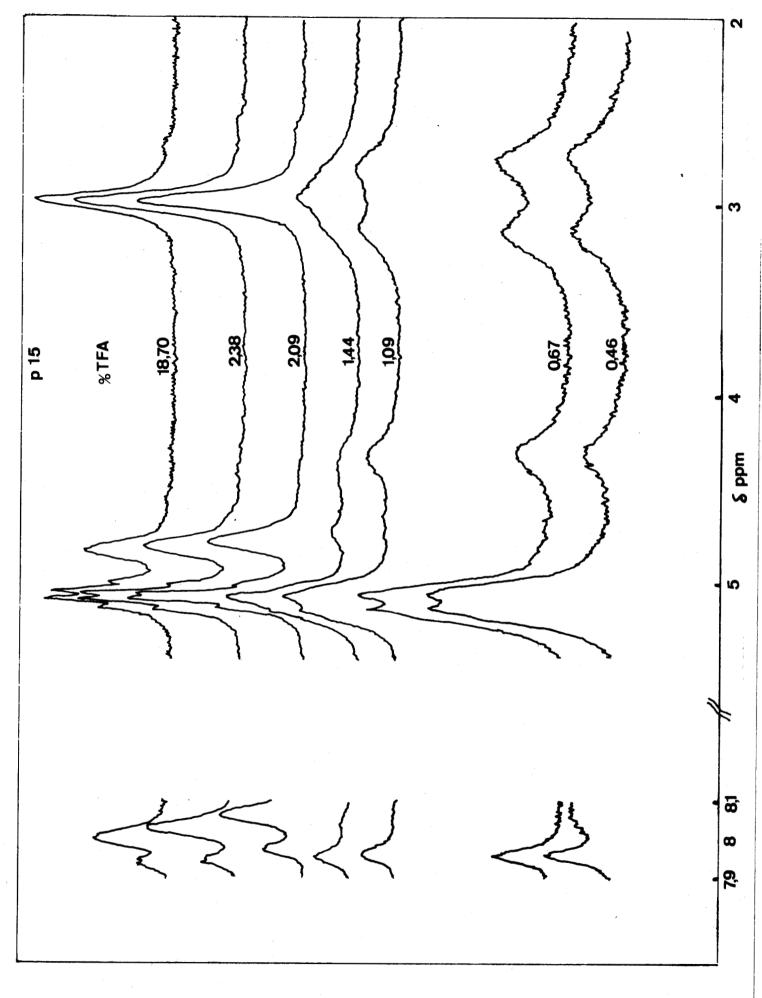
- Chaîne principale.

Les résultats de dichroïsme circulaire nous ont montré que, lorsque la teneur en dérivé nitrobenzyle est inférieure à 30% environ, les copolymères adoptent en solution dans le chloroforme, une conformation en hélice α gauche; au-delà de cette teneur, les copolymères sont sous forme d'hélice α droite.

*Copolymère 15%: Fig XXV.

Quand la teneur en TFA est faible, on constate que la bande NH est tout à fait invisible.

Quand cette teneur augmente et atteint 1,44%, il apparaît un épaulement puis une bande centrée à environ 7,95ppm qui s'affine à mesure que l'on ajoute du TFA. Cette bande doit correspondre au NH sous forme de pelote statistique. La bande que l'on voit centrée aux environs de 8,08ppm et qui reste fixe quand la teneur en TFA augmente est dûe aux hydrogènes en ontho du cycle aromatique.



(BUS)

Fig 🔯

Celle qui correspond au $\alpha C\underline{H}$ commence à être visible pour 0,46% de TFA. Elle est alors, centrée à 4,32ppm et caractéristique d'une hélice α gauche (37). Quand la teneur en TFA augmente, le pic se déplace vers les champs faibles et s'affine; pour une quantité suffisante de TFA, il est centré à 4,80ppm, valeur caractéristique d'une pelote statistique.

On constate à 1,44% l'existence d'un double pic. Celui-ci a déjà été observé par un certain nomble d'auteurs lors de transitions hélice + chaîne et son origine a donné lieu à de nombreuses controverses. Nous avons admis, avec R.Ullman (57) qu'il existe un échange rapide entre les deux conformations hélice et pelote statistique au cours de la transition et que les deux pics qui apparaissent sont dûs à des effets d'extrémité de chaîne ou à la polydispersité. L'un des pics représente le mélange entre les deux structures, l'autre pic est dû à un reste de structure hélicoïdale venant des masses moléculaires les plus élevées qui n'ont pas encore subi la transition.

Nous avons porté (Fig XXXVI) la variation de la position de la bande αCH en fonction de la teneur en TFA dans le milieu. La courbe obtenue a l'allure d'une courbe de transition hélice-chaîne et Bovey (6) a montré sur un polyaspartate de benzyle que la courbe de variation des glissements chimiques se superposait à la courbe de variation du bo. Il sera donc possible, à partir des mesures de RMN de déterminer la stabilité de la structure hélicoïdale.

* Copolymère 28%: Fig XXVII.

La bande $\alpha C\underline{H}$ ne commence à apparaître que pour une teneur en TFA de 0,38% et n'est vraiment visible que pour une teneur de 1,11%. Elle est alors centrée à 4,35ppm. Cette valeur est intermédiaire entre celles correspondant à une hélice gauche (4,30) et à une hélice droite (4,40).

On peut donc penser que le polymère est constitué de 50% de chacune de ces structures, en échange rapide. Quand la teneur en TFA augmente, on observe comme dans le cas précédent un déplacement et un affinement de la bande. Pour 3,43% de TFA, cette bande est centrée à 4,80ppm. On observe

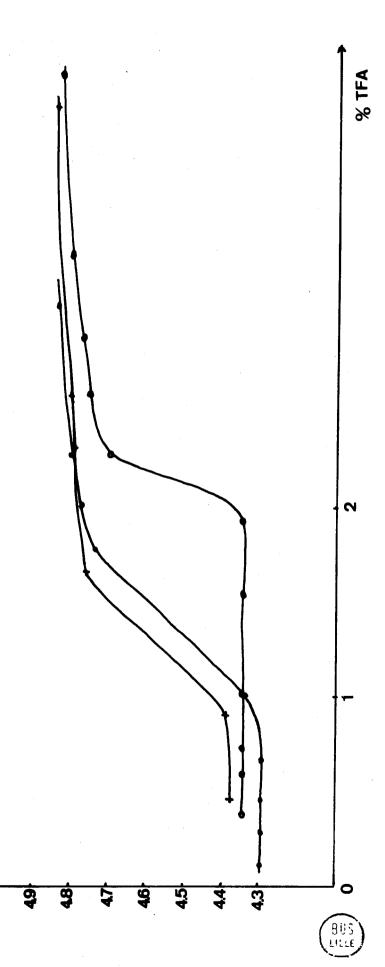
(LAB, LA pNB)

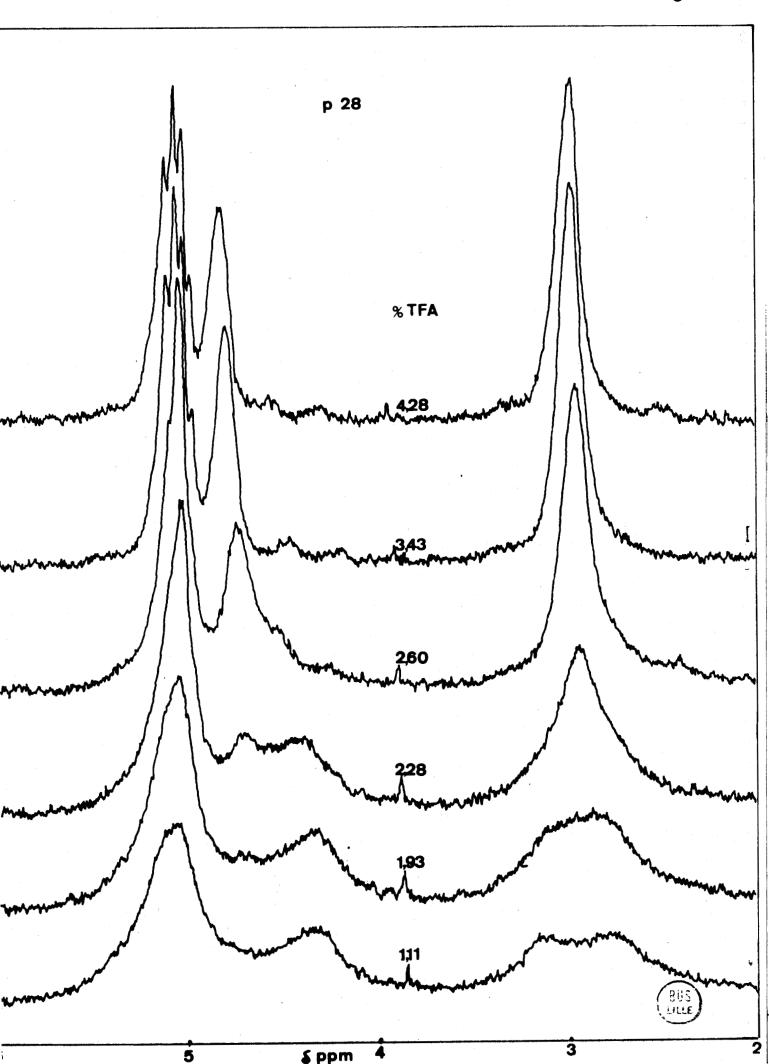
CD Cl3





aCH ∳ ppm





encore la présence d'un double pic pour une teneur en TFA de 2,28%.

*Copolymère 40% : Fig XVIII.

La bande du $\alpha C\underline{H}$ commence à apparaître pour 0,47% de TFA et on la trouve centrée à 4,38ppm. Si le copolymère est constitué d'un mélange d'hélice α droite et d'hélice α gauche, il doit contenir 80% d'hélice α droite et 20% d'hélice α gauche. La même variation du pic $\alpha C\underline{H}$ est observée quand la teneur en TFA augmente comme dans les cas précédents (Fig XXVI).

- Stabilité des polymères.

On constate que les bandes correspondant aux polymères sous forme hélicoïdale sont plus larges que celles correspondant aux polymères sous forme de pelote. Cela confirme que la chaîne principale est plus rigide dans le premier cas que dans le second.

D'autre part, la bande aCH du copolymère 40% sous forme d'hélice droite est plus large que celle du copolymère 18% sous forme d'hélice gauche. Cela signifierait que l'hélice des polyaspartates est plus rigide sous forme droite que sous forme gauche.

Sur la figure XXVI, on peut comparer la stabilité de la structure secondaire des différents copolymères en déterminant la quantité de TFA ajouté au milieu de la transition. Les résultats obtenus sont assez surprenants.

D'une part, on constate que les deux copolymères 15% et 40% ont des stabilités très voisines, puisqu'au point de demi-transition correspondent des quantités en TFA de 1,3% et 1,2% alors que les hélices formées adoptent des sens d'enroulement différents. Ceci signifie que l'hélice a droite, dans ce cas particulier, n'est pas plus stable que l'hélice a gauche. On peut comparer ce résultat à celui obtenu par Bovey (6) qui trouve pour le polyaspartate de benzyle dans les mêmes conditions la demi-transition à environ 2% de TFA.

D'autre part, le copolymère 28% correspond à une stabilité plus grande. Or il semble constitué d'hélice α gauche et d'hélice α droite en égales quantités ce qui devrait correspondre à une stabilité moins grande.

- Comparaison des résultats obtenus par R.M.N. et par D.C.

Nous avons reporté sur la Figure XXIX, la variation du glissement chimique $\alpha C\underline{H}$ et de l'ellipticité à 222nm en fonction de la teneur en groupements nitrobenzyle des copolymères, en solution dans $CDCl_3$ et $CHCl_3$. Les transitions hélice gauche \rightarrow hélice droite se produisent pour des valeurs voisines du pourcentage en dérivés nitro. L'écart entre ces deux transitions est de l'ordre des erreurs expérimentales. La position de la bande $\alpha C\underline{H}$ ne se fait pas avec une bonne précision étant donnée la largeur de la bande. Cette différence peut être dûe aussi à la faible quantité de TFA présente dans les solutions de RMN. Bradbury signale en effet (37) qu'une addition de TFA peut provoquer une inversion du sens de l'hélice.

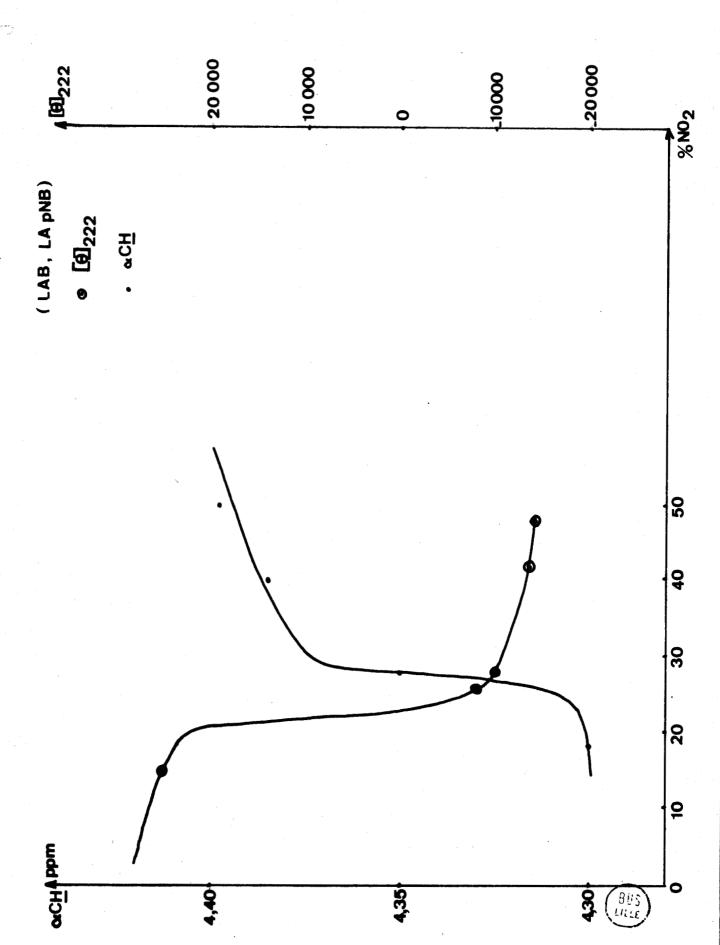
Par contre, cette comparaison entre les deux techniques nous permet d'affirmer que pour le copolymère 28%, nous avons bien un mélange d'hélice gauche et d'hélice droite: si la position de la bande αCH correspondait à un mélange d'hélice α gauche et de pelote, un calcul simple nous montre que αCH = 4,35 ppm donnerait 90% d'hélice gauche et 10% de pelote. Θ 222 devrait être alors de l'ordre de + 30.000 deg.cm².decimole 1. Or il n'en est rien.

- Chaîne latérale.

Nous nous préoccuperons essentiellement des $\beta \text{CH}_{\underline{2}}$ et des $\text{CH}_{\underline{2}}$ benzyle.

- Les protons βCH_2 sont centrés à environ 3,05ppm. Quand les copolymères sont sous forme de pelote statistique, on n'observe qu'une seule bande. Cela veut dire qu'il n'y a aucune conformation préférentielle et que les deux protons sont parfaitement équivalents. La bande est relativement large à cause du couplage $J_{\alpha\beta}$.

*Pour les copolymère 40% qui adopte dans CHCl₃ contenant peu de TFA, une conformation en hélice droite, la bande des β CH₂ devient très large, mais ne se dédouble pas. Il n'y aurait donc pas de conformations préférentielles dans ce cas.



#Pour le copolymère 15%, on observe un dédoublement quand la teneur en TFA diminue, donc lorsque le polymère est sous forme d'hélice α gauche. Le multiplet (Δ = 0,37 ppm) est centré à 3ppm, la composante vers les champs faibles étant à 3,14ppm, la composante vers les champs forts à 2,77ppm. Le polymère adopte donc deux conformations préférentielles. Ceci est en accord avec les résultats de Bradbury et Scheraga qui ont mis en évidence deux conformations de la chaîne latérale pour une hélice α gauche. Par contre, Bradbury (37) trouve également pour le copolymère aspartate de benzyle-alanine, sous forme hélice droite quand la teneur en alanine est de 10%, deux conformations préférentielles de la chaîne latérale. Ces résultats est donc contraire à celui qui a été obtenu avec le copolymère 40%.

*Pour le copolymère 28% qui, rappelons-le, est constitué à la fois d'hélice α droite et d'hélice α gauche, le spectre des βCH₂ a une allure intermédiaire entre les deux spectres obtenus pour les copolymères 15% et 40% : on observe un dédoublement de la bande βCH₂ aux faibles teneurs en TFA, mais les deux bandes observées alors sont très larges et mal définies.

Lorsque le polymère est sous forme de pelote statistique, la résonance du CH₂ benzyle centrée à 5,06ppm est un quartet AB de $\Delta \simeq 0,05$ ppm et J $\simeq 12,5$ Hz. Il n'y a pas de couplage avec les autres protons et le groupe est très mobile. Le monomère L-aspartate de benzyle dans le TFA donne $\Delta \simeq 0,03$ ppm et J gem = 12±0,5Hz (59). On devrait s'attendre à trouver cette valeur pour une libre rotation mais la valeur $\Delta \simeq 0,05$ ppm est trop grande. Il faut donc admettre que bien que le C α soit assez éloigné, son asymétrie est ressentie par les protons du CH₂ benzyle. Quand la teneur en TFA diminue, la structure fine du quartet disparaît. Cela veut dire que la mobilité de la chaîne latérale diminue également.

Pour le copolymère 40%, la bande s'élargit au fur et à mesure que la teneur en structure hélicoïdale augmente, et, lorsqu'il est totalement sous forme hélice, la bande est très large et non dédoublée.

.../...

Par contre pour le copolymère 15%, la bande s'élargit aussi quand la teneur en TFA diminue, mais elle se dédouble quand le polymère adopte une conformation en hélice α gauche avec $\Delta \simeq 0.07 \mathrm{ppm}$. Cette valeur est plus élevée que celle trouvée pour la pelote statistique, mais l'interprétation des Δ en termes de populations votamères est impossible. On peut dire cependant que l'hélice α gauche des poly-L-aspartates est fortement ressentie au niveau du groupe $\mathrm{CH}_{\frac{2}{2}}$ benzyle, ce qui n'était pas le cas pour l'hélice α droite ($\overline{\mathrm{cf}}$ copolymère 40%). De plus, s'il est possible de dire que deux conformations préférentielles existent, on ne peut cependant pas estimer le degré d'immobilisation de la chaîne latérale.

Comme précédemment dans le cas des βCH_2 , on remarque pour la résonance des CH_2 benzyle du copolymère $\overline{28\%}$ un comportement intermédiaire entre celui observé pour le copolymère 15% et le copolymère 40%; lorsque le copolymère est sous forme de pelote statistique, le quartet AB des CH_2 benzyle est bien défini puis s'élargit quand la teneur en TFA diminue, mais ne se dédouble pas quand le polymère adopte une conformation hélicoïdale.

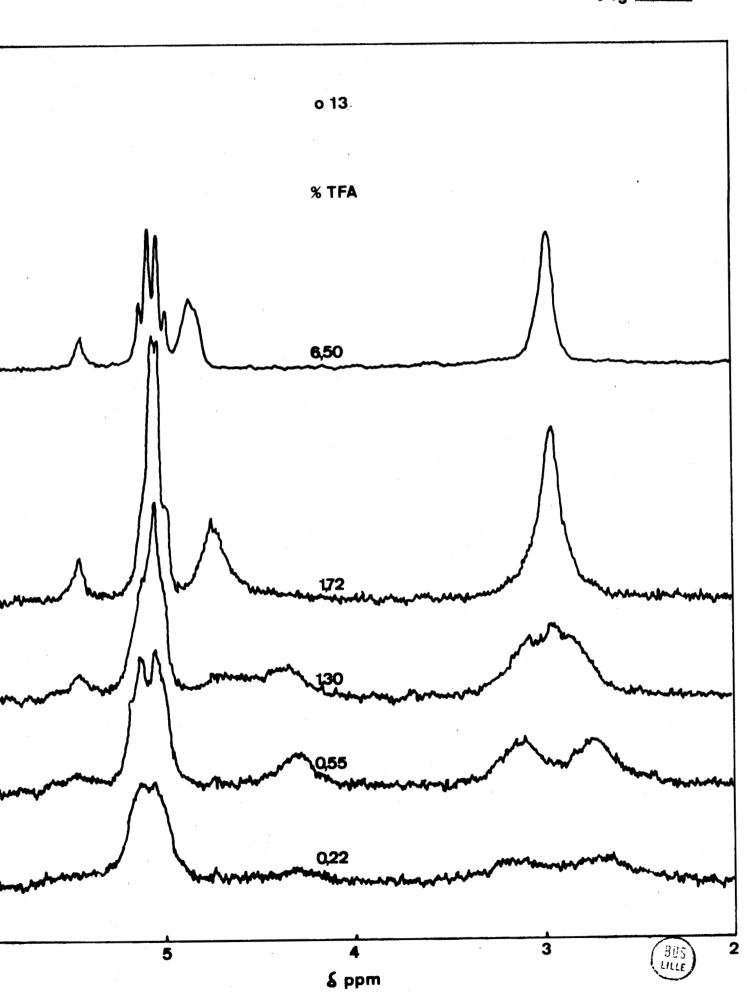
En résonance magnétique nucléaire, la transition hélice gauche \rightarrow hélice droite peut être suivie soit par la position de la bande dûe au $\alpha C\underline{H}$, soit par la position des bandes dûes à la chaîne latérale.

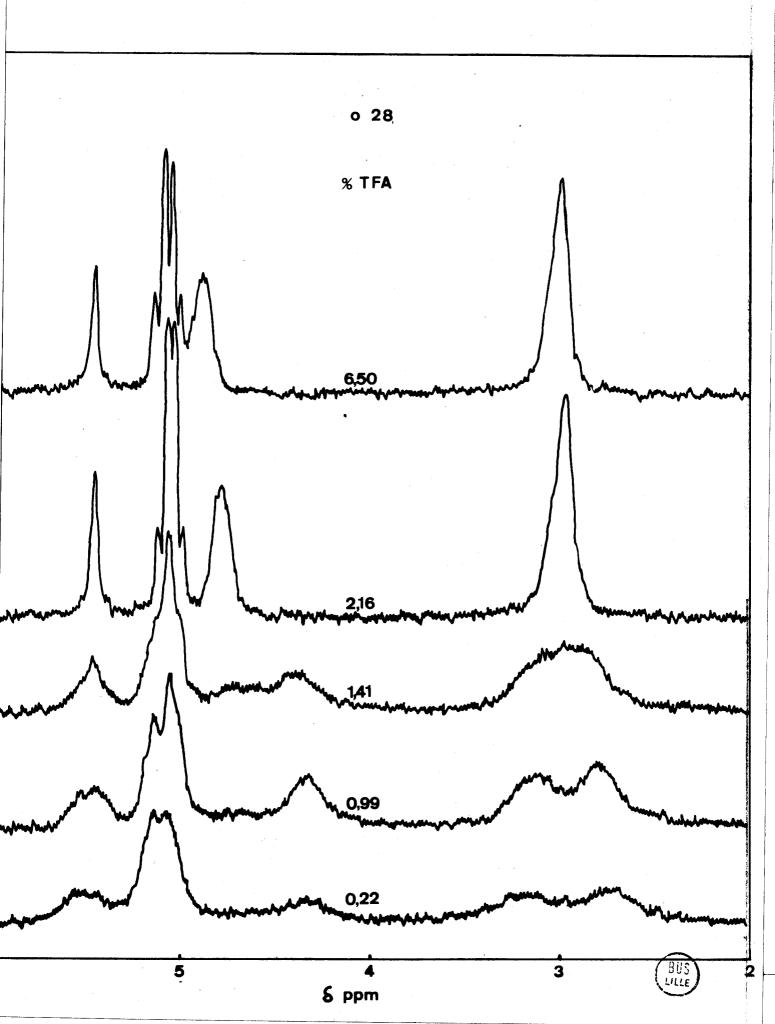
Quand l'hélice a est gauche, nous avons mis en évidence l'existence de deux rotamères que nous ne retrouvons pas quand l'hélice est droite.

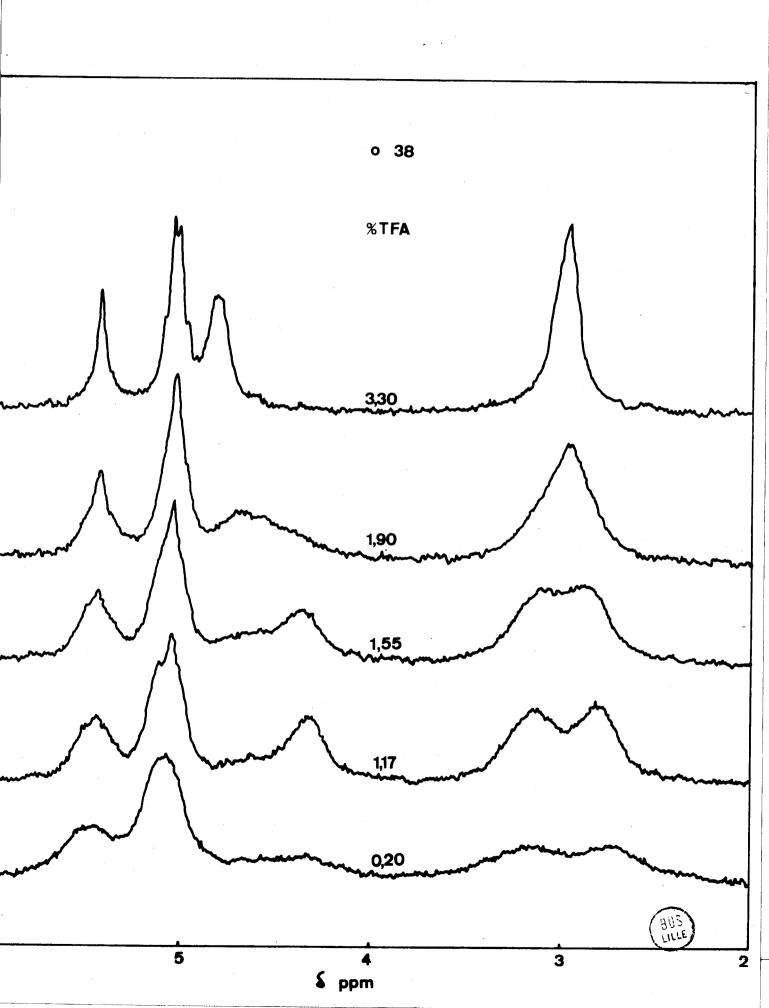
Une étude identique a été menée sur les copolymères P(LAB,LAONB).

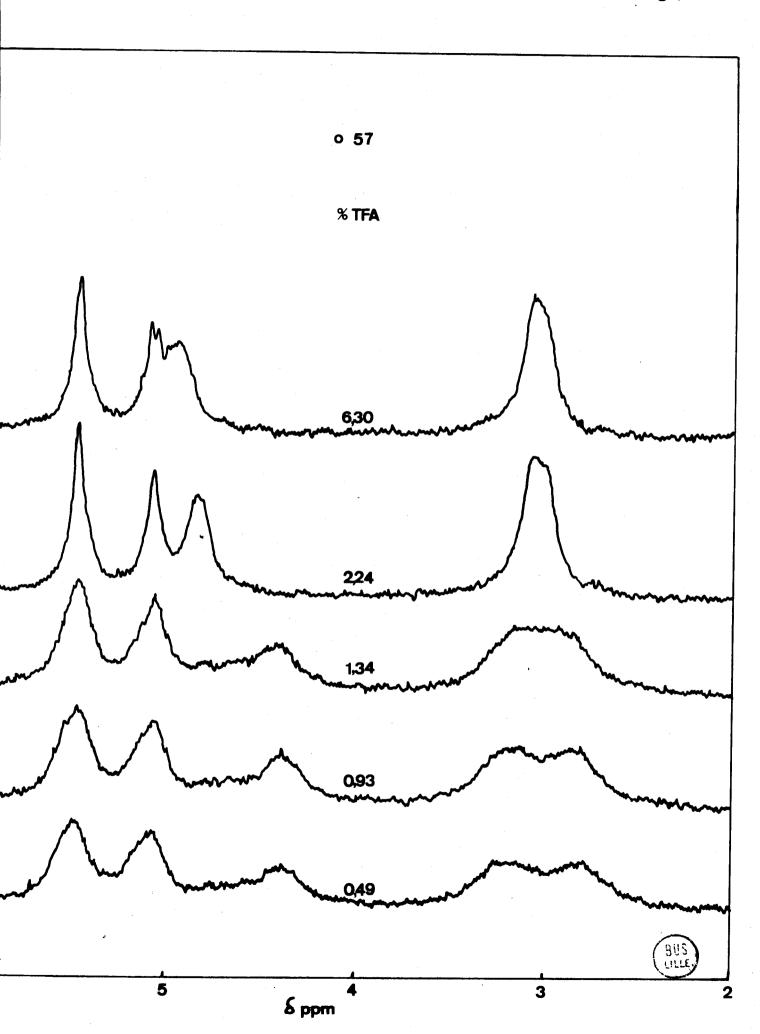
b) Copolymères d'aspartate de benzyle et d'aspartate d'ontho nitrobenzyle P(LAB, LAONB).

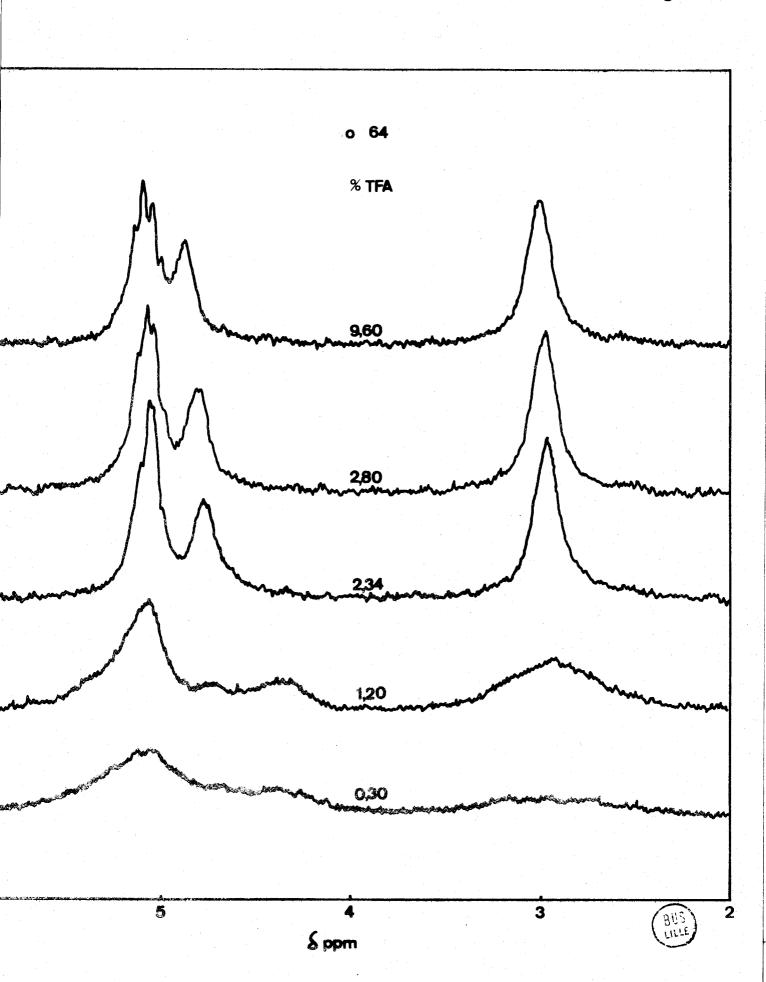
Les copolymères contenant 13%,28%,38%, 57% et 64% de dérivés ontho nitrobenzyle ont été étudiés en solution dans CDCl₃ auquel on ajoute des quantités croissantes de TFA (Fig XXX, XXXII, XXXIII, XXXIV).











- Chaîne principale.

La bande correspondant au proton NH n'est pas visible lorsque les polymères sont sous forme hélicoïdale et n'apparaît nettement que lorsque la teneur en TFA est assez importante. Une fois encore, nous n'avons pas utilisé cette bande pour la détermination de la structure secondaire.

Considérons la bande aCH

Pour chaque copolymère, nous avons observé les spectres dans le mélange CDCl₃+ 1% TFA dans lequel les copolymères sont sous forme hélicoïdale.

| T. e | tableau | 7.7 | réuni+ | 1 0 0 | résultats | obtonus |
|------|---------|-----|--------|-------|-----------|----------|
| ьe | сартеац | V | rennit | Tes | resultats | ontenus. |

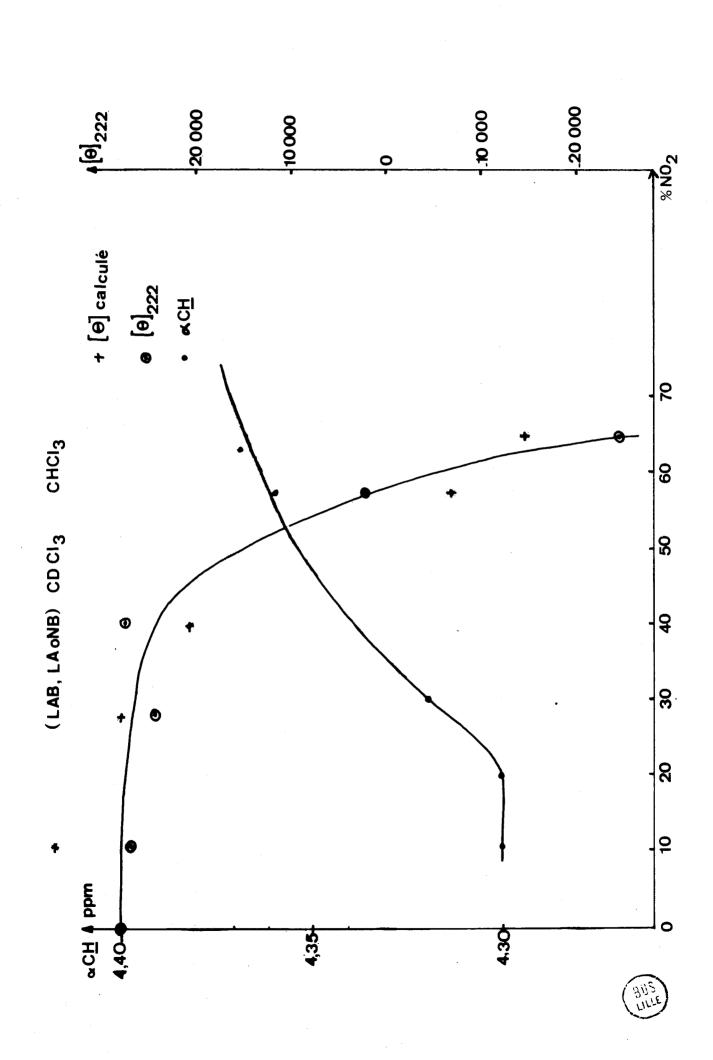
| (Copolymère (| αC <u>H</u> τ ppm | : ΗαD | : ΗαG : | [0] ₂₂₂ :calculé |
|-------------------|----------------------|------------|---------------|-----------------------------|
| 13 | 4,30 | • | · : 100% | : 35.000 |
| ((28 | 4,31 | 10% | 90% | 28.000 |
| (38 | 4,32 | : 20% | : 80% | : 21.000 |
| (57 | 4,36 | 60% | 40% | -7.000 |
| (64 (| 4,37 | : 70% : | 30% | :-14.000 |

Tableau V

La figure XXXVI à été établie à partir de ces données. Nous avons représenté également la courbe de variation de l'ellipticité $\{\theta\}_{222}$ en fonction de la teneur en groupements NO_2 .

On remarque que les points d'inflexion de ces courbes se situent à des valeurs assez différentes en groupements NO_2 et que l'allure de la courbe RMN semble correspondre, pour la transition, à un phénomène moins coopératif que s'il est étudié par dichroïsme circulaire.

Rappelons que par cette méthode, nous avions trouvé un point d'inflexion à 60% environ en dérivé ortho nitrobenzyle. Comme pour les copolymères en "para", cette différence peut être dûe aux conditions dans lesquelles ont été faites les mesures en D.C. et en R.M.N.De plus, une petite quantité de TFA suffirait à inverser le sens de l'hélice.(cf p.43)



Cet effet serait d'autant plus important que l'hélice droite des dérivés ontho est moins stable que l'hélice droite des dérivés para puisque les transitions ont lieu respectivement à environ 60 et 30% de dérivé nitro. Cette faible stabilité avait déjà été soulignée par Aragâo qui avait comparé le comportement des polymères de nitrobenzyle par dichroïsme circulaire et par spectrophotométrie infra-rouge.

A partir des valeurs de glissements chimiques du $\alpha C\underline{H}$ et en supposant que le polymère est constitué des deux structures α hélicoïdales droite et gauche en échange rapide, nous avons déterminé le taux d'hélicité de chacun des copolymères. Puis, à partir de cette valeur, nous avons recalculé ce que seraient les valeurs de $\{\theta\}_{222}$ correspondantes. Pour cela, nous avons utilisé les références suivantes :

| | (] | hélice α gauche | : hélice α droite |
|----------------------|----------|-----------------|-------------------|
| (Glissement | chimique | 4,30 ppm | : 4,40 ppm |
| ([0] ₂₂₂ | : | + 35.000 | - 35,000 |

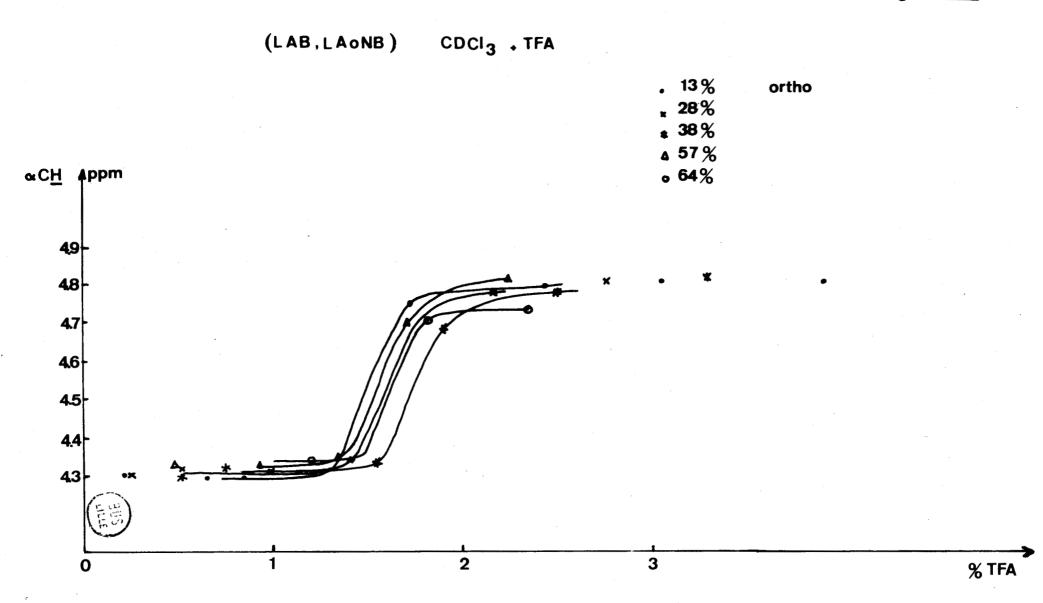
Ces points sont en bon accord avec la courbe expérimentale de transition de $[A]_{22}$ cf tableau V.

Il semblerait donc que le polymère d'ortho nitrobenzyle adopte effectivement une structure en hélice α droite, mais que cette structure est très peu stable.

La stabilité de chacun des copolymères a été étudiée en suivant la transition hélice → chaîne à partir de mélange CDCl₃-TFA avec des quantités croissantes de TFA. Les résultats sont indiqués dans la figure XXXVdonnant la variation du glissement chimique du αCH en fonction de la teneur en TFA. Quelle que soit leur teneur en dérivé nitro, les copolymères ont une stabilité voisine, mais tous sont moins stables que le PLAB dont la transition hélice → chaîne dans les mêmes conditions se situerait aux environs de 3% de TFA (37).

Ceci impliquerait qu'une faible quantité d'aspartate d'ontho nitrobenzyle incorporée dans le PLAB suffit à déstabiliser l'hélice gauche de celui-ci. Cet effet de déstabilisation reste pratiquement le même, que le résidu d'aspartate d'ontho nitrobenzyle adopte une conformation en hélice d'onte ou gauche.

Fig XXXV



-Chaînes latérales

♣ Protons β CH₂

Pelote statistique: quel que soit le polymère considéré la bande β CH₂ est toujours centrée au même endroit (3 ppm).

Contrairement à ce que nous avions observé dans l'étude des dérivés "para", cette bande est toujours large quand la teneur en TFA est supérieure à 5%. Sous forme de pelote statistique, les polymères ont leurs chaînes latérales parfaitement dépliées dans le milieu. Quand le cycle aromatique est substitué en para, aucun encombrement ne vient perturber sa libre rotation autour de la liaison ${\rm CH_2}$ - \P . Par contre, lorsque le substituant est placé en ortho, cette rotation n'est plus libre comme le montre un examen de modèle moléculaire. Ceci a pour effet d'élargir la bande ${\rm BCH_2}$. Nous avons vu précédemment que cet élargissement était ${\rm d}\widehat{u}$ aussi à une interaction avec le carbone asymétrique ${\rm C_{\alpha}}$.

Forme héclioïdale : de nouveau, on constate que lorsque le copolymère adopte une conformation en hélice α gauche, la bande β CH se dédouble. Il y correspondrait donc deux conformations préférentielles de la chaîne latérale. La valeur Δ différence entre les glissements chimiques correspondants est du même ordre de grandeur que pour les dérivés "para" (Δ =0,37ppm). Quand le copolymère est sous forme d'hélice α droite, le dédoublement n'est plus visible.

* Protons CH2

On remarque tout de suite que pour les copolymères à 13%,28%,38% et 57% de dérivés nitro, une nouvelle bande apparaît. Sa position varie un peu suivant le copolymère, mais elle ne varie pas quand, pour un même copolymère, on passe de la forme hélicoïdale à la forme en pelote statistique.

| (| % NO ₂ | : 13 | 28 | 38 | 57) |
|---|-------------------|------------|------|------|-----------------|
| | Position | : :5,45 | 5,47 | 5,44 | 5 , 46) |

Cette bande n'apparaît que lorsque les copolymères sont sous forme d'hélice a gauche. En particulier, elle n'est absolument pas visible pour le copolymère 64% dont on a vu qu'il était constitué de 70% d'hélice a droite.

Cette bande serait dûe aussi au CH_2 φ et correspondrait à un autre rotamère de la chaîne latérale, c'est à dire à un arrangement préférentiel des chaînes latérales des dérivés nitrobenzyle.

Il est difficile de tirer parti quantitativement de cette bande car les concentrations de chacune des solutions sont mal définies. Mais elle permet quand même une comparaison qualitative. On constate que l'intensité de la bande centrée à 545ppm environ, croît avec la teneur en groupements nitrobenzyle dans le copolymère et que la somme des intensités des deux bandes dûes aux CH2 - celle: à 5,45 et celle à 5,05- reste sensiblement constante.

Ceci est donc en accord avec l'existence de deux conformations préférentielles de la chaîne latérale. Il est surprenant que cette double bande n'apparaisse pas lorsque le polymère est sous forme hélice α droite. En effet, si ce dédoublement était dû à la structure hélice α gauche, il disparaîtrait quand le copolymère adopte une structure en pelote statistique. Or on remarque la présence de cette bande quand la teneur en TFA est forte.

Si on ne tient pas compte du spectre du copolymère contenant 64% de dérivés nitrobenzyle, on peut admettre que l'existence d'un dédoublement de la bande CH_2 est dûe à l'apparition de deux conformations préférentielles de la chaîne latérale. Celles-ci seraient une conséquence, non pas de la structure secondaire, mais de l'empêchement stérique occasionné par la position en ortho du groupement NO_2 . Cela explique que, comme nous l'avons vu pour la bande BCH_2 , cette nouvelle bande dûe aux CH_2 benzyle est très large également.

CONCLUSION DE CETTE ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

Le Dichroïsme Circulaire et la Résonance Magnétique Nucléaire permettent une étude approfondie de la structure secondaire de tous nos copolymères, notamment la transition hélice gauche + hélice droite. Dans notre cas, les résultats obtenus par ces deux méthodes sont tout à fait cohérents.

De plus, par résonance magnétique nucléaire, nous avons pu préciser la structure secondaire des copolymères situés dans la transition. Tout porte à croire, en effet, qu'ils sont constitués d'un mélange d'hélice α gauche et d'hélice α droite en échange rapide.

Les copolymères P(LAB,LAPNB) ont donné dans ces deux études, des résultats nettement plus comparables que les copolymères P(LAB,LAONB). Nous pensons que le peu de stabilité de ces derniers joue un grand rôle dans leur comportement.

Les écarts entre les deux techniques sont dûs au temps de réponse des phénomènes étudiés : par RMN, on observe un échange entre les différentes structures, par D.C., une structure à un instant donné. De plus, les concentrations utilisées sont beaucoup plus fortes en RMN qu'en D.C. Il faut donc tenir compte aussi des effets de solvant.

Nous avons envisagé également de nous intéresser aux chaînes latérales. Pour cela, des conditions favorables à cette étude ont été réunies : nous avons choisi le chromophore nitrobenzyle car il présente deux intérêts :

- il est intrinsèquement symétrique.
- ses bandes d'absorption ultra-violette sont bien distinctes de la bande d'absorption peptidique.

De nombreux auteurs se sont penchés sur l'origine de la perturbation créée au niveau du chromophore quand le polymère est sous forme hélicoïdale. Jusqu'à lors, deux hypothèses étaient proposées :

Les effets Cotton observés étaient dûs soit au champ asymétrique de l'hélice qui crée une dissymétrie au niveau du chromophore, soit aux interactions entre groupements latéraux voisins. Blout, Stryer (60) et nous-mêmes (39) avons pensé pouvoir choisir entre ces deux hypothèses. Mais nos travaux ainsi que ceux de Le Barny (61) ont montré que le carbone asymétrique C_{α} dans le monomère pouvait à lui seul perturber le chromophore extrinsèque.

Par Dichroïsme circulaire, aucun renseignement concernant ce problème n'a pu être fourni. Cependant, nous avons pu relever un point intéressant. En effet, l'étude des bandes extrinsèques a permis de voir que la bande à 350nm était sensible à la structure secondaire donc au champ asymétrique de l'hélice car l'ellipticité [6] permet de suivre la transition hélicechaîne. Citons à ce sujet les travaux de Le Barny. Ceci peut être intéressant en particulier pour suivre une transition dans un solvant non transparent en Ultra-Violet.

Nous avons donc utilisé une deuxième technique, la Résonance Magnétique Nucléaire, qui pouvait nous renseigner davantage à ce sujet.

En effet, si il y a interactions entre les groupements de la chaîne latérale, nous devrions observer des glissements chimiques au moment du passage de la forme hélice à la forme chaîne. Or ceci n'apparaît pas en ce qui concerne les protons du cycle aromatique. La bande correspondante est toujours fine, ce qui montre que le noyau aromatique est toujours très mobile et trop éloigné pour ressentir une interaction avec le squelette.

Pour les protons βCH_2 et CH_2 , nous ne constatons pas non plus de glissements chimiques. Donc, il semblerait qu'il n'y ait pas d'interaction chaîne latérale-chaîne latérale. Ceci est en accord avec les résultats d'Aragâo obtenus par spectrophotométrie infra-rouge.

Par contre, le dédoublement de ces mêmes bandes observé pour tous les copolymères "para" et "ortho" sous forme hélice gauche montre qu'il existe dans ce cas deux conformations préférentielles.

Nous pensons que les interactions chaîne latérale-chaîne principale sont nettement prépondérantes dans les polypeptides et nous pouvons rapprocher ces conclusions de celles concernant les

. . . / . . .

recherches de la structure secondaire à partir de la structure primaire : notamment Finkelstein et Ptitsyn (62) d'une part, Robson et Pain (63) d'autre part, déduisent eux aussi de leurs travaux le rôle important des interactions chaîne latérale-chaîne principale.

Nous avons préparé deux séries de copolymères statistiques P(LAB, LAPNB) et P(LAB, LAONB), par la méthode du complexe cuivrique et le passage par l'anhydride de
Leuchs. Ces différentes préparations nous ont amené à rechercher les conditions les plus favorables de polymérisation. C'est
ainsi que nous avons choisi les mélanges CHCl₃-DMF et NB-DMF
qui solubilisent les polymères, leur précipitation se faisant
par le méthanol.

Nous avons étudié ces copolymères par deux méthodes spectroscopiques : le Dichroïsme Circulaire dans CHCl₃ et CHCl₃/HFIP, et la Résonance Magnétique Nucléaire. Pour cette seconde technique, nous avons utilisé le chloroforme deutéré dans lequel nous avons pu suivre la transition hélice-chaîne par addition de TFA.

Cela nous a permis de mettre en évidence le fait que le PLApNB et le PLAoNB adoptent une conformation en hélice α droite dans les mêmes conditions que celles dans lesquelles le polyaspartate de benzyle adopte une conformation en hélice α gauche.

Une étude de la stabilité des copolymères a montré que le PLAONB était beaucoup moins stable que le PLAPNB.

La transition hélice gauche hélice droite a pu être suivie par D.C. grâce à la bande dichroïque intrinsèque à 222nm et surtout grâce à la bande dichroïque extrinsèque à 350nm. Par R.M.N, cette transition a été étudiée en observant la bande dûe au proton $\alpha C\underline{H}$.

Nous avons montré l'existence de deux conformations préférentielles et tous nos résultats s'expliquent par la prépondérance des interactions chromophore-hélice.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) W.MOFFITT, J.T.YANG.Proc.Natl.Acad.Sci.US. (1956), <u>42</u>, 596
- (2) G.HQLZWARTH, P.DOTY.J.A.C.S. (1965),87,218.
- (3) J.BRAHMS et D.SPACH Nature (1963), 72, 200.
- (4) E.M.BRADBURY, B.G.CARPENTER et H.GOLDMAN. Biopolymers, (1968),6,837.
- (5) M GOODMAN, F.BOARDMAN et I.LISTOWSKI. J.A.C.S. (1963), 85,2483.
- (6) F.A.BOVEY Pure and Applied Chemistry (1968), 16,417.
- (7) M.GOODMAN et A.M.FELIX. cf C.TONIOLO, M.FALXA et M. GOODMAN Biopolymers (1968),6, 1579.
- (8) M.HASHIMOTO et J.ARITOMI Bull.Chem.Soc.Japan (1966),39, 2707.
- (9) M.HASHIMOTO Bull. Chem. Soc. Japan (1966), 39, 2713.
- (10) M.GOODMAN, C.M.DEBER et A.M.FELIX.J.A.C.S.(1962),84,3773.
- (11) M.GOODMAN, A.M. FELIX, C.M. DEBER, A.R. BRAUSE et G.SCHWARTZ. Biopolymers (1963), 1,371.
- (12) R.H.KARLSON, K.S.NORLAND, G.D.FASMAN et E.R.BLOUT.J.A.C.S. (1960),82,2268.
- (13) E.R.BLOUT et R.H.KARLSON.J.A.C.S. (1958),80,1259.
- (14) E.M.BRADBURY, A.M.DOWNIE, A.ELLIOT et W.E.HANBY. Proc.Roy. Soc. (London) (1960), A259, 110.

.../...

- (15) E.M.BRADBURY, L.BROWN, A.R.DOWNIE, A.ELLIOT, W.E.HANBY et T.R.R.Mc DONALD Nature (1959), 183, 1786.
- (16) E.M.BRADBURY, A.R.DOWNIE, A.ELLIOT et W.E.HANBY Nature (1960), 187, 320.
- (17) C.H.BAMFORD, D.G.H. BALLARD et A.ELLIOT Makromol.Chem. (1960),35,222.
- (18) J.A.FERETTI Chem.Commun (1967) 1030.
- (19) E.R.BLOUT Biopolymers Symp (1964), 1,397.
- (20) D.F.BRADLEY, M.GOODMAN, A.FELIX et R.RECORDS Biopolymers (1966),4,607.
- (21) M.GOODMAN, A.M.FELIX, C.M.DEBER et A.R.BRAUSE Biopolymers Symp (1964), 1,409.
- (22) M.GOODMAN, A.M.FELIX et G.SCHWARTZ dans Electronic Aspects of Biochemistry, Academic Press, New York (1966).
- (23) M.HASHIMOTO, S.ARAKAWA et K.NAKAMURA présenté au Symposium de Chimie macromoléculaire de Tokyo-Kyoto-Preprints; (1966) 9,12.
- (24) M.HASHIMOTO et S.ARAKAWA Bull.Chem.Soc.Japan (1967), 40, 1698.
- (25) M.GOODMAN et F.R.PRINCE .cf C.TONIOLO, M.L.FALXA et M. GOODMAN Biopolymers (1968),6, 1579.
- (26) J.B.ARAGAO, M.H.LOUCHEUX J.Chim.Phys (1971),1579.
- (27) T.M.BIRSHTEIN, O.B.PTITSYN (1966) Conformations des macromolécules. New-York/London/Sydney: Interscience 350.

- (28) P.J.FLORY (1969) Statistical Mechanics of chain Molecules.

 New-York: Interscience 432.
- (29) S.LIFSON, J.OPPENHEIM.J.Chem.Phys. (1960), 33, 109.
- (30) I.B.HENDRICKSON.J.A.C.S.(1961), 83,4537.
- (31) N.GO, H.A.SCHERAGA.J.Chem.Phys. (1969),51,4751.
- (32) P.DE SANTIS, E.GIGLIO, A.M.LIQUORI, A.RIPAMONTI.J.Polymer. Sci (1963), A1, 1383.
- (33) P.DE SANTIS, E.GIGLIO, A.M.LIQUORI, A.RIPAMONTI. Nature (1965) 206, 456;
- (34) H.A.SCHERAGA Advanced. Phys. Org. Chem. (1968), 6, 103.
- (35) J.F.YAN, G.VANDERKOOI, et H.A.SCHERAGA.J.Chem.Phys. (1968), 49, 2713.
- (36) D.N.SILVERMAN, G.T.TAYLOR et H.A.SCHERAGA. ABB. (1971), 146, 587.
- (37) E.M.BRADBURY, B.G.CARPENTER, C.CRANE-ROBINSON et H.GOLDMAN Macromolecules (1971),4, 557.
- (38) E.M.BRADBURY, C.CRANE-ROBINSON, V.GIANCOTTI et R.M. STEPHENS.Polymer (1972), 13, 33.
- (39) M.H.LOUCHEUX et C.DUFLOT Biopolymers (1973), 12, 121.
- (40) A.K.CHEN et R.W.WOODY.J.A.C.S. (1971), 93,29.
- (41) M.DELPORTE-LEROY, P.LE BARNY, M.H.LOUCHEUX.Macromolecules Sous presse.
- (42) L.PAOLILLO, B.G.CARPENTER, E.M.BRADBURY et C.CRANE-ROBINSON Biopolymers (1972),11,2043.

.../...

- (43) E.M.BRADBURY, B.G.CARPENTER, C. CRANE-ROBINSON, H. GOLDMAN Nature (1970) 225,64.
- (44) E.M.BRADBURY, C.CRANE-ROBINSON, H.W.E.RATTLE Nature (1967),216,862.
- (45) E.M.BRADBURY, B.G.CARPENTER et R.M.STEPHENS Macromolecules (1972),5,8.
- (46) Y.TAKEDA, Y.IITAKA et M.TSUBOI.J.Mol.Biol.(1970),51,101.
- (47) F.H.C.STEWART, R.LEDGER.Austr.J.Chem. (1965), 18, 1477.
- (48) E.R.BLOUT et R.H.KARLSON.J.A.C.S.(1956) 78,941.
- (49) F.FUCHS Ber (1922),55,2943
 A.C.FARTHING J.Chem.Soc.(1950),32,13.
- (50) J.ARAGAO Thèse de 3ème cycle Strasbourg (1970).
- (51) J.A.C.S. (1916),38,1077.
- (52) G.SNATZKE.Optical Rotatory Dispersion and circular Dichroisin organic Chemistry (1967), p41.
- (53) G.SNATZKE Optical Rotatory Dispersion and circular Dichroisme in Organic Chemistry (1967),p 224.
- (54) J.PLATT J.Chem.PHys (1951) 19,101.
- (55) M.GODFREY et J.N. MURELL Proc. Chem. Soc. (1961), 171.
- (56) H.SUZUKI dans "Electronic Absorption Spectra and Geometry in Organic Molecules "Acad Press New-York (1967).
- (57) R.ULLMAN Biopolymers (1970),9,471.
- (58) U.V.ATLAS of Organic Compounds. Butterworths.

- (59) R.CAHILL, R.C.COOKSON et T.A.CRABB. Tetrahedron (1969) 25, 4681.
- (60) E.R.BLOUT et L.STRYER, J.A.C.S. (1961),83,1411.
- (61) P.LE BARNY Thèse 3ème cycle Lille (1972).
- (62) A.V.FINKELSTEIN et O.B.PTITSYN. J.Mol.Biol.(1971), 62, 613.
- (63) B.ROBSON et R.H.PAIN. J.Mol.Biol.(1971),58,237.

