

50376  
1974  
182

N<sup>o</sup> d'ordre : 490

50376  
1974  
182

# THESE

*présentée à*

L'UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

*pour obtenir le titre de*

DOCTEUR 3<sup>o</sup> CYCLE

*par*

Jean - Pierre AUBERT

\*

**SYNTHESE ET ETUDE D'UN COPOLYMERE ALTERNE**  
**Le Poly( $\beta$ L Aspartate de 4 nitrobenzyle -**  
 **$\beta$ L Aspartate de benzyle)**



*Soutenue le 26 octobre 74 devant la Commission d'examen*

**Membres du Jury**

M.	C. LOUCHEUX	<i>Président</i>
Mme	M.H. LOUCHEUX	<i>Examineur</i>
M.	H. SLIWA	<i>Examineur</i>
M.	G. BISERTE	<i>Membre Invité</i>
M.	G. SPACH	<i>Membre Invité</i>



M. PROUVOST Jean	Géologie Minéralogie
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. DERCOURT Jean-Michel	Sciences de la Terre
M. LEBRUN André	Electronique (Lille)
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEUR SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BONNOT Ernest	Biologie
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Chimie Minérale
M. DEPREZ Gilbert	I.U.T. Lille
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LACOSTE Louis	Biologie
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mlle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MIGEON Michel	Chimie
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. RACZY Ladislas	Physique
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	I.E.E.A.
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques

M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCOQ Denis	Mathématiques
M. BREZINSKI Claude	I.E.E.A.
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COQUERY Jean-Louis	Biologie
M. COULON Jean	I.E.E.A.
M. CROSNIER Yves	E.U.D.I.L.
M. COUTURIER Daniel	Chimie
M <sup>le</sup> DACCHARI Monique	Géographie et aménagement Spatial
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DHAINAUT André	Biologie
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
M. DERIEUX Jean-Claude	Biologie (I.U.T.)
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DUEE Gérard	Sciences de la Terre
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M <sup>me</sup> EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M. FONTAINE Jacques-Marie	I.U.T. Lille
M. FOURNET Bernard	I.U.T. Lille
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. CAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques et Sociales
M. HECTOR Joseph	S.E.N. Calais
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	I.E.E.A.
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
M <sup>le</sup> KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M <sup>le</sup> LEGRAND Denise	Mathématiques
M <sup>le</sup> LEGRAND Solange	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	Electronique (Lille)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHET Pierre	I.U.T. Lille
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique (I.U.T. Lille)
M <sup>me</sup> N'Guyen Van Chi Régine	Géographie et Aménagement Spatial
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economique et Sociales

M. MESSELIN Jean	Physique
M. MOTZKIN Joseph	Mathématiques
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. NICOLE Jacques	Chimie (E.N.S.C.L.)
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PERTUZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. ROGALSKI Marc	Mathématiques
M. ROY Jean-Claude	Biologie
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. THERY Pierre	Calais
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique (Béthune)
M. WERNER Georges	Informatique (I.U.T. Lille)
M. WATERLOT Michel	Géologie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

A mon père

dont la droiture et la tenacité sont des exemples constants  
pour moi.

A ma mère

en hommage affectueux et respectueux pour sa tendresse et  
son dévouement.

A ma femme

Son appui de tous les instants m'a permis de mener à bien  
ce travail.

Monsieur C. LOUCHEUX, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, m'a accueilli dans son laboratoire de chimie macromoléculaire où ce travail a été réalisé. Il m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Madame M-H. LOUCHEUX, Maître de recherches au CNRS, m'a proposé le sujet de travail exposé dans cette thèse. Elle en a suivi le développement avec le plus grand intérêt. Son aide constante, ses nombreux conseils ont permis mon initiation à la chimie physique. Je tiens à lui exprimer ici ma respectueuse reconnaissance.

Monsieur H. SLIWA, Professeur 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 M.G. SPACH, Directeur de recherches au CNRS, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Monsieur G. BISERTE, Professeur de Biochimie Pathologique et Directeur de l'IRCL, a bien voulu me faire l'honneur de juger ce travail. Qu'il veuille accepter mes respectueux remerciements.



Les spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés au laboratoire de génétique moléculaire de Gif sur Yvette. Je tiens à remercier Monsieur V. LUZZATI, Directeur de recherches au CNRS, et Monsieur E. SHECHTER, Professeur à la Faculté des Sciences d'Orsay.

Le centre textile et de recherche scientifique a mis à ma disposition un spectrophotomètre infra-rouge pour l'étude en lumière polarisée. Mes remerciements vont à Monsieur MAZINGUE, Directeur du CTCRS, ainsi qu'à Monsieur KACZMAREK pour sa serviabilité.

Enfin, c'est pour moi un plaisir d'associer en une même pensée tous mes camarades de laboratoire qui, à titres divers, ont contribué à la réalisation de ce travail. En particulier, Monsieur LE BARNY avec lequel j'ai eu de très nombreuses et très intéressantes discussions. Je le remercie et lui exprime ma sincère amitié. Madame M. P. HILDEBRAND a réalisé la dactylographie de ce mémoire avec beaucoup de minutie et Mademoiselle C. BELAIR en a réalisé l'impression. Qu'elles en soient remerciées ici.

## TABLE DES MATIERES

---

INTRODUCTION.

### CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES. p.2.

- A. RAPPEL DES CONFORMATIONS DES ESTERS EN 3 DE L'ACIDE POLY L ASPARTIQUE.
- B. RAPPELS CONCERNANT L'ETUDE DES COPOLYMERES STATISTIQUES  $\beta$  L ASPARTATE DE BENZYLE- $\beta$  L ASPARTATE DE 4 NITROBENZYLE.
- C. RAPPELS CONCERNANT LES COPOLYPEPTIDES ALTERNES.

### CHAPITRE II : SYNTHÈSE DES POLYPEPTIDES.

#### A. PRINCIPE DE SYNTHÈSE. p.7.

- I) Conditions générales.
- II) Choix des groupements protecteurs.
  - 1) Protection de la fonction acide.
  - 2) Protection de la fonction amine.
- III) Formation de la liaison peptidique.
  - 1) Activation du partenaire aminé.
  - 2) Activation du partenaire carboxylé.
  - 3) Méthode aux carbodiimides.
- IV) Racémisation.

#### B. PARTIE EXPERIMENTALE. p.13.

- I) Schémas réactionnels.
- II) Synthèse et caractérisations.
  - 1) Synthèse.
  - 2) Caractérisations.

.../...

### CHAPITRE III : ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES.

#### A. DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE (DOR) ET DICHROISME CIRCULAIRE (DC).p.29.

I) Rappels concernant les chromophores optiquement actifs.

II) Généralités.

III) Dispersion optique rotatoire.

IV) Dichroïsme circulaire.

V) Application de la DOR et du DC à l'étude des polypeptides.

1) DOR des polypeptides.

2) DC des polypeptides.

VI) Résultats.

1) Dispersion optique rotatoire.

a) ATF

b) DMF

c) TMP

d) TMP + ATF

e)  $\text{CHCl}_3$

f)  $\text{CHCl}_3$  + ATF

2) Dichroïsme circulaire

a) ATF

b) TMP

c) HFIP

d) HFIP + ATF

e)  $\text{CHCl}_3$

f)  $\text{CHCl}_3$  + ATF

VII) Conclusions.

#### B. INFRA-ROUGE.p.45.

I) Rappels

II) Résultats.

C. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN). p. 49.

I) Rappels.

II) Résultats.

1) DMF.

2) TMP.

3) HFIP.

4)  $\text{CHCl}_3$ .

III) Conclusions.

CONCLUSION.

ANNEXE : PREPARATIONS

I) Préparation du  $\beta$  L aspartate de 4 nitro benzyle.

II) Préparation du  $\beta$  L aspartate de benzyle.

III) Préparation des monomères protégés.

IV) Préparation du dimère et du trimère protégés.

V) Polymérisation.

## GLOSSAIRE

---

H-Asp-OH   OH	Acide L Aspartique.
H-Asp-OH   OBzl	$\beta$ L Aspartate de benzyle.
H-Asp-OH   OPNB	$\beta$ L Aspartate de 4 nitro benzyle.
tBOC	Tertiobutyloxycarbone.
DMF	Diméthylformamide.
AcOEt	Acétate d'Ethyle.
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique.
HFIP	Hexafluoroisopropanol.
ATF	Acide Trifluoroacétique.
Et <sub>3</sub> N	Triéthylamine.
DCHA	Dicyclohexylamine.
Pcp	Pentachlorophénol.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
DCCI	Dicyclohexylcarbodiimide.
ADC	Acide dichloracétique.
TMP	Triméthylphosphate.
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme.
[ $\theta$ ]	Ellipticité molaire.
[ $\alpha$ ]	Pouvoir rotatoire spécifique.
[m]	rotation molaire

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

Les polypeptides et copolypeptides obtenus à partir des esters en  $\beta$  de l'acide L aspartique ont été très étudiés. En effet, suivant la nature de cet ester, les monomères favorisent soit un enroulement en hélice  $\alpha$  gauche, soit un enroulement en hélice  $\alpha$  droite.

Jusqu'ici, ce sont surtout les copolymères statistiques qui ont été étudiés. Dans ce cas, les polymères adoptent des structures hélicoïdales dans les solvants hélicogènes et, suivant les cas, on observe soit un mélange d'hélices  $\alpha$  droite et gauche (1,2), soit une hélice d'enroulement unique. La structure primaire n'est donc connue que statistiquement et c'est pourquoi nous avons synthétisé un copolymère alterné. Notre choix s'est porté sur le copolymère  $\beta$  L Aspartate de 4 nitro benzyle-  $\beta$  L aspartate de benzyle: en effet l'homopoly  $\beta$  L aspartate de 4 nitro benzyle adopte une conformation en hélice  $\alpha$  droite alors que dans les mêmes conditions l'homopoly  $\beta$  L aspartate de benzyle adopte une conformation en hélice  $\alpha$  gauche (3).

Il est intéressant de noter que des travaux, concernant la structure secondaire qu'adoptent des polymères D-L alternés, ont déjà été réalisés. Il s'agit bien dans ce cas d'un copolymère dans lequel un résidu adopte une conformation en hélice  $\alpha$  droite alors que le suivant adopte une conformation en hélice  $\alpha$  gauche. Les monomères sont des antipodes optiques. Le dernier travail que nous connaissons sur le sujet est la thèse de F.Heitz (4) concernant le copolymère alterné DL glutamate de benzyle.

Par contre, dans l'exemple que nous avons étudié, tous les résidus ont la même configuration, L, et ne varient que par la nature de leurs chaînes latérales.

Nous pensions ainsi créer des interactions au niveau de la chaîne principale et des chaînes latérales et mettre en évidence une nouvelle structure liée à ces interactions.

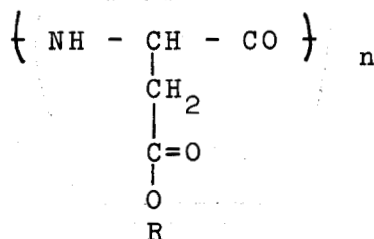
CHAPITRE I



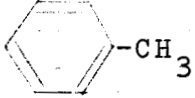
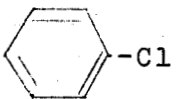


RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

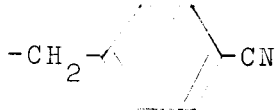
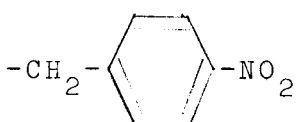
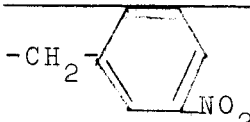
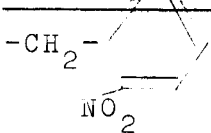
A. RAPPEL DES CONFORMATIONS DES ESTERS EN  $\beta$  DE L'ACIDE POLY L ASPARTIQUE.

On a rappelé dans le tableau ci-dessous les différentes conformations adoptées par les esters de l'acide poly L aspartique.



Groupement ester R	Sens de l'hélice	solvants	Références
$-\text{CH}_3$	gauche	$\text{CHCl}_3$ Film orienté	(5-8)(2)
$-\text{CH}_2-\text{CH}_3$	droit	$\text{CHCl}_3$ Film orienté	(5)(7)(2)
$-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	droit	$\text{CHCl}_3$ Film orienté	(5)(7)
$-\text{CH}_2-\text{CH} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_2-\text{CH}_3 \end{array}$	droit	Dioxanne	(8)
$-\text{CH}_2-$ 	gauche	$\text{CHCl}_3$ Dichloro- méthane	(5)(9-19)(2) (15)(20)
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 	droit	$\text{CHCl}_3$	(5)(19)
$-\text{CH}_2-$  $-\text{CH}_3$	droit	$\text{CHCl}_3$ DMF	(10)(19) (11)
$-\text{CH}_2-$  $-\text{Cl}$	droit	$\text{CHCl}_3$ DMF	(10)(19) (11)



	droit	CHCl <sub>3</sub>	(10)(19)
		DMF	(11)
	droit	CHCl <sub>3</sub> /	(8)(10)(12)
		HFIP <sup>3</sup> /	(21)(19)(22)
		DMF	(23)(24)
		TMP	(8)
		Film	(21)
	gauche	CHCl <sub>3</sub>	(25)
	droit	CHCl <sub>3</sub>	(1)

On peut classer les polyaspartates en deux groupes suivant la longueur de la chaîne latérale :

- chaîne latérale courte : on obtient une hélice  $\alpha$  gauche.
- chaîne latérale longue : on obtient une hélice  $\alpha$  droite.

Lorsque les chaînes latérales sont des groupements aromatiques, on peut également faire une distinction :

- groupement benzyle : on obtient une hélice  $\alpha$  gauche
- substitution en para du groupement benzyle : on obtient une hélice  $\alpha$  droite.

#### B. RAPPELS CONCERNANT L'ETUDE DES COPOLYMERES STATISTIQUES $\beta$ L-ASPARTATE DE BENZYLE- $\beta$ L ASPARTATE DE 4 NITRO BENZYLE (22).

L'étude physicochimique de tels copolymères a été faite par dispersion optique rotatoire, dichroïsme circulaire et résonance magnétique nucléaire.

Quel que soit le pourcentage de dérivés nitro benzyle, la structure est toujours hélicoïdale, mais le sens d'enroulement change suivant la composition du polymère comme l'indique le tableau suivant.

Dans ce cas les polymères sont en solution dans le chloroforme. La transition H $\alpha$ G  $\rightarrow$  H $\alpha$ D est donc observée aux environs de 28% en dérivé nitré : l'hélice  $\alpha$  gauche du poly  $\beta$  L aspartate de

benzyle est moins stable que l'hélice  $\alpha$  droite du poly L aspartate de 4 nitro benzyle.

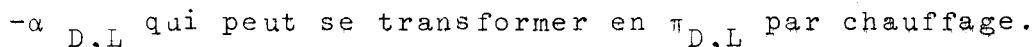
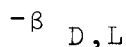
Polymère	:	Sens de l'hélice
0% NO <sub>2</sub>	:	H $\alpha$ G
15% NO <sub>2</sub>	:	H $\alpha$ G
28% NO <sub>2</sub>	:	50% H $\alpha$ G 50% H $\alpha$ D
40% NO <sub>2</sub>	:	80% H $\alpha$ D 20% H $\alpha$ G
100% NO <sub>2</sub>	:	H $\alpha$ D

### C. RAPPELS CONCERNANT LES COPOLYPEPTIDES ALTERNES.

La plupart des travaux réalisés sur ce type de copolypeptides sont ceux de G.Spach, A.Brack et F.Heitz (4,26-29,79). Le problème traité par ces auteurs est différent du nôtre car ils ont travaillé sur des copolymères alternés formés de résidus D et L.

Les interactions au niveau du carbone asymétrique sont donc différentes de celles où le copolymère est formé de 2 résidus L.

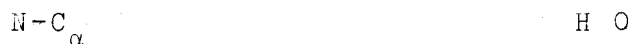
Les structures mises en évidence sont les suivantes :



Quand les deux comonomères ont une configuration L et favorisent un enroulement en hélice  $\alpha$  droit et gauche, la valeur des angles  $\phi$  et  $\psi$  est égale mais de signe contraire pour chacun des résidus.

La figure 1 nous montre les angles  $\phi$  et  $\psi$ .

$\phi$  définit la rotation du plan -N-C- autour de la liaison

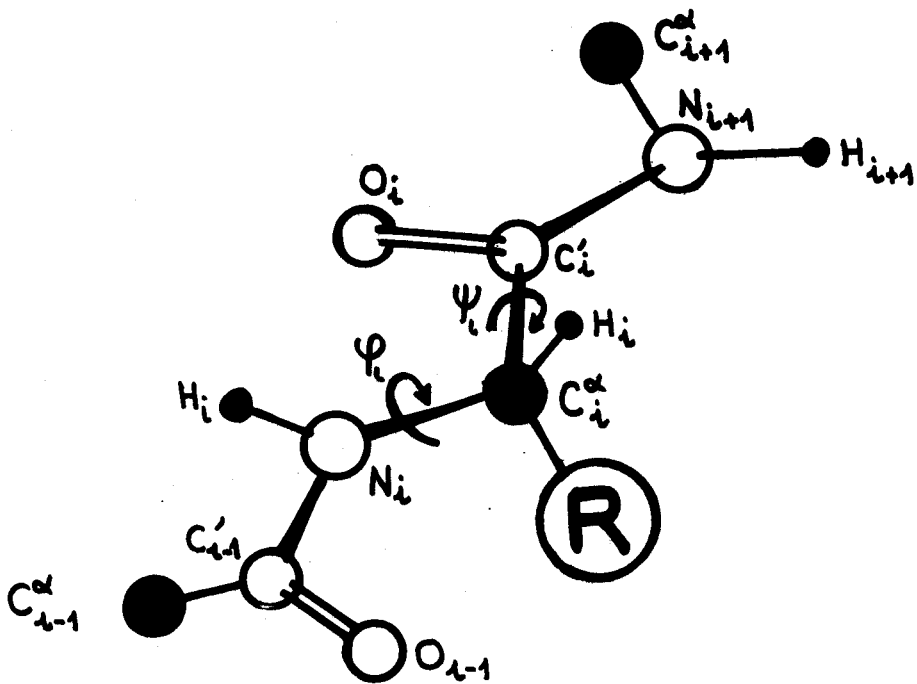
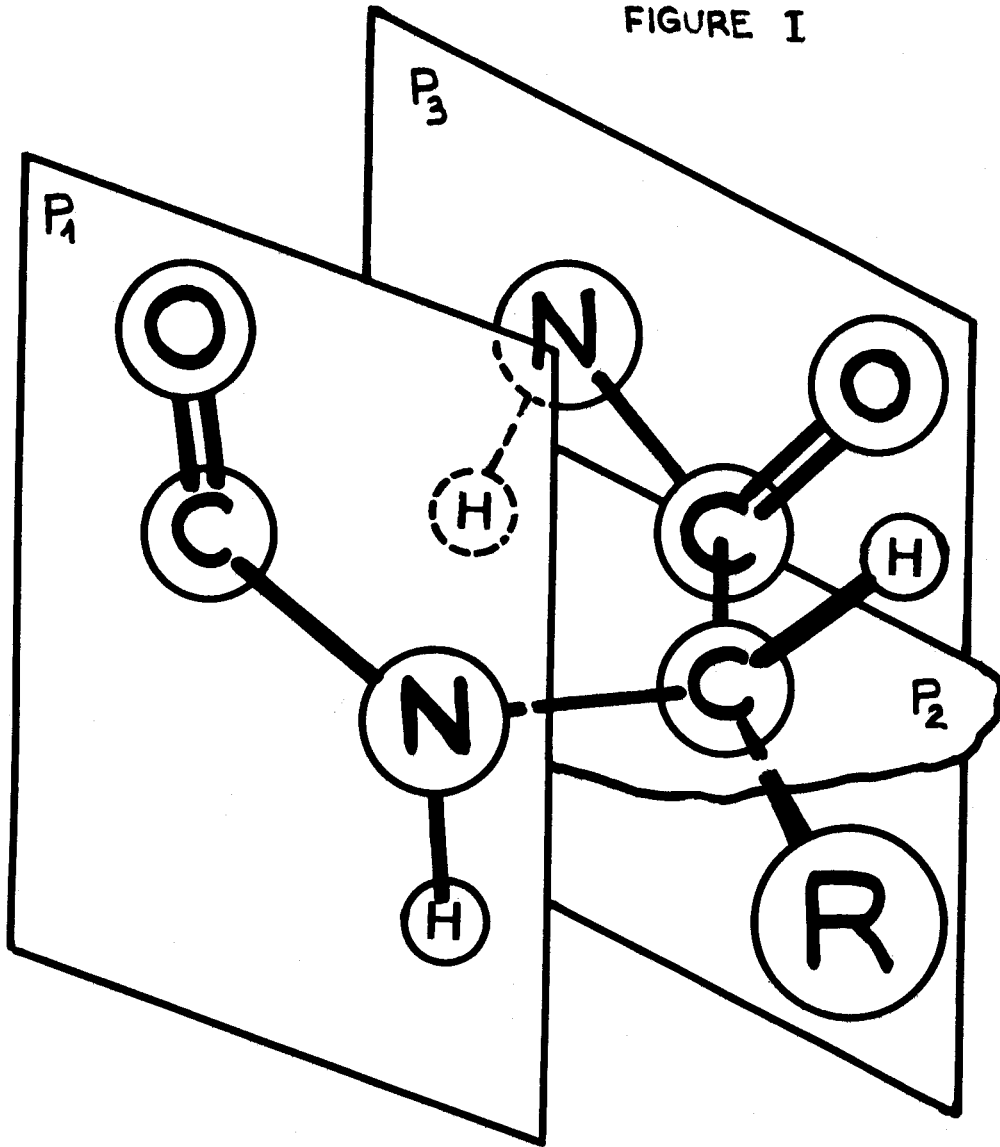


$\psi$  définit la rotation du plan -C-N- autour de la liaison



$P_1$ : plan de la liaison -N<sub>i</sub>-C<sub>i-1</sub>-

FIGURE I



BUS  
LIFE

$P_2$  : plan de la liaison  $\begin{array}{c} \text{-C}_i \text{-N}_{i+1} \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$

$P_3$  : plan des liaisons  $\text{N}_i \text{-C}_\alpha \text{-C}_i$

On donne  $\varphi = \psi = 0$  quand la chaîne est totalement étendue, c'est à dire que tous les  $\begin{array}{c} \text{-C-N-} \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$  sont dans le même plan.

Pour l'hélice  $\alpha$  classique, les valeurs des angles sont (30) :

$\varphi = +132^\circ$  et  $\psi = +123^\circ$  pour le résidu L donnant l'hélice  $\alpha$  droite.

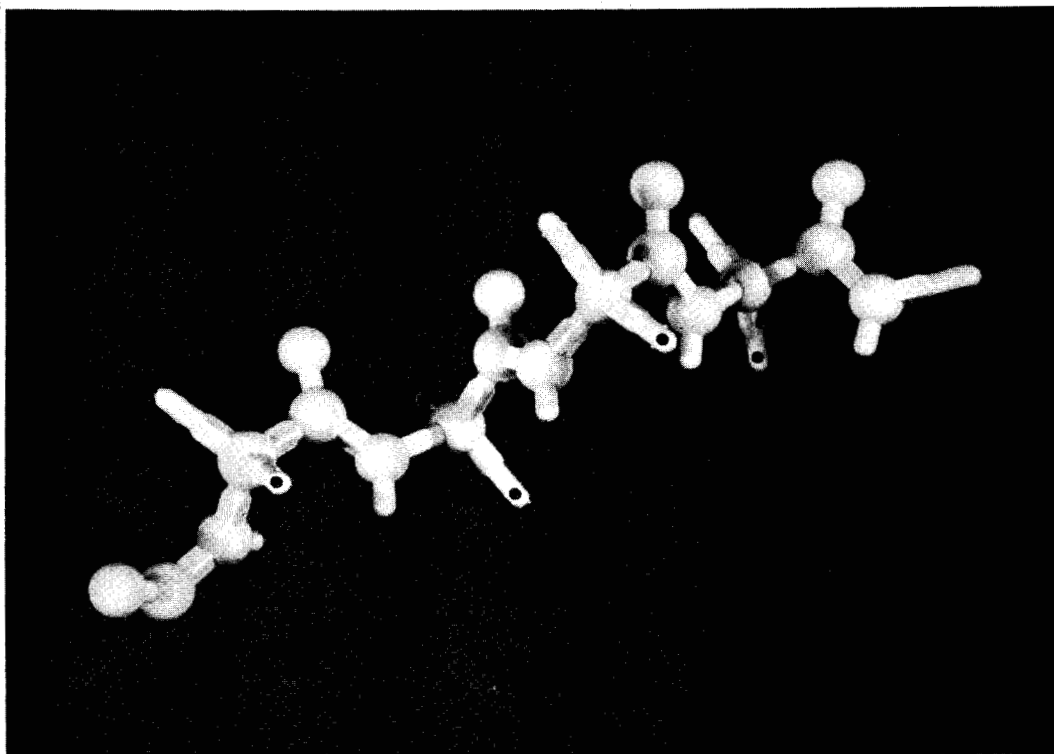
$\varphi = -132^\circ$  et  $\psi = -123^\circ$  pour le résidu L donnant l'hélice  $\alpha$  gauche.

On considère que  $\varphi_a = \psi_a = -\varphi_a = -\psi_a$

a : pour le résidu  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle.

a\* : pour le résidu  $\beta$  L aspartate de benzyle.

En partant de ces données, nous avons construit un modèle correspondant à l'enchaînement a a\*.



● : Ce signe donne la position des chaînes latérales.

On constate que cette structure s'assimile à une structure  $\beta$ . D'ailleurs, Scheraga (31) note qu'il n'est pas possible d'avoir une structure hélicoïdale quand les angles  $\phi$  et  $\psi$  sont égaux en valeur absolue mais alternativement positif et négatif. Nous avons eu confirmation de ce résultat par Colonna-Cesari.

Par contre, De Santis et ses coll. (32-34) admettent l'existence d'une telle structure  $\beta_{aa}$  qui serait adoptée par la poly L lysine lors de l'interaction polylysine-DNA.

Cette structure permettrait de mettre en contact tous les groupements  $PO_4^-$  de la chaîne de DNA avec tous les  $\epsilon NH_3^+$  de la polylysine.

Dans ce cas, les auteurs doivent admettre une certaine flexibilité de la chaîne principale qui "s'adapterait" au DNA pour former une structure hélicoïdale moulée sur l'hélice du DNA.

C'est cette structure que nous pensons pouvoir mettre en évidence par l'étude physicochimique de notre copolymère alterné.

Nous l'avons appelée  $\beta_{aa}$ .

CHAPITRE II

---

SYNTHESE DES POLYPEPTIDES

## A. PRINCIPE DE SYNTHÈSE.

### 1) Conditions générales.

La synthèse de nos copolypeptides se devant d'être sélective, nous ne pouvons utiliser la méthode classique de polymérisation à partir des anhydrides de Leuchs (NCA's) (35-37).

Le copolymère alterné  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle-  $\beta$  L aspartate de benzyle a été réalisé en polycondensant le dimère correspondant et le copolymère séquencé (  $\beta$  L aspartate de benzyle )<sub>2</sub>-  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle, à partir du trimère correspondant.

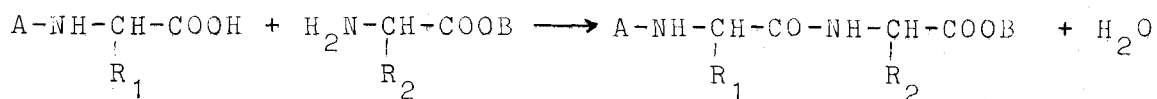
Pour obtenir ces motifs de répétition, nous avons utilisé la synthèse peptidique qui consiste à créer une fonction amide entre 2 acides  $\alpha$  aminés.

Plusieurs voies de synthèse s'offraient à nous et la méthode choisie devait permettre d'éviter toute racémisation.

Examinons successivement les différentes méthodes:

- A partir du mélange des acides aminés correspondants; dans ce cas la réaction ne se fait qu'à haute température et n'est absolument pas spécifique, elle ne peut donc être retenue.
- L'activation de tous les groupements aminés ou carboxyles (38); cette méthode ne permet pas non plus une synthèse dirigée car on peut obtenir des homopolymères ou des copolymères statistiques.
- La protection des groupements aminés et acides qui ne doivent pas réagir.

Dans ce cas, les réactions secondaires peuvent être évitées :



Dans ce schéma, A est un groupement N-protecteur et B un groupement C-protecteur.

## A. PRINCIPE DE SYNTHÈSE.

### I) Conditions générales.

La synthèse de nos copolypeptides se devant d'être sélective, nous ne pouvions utiliser la méthode classique de polymérisation à partir des anhydrides de Leuchs (NCA's) (35-37).

Le copolymère alterné  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle-  $\beta$  L aspartate de benzyle a été réalisé en polycondensant le dimère correspondant et le copolymère séquencé ( $\beta$  L aspartate de benzyle)<sub>2</sub>-  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle, à partir du trimère correspondant.

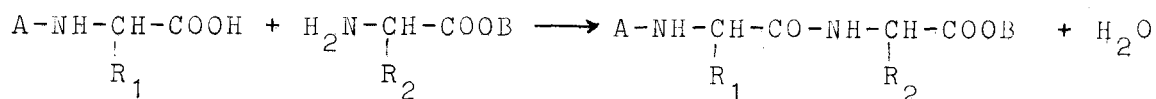
Pour obtenir ces motifs de répétition, nous avons utilisé la synthèse peptidique qui consiste à créer une fonction amide entre 2 acides  $\alpha$  aminés.

Plusieurs voies de synthèse s'offraient à nous et la méthode choisie devait permettre d'éviter toute racémisation.

Examinons successivement les différentes méthodes:

- A partir du mélange des acides aminés correspondants; dans ce cas la réaction ne se fait qu'à haute température et n'est absolument pas spécifique, elle ne peut donc être retenue.
- L'activation de tous les groupements aminés ou carboxyles (38); cette méthode ne permet pas non plus une synthèse dirigée car on peut obtenir des homopolymères ou des copolymères statistiques.
- La protection des groupements aminés et acides qui ne doivent pas réagir.

Dans ce cas, les réactions secondaires peuvent être évitées :



Dans ce schéma, A est un groupement N-protecteur et B un groupement C-protecteur.



C'est cette méthode que nous avons retenue.

Les groupements protecteurs facilitent parfois la réaction de couplage par exemple dans le cas des esters actifs. De plus, ils augmentent la solubilité de l'acide aminé dans les solvants organiques.

## II) Choix des groupements protecteurs (39)

Le choix d'un groupement doit répondre à certaines exigences :

- se mettre en place facilement.
- s'éliminer facilement et sélectivement.
- respecter la pureté optique des constituants.

### 1) Protection de la fonction acide.

L'acide aspartique possède deux groupements carboxyliques, un en  $\alpha$  et un en  $\beta$ .

Celui en  $\beta$  est, dans le cas présent, toujours estérifié soit par un groupement benzyle soit par un groupement 4 nitrobenzyle.

Pour la fonction en  $\alpha$ , on a choisi la méthode de l'ester activé qui permet à la fois une protection et une activation de la fonction carboxylique.

### 2) Protection de la fonction amine.

Dans ce cas, il faut diminuer la disponibilité du doublet électronique libre de l'azote.

Les principales protections utilisées sont :

- les groupements du type alkyle (40,41)

Nous n'avons pas retenu ce type de groupes protecteurs car étant donné leur encombrement, ils ne peuvent se fixer ou se détacher qu'avec de mauvais rendements.

- les groupements du type acyle;

Formyle (42), phtalyle (43), orthonitrophénylsulfonyle (44) que nous n'avons pas utilisés.

.../...

- les groupements du type uréthane;

Le benzyloxycarbonyle (Z)(45) et le tertibutyloxycarbonyle (tBOC) (46). Ce dernier nous a donné d'excellents résultats.

### III) Formation de la liaison peptidique.

La liaison peptidique, pour se former, nécessite un apport d'énergie. Différentes méthodes peuvent être utilisées, en particulier, l'activation des groupements réactifs mis en cause.

#### 1) Activation du partenaire aminé.

C'est une méthode très peu utilisée.

#### 2) Activation du partenaire carboxylé.

- méthode aux azides (47)

Cette technique présente l'avantage de ne provoquer aucune racémisation mais étant donné les très faibles rendements (48,49) qu'elle permet d'obtenir, elle est très peu utilisée;

- méthode aux chlorures d'acides (38)

On ne l'utilise plus de nos jours.

- méthode aux anhydrides mixtes (50,51)

On emploie couramment l'anhydride mixte obtenu par action du chloroformiate d'isobutyle sur l'acide  $\alpha$  aminé N protégé.

- méthode aux esters activés

C'est la méthode que nous avons utilisée pour la polycondensation. Les principaux esters employés sont répertoriés dans le tableau I dans lequel nous avons fait figurer également le mode de greffage que les auteurs ont utilisé ainsi que les taux de racémisation observés.

Les différents résultats obtenus mettent en évidence le rôle joué par la nature des acides aminés mis en jeu ainsi que celui des conditions opératoires.

.../...

Tableau I:

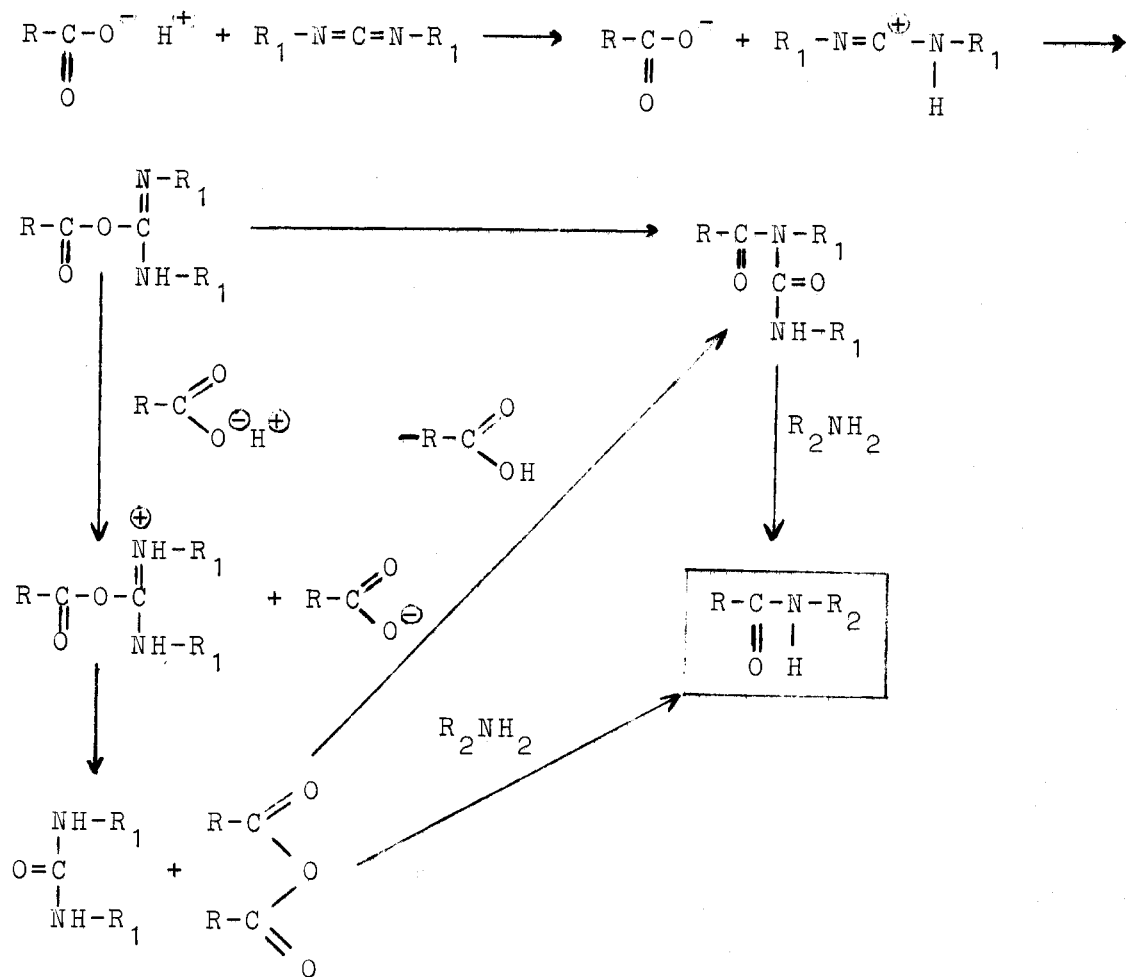
Esters	Abbré- viations	Mode de greffage	Taux de racémisation	Références
Catéchol	Cat	chloroformia- te d'éthyle	0%	(52)
		DCCI	0%	(53)
Pentachloro- phénol	Pcp	DCCI	0%	(54,55)
		DCCI	0-10%	(56)
		DCCI		(27)
		DCCI	0-25%	(57)
Paranitra- phénol	Pnp	DCCI	0%	(58)
		DCCI	0-10%	(57)
Pentafluoro- phénol	Pfp	DCCI	0-10%	(56)
4,5 dichloro-2 hydroxyphénol		Pyridine à T°		(59)
N-hydroxysucci- nimide	Nhs	DCCI	0-10%	(57)
		DCCI	0%	(60)

Nous avons utilisé l'ester pentachlorophénylique car c'est celui qui nous a donné les meilleurs résultats. En effet, le paranitrophénol ne semble pas assez actif pour la polycondensation et avec le catéchol, nous nous sommes heurté à des problèmes de cristallisation.

### 3) Méthode aux carbodiimides.

L'élimination d'une molécule d'eau permettant la formation d'une liaison peptidique ou ester se fait grâce à la transformation d'une carbodiimide en une uréide. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour cette réaction; celui proposé par Khorana est celui qui est généralement retenu.

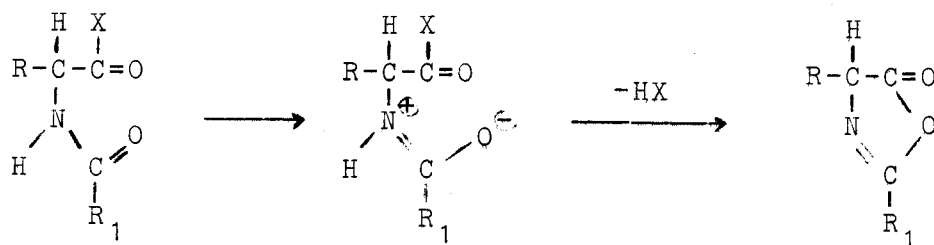
Mécanisme proposé par KHORANA (61)



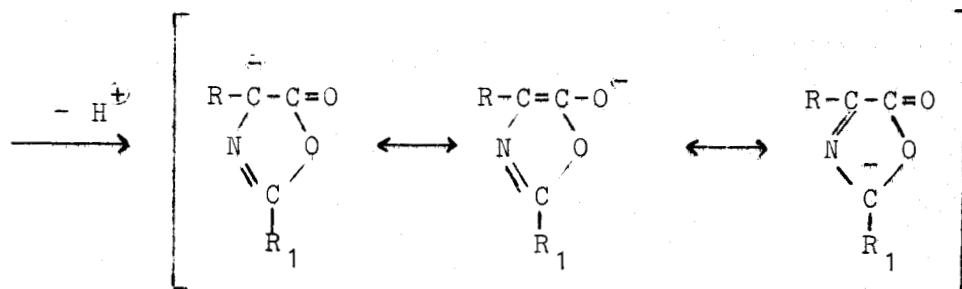
C'est la méthode que nous avons utilisée pour synthétiser le dimère et le trimère ainsi que pour estérifier la fonction acide en  $\alpha$ .

#### IV Racémisation(62-64)

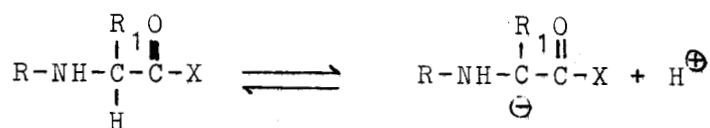
Le seul carbone pouvant s'épimériser durant la formation de la liaison peptidique est le carbone asymétrique situé en  $\alpha$  du groupe carboxyle activé



.../...



Lorsqu'il ne peut y avoir formation d'une oxazolone, on aurait alors une ionisation directe du proton porté par le carbone asymétrique;



Le tertibutyloxycarbonyle permet d'éviter la racémisation car il stabilise l'hydrogène du carbone asymétrique. C'est pourquoi nous l'avons choisi.

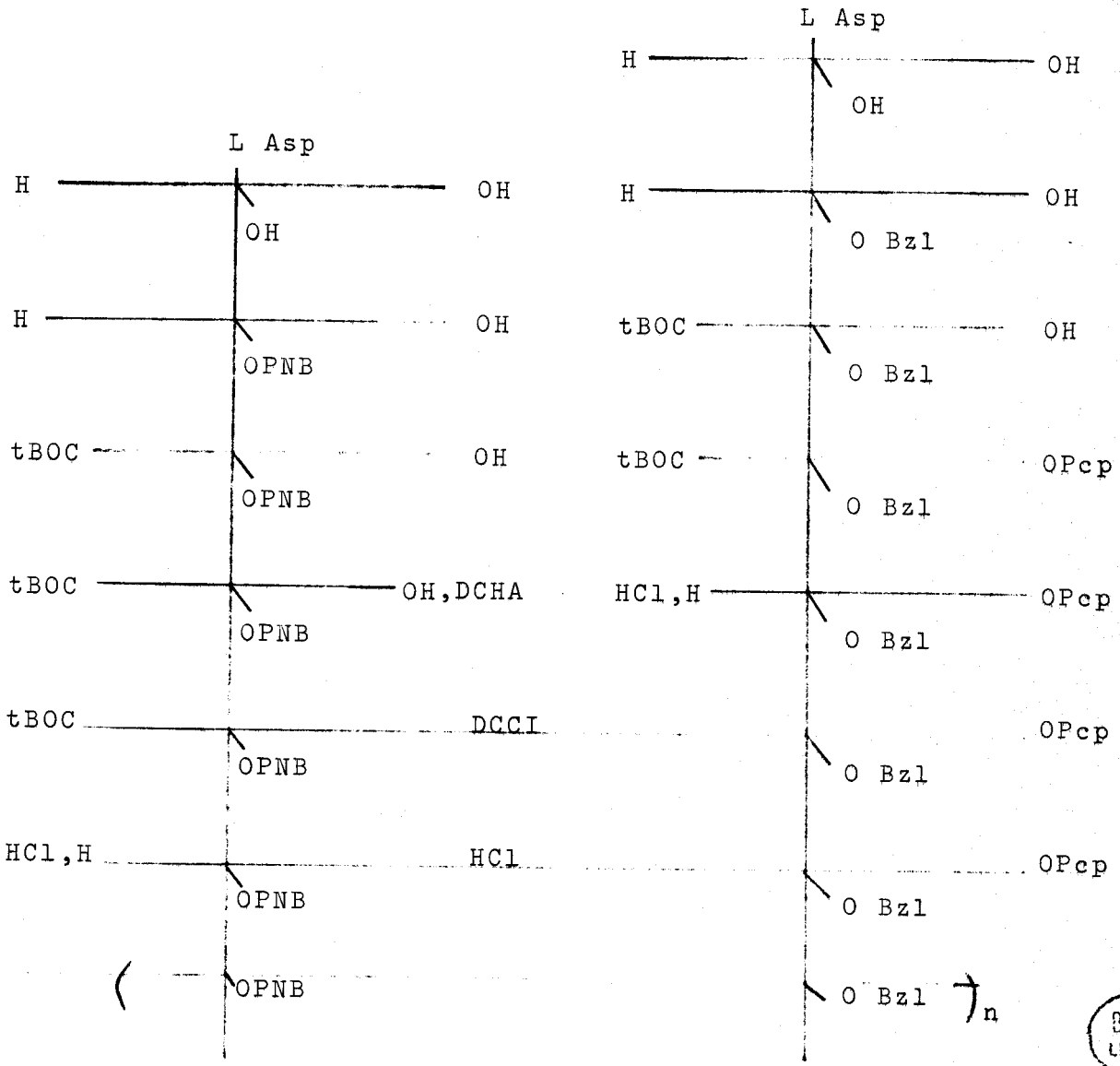


Il faut également préciser que le taux de racémisation peut varier suivant les conditions expérimentales. En particulier il faut utiliser des solvants peu polaires, éviter un milieu basique et dans le cas de la N N' dicyclohexylcarbodiimide, travailler à basse température (-5 à -10°C).

B. PARTIE EXPERIMENTALE.

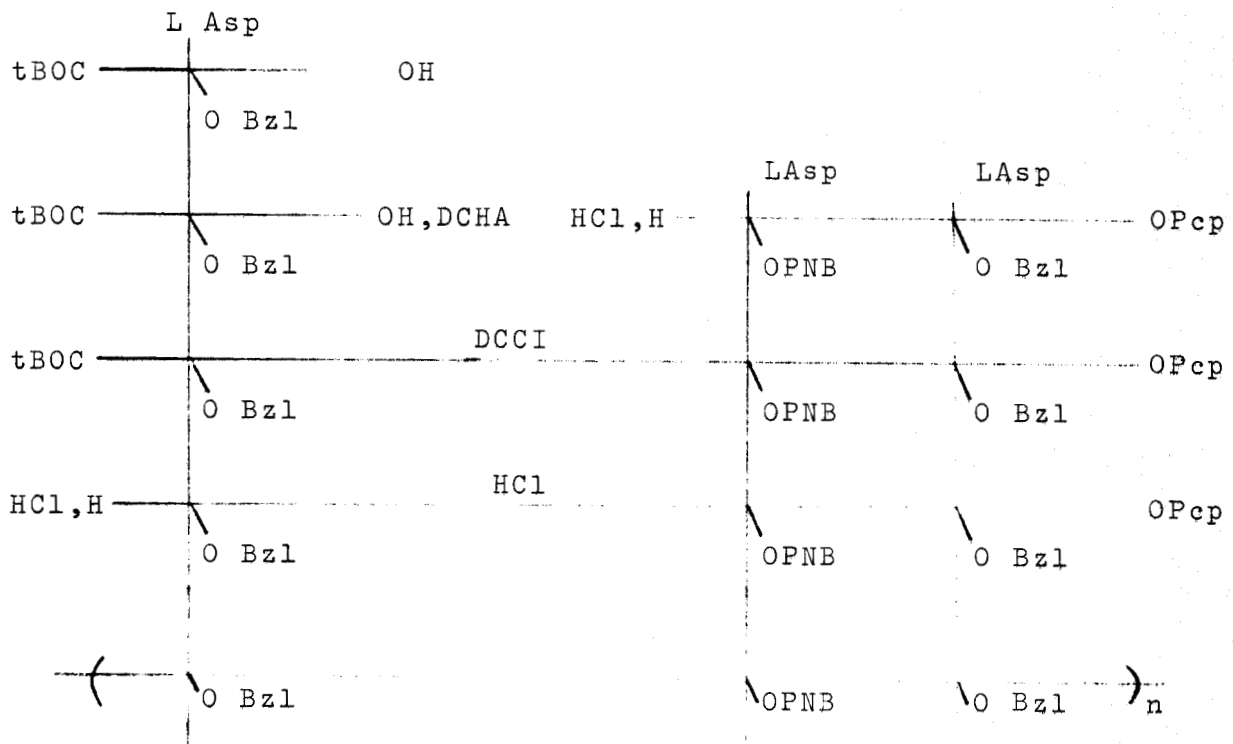
I) Schémas réactionnels.

1) Poly (  $\beta$ -L aspartate de 4 nitrobenzyle- $\beta$ -L aspartate de benzyle.



Polydimère

2) Poly (  $\beta$  L aspartate de benzyle-  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle-  $\beta$  L aspartate de benzyle ).



C'est le schéma de synthèse que nous désirions suivre. Cependant nous n'avons pu utiliser le polytrimère car il a subi de nombreuses coupures du groupement nitrobenzyle.

Les coupures se sont produites au moment de l'enlèvement de la protection et se sont accentuées au moment de la polymérisation. Ce résultat est difficilement interprétable en particulier le groupement nitrobenzyle ne devrait pas être affecté lors de la réaction de coupure qui se fait en milieu acide. Par contre, il peut être coupé lors de la polymérisation qui, elle, s'effectue en milieu légèrement basique. La nouvelle composition de ce copolymère a été déterminée par spectrophotométrie ultra-violette :

- 2/3 Aspartate de benzyle
- 1/6 Aspartate de 4 nitrobenzyle
- 1/6 Acide aspartique.

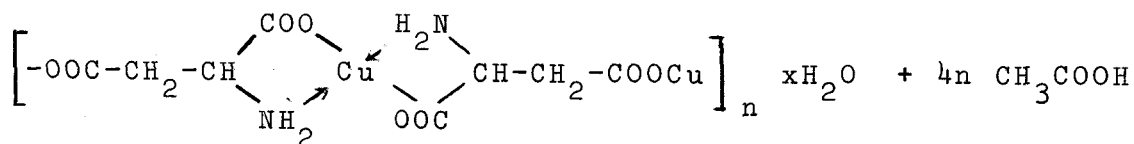
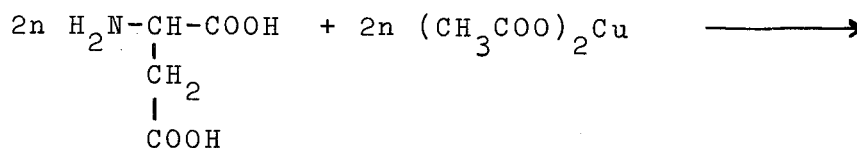
.../...

## II) Synthèse et caractérisations.

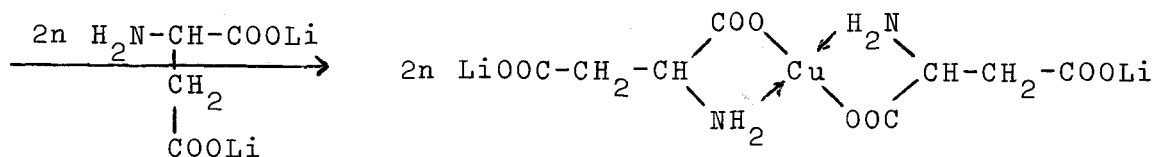
### 1) Synthèse

- Préparation des esters en  $\beta$  de l'acide L aspartique.

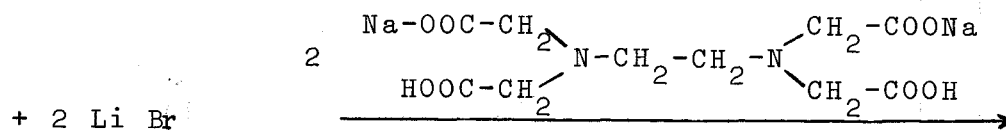
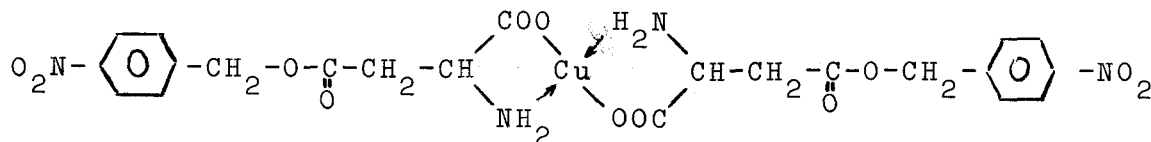
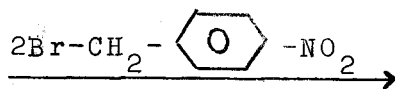
Le  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle a été préparé suivant la méthode de complexation par le cuivre (65,66)



Aspartate de cuivre

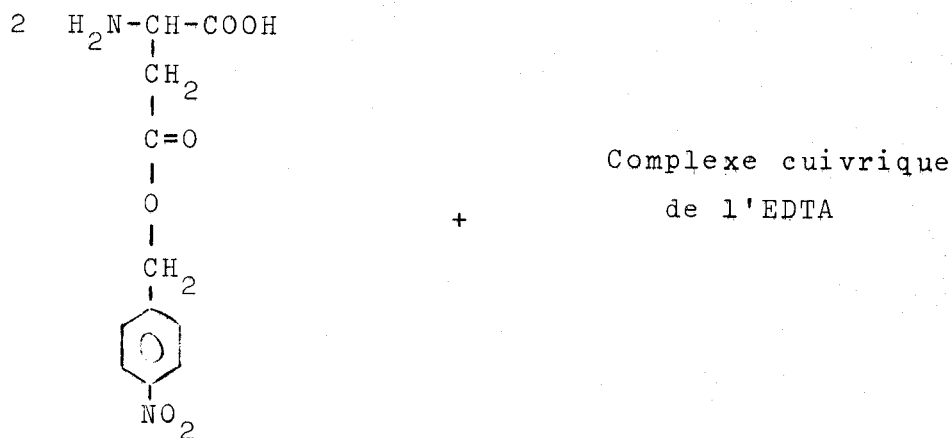


Aspartate de cuivre et de lithium



.../...



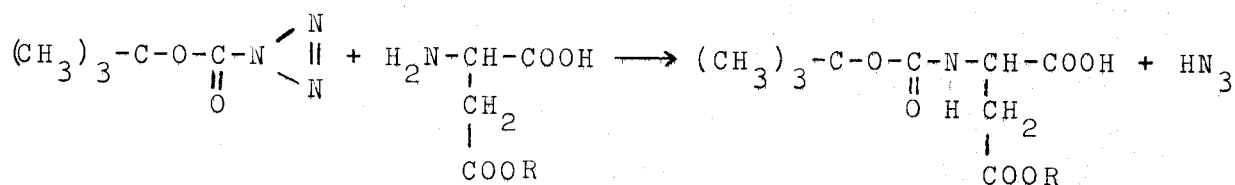


$\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle

Le  $\beta$  L aspartate de benzyle a été préparé par estérification directe de l'acide L aspartique par l'alcool benzylique en présence d'acide chlorhydrique sec (15)

- Protection de la fonction  $\text{NH}_2$

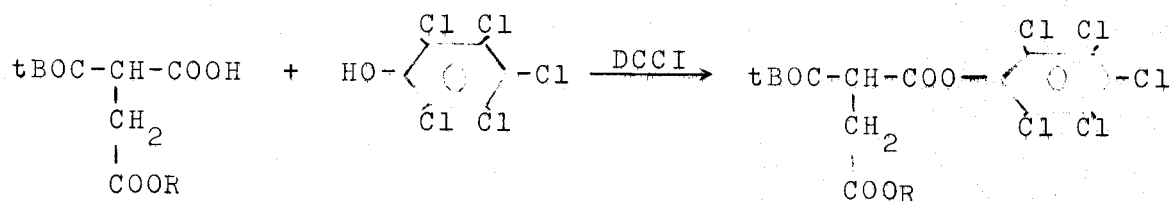
Le groupement tertibutyloxy-carbonyle est fixé à la fonction  $\text{NH}_2$  par action de l'azidoformiate sur l'acide aminé.



R = benzyle ou 4 nitrobenzyle.

- Protection de la fonction acide en  $\alpha$ .

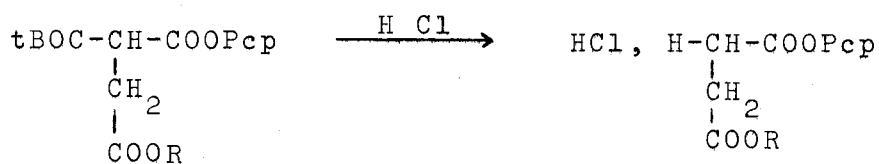
On estérifie cette fonction par le pentachlorophénol.



.../...

- Coupure de la protection tertibutyloxycarbone

Le produit protégé est dissout dans le chloroforme ou l'acétate d'éthyle. On fait barboter de l'acide chlorhydrique gazeux dans la solution. Le sel formé précipite.



- Polymérisation

Il faut éviter la formation d'une dicétopipérazine. Le milieu le plus concentré donne les meilleurs résultats car il favorise les réactions intermoléculaires. (67)

## 2) Caractérisations

- Rendement; Point de fusion;  $[\alpha]_{546}^{20}$

Produits	Rendement	Point de fusion	$[\alpha]_{546}^{20}$
tBOC-Asp-OH   OBzl	85%	102°C	+19,86 :c=1 CHCl <sub>3</sub>
tBOC-Asp-OH, DCHA   OBzl	98%	136°C	+16,86 :c=1 CHCl <sub>3</sub>
tBOC-Asp-OPcp   OBzl	57%	132-133°C	-5,49 :c=1 CHCl <sub>3</sub>
HCl, H-Asp-OPcp   OBzl	79%	150-151°C	+34,16 :c=1 Méthanol
tBOC-Asp-OH   OPNB	73%	137°C	+26,23 :c=1 CHCl <sub>3</sub>
tBOC-Asp-OH, DCHA   OPNB	91%	127°C	+13,67 :c=1 CHCl <sub>3</sub>
tBOC-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	56%	140-141°C	+1 :c=1 CHCl <sub>3</sub>

.../...

HCl, H-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	: 77%	: 147-148°C	: -2,08 c=1 Méthanol
tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp   OBzl OPNB OBzl	: 74%	: 154-155°C	: :
HCl, H-Asp-Asp-Asp-OPcp   OBzl OPNB OBzl	: 48%	: :	: :

- Infra-rouge.

Les spectres ont été réalisés à partir de pastilles de KBr sur un appareil Perkin-Elmer 257.

Sur les tableaux suivants, nous avons donné, en  $\text{cm}^{-1}$ , la position des bandes amide A, amide I et amide II ainsi que celles caractéristiques des protections:

- le groupement benzyle
- le groupement 4 nitrobenzyle
- le groupement tertiobutyloxycarbonyle
- le groupement pentachlorophénol

Bandes dues à la liaison  $\begin{array}{c} \text{-C-NH-} \\ || \\ \text{O} \end{array}$

	Amide A	Amide I	Amide II
tBOC-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	3310	1660	1550
HCl, H-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	3350	1680	1550
tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp   OBzl OPNB OBzl	3340	1680	1540
Polymère alterné	3280	1650	1540

.../...

Bandes dues au groupement benzyle

	( =C-H	: C=C	: C-H	: C=O	: O-CH <sub>2</sub>	: C=O
	(	:	: aromatique	: ester	:	: ester
	(	:	:	:	:	: C-H
	(	:	:	:	:	: benzyle
tBOC-Asp-OH   OBzl	3030	1530	795	1740	1390	1160
tBOC-Asp-OPcp   OBzl	3020	1530	800	1745	1390	1160
HCl, H-Asp-OPcp   OBzl	3040	1505	800	1720	1390	1160
tBOC-Asp-OH, DCHA   OBzl	3040	1510	800	1740	1405	1140
tBOC-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	3040	1460	700	1740	1390	1150
HCl, H-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	3040	1460	700	1745	1390	1150
tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp   OBzl OPNB OBzl	3040	1505	805	1745	1390	1170
		1450	740			
			700			

Bandes dues au groupement 4 nitrobenzyle

	( =C-H	: C=C	: C-H	: C=O	: NO <sub>2</sub>	: Substi-
	(	:	: aromatique	: ester	:	: tution
	(	:	:	:	:	: para
tBOC-Asp-OH   OPNB	3020	1460	780	1745	1525	810
tBOC-Asp-OH, DCHA   OPNB		1450	780	1740	1525	810
tBOC-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	3040	1460	775	1730	1530	800
HCl, H-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	3040	1460	770	1730	1350	
tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp   OBzl OPNB OBzl	3040	1460	775	1745	1530	805
			740		1350	



## Bandes dues au groupement tBOC

	$\left( \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \\   \\ \text{CH}_3 \end{array} \right) : \text{O} - \text{C} - \text{N} : \left( \text{CH}_3 \right)_3 - \text{C} - \text{O}$		
tBOC-Asp-OH	1230	3380	885
 OBzl		1665	
		1610	
tBOC-Asp-OH, DCHA	1220	3400	895
 OBzl		1700	
		1640	
tBOC-Asp-OPcp	1220	3340	895
 OBzl		1685	
		1630	
tBOC-Asp-OH	1220	3450	895
 OPNB		1680	
		1610	
tBOC-Asp-OH, DCHA	1235	3380	900
 OPNB		1650	
		1610	
tBOC-Asp-Asp-OPcp	1245	3340	910
 OPNB OBzl		1685	
		1630	
tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp	1220	3340	895
 OBzl OPNB OBzl		1695	
		1630	

## Bandes dues au groupement Pcp

	C=O ester	C-Cl
tBOC-Asp-OPcp	1790	720
 OBzl		1150
HCl, H-Asp-OPcp	1795	725
 OBzl		1160
tBOC-Asp-Asp-OPcp	1780	725
 OPNB OBzl		1155
HCl, H-Asp-Asp-OPcp	1785	725
 OPNB OBzl		1155
tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp	1790	720
 OBzl OPNB OBzl		1145



## - Ultra violet

Les spectres ont été réalisés sur un appareil DBG Beckman. Les déterminations de  $\epsilon$  ont été ramenées au motif de répétition dans le cas du polymère. La détermination du coefficient d'absorption molaire a toujours été faite au maximum de la bande.

Produits	$\epsilon$ l.mole <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup>	Solvants
tBOC-Asp-OH   OBzl	$\epsilon_{260\text{nm}} = 200$	Acétonitrile
tBOC-Asp-OH   OPNB	$\epsilon_{270\text{nm}} = 10\ 200$	Acétonitrile
tBOC-Asp-OPcp   OBzl	$\epsilon_{269\text{nm}} = 675$	Acétonitrile
HCl, H-Asp-OPcp   OBzl	$\epsilon_{265\text{nm}} = 402$	Méthanol
tBOC-Asp-Asp-OPcp        OPNB OBzl	$\epsilon_{269\text{nm}} = 10\ 700$	Acétonitrile
tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp             OBzl OPNB OBzl	$\epsilon_{269\text{nm}} = 10\ 800$	Acétonitrile
Polydimère	$\epsilon_{268\text{nm}} = 9\ 600$	HFIP
	$\epsilon_{268\text{nm}} = 7\ 000$	ATF
	$\epsilon_{268\text{nm}} = 8\ 000$	TMP
	$\epsilon_{268\text{nm}} = 8\ 500$	CHCl <sub>3</sub>
	$\epsilon_{268\text{nm}} = 7\ 800$	dichloroéthane

## - Analyse élémentaire

Les analyses élémentaires ont été effectuées au Centre de Recherches sur les Macromolécules à Strasbourg par Monsieur P.Calmé que nous tenons à remercier ici.

.../...

Produits	Eléments	Calculé%	Trouvé%
H-Asp-OH   OPNB	C	49,25	46,24
	H	4,51	4,85
	O	35,79	38,77
	N	10,44	9,80
tBOC-Asp-OH   OPNB	C	52,17	52,50
	H	5,47	5,10
	O	34,75	34,41
	N	7,6	7,7
tBOC-Asp-OH, DCHA   OPNB	C	61,19	61,43
	H	7,88	7,86
	O	23,29	23,44
	N	7,65	7,72
H-Asp-OH   OBzl	C	59,19	59,51
	H	5,87	5,82
	O	28,67	28,63
	N	6,27	6,27
tBOC-Asp-OH   OBzl	C	59,44	59,60
	H	6,54	6,53
	O	29,68	29,37
	N	4,33	4,38
tBOC-Asp-OH DCHA   OBzl	C	66,64	66,67
	H	8,79	8,85
	O	19,02	19,11
	N	5,55	5,33
tBOC-Asp-OPcp   OBzl	C	46,22	45,95
	H	3,53	3,69
	O	16,80	16,82
	N	2,45	2,59
	Cl	31,00	30,53
HCl, H-Asp-OPcp   OBzl	C	40,20	40,41
	H	2,57	2,65
	O	12,60	12,98
	N	2,76	2,82
	Cl	41,87	41,38
tBOC-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	C	48,23	50,11
	H	3,68	3,79
	O	21,40	20,94
	N	5,11	5,65
	Cl	21,57	18,78
HCl, H-Asp-Asp-OPcp   OPNB OBzl	C	44,36	44,40
	H	3,05	3,04
	O	19,00	19,43
	N	5,54	5,58
	Cl	28,05	28,43



(		: C	: 51,41	: 52,21	)
(	tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp	: H	: 3,99	: 4,80	)
(		: O	: 21,81	: 19,50	)
(	OBzl  OPNB  OBzl	: N	: 5,45	: 5,30	)
(		: Cl	: 17,33	: 18,40	)
(		:	:	:	)
(	HCl, H-Asp-Asp-Asp-OPcp	: C	: 48,60	: 40,74	)
(		: H	: 3,53	: 2,89	)
(	OBzl  OPNB  OBzl	: O	: 19,94	: 12,96	)
(		: N	: 5,82	: 2,97	)
(		: Cl	: 22,12	: 40,39	)
(		:	:	:	)

- Mesure de masse par tonométrie

1) Théorie

Deux thermistances, utilisées comme palpeurs de température, se trouvent dans une cellule de mesure thermostatée de façon très constante. Si on dispose une goutte de solvant sur chaque thermistance, ces deux gouttes sont en équilibre avec le milieu ambiant et la différence de température est nulle.

Si on remplace une goutte de solvant par une goutte de soluté, celle-ci a une tension de vapeur différente. Il y a alors un écart de température  $\Delta T$  entre les deux thermistances. On considère que :

$$\Delta T = \frac{T}{\Delta H_v} \times \Delta \mu_1$$

On remplace  $\Delta \mu_1$  par son expression en fonction de  $C_w$  (Concentration en g/kg de solvant).

$$\Delta T = \frac{RT^2}{\Delta H_v 10^3} \left[ \frac{M_1}{M_2} C_w + \frac{(1/2 - \chi_1)}{10^3} \frac{d_1^2}{d_2} C_w^2 + \dots \right]$$

$$\bar{M}_n = \frac{RT^2 M_1}{10^3 \Delta H_v} \times \frac{1}{\left( \frac{\Delta T}{C_w} \right)_0} = K \times \frac{1}{\left( \frac{\Delta T}{C_w} \right)_0}$$

.../...



$\Delta\mu_1$  = différence de potentiel chimique entre le solvant et le soluté.

$\Delta H_v$  = différence d'enthalpie de vaporisation.

$M_1$  = Masse moléculaire du solvant.

$M_2$  = Masse moléculaire du soluté.

$\chi_1$  = coefficient d'interaction polymère-solvant.

$d_1$  et  $d_2$  = densité du solvant et du soluté.

On détermine  $K$  en utilisant une substance de référence.

$$\bar{M}_n = K_{et} \times \frac{1}{\left(\frac{\Delta T}{C_w}\right)_o}$$

$C_w$  en g/kg =  $C_{en\ moles/kg} \times \bar{M}_n$  et

$$\bar{M}_n = K_{et} \times \frac{1}{\left(\frac{\Delta T}{C_{\text{moles/kg}} \times \bar{M}_n \text{ et}}\right)_o}$$

$$\Rightarrow K_{et} = \frac{\Delta T}{C \text{ en moles/kg}}$$

Si on reprend la même équation avec un produit de masse inconnue :

$$\bar{M}_n = K_{et} \times \frac{1}{\left(\frac{\Delta T}{C_w}\right)_o}$$

$$\bar{M}_n = \frac{\left(\frac{\Delta T}{C \text{ en moles/kg}}\right)_o}{\left(\frac{\Delta T}{C_w \text{ en g/kg}}\right)_o}$$

$$K_1 = \frac{1}{\left(\frac{\Delta T}{C_w}\right)_o} \Rightarrow \bar{M}_n = \frac{K_{et}}{K_1}$$

$\bar{M}_n$  est bien une masse moléculaire :

.../...

$$\bar{M}_n = \left( \frac{\Delta T}{C \text{ moles/kg}} \right)_o \times \left( \frac{C \text{ g/kg}}{\Delta T} \right)_o \Rightarrow \text{en g/moles}$$

## 2) Résultats

Toutes les manipulations ont été faites en utilisant comme solvant le diméthylformamide.

La constante d'étalonnage a été déterminée en prenant comme référence le pentachlorophénol.

$$K_{et} = 4480 \text{ kg/mole}$$

Voir tableau

Il nous a été impossible de déterminer la masse de notre polymère car aucun solvant n'a semblé convenir même à des concentrations très fortes.

Produits	Masse théorique	$K_1$ kg/g	Masse trouvée
tBOC-Asp-OH   OPNB	368	12,4	361
tBOC-Asp-OH   OBzl	323	13,5	331
tBOC-Asp-OPcp   OBzl	572	7,9	563
tBOC-Asp-Asp-OPcp     OPNB OBzl	822	5,5	814

- Détermination de la masse moléculaire du polymère.

N'ayant pu obtenir la masse moléculaire du polymère par tonométrie ou par ultracentrifugation, nous avons essayé de la déterminer à partir des mesures de viscosité intrinsèque.

La viscosité intrinsèque est reliée à la masse moléculaire par la relation :

$$[\eta] = KM^\alpha$$

Nous nous sommes basé sur les résultats de J.B.ARAGAO (25) qui, travaillant sur des copolymères statistiques (aspartate de benzyle-aspartate de 4 nitrobenzyle), a déterminé une masse apparente de ses produits par diffusion de la lumière ainsi que leur viscosité intrinsèque en solution dans l'acide dichloracétique.

La loi  $\log [M] = f(\log [\eta])$  est linéaire.

Si nous reportons les valeurs de  $\log [\eta]$  correspondant aux différents échantillons de nos copolymères alternés, nous pouvons dire que les différentes masses obtenues varient de 6 à 7000; c'est à dire qu'elles correspondent à 26 à 32 motifs monomères par chaîne.

Si l'on tient compte des résultats de Miller et coll (68), qui ont observé le comportement hydrodynamique de stéréopolymères, de copolymères en bloc, de copolymères statistiques et de copolymères alternés, on peut conclure que : à masse égale, la viscosité diminue.

Notre polymère alterné posséderait donc une masse plus grande que celle mesurée.

En effet, F.HEITZ (4), travaillant sur des copolymères alternés D-L glutamate de benzyle, a montré que la masse déterminée par viscosimétrie était 4 fois plus faible que celle obtenue par diffusion de la lumière.

Il faut des copolymères alternés n'ayant subi aucune racémisation et travailler dans des solvants non hélicogènes.

Bien que les polymères étudiés ne soient pas constitués d'une succession de motifs L et D, nous pensons que, peut-être, les conclusions obtenues par Miller peuvent être appliquées à notre cas.

- chromatographie sur couche mince.

Etant donné les difficultés rencontrées pour déterminer les taux de racémisation lors d'une synthèse peptidique, nous nous sommes demandé si, comme l'avaient déjà dit plusieurs auteurs, une étude par chromatographie sur couche mince pouvait

.../...

être utilisée dans ce cas.

En effet, d'après ces auteurs (69), il est possible de séparer les isomères optiques par cette méthode.

Les chromatographies ont été réalisées sur des plaques DC Plastikfolien Kieselgel F 254 Merck.

Les taches ont été révélées par la ninhydrine après avoir fait séjourner les plaques dans l'acide chlorhydrique gazeux un quart d'heure.

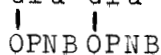
Solvant n°1 : 500ml butanol 2  
808ml Acide formique  
760ml d'eau

Solvant n°2 : 1520 ml chloroforme  
80 ml méthanol  
48 ml acide acétique

Voir tableau II : Résultats de la chromatographie.

Des résultats groupés dans ce tableau on constate que, dans tous les cas et quel que soit le solvant, on observe une tache et une seule.

Pour tester la sensibilité de cette technique nous avons étudié les dimères  $t\text{BOC-Glu-Glu-OCH}_3$  sous forme D-D; D-L; L-D; L-L.



L-D; L-L.

On constate que, dans tous les cas, il est impossible de séparer les mélanges d'isomères optiques.

Nous n'avons donc pu déterminer un taux de racémisation par cette méthode.

Par contre une étude par hydrolyse complète des produits par HCl puis mesure du  $[\alpha]_{589}$  permet de ne détecter aucune racémisation (81).

Produits	$[\alpha]_{589}$	Solvant
Polymère hydrolysé	0	ADC
H-Asp-OH hydrolysé   OBzl	+0,781	ADC
H-Asp-OH hydrolysé   OPNB	-0,768	ADC

Tableau II: Résultats de la chromatographie.

Produits	Rf Solvant N°1	Rf Solvant N°2
tBOC-Asp-OH   OBzl	0,945	0,93
tBOC-Asp-OPcp   OBzl	0,84	0,92
HCl, H-Asp-OPcp   OBzl	0,94	0,89
tBOC-Asp-OH, DCHA   OBzl	0,905	0,935
H-Asp-OH   OPNB	0,725	0,925
tBOC-Asp-OH   OPNB	0,95	0,94
tBOC-Asp-OH, DCHA   OPNB	0,925	0,88
tBOC-Asp-Asp-OPcp     OPNB OBzl	0,95	0,93
HCl, H-Asp-Asp-OPcp     OPNB OBzl	0,93	0,9
tBOC-Asp-Asp-Asp-OPcp       OBzl OPNB OBzl	0,89	0,925
HCl, H-Asp-Asp-Asp-OPcp       OBzl OPNB OBzl	0,9	0,925



CHAPITRE III

---

ETUDES PHYSICO-CHIMIQUES

## A. DISPERSION OPTIQUE ROTATOIRE (DOR) ET DICHROISME CIRCULAIRE (DC)

### I) Rappels concernant les chromophores optiquement actifs.

On peut ranger les chromophores optiquement actifs dans deux groupes :

- les chromophores intrinsèquement dissymétriques dont l'exemple le plus connu est l'hexahélicène.
- les chromophores intrinsèquement symétriques.

A cette catégorie appartiennent :

- le groupement peptidique  $\begin{array}{c} \text{-C-N-} \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$  qui appartient à la chaîne principale des polypeptides et des protéines.
- le groupement 4 nitrobenzyle qui fait partie des chaînes latérales.

Les chromophores intrinsèquement symétriques ne deviendront optiquement actifs que s'ils sont perturbés de façon dissymétrique.

L'activité optique du chromophore  $\begin{array}{c} \text{-C-N-} \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$  est directement reliée à la structure secondaire du polypeptide. Les effets Cotton correspondants sont appelés "intrinsèques".

Le groupement nitrobenzyle, placé dans un environnement asymétrique devient optiquement actif et présente trois bandes dichroïques correspondant aux bandes d'absorption ultraviolette. Ce sont les effets Cotton "extrinsèques". Les effets dichroïques dus au chromophore nitrobenzyle sont bien différenciés de ceux dus au chromophore peptidique.

Le chromophore  $\begin{array}{c} \text{-C-N-} \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$  présente des effets Cotton dans la région 200-240nm

- 190nm : transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée perpendiculairement.

.../...

- 207nm : transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée parallèlement.
- 222nm : transition  $n \rightarrow \pi^*$ .

Les trois bandes du chromophore nitrobenzyle sont centrées aux environs de :

- 340 nm : transition  $\pi \rightarrow \pi^*$
- 300 nm : transition  $n \rightarrow \pi^*$
- 260 nm : bande de transfert de charge.

## II) Généralités.

Une onde électromagnétique dans le vide est formée par un vecteur champ électrique  $\vec{E}$  et un vecteur excitation magnétique  $\vec{H}$  vibrant à angle droit.

Si on polarise linéairement l'onde électromagnétique,  $\vec{E}$  se décompose en deux vecteurs  $\vec{E}_G$  et  $\vec{E}_D$  tournant autour de la direction de propagation avec des vitesses égales et de sens contraire.

Lorsque l'onde rencontre un milieu optiquement actif, les vitesses de rotation de  $\vec{E}_G$  et  $\vec{E}_D$  deviennent différentes. Le vecteur champ électrique est toujours linéairement polarisé mais a tourné d'un angle  $\varphi$ .

Un milieu optiquement actif est caractérisé par une différence d'indice de réfraction entre la lumière circulairement polarisée droite et la lumière circulairement polarisée gauche.

On a la relation :

$$\varphi = \frac{\pi}{\lambda} (n_G - n_D) l \quad \text{relation de Fresnel}$$

$\lambda$  : longueur d'onde

$(n_G - n_D)$  : différence d'indice de réfraction.

$l$  : épaisseur du milieu traversé.

Les unités employées sont imposées par la tradition.

### 1) Rotation spécifique ( $\gamma$ )

$$[\alpha] = \frac{\varphi}{lc}$$

$\varphi$  : angle de rotation mesuré en degrés.

$l$  : épaisseur de la cellule en dm.

$c$  : concentration en  $\text{g.ml}^{-1}$ .

.../...



## 2) Rotation molaire.

Dans le cas des macromolécules, on utilise la rotation par unité monomère :

$$[\eta] = \frac{\varphi}{1 \mathcal{C}}$$

$$\mathcal{C} = \frac{100 \text{ C}}{M_0}$$

$M_0$  : masse moléculaire du résidu porté par la chaîne.

$\mathcal{C}$  : Concentration en moles pour 100 ml

$$[\eta] = \frac{[\alpha] M_0}{100}$$

III) Dispersion optique rotatoire.

C'est l'étude de l'activité optique en fonction de la longueur d'onde.

On distingue deux types de courbes :

- lorsqu'il n'y a pas de groupement chromophore optiquement actif dans le domaine spectral étudié, on obtient une courbe normale ou monotone.
- dans le cas contraire, la courbe présente deux extréma. Il y a dans ce cas "Effet Cotton".

IV) Dichroïsme circulaire.

Lorsqu'une onde électromagnétique linéairement polarisée traverse un milieu possédant un ou plusieurs chromophores optiquement actifs, en plus de la différence d'indice de réfraction, on observe une différence d'absorption entre la lumière circulairement polarisée droite et la lumière circulairement polarisée gauche.

Dans le cas de la dispersion optique rotatoire, la lumière linéairement polarisée est devenue circulairement polarisée sauf s'il y a effet Cotton.

.../...

En dichroïsme circulaire, la lumière devient elliptiquement polarisée et le vecteur champ électrique décrit une ellipse par son extrémité.

L'ellipticité n'est mesurable qu'au niveau d'une bande d'absorption du chromophore étudié.

Comme pour la dispersion optique rotatoire, nous allons définir des grandeurs macroscopiques liées au phénomène de dichroïsme circulaire.

1) Ellipticité spécifique

$$[\psi] = \frac{\psi}{lc}$$

$\psi$  : exprimé en degrés.

$l$  : trajet optique en dm.

$C$  : concentration en  $\text{g.ml}^{-1}$ .

2) Ellipticité molaire.

$$[\theta] = 3300 \Delta\epsilon$$

$\Delta\epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$  : absorption différentielle dichroïque

$$[\theta] \text{ en deg décimole}^{-1} \text{ cm}^2$$

V) Application de la dispersion optique rotatoire et du dichroïsme circulaire à l'étude des polypeptides.

1) Dispersion optique rotatoire des polypeptides.

\* Equation de Moffitt-Yang (71)

Moffitt et Yang expriment la rotation molaire en fonction de trois paramètres  $a_o$ ,  $b_o$ ,  $\lambda_o$ .

$$[m] = \frac{a_o \lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + \frac{b_o \lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2}$$

$b_o$  dépend uniquement de la structure secondaire,  $a_o$  dépend des interactions entre le solvant et le polymère.

Si on trace  $[m] (\lambda^2 - \lambda_o^2)$  en fonction de  $\frac{1}{\lambda^2 - \lambda_o^2}$ , on obtient

une droite dont l'ordonnée à l'origine est  $a_o \lambda_o^2$  et dont la pente est  $b_o \lambda_o^4$ . Le paramètre  $\lambda_o$  est ajusté pour que

.../...

$$[m](\lambda^2 - \lambda_0^2) = f \left( \frac{1}{\lambda - \lambda_0} \right) \text{ soit une droite.}$$

Il a été déterminé expérimentalement par Moffitt et Yang

$$\lambda_0 = 212 \text{ nm (71)}$$

$$b_0 = -630 \Rightarrow \text{hélice } \alpha \text{ droite}$$

$$b_0 = +630 \Rightarrow \text{hélice } \alpha \text{ gauche}$$

$$b_0 = 0 \Rightarrow \text{pelote statistique ou mélange des deux hélices } \alpha \text{ en quantités égales.}$$

Pour établir leur équation, Moffitt et Yang supposent que seul le chromophore peptidique est optiquement actif et que lui seul contribue à la courbe de DOR. Il n'en est plus de même quand un autre chromophore est présent sur le polymère. Que ce chromophore se trouve dans la région étudiée ou assez loin de cette zone, il perturbe la courbe et l'équation de Moffitt-Yang n'est plus applicable.

Equation de Drude à 2 termes.

Drude rend compte de l'allure des courbes de DOR par l'équation :

$$[m] = \sum_i \frac{A_i}{\lambda^2 - \lambda_i^2}$$

$A_i$  est une constante.

$\lambda_i$  est la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption le plus proche.

Shedder et Blout ont représenté la courbe de DOR d'une hélice  $\alpha$  par une équation de Drude à 2 termes .

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

Le terme  $\frac{A_{193} \lambda_{193}^2}{\lambda^2 - \lambda_{193}^2}$  rend compte de l'effet Cotton correspondant à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée perpendiculairement.

Le terme  $\frac{A_{225} \lambda_{225}^2}{\lambda^2 - \lambda_{225}^2}$  représente la contribution de toutes

.../...

les transitions électroniques autres que la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée perpendiculairement.

On détermine graphiquement  $A_{193}$  et  $A_{225}$  en traçant

$$[m] \left( \frac{\lambda^2 - \lambda_{193}^2}{\lambda_{193}^2} \right) \text{ en fonction de } \frac{\lambda_{225}^2 (\lambda^2 - \lambda_{193}^2)}{\lambda_{193}^2 (\lambda^2 - \lambda_{225}^2)}$$

$A_{193}$  est l'ordonnée à l'origine et  $A_{225}$  est la pente de la droite.

En se basant sur de nombreuses expériences sur les polypeptides et les protéines, Shechter et Blout ont obtenu une droite d'équation:

$$A_{225} = -0,55 A_{193} - 280 \text{ pour des solutions organiques}$$

$$A_{225} = -0,55 A_{193} - 430 \text{ pour des solutions aqueuses}$$

Si un point de coordonnées  $(A_{193}, A_{225})$  décrivant un polypeptide ne se trouve pas sur la droite de Shechter et Blout, cela signifie que sa structure secondaire est autre chose qu'une hélice  $\alpha$  ou une chaîne désordonnée, ou un mélange des deux. La droite de Shechter et Blout n'est valable que dans le cas où on a affaire à une hélice  $\alpha$  droite ou une pelote statistique. Pour une hélice  $\alpha$  gauche, on ne peut plus tenir compte de cette droite (72). L'équation de Moffitt-Yang permet cette distinction grâce au signe de  $b_0$ .

## 2) Dichroïsme circulaire des polypeptides.

Les polypeptides ayant une structure  $\alpha$  hélicoïdale ont un spectre dichroïque caractéristique et bien connu.

- une bande centrée à 190nm correspondant à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée perpendiculairement.
- une bande centrée à 207nm correspondant à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée parallèlement.

.../...

- une bande centrée à 222nm correspondant à la transition  $n \rightarrow \pi^*$ .

L'intensité et le signe de la bande  $n \rightarrow \pi^*$  nous donnent le sens d'enroulement de l'hélice  $\alpha$  et le pourcentage d'hélicité (73).

$$[\theta]_{222} = -40.000 \text{ deg.decimole}^{-1} \cdot \text{cm}^2; \text{ hélice } \alpha \text{ droite.}$$

$$[\theta]_{222} = +40.000 \text{ deg.decimole}^{-1} \cdot \text{cm}^2; \text{ hélice } \alpha \text{ gauche.}$$

Il faut préciser que pour la pelote statistique, aucun spectre dichroïque type n'a encore été donné. Longtemps l'acide polyglutamique en solution basique avait été pris comme modèle de pelote statistique mais Tiffany et Krimm ont contesté cette référence et proposent comme modèle la poly L proline dans  $\text{CaCl}_2$  6M ou celui de l'acide polyglutamique dans  $\text{LiClO}_4$  4,5M après chauffage à 50°C (74).

On observe sur ces spectres une seule bande négative centrée à 207 nm et d'intensité moyenne.

#### VI) Résultats.

##### 1) D.O.R.

Les mesures ont été faites sur un spectropolarimètre Perkin-Elmer 141. Nous disposons de cellules de 5cm et 1cm. Les mesures ont été réalisées dans les solvants suivants :

ATF, DMF, TMP,  $\text{CHCl}_3$ .

##### a) ATF.

L'ATF est un solvant hélicoclaste, et effectivement les résultats obtenus sont en accord avec l'existence d'une pelote statistique.

La valeur de  $b_0$  est très peu différente de 0.

Les valeurs des coefficients de l'équation de Drude à 2 termes  $A_{193}$  et  $A_{225}$  sont :

$$A_{193} = -70 \rightarrow \% \text{ d'hélicité} = 14,7.$$

$$A_{225} = -280 \rightarrow \% \text{ d'hélicité} = 14,7.$$

Le point correspondant à ces coordonnées se trouve très près de la droite de Shechter et Blout dans le domaine des teneurs en hélice pratiquement nulles (Fig 2).

.../...

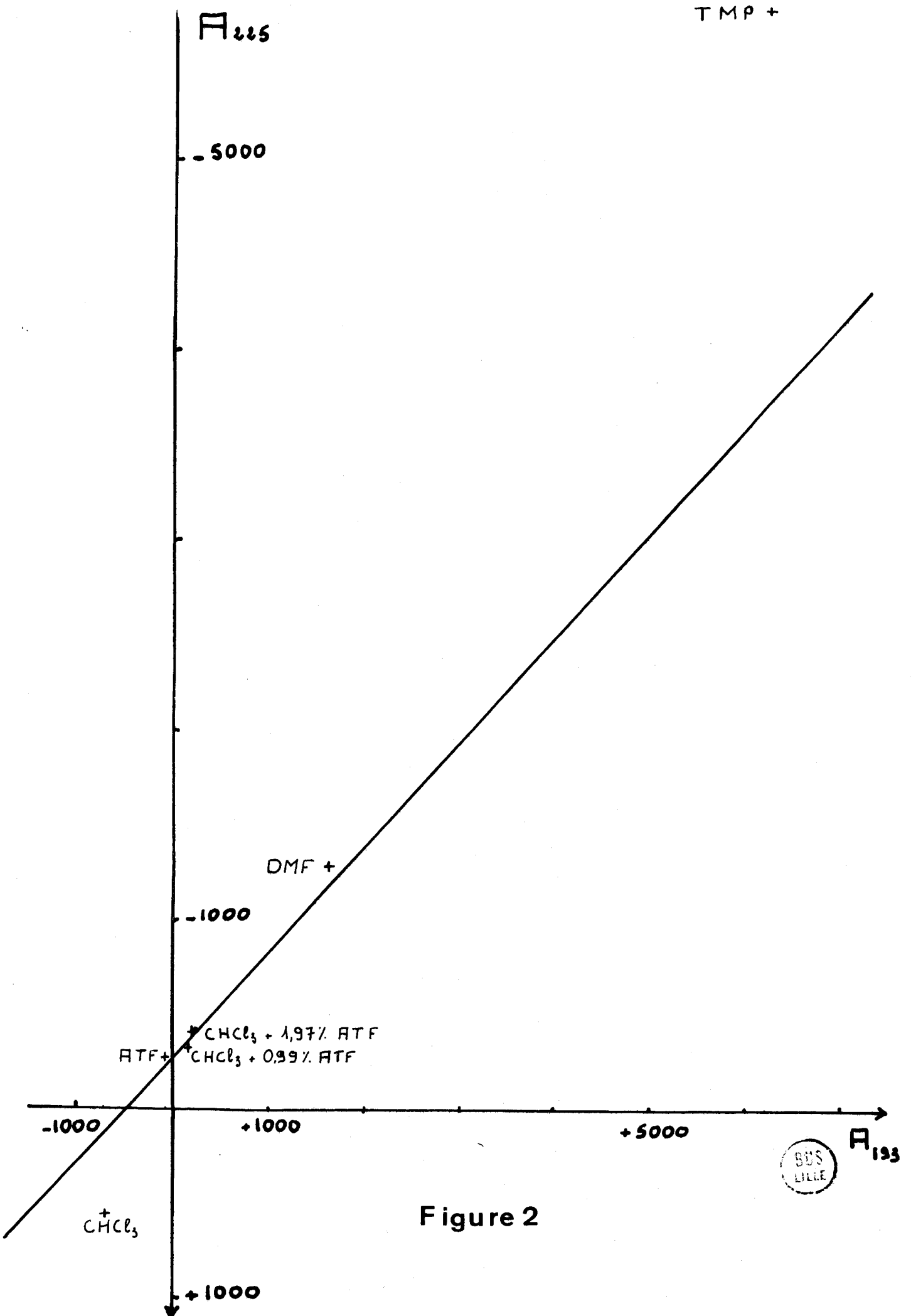


Figure 2

## b) DMF.

Dans ce solvant, l'homopoly  $\beta$  L Aspartate de benzyle adopte une conformation en pelote statistique (11) alors que l'homopoly  $\beta$  L Aspartate de 4 nitrobenzyle adopte une conformation en hélice  $\alpha$  droite (3).

Le copolymère statistique 50-50 est presque totalement sous forme hélice  $\alpha$  droite (3).

La courbe  $[\eta] = f(\lambda)$  ne présente pas d'effet Cotton observable (Fig 3). Nous utilisons donc la représentation de Moffitt-Yang. On trouve  $b_0 = -100$ ; c'est à dire qu'il n'y aurait pratiquement pas de structure hélicoïdale dans ce solvant.

Les valeurs de  $A_{193}$  et  $A_{225}$  sont :

$$A_{193} = + 1600$$

$$A_{225} = -1300$$

Le point correspondant se trouve également sur la droite de Shechter et Blout (Fig 2).

D'après ce résultat, le copolymère adopterait essentiellement dans ces conditions une conformation en pelote statistique.

## c) TMP.

Dans ce solvant, l'homopoly  $\beta$  L Aspartate de benzyle est légèrement sous forme hélice  $\alpha$  gauche (20%) et l'homopoly  $\beta$  L Aspartate de 4 nitrobenzyle a une teneur en hélice  $\alpha$  droite d'environ 25% (25).

La courbe  $[\eta] = f(\lambda)$  ne présente pas d'effet Cotton observable dans la région étudiée (350-600nm) (Fig 3).

La valeur de  $b_0$  obtenue est de -1415.

En valeur absolue ce  $b_0$  est beaucoup plus grand que celui correspondant à 100% d'hélice  $\alpha$  (630), bien que la représentation de Moffitt-Yang soit linéaire. Cette grande valeur de  $b_0$  dans le cas d'homopolyaspartates de 4 nitro benzyle avait déjà été observée par Goodman (3) sans qu'aucune explication satisfaisante n'en soit donnée.

De plus Le Barny (75) a mis en évidence, à partir de poly glutamates de 4 nitro benzyle en solution dans le dichlor-

.../...

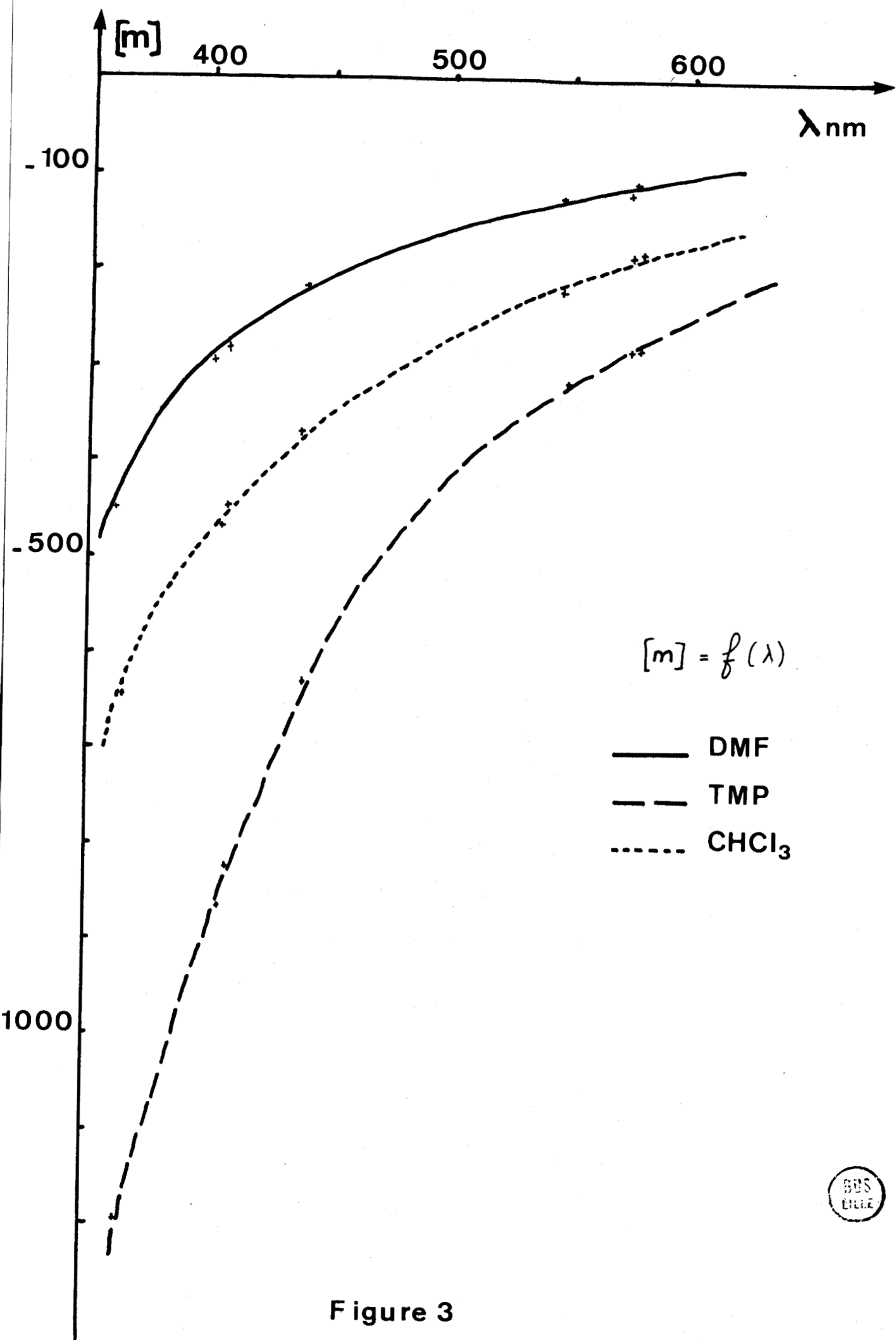


Figure 3



éthane et l'hexafluoroisopropanol étudiés par DOR et DC, un comportement identique. La valeur de  $b_0$  est de l'ordre de -900 bien que le spectre dichroïque soit caractéristique d'une hélice  $\alpha$  droite.

Il avait attribué cela à l'existence d'un effet Cotton "caché" c'est à dire situé à une longueur d'onde inférieure à 200nm qui ne peut être observé expérimentalement. Dans le cas présent il serait situé aux environs de 150nm puisque l'on sait qu'une bande d'absorption UV due au groupement nitrobenzyle existe dans cette zone.

Cet effet Cotton "caché" ne perturbe pas la linéarité pour le calcul de  $b_0$  (75).

Nous avons également déterminé les valeurs de  $A_{193}$  et  $A_{225}$ .

$$A_{193} = +6200$$

$$A_{225} = -5800$$

La représentation de l'équation de Drude à 2 termes est linéaire mais il n'est pas surprenant de constater que le point ne se place pas sur la droite représentative de Shechter et Blout (Fig 2).

Il n'est pas possible de dire si cela est dû à l'existence de l'effet Cotton "caché", ou au fait que le polymère présente dans le TMP une structure autre que l'hélice  $\alpha$  droite ou la pelote statistique, les deux éventualités pouvant se combiner.

Dans ce cas les résultats de DOR ne peuvent donc nous renseigner sur la structure secondaire du polymère.

#### d) TMP + ATF

Afin d'essayer de mettre en évidence l'existence d'une structure organisée dans le TMP, nous avons cherché à observer si l'addition d'ATF donnait lieu à une transition. Cette étude est assez délicate car on observe une précipitation du polymère pour des concentrations situées entre 15 et 55% en ATF. Le polymère se redissout quand la teneur en ATF dépasse 55%.

Puisque  $b_0$  ou la représentation de Shechter et Blout ne sont pas utilisables dans ce cas, nous avons observé la variation de  $[\alpha]_{579}$  et  $[\alpha]_{436}$  en supposant qu'à ces longueurs

d'onde, les effets Cotton avaient une influence pratiquement nulle sur l'activité optique.

Ces courbes ont l'allure caractéristique d'une courbe de transition dont le point d'inflexion n'est pas observable puisque le polymère précipite (Fig 4).

On peut cependant dire que la structure qui existe dans le TMP paraît assez stable, en particulier elle semble rester inchangée jusqu'à 10% en ATF.

e)  $\text{CHCl}_3$

Dans le chloroforme, l'homopoly  $\beta$  L Aspartate de benzyle est sous forme d'hélice  $\alpha$  gauche alors que l'homopoly  $\beta$  L Aspartate de 4 nitrobenzyle est sous forme d'hélice  $\alpha$  droite ( 3).

Les copolymères statistiques sont bien connus dans ce cas. Le 50-50 est sous forme hélice  $\alpha$  droite alors que le 72% Aspartate de benzyle- 28% Aspartate de 4 nitrobenzyle est sous la forme : 50% hélice  $\alpha$  droite, 50% hélice  $\alpha$  gauche ( 1 ). Bien qu'il n'y ait pas d'effet Cotton observable par DOR (Fig 3 ) et que la représentation de Moffitt-Yang soit linéaire, la valeur de  $b_0$  ( $b_0 = +270$ ) n'a aucun sens dans ce cas car on sait à partir de l'étude des copolymères statistiques dans le chloroforme, qu'il existe une bande "cachée". (22).

De même les valeurs trouvées pour  $A_{193}$  ( $A_{193} = -720$ ) et  $A_{225}$  ( $A_{225} = +550$ ) ne peuvent être reliées à une détermination de structure secondaire, le point représentatif correspondant se trouvant en dehors de la droite de Shechter et Blout (Fig 2 ).

On ne peut donc attribuer de signification à cela.

f)  $\text{CHCl}_3 + \text{ATF}$

Comme dans le cas du mélange TMP-ATF nous avons essayé de voir s'il existait une transition en suivant la variation de  $[\alpha]_{579}$  et  $[\alpha]_{436}$  en fonction de ATF ajouté.

On observe une augmentation très rapide de  $[\alpha]$  et un palier

.../...

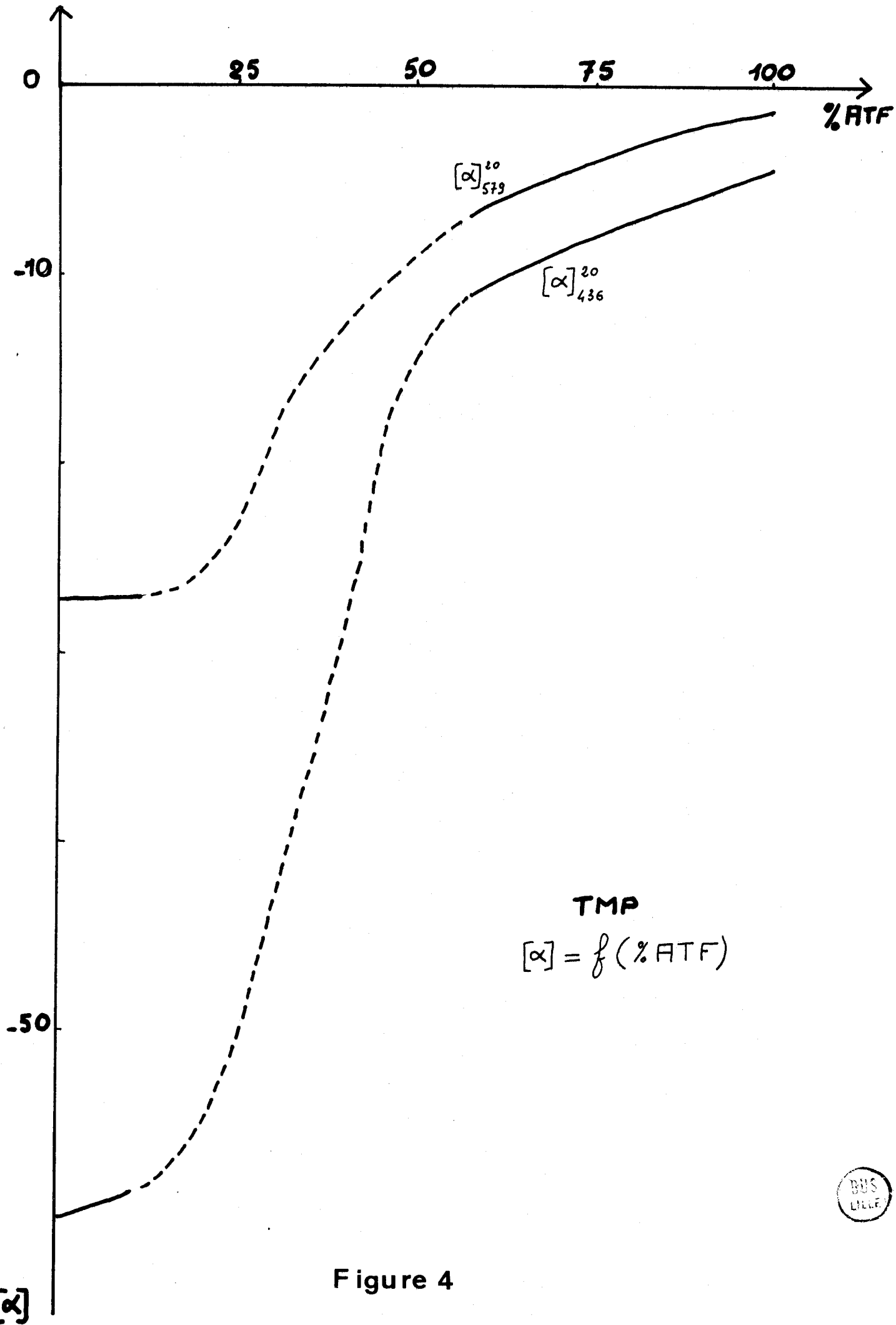


Figure 4



aux environs de 7% en ATF (Fig 5 ).

Si on utilise l'équation de Drude à 2 termes, dès l'instant où on ajoute de l'ATF, les valeurs de  $A_{193}$  et  $A_{225}$  sont les coordonnées d'un point qui se trouve sur la droite de Shechter et Blout (Fig 2 ).

Ces résultats semblent montrer que, dans le chloroforme pur, une structure organisée existe mais qu'une très petite quantité d'ATF la détruit en faveur de la formation d'une pelote statistique.

En effet les points représentatifs de l'équation de Drude à 2 termes se situent dans la zone où les teneurs en hélice sont faibles (Fig 2 ).

## 2) Dichroïsme circulaire

Les mesures ont été faites sur un dichrographe Roussel Jouan II. Nous disposons de toute une série de cuves 5; 2; 1; 0,5; 0,1; 0,01 cm qui nous permet de réaliser les spectres dans les meilleures conditions de densité optique (0,8 à 1,2).

Les mesures ont été effectuées dans les solvants suivants :

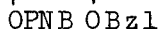
-ATF- TMP- HFIP-  $\text{CHCl}_3$ -

a) ATF.

Nous avons pu atteindre 223 nm avec une cellule de 0,01 cm. Nous ne considérerons donc que les effets Cotton extrinsèques.

Nous avons étudié successivement le dimère et le polymère.

- le dimère tBOC-Asp-Asp-OPcp présente 3 bandes dichroïques



de faible intensité et situées dans des domaines de longueurs d'onde correspondant aux bandes d'absorption ultra violette (Fig 6 ).

Puisqu'il n'y a qu'un seul groupement 4 nitro benzyle par molécule, les effets Cotton sont dus soit à une interaction entre le chromophore extrinsèque et le carbone asymétrique, soit à des interactions intermoléculaires entre les groupements latéraux.

.../...

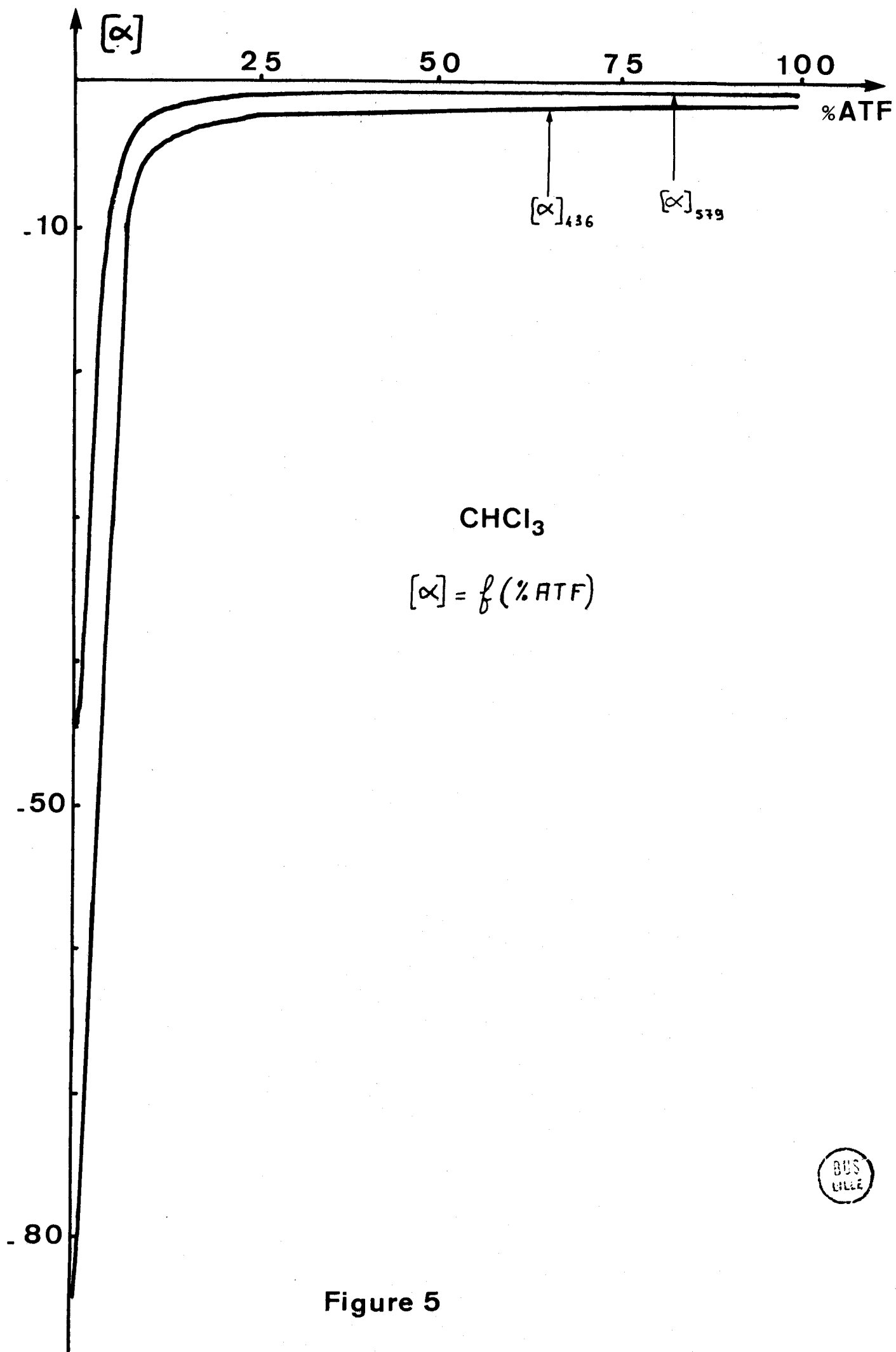


Figure 5



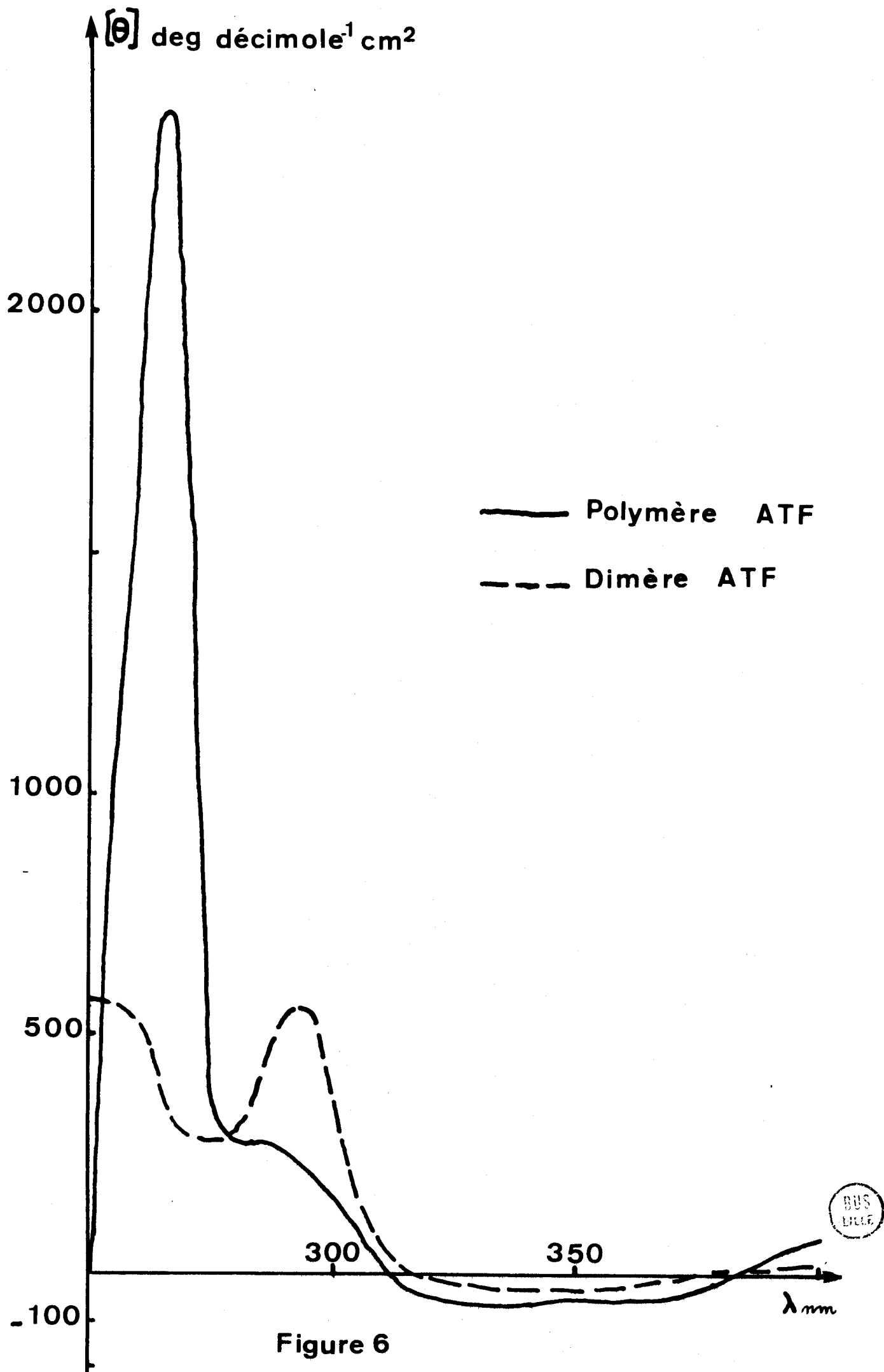


Figure 6

Comme la concentration est faible (0,01 mole/l), ces dernières sont sûrement peu importantes.

De plus l'interaction nitro benzyle-carbone asymétrique a déjà été observée sur les aspartates (22) et sur les glutamates (76).

- le polymère présente des bandes aux mêmes longueurs d'onde (Fig. 6.); elles sont de signe identique mais d'intensité différente comme le montrent les résultats rassemblés dans le tableau ci-dessous.

$\lambda$ nm	$[\theta]$ deg.decimole <sup>-1</sup> .cm <sup>2</sup> Polymère	$[\theta]$ deg.decimole <sup>-1</sup> .cm <sup>2</sup> Dimère
335	-70	-40
285-290	+280	+550
250-260	+2400	+550

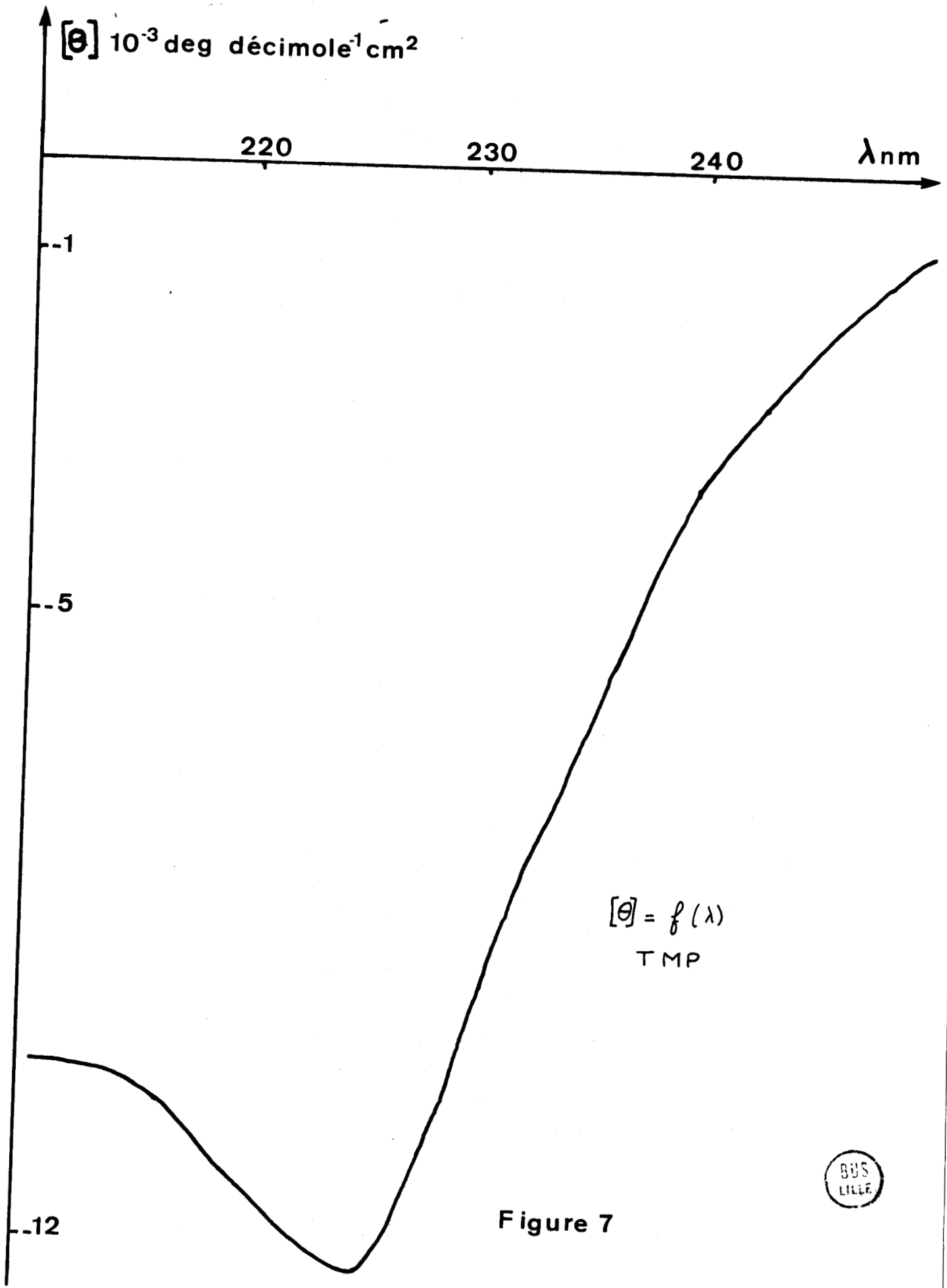
Ces résultats peuvent surprendre puisque le polymère dans l'ATF se trouve sous forme de pelote statistique. Il faut admettre que la chaîne macromoléculaire permet aux groupements nitro benzyle d'être suffisamment proches les uns des autres pour donner des interactions supplémentaires, donc des effets Cotton plus intenses. En effet la concentration locale en groupements nitrobenzyle augmente et favorise les interactions chaînes latérales-chaîne principale ainsi que chaînes latérales entr'elles.

b) TMP.

Le spectre a été tracé jusqu'à 211 nm. On observe un extrênum à 225 nm et  $[\theta] = -12.500$  deg.decimole<sup>-1</sup>.cm<sup>2</sup> (Fig 7).

Il est difficile de dire si le spectre est ou non caractéristique d'une hélice  $\alpha$  droite puisque l'on ne peut descendre en dessous de 211 nm, donc atteindre la bande  $\pi \rightarrow \pi^*$ . De plus, ce spectre ne correspond pas non plus à une structure  $\beta$  (77); en particulier la position des extrêma est différente.

Nous avons cherché à déterminer à quoi pouvait correspondre ce spectre et en premier lieu nous l'avons comparé à celui qui est obtenu à partir d'un mélange de structure hélicoïdale,



$[\theta] = f(\lambda)$   
TMP

Figure 7





de pelote statistique et de structure  $\beta$  suivant un procédé déjà utilisé par Greensfield et Fasman (77).

Puisque les  $[\theta]$  ont des propriétés additives, il est possible d'écrire, à une longueur d'onde donnée :

$$[\theta] = f_D \times [\theta]_D + f_\beta \times [\theta]_\beta + f_p \times [\theta]_p$$

$f_D$  : fraction en hélice  $\alpha$  droite

$f_\beta$  : fraction en structure  $\beta$

$f_p$  : fraction en pelote statistique.

$[\theta]_D$ ,  $[\theta]_\beta$  et  $[\theta]_p$  : valeur des ellipticités correspondant à 100% de chaque structure.

Nous admettons que  $f_D + f_\beta + f_p = 1$

Nous avons pris comme référence :

pour l'hélice  $\alpha$  droite :

- le spectre de la polylysine à pH=11,1 (77).

pour la structure  $\beta$  :

- le spectre de la polylysine chauffée à 52°C, 15mn. (77)

Quant à la pelote statistique, nous avons choisi, parmi les spectres existants, les trois spectres suivants :

- le spectre de la polylysine à pH = 5,7 (77).

- le spectre de notre polymère dans l'ATF.

- le spectre de la pelote donné par Quadrifoglio et Urry (78).

Les calculs vont jusque 223 nm dans un cas et 211nm dans les autres cas.

La meilleure superposition est obtenue pour un mélange 45% hélice  $\alpha$  droite et 55% pelote statistique (quelle que soit la pelote).

La comparaison peut également être faite avec un mélange 24% hélice  $\alpha$  droite, 36% structure  $\beta$  et 40% pelote statistique (Polylysine) (Fig 8).

Cette superposition est peut être fortuite et on ne peut affirmer si on a vraiment cette composition de mélanges.

- chromophore nitrobenzyle.

On observe 3 bandes (Fig 9).

- 340nm  $[\theta] = -120 \text{ deg decimole}^{-1} \text{ cm}^2$

- 305nm  $[\theta] = +150 \text{ deg decimole}^{-1} \text{ cm}^2$

.../...

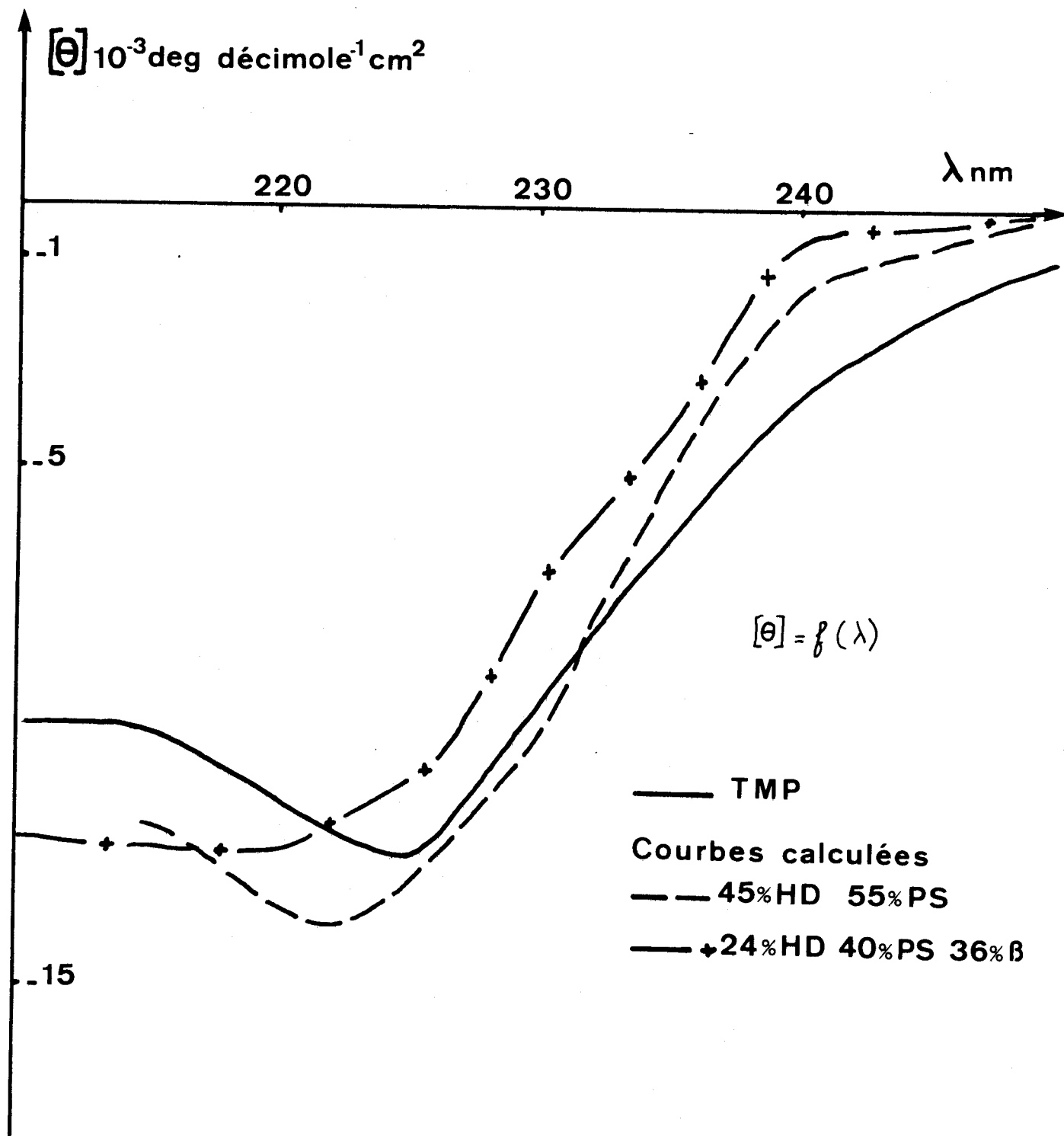


Figure 8



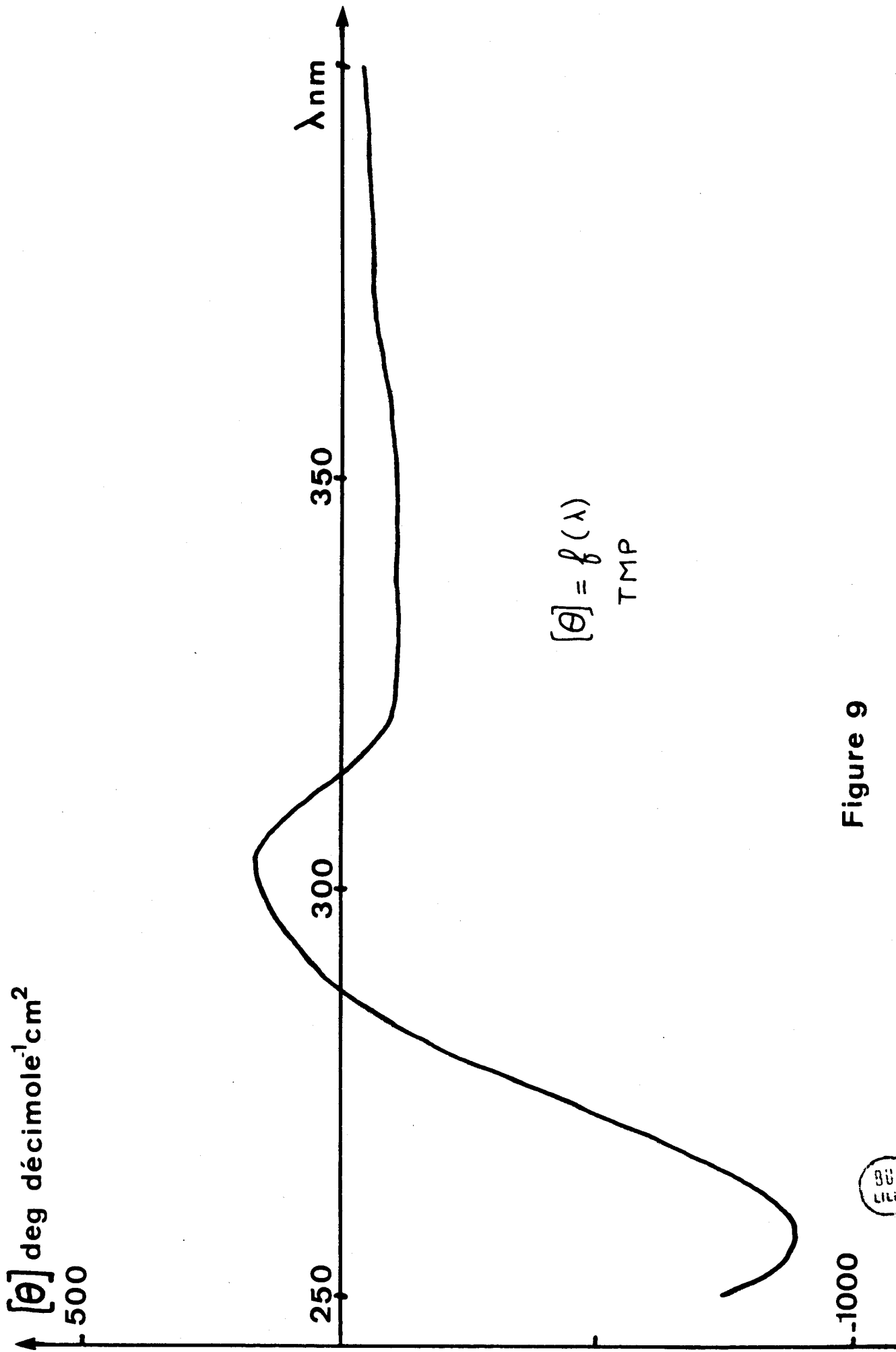


Figure 9



$$- 260\text{nm} \quad [\theta] = -900 \text{ deg décimole}^{-1} \text{ cm}^2$$

Elles sont situées aux longueurs d'onde correspondant aux trois bandes du spectre U.V.

Les deux situées aux longueurs d'onde les plus élevées sont du même signe que dans l'ATF et d'une intensité voisine. La bande correspondant à la bande de transfert de charge est de signe opposé dans l'ATF et le TMP mais d'intensité voisine.

#### c) HFIP

- chromophore peptidique

Le spectre a été tracé jusqu'à 205nm. On observe 2 minima (Fig 10)

$$- 223 \text{ nm} \quad [\theta] = -13.200 \text{ deg.decimole}^{-1} \text{ .cm}^2$$

$$- 217 \text{ nm} \quad [\theta] = -12.500 \text{ deg.decimole}^{-1} \text{ .cm}^2$$

De nouveau nous avons essayé de voir à quoi pouvait correspondre le spectre.

Dans HFIP les polyaspartates sont très peu hélicoïdaux. Il doit y avoir une teneur élevée en pelote statistique. Le spectre calculé à partir du mélange 40% pelote statistique (polylysine), 24% hélice  $\alpha$  droite et 36% de structure  $\beta$  se rapproche de notre spectre, mais la superposition n'est pas parfaite. (Fig 12).

- chromophore nitrobenzyle.

Nous n'observons que deux bandes (Fig 13).

$$- 350 \text{ nm} \quad [\theta] = -150 \text{ deg.decimole}^{-1} \text{ .cm}^2$$

$$- 300 \text{ nm} \quad [\theta] = -2050 \text{ deg.decimole}^{-1} \text{ .cm}^2$$

La bande à 300nm est particulièrement intense. L'HFIP est un alcool-acide et peut réagir avec les groupements nitrobenzyle pour favoriser les interactions entre les chaînes latérales. Une même constatation avait déjà été faite sur les polyglutamates de nitrobenzyle.

On observe dans ce cas 2 bandes pour les dérivés méta et ortho dont les intensités sont du même ordre de grandeur (76) que dans notre cas.

#### d) HFIP+ATF

Au fur et à mesure que l'on ajoute de l'ATF, l'allure générale du spectre reste la même, mais l'intensité augmente lentement et la longueur d'onde du maximum se déplace vers

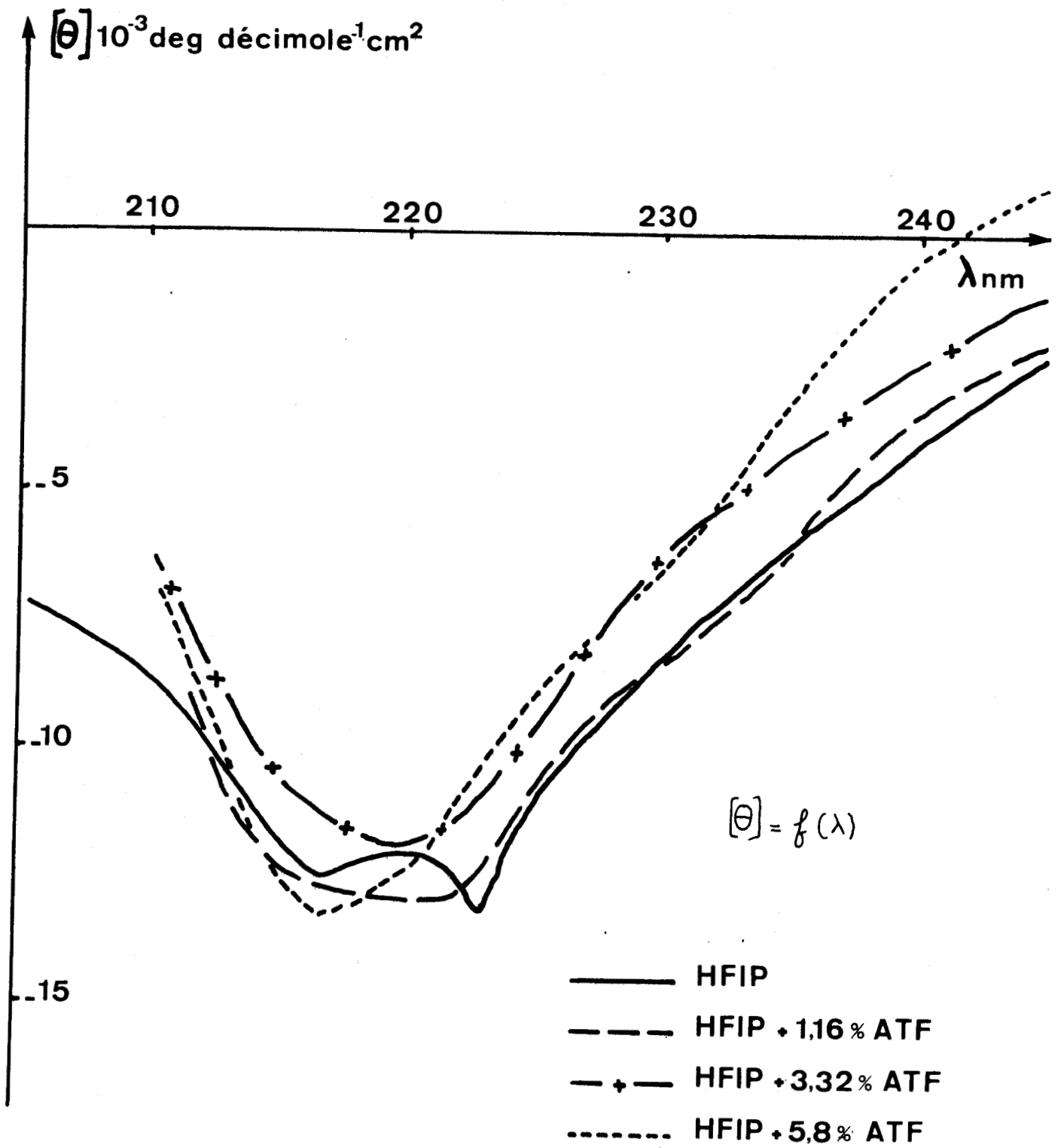


Figure 10



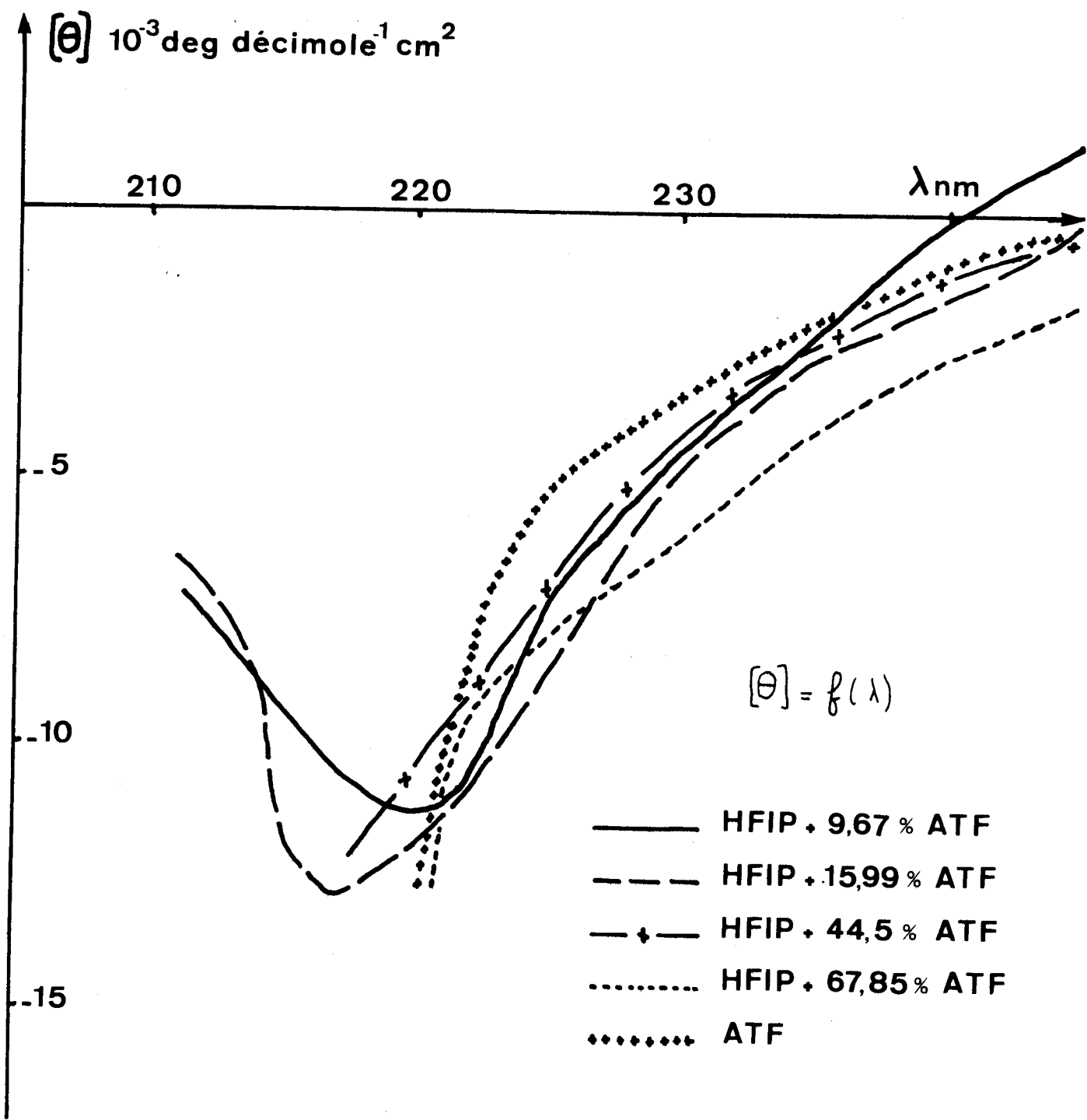


Figure 11



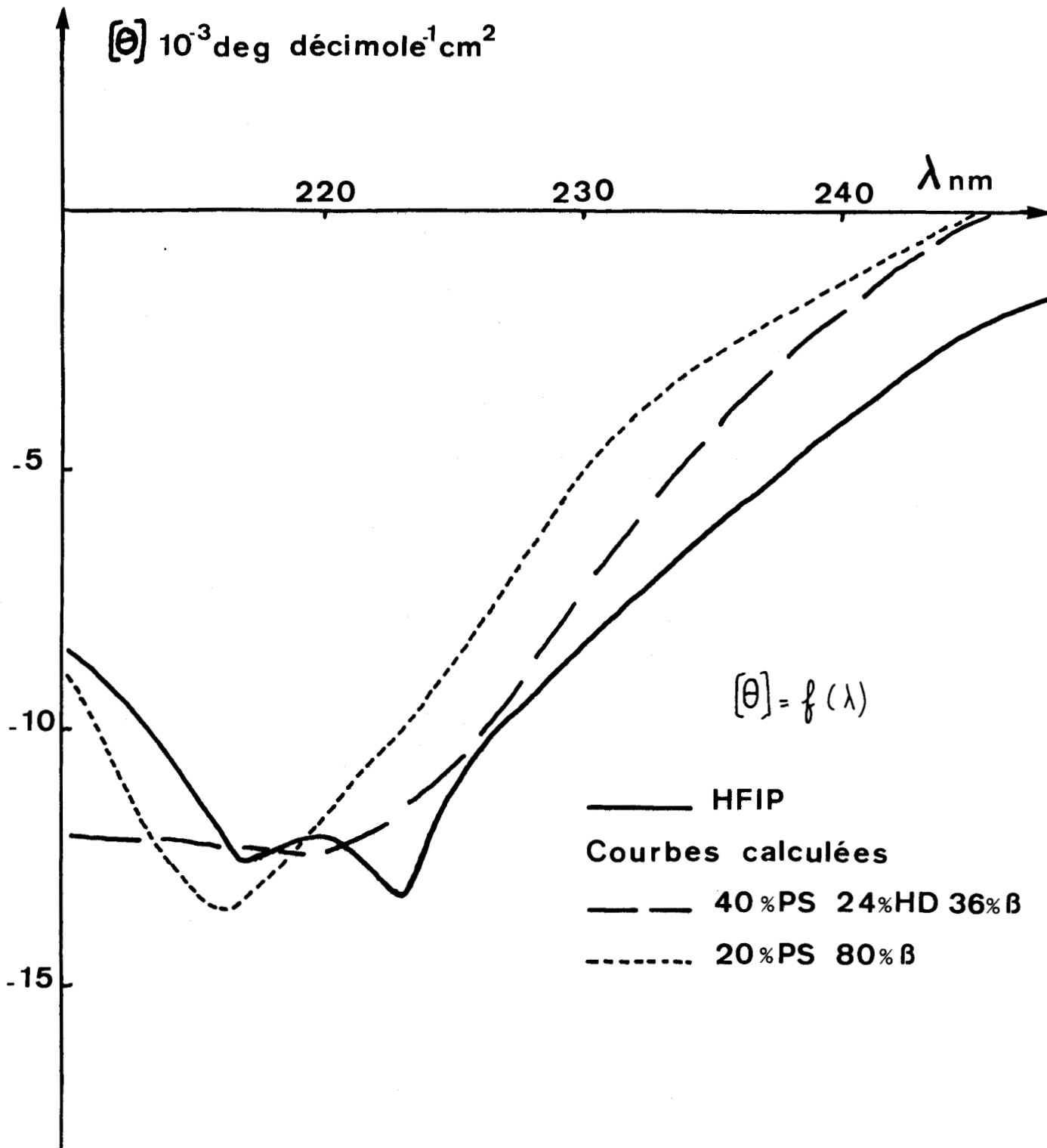


Figure 12



les basses longueurs d'onde (Fig. 10,11)

Vers 15% en ATF, le  $[\theta]_{\max}$  est situé à 218 nm et a une valeur de  $-13.000 \text{ deg. decimole}^{-1} \cdot \text{cm}^2$ .

Après 15% en ATF, le polymère semble totalement sous forme de pelote statistique.

Si on trace  $[\theta]_{223} = f(\% \text{ATF})$ , on constate que dès le début de l'addition de l'ATF, l'ellipticité diminue en valeur absolue, et la courbe présente une cassure aux environs de 10% (Fig 15).

- chromophore nitrobenzyle.

On n'observe pas toujours les trois bandes dichroïques comme le montre l'examen du tableau ci-dessous. (Fig 13,14).

$\lambda_{\text{nm}}$ \ / \ %ATF	0,97	3,09	5,46	8,79	15,99	44,5	67,85	100
310-350	-200	+50	+70					-100
280-300	-600		+900	+600	+250	+100	+200	+300
250-270	+550	+900	+1700	+1800	+3100	+2950	+2300	+2400

Valeurs des ellipticités  $[\theta]$  exprimées en  $\text{deg. decimole}^{-1} \cdot \text{cm}^2$  correspondant à chacune des bandes dichroïques extrinsèques (mélange HFIP-ATF).

e)  $\text{CHCl}_3$

- chromophore peptidique.

Le spectre a été tracé jusque 215nm. Le maximum de la courbe est situé à 225 nm et  $[\theta] = -8000 \text{ deg. decimole}^{-1} \cdot \text{cm}^2$  (Fig 16).

Nous avons reporté sur une même figure les spectres dichroïques correspondant à plusieurs structures : l'hélice  $\alpha$  (77), le spectre de la Gramicidine (82), la pelote (77) et la structure  $\beta$  (77). (Fig. 18).

Notre courbe expérimentale n'est caractéristique d'aucune de ces structures. Comme dans les cas précédents, on a cherché la courbe calculée qui pourrait représenter notre courbe expérimentale. La superposition n'est pas possible et ceci est en accord avec l'existence d'une structure nouvelle.

.../...



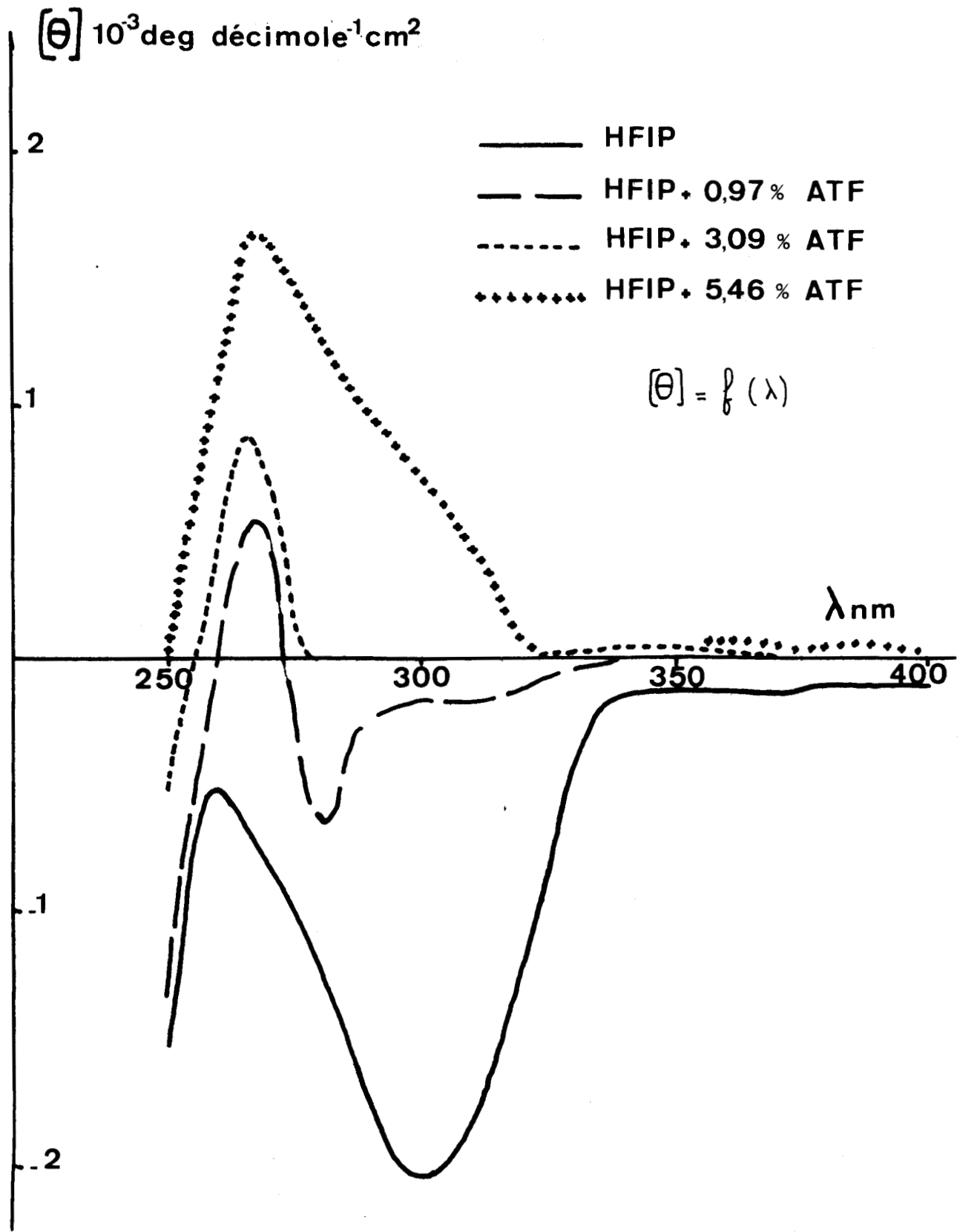


Figure 13



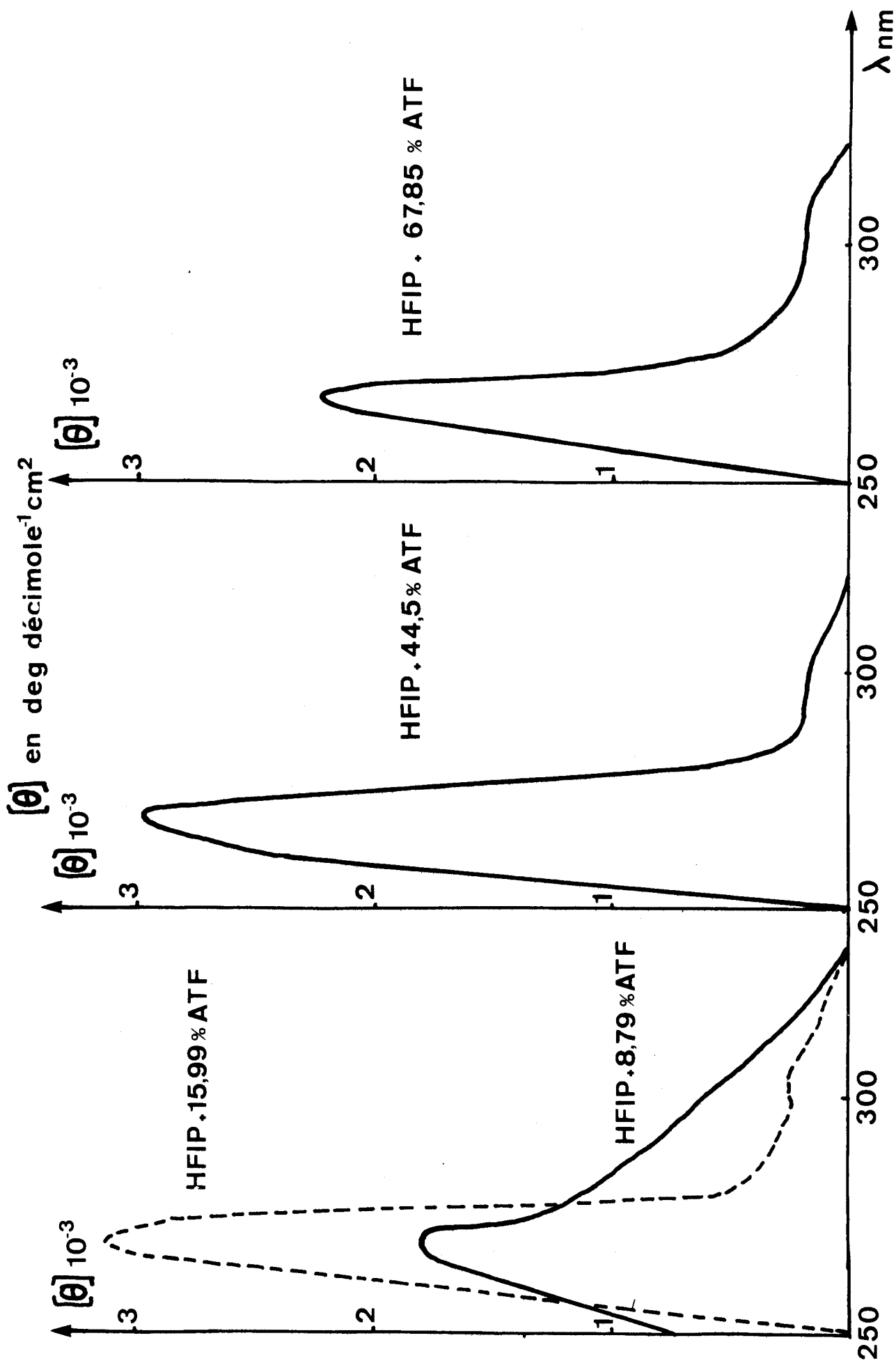
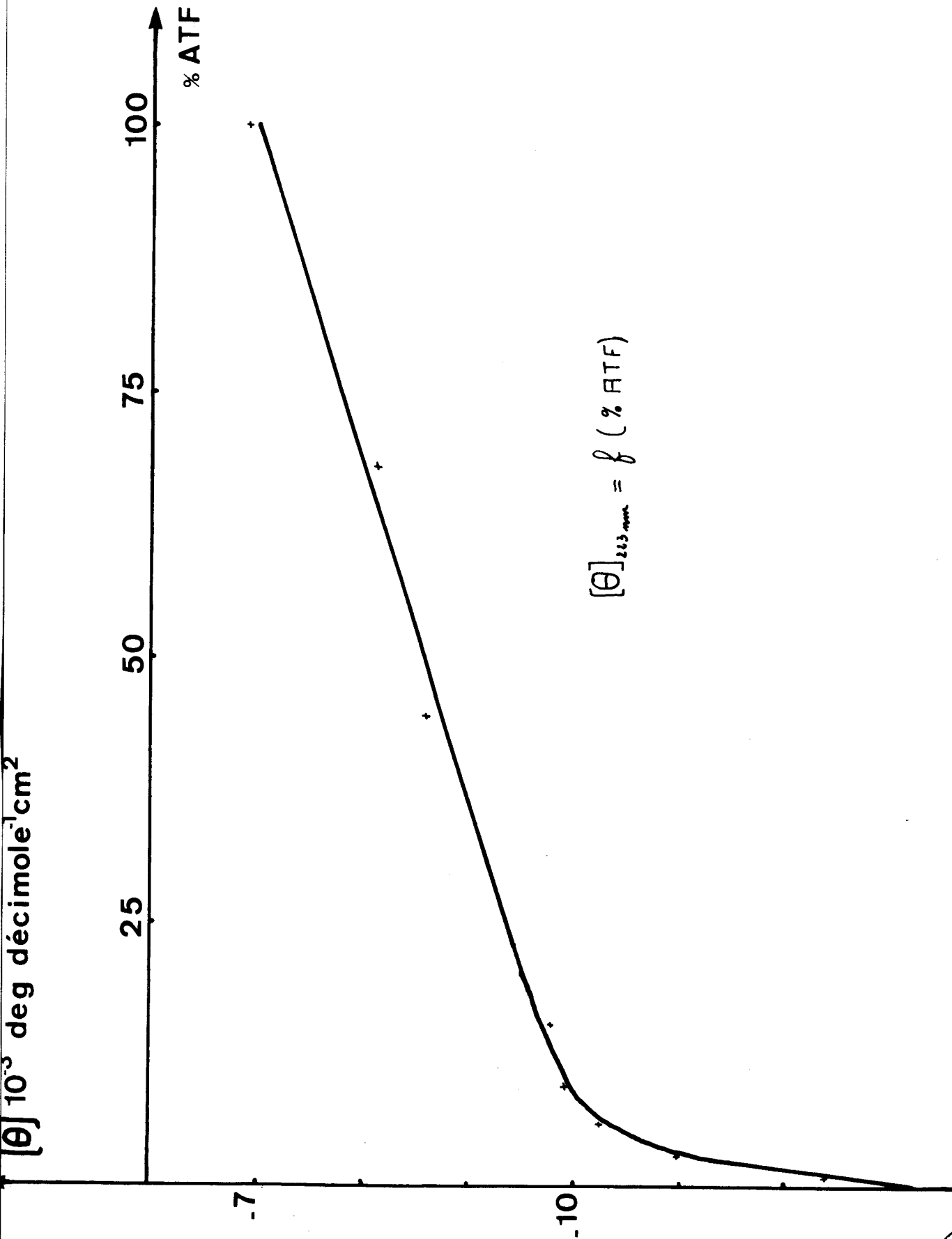


Figure 14



$$[\theta]_{223 \text{ nm}} = f(\% \text{ ATF})$$

Figure 15



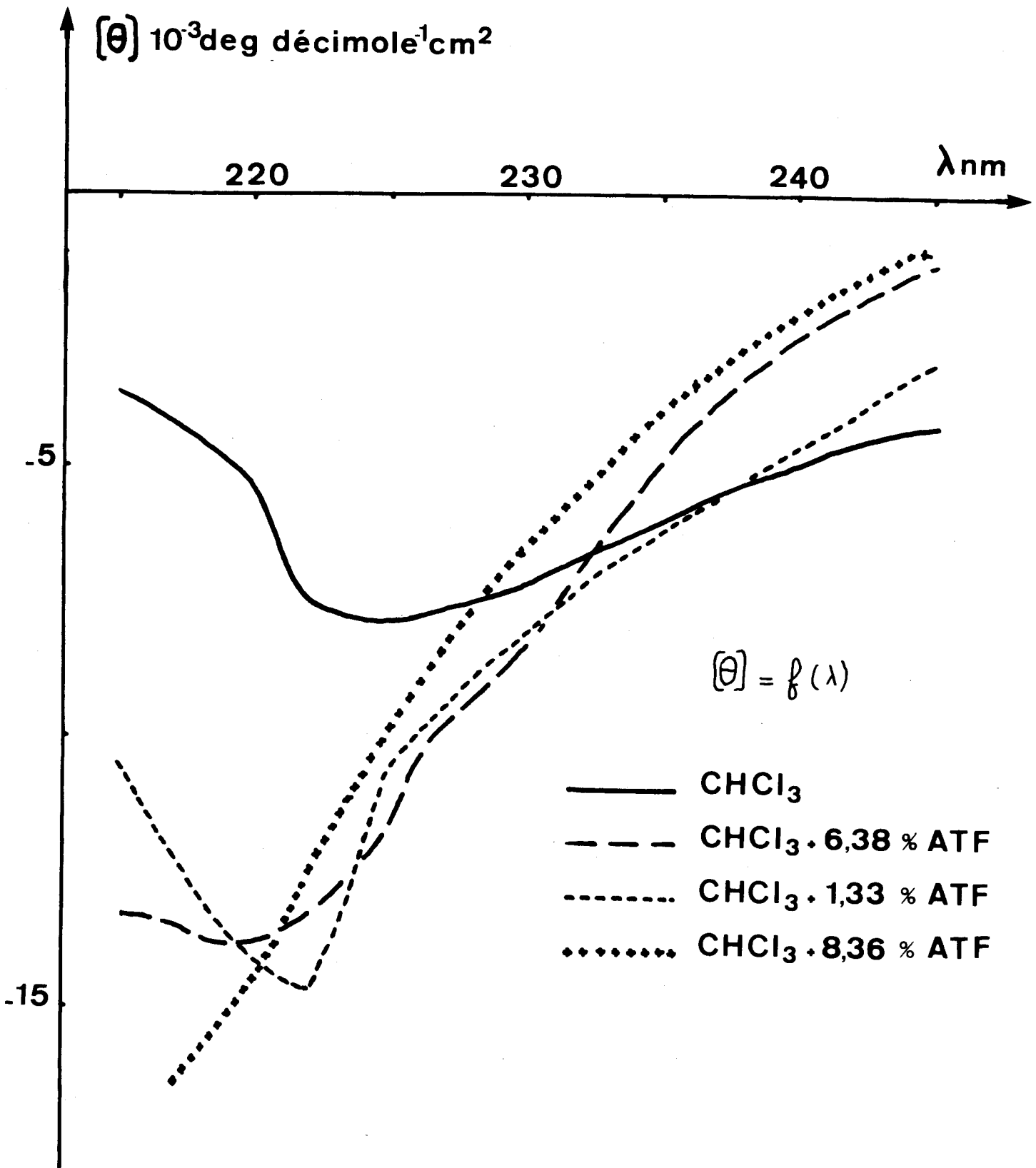


Figure 16



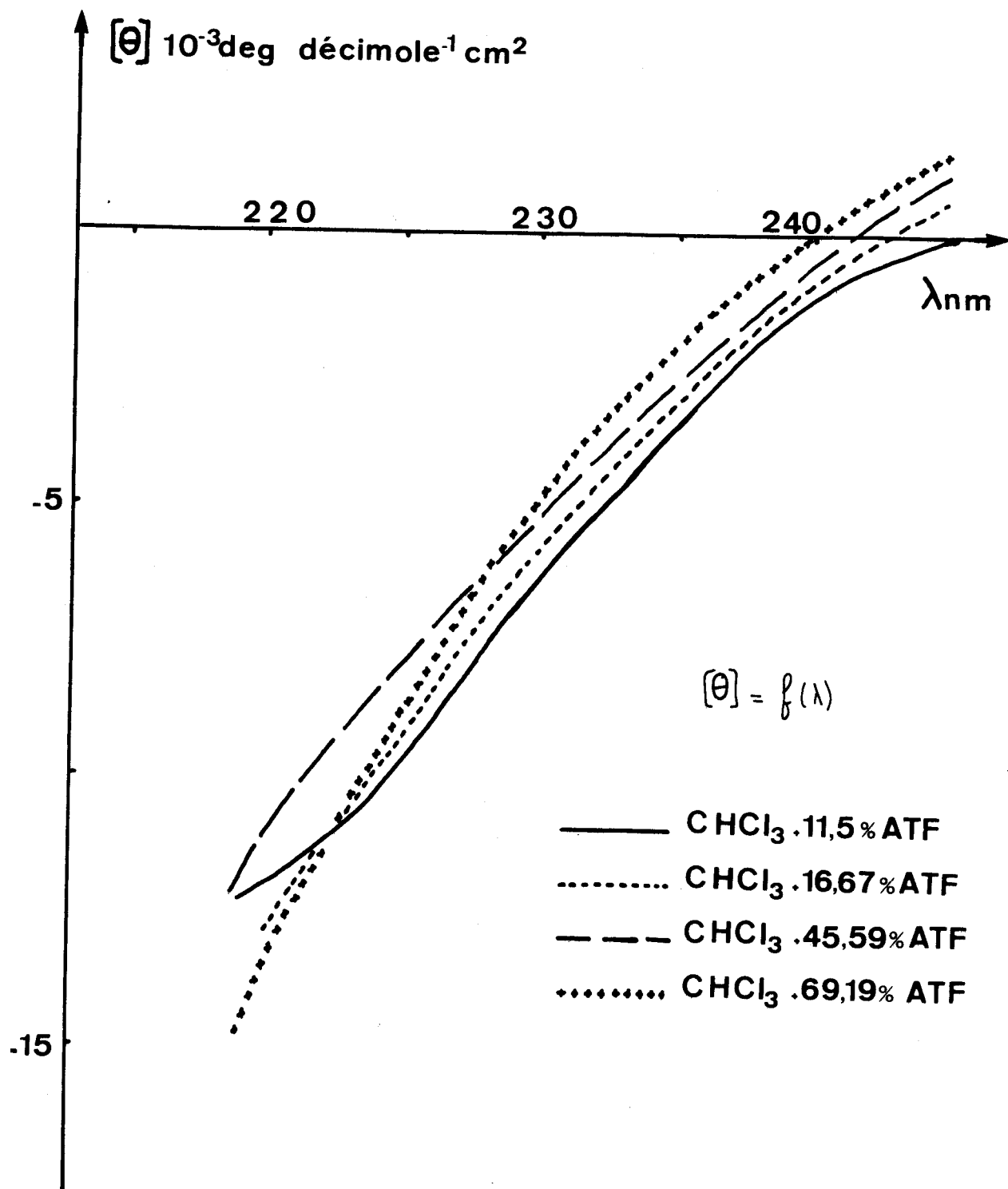


Figure 17

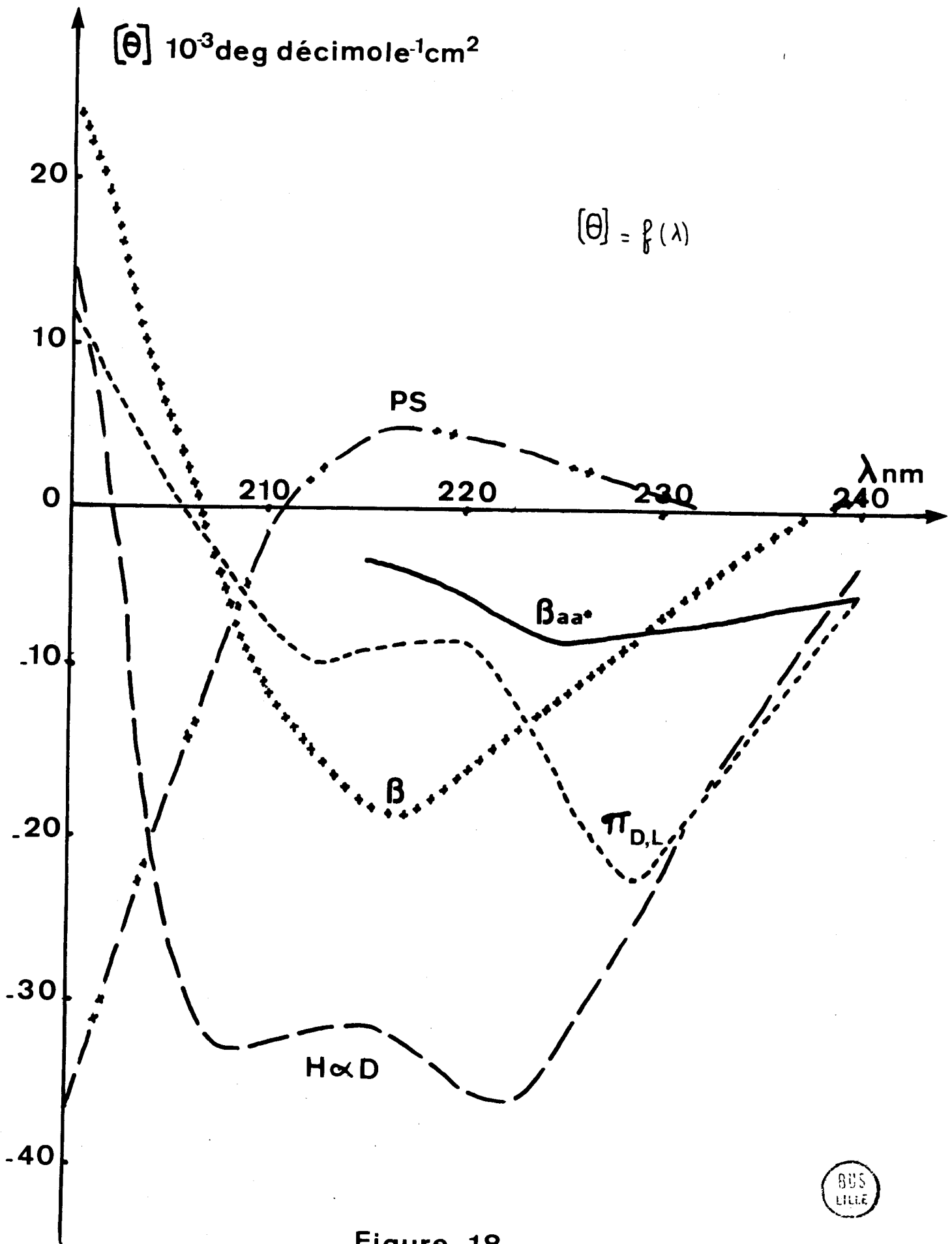


Figure 18

- chromophore nitrobenzyle.

Nous n'observons que deux bandes (Fig 19).

$$\begin{aligned} - 350\text{nm} \quad [\theta] &= -200 \text{ deg.decimole}^{-1}.\text{cm}^2 \\ - 295\text{nm} \quad [\theta] &= -2400 \text{ deg.decimole}^{-1}.\text{cm}^2 \end{aligned}$$

La bande de transfert de charge n'est pas observée, mais elle est peut être cachée dans la queue de la bande  $n \rightarrow \pi^*$  peptidique. La bande à 295nm est intense et elle est peut être reliée à l'existence d'une structure organisée qui oblige les chaînes latérales à rester dans une géométrie donnée.

f)  $\text{CHCl}_3 + \text{ATF}$

- chromophore peptidique.

Dès l'addition d'ATF la valeur du  $[\theta]_{\text{max}}$  augmente en valeur absolue et reste stable jusque 6% en ATF (Fig.16,17).

$$[\theta] = -14.000 \text{ deg.decimole}^{-1}.\text{cm}^2$$

La position du  $[\theta]_{\text{max}}$ , qui dans  $\text{CHCl}_3$  est situé à 225nm, se déplace vers les basses longueurs d'onde au fur et à mesure que l'on ajoute de l'ATF.

A partir de 6% en ATF, le polymère paraît adopter une structure en pelote statistique.

Si on trace  $[\theta]_{222\text{nm}} = f(\% \text{ATF})$ , on obtient une courbe présentant deux transitions (Fig.21).

- chromophore nitrobenzyle.(19,20)

Nous n'observons pas toujours les trois bandes et les valeurs des ellipticités correspondantes sont indiquées dans le tableau ci-dessous.

% ATF	0,97	3,41	5,47	8,65	16,67	45,59	69,19	100
320-350	-200	+200	+100	+100		+300	-200	-100
280-300	-1250	-625	-500	+200	+100		+125	+300
250-270				+800	+2100	+2750	+1950	+2400

Valeurs des ellipticités  $[\theta]$  exprimées en  $\text{deg.decimole}^{-1}.\text{cm}^2$  correspondant à chacune des bandes dichroïques extrinsèques (mélange  $\text{CHCl}_3$ -ATF).

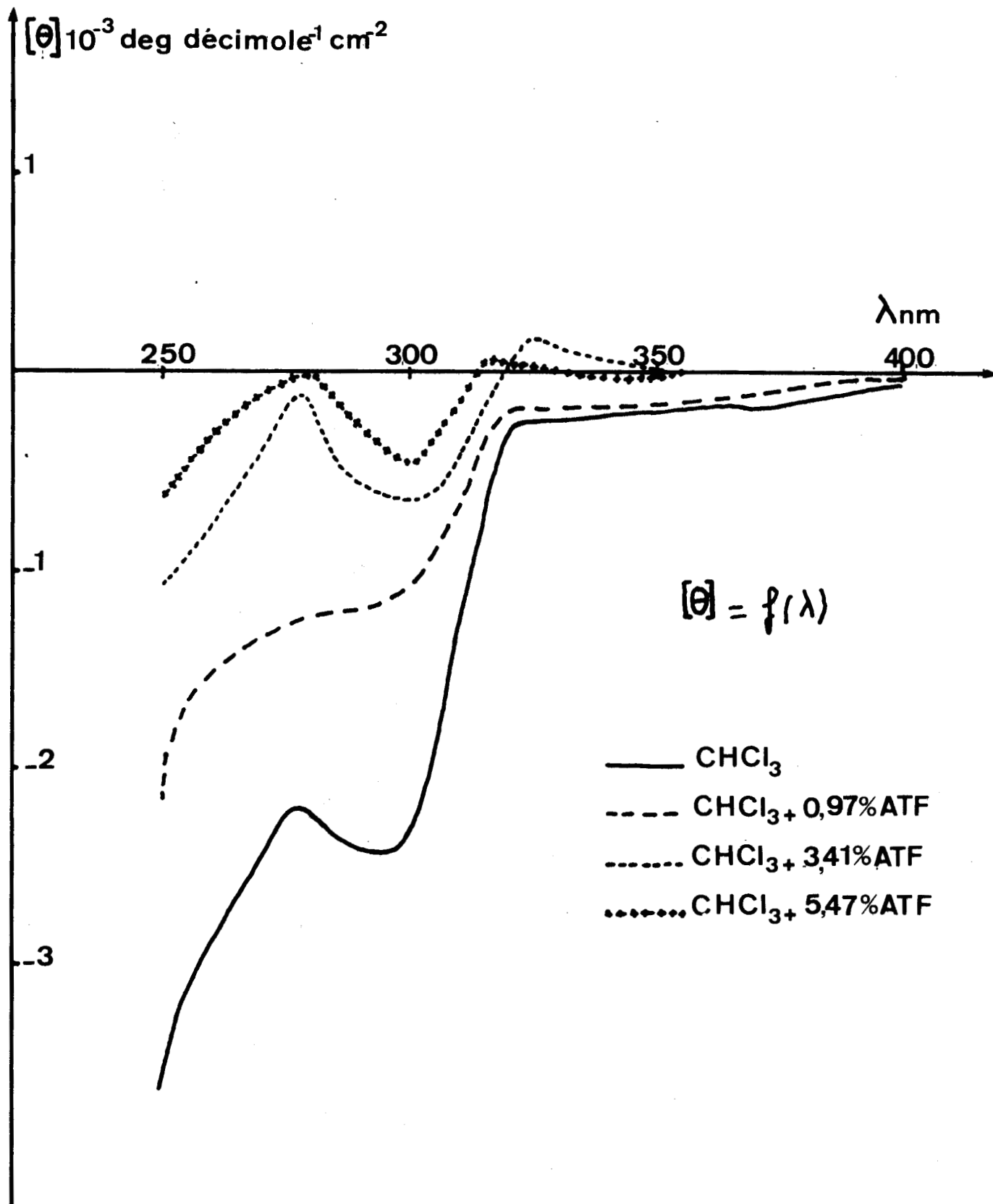


Figure 19





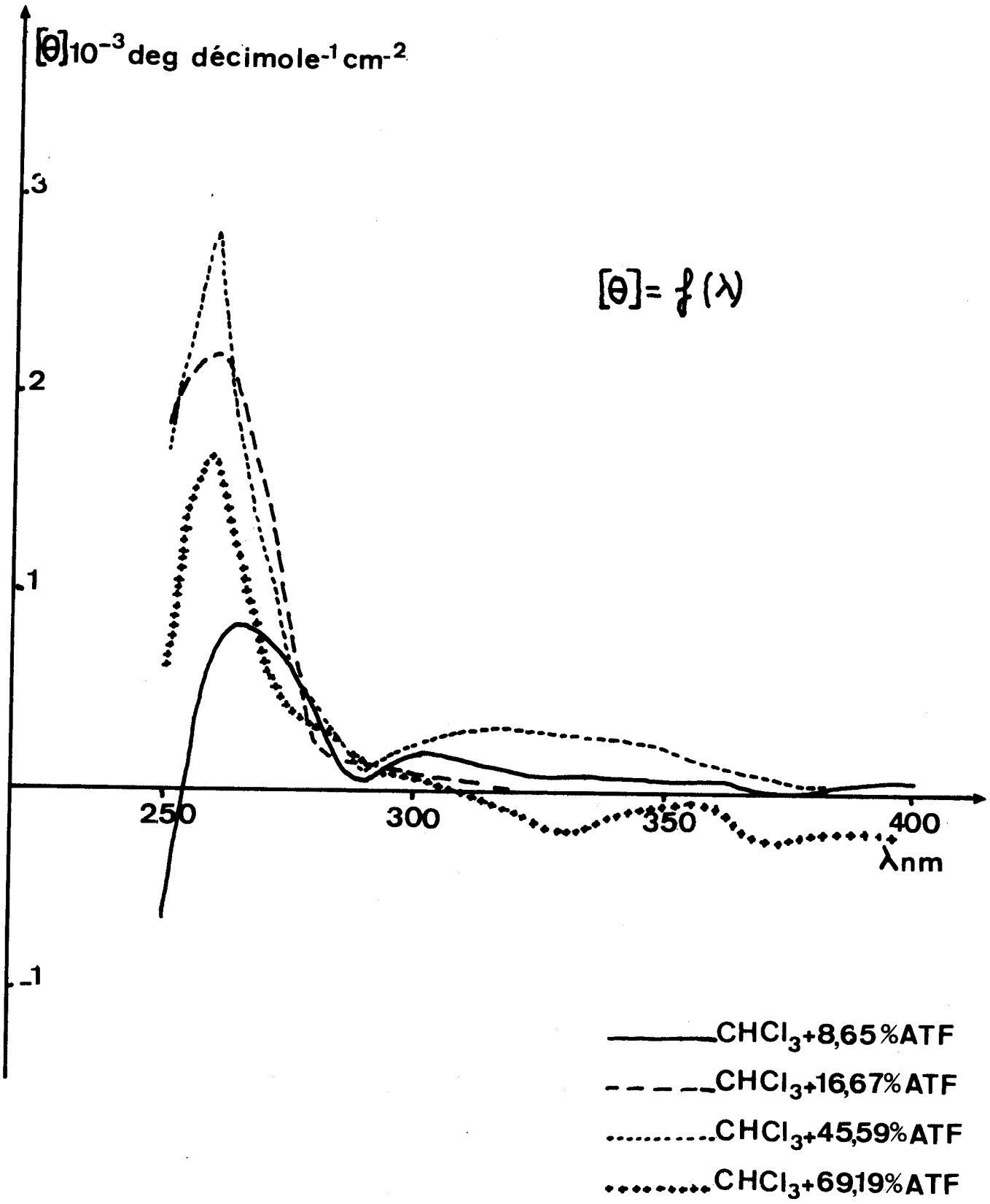
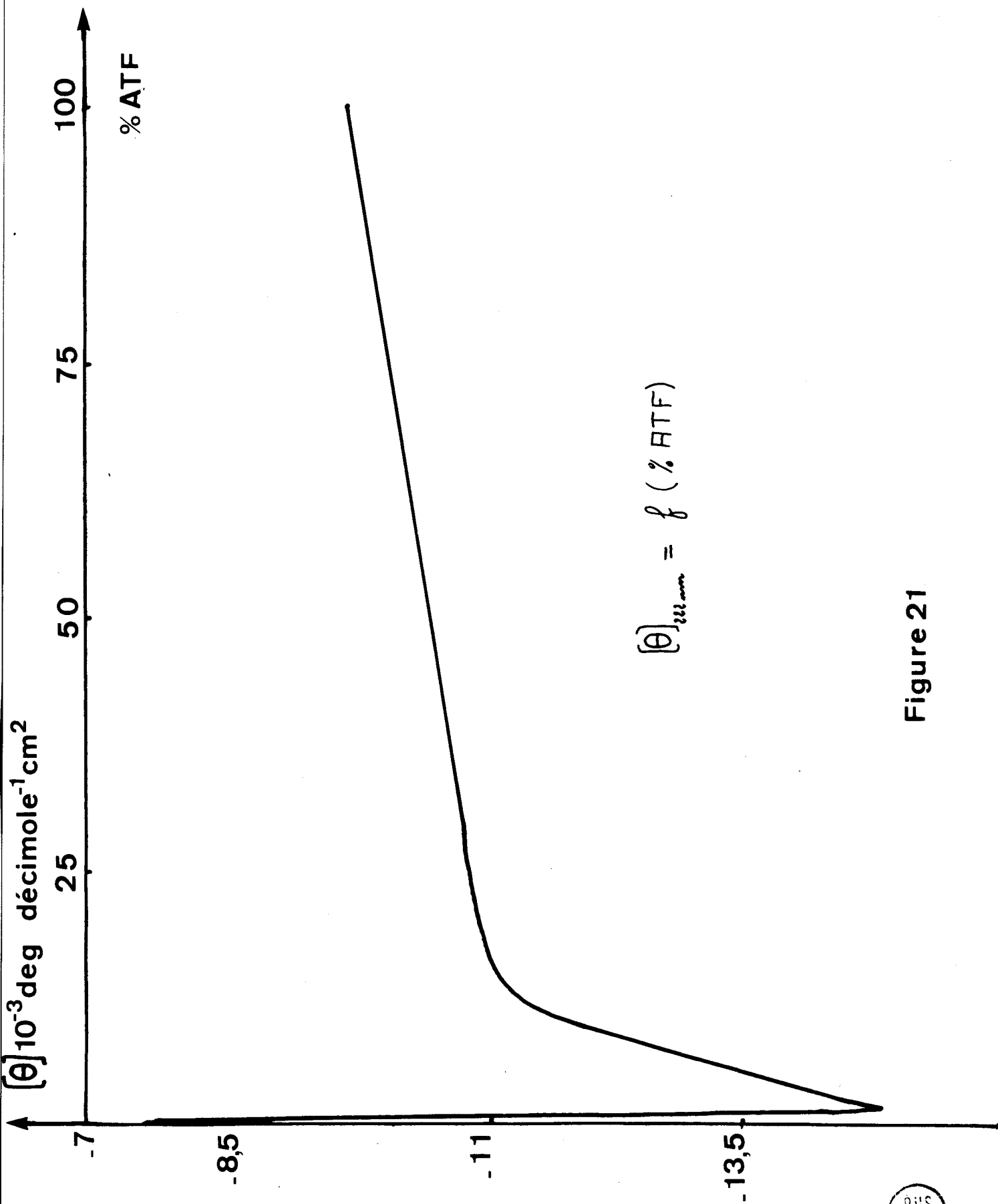


Figure 20





BUS  
LILLE

Figure 21

## VII) Conclusions.

Les résultats obtenus par DOR et DC dans les différents solvants ne sont pas interprétables en considérant les structures habituelles en hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$  et pelote statistique. Nous pensons donc qu'il pourrait s'agir d'une structure nouvelle non encore décrite, quand le polymère est en solution dans le chloroforme.

Dans le triméthylphosphate, nous sommes en présence d'un mélange de structures connues : hélice  $\alpha$ , pelote statistique et peut être structure  $\beta$ .

Dans l'hexafluoroisopropanol, il doit également exister un mélange de conformations dont la composition est beaucoup plus difficile à définir.

Le diméthylformamide et l'acide trifluoroacétique favorisent la conformation en pelote statistique.

Ces résultats vont être confirmés par l'étude de la résonance magnétique nucléaire.

## B. INFRA-ROUGE.

### I) Rappels.

La position des bandes d'absorption dans les différentes régions spectrales est une fonction de la nature du motif monomère mais aussi de la conformation.

Les bandes les plus utilisées pour la caractérisation de la structure secondaire des polypeptides sont les bandes :

- Amide A aux environs de  $3300 \text{ cm}^{-1}$

- Amide I aux environs de  $1650 \text{ cm}^{-1}$

Vibration de valence de C=O dans le groupement  $\begin{array}{c} \text{-C-N-} \\ \parallel \quad | \\ \text{O} \quad \text{H} \end{array}$

- Amide II aux environs de  $1550 \text{ cm}^{-1}$

Déformation de N-H et vibration de valence de C-N.

L'étude en lumière polarisée apporte des renseignements supplémentaires, et les valeurs des fréquences en fonction de la structure secondaire ont été calculées par Mizushima (80).

.../...

	Fréquence		Dichroïsme	
	Hélice $\alpha$	Structure $\beta$	Hélice $\alpha$	Structure $\beta$
Amide A	3300	3300	//	$\perp$
Amide I	1660	1640	//	$\perp$
Amide II	1545	1525	$\perp$	//

La valeur des rapports dichroïques et leur polarisation permet donc de définir la structure secondaire d'un polypeptide.

Position des bandes Amide I et Amide II en lumière polarisée.

		Amide I			Amide II		
Structure Secondaire	Désignation	MIYAZAWA BLOUT(83) Nombre d'onde calculé	KRIMM (84)	OBSERVE	MIYAZAWA BLOUT	KRIMM	OBSERVE
chaîne statistique	$\nu_0$	1658	1658	1656	1535	1520	1520 1535
Hélice $\alpha$ droite	$\bar{\nu}_{//}$ (0) $\bar{\nu}_{\perp}$ ( $\frac{2\pi}{3,6}$ )	1650	1650	1650	1516	1516	1516
Chaîne $\beta$ parallèle	$\bar{\nu}_{//}$ (0,0) $\bar{\nu}_{\perp}$ ( $\pi,0$ )	1648	1648	1645	1530	1530	1530
Chaîne $\beta$ anti- parallèle	$\bar{\nu}_{//}$ (0, $\pi$ ) $\bar{\nu}_{\perp}$ (0, $\pi$ ) $\bar{\nu}_{\perp}$ ( $\pi,\pi$ )	1685 1632 1668	1685 1632 1668	1685 1632	1530 1540 1550	1530 1510 1550	1530

Positions des bandes Amide A, I, II en lumière naturelle.

Structure :	Amide A	C=O ester	Amide I	Amide II	Références
Hélice $\alpha$	D: 3296 G: 3295-3315	1735-1743 1733-1740	1651-1660 1662-1668	1540-1555 1552-1561	+
Chaîne statistique		1735-1745	1653-1658	1525-1535	+
Chaîne $\beta$	3285-3305	1735-1740	1623-1637	1524-1545	+
Hélice $\omega$	D: 1727 G: 3291-4001	1671	1538		+
Hélice $\pi$ D,L	3270		1645	1540	*

+ Thèse 3ème cycle J.B.Aragão Strasbourg 1970

\* Thèse Etat F.Heitz Orléans 1974

Position des bandes Amide A, I, II en lumière naturelle sur des copolymères statistiques  $\beta$  L Aspartate de benzyle-  $\beta$  L Aspartate de 4 nitrobenzyle (état solide).

Polymère	Amide A	Amide I	Amide II	Conformation.
PLAB	3300	1667	1557	H $\alpha$ G
21% 4 nitrobenzyle	3306	1669	1559	H $\alpha$ G
27,5% 4 nitrobenzyle	3289	1661	1555	H $\alpha$ D + G
33% 4 nitrobenzyle	3268	1658	1553	H $\alpha$ D
100% 4 nitrobenzyle	3257	1658	1553	H $\alpha$ D

Valeurs obtenues par J.B.Aragão. Thèse 3ème cycle Strasbourg 1970.

.../...

## II) Résultats

L'étude en lumière polarisée s'est révélée totalement infructueuse. En effet, on n'observe aucun dichroïsme linéaire.

Etant donné les faibles masses des copolymères, l'orientation des films n'était pas parfaite bien que l'observation au microscope polarisant montre des zones bien orientées. On ne peut donc savoir si l'absence de dichroïsme est due à la structure ou aux défauts de l'orientation. En lumière naturelle, la position des bandes est bien définie que ce soit à l'état solide à partir des pastilles de KBr ou sur des films préparés à partir d'une solution de chloroforme ou d'hexafluoroisopropanol.

- Amide A :  $3280 \text{ cm}^{-1}$
- C=O ester :  $1721 \text{ cm}^{-1}$
- Amide I :  $1650 \text{ cm}^{-1}$
- Amide II :  $1540 \text{ cm}^{-1}$
- $\text{NO}_2$  :  $1517 \text{ cm}^{-1}$

Si nous comparons les résultats obtenus avec ceux précédemment donnés en revue, les valeurs trouvées ne correspondent à aucune structure connue.

De plus, nous constatons que, quand la température augmente, aucune variation n'est décelable dans le spectre.

Ce résultat a été observé sur un film obtenu à partir d'une solution dans le chloroforme et chauffé progressivement.

Cette étude a été menée jusqu'à  $120^\circ\text{C}$  sous vide. Au delà de cette température, le polymère se décompose.

Ce résultat est à comparer à celui obtenu par F.Heitz (4) à partir du poly D-L glutamate de benzyle alterné.

Certains échantillons adoptent une structure  $\alpha_{\text{DL}}$  en solution qui se transforme en structure  $\pi_{\text{DL}}$  par chauffage. La transition se faisant entre  $25$  et  $95^\circ\text{C}$ .

## C. RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)

### I) Rappels

La résonance magnétique nucléaire constitue un outil précieux dans l'étude de la structure des polypeptides. En particulier, le fait que puissent être observées simultanément les bandes correspondant à la chaîne principale et aux chaînes latérales permet d'obtenir par cette technique davantage de renseignements que par l'utilisation de la DOR et du DC.

Les spectres RMN d'un certain nombre de polyaspartates et de copolymères ont montré que les déplacements chimiques correspondant aux protons  $\alpha\text{CH}$  et  $\text{NH}$  varient avec la structure secondaire des polymères.

-Spectre de la chaîne principale.

Dans le cas des polyaspartates, il est possible de trouver des conditions telles que les polymères adoptent soit une conformation en hélice  $\alpha$  droite, soit une conformation en hélice  $\alpha$  gauche. Les valeurs admises actuellement sont celles de Bradbury et al. qui ont été obtenues à partir de poly L aspartate de benzyle (H $\alpha$ G) et de copolymères d'aspartate de benzyle à faible teneur en alanine (H $\alpha$ D) en solution dans le chloroforme (2). Il a été montré que les valeurs de ces glissements chimiques sont indépendantes des chaînes latérales et ne dépendent que de la structure secondaire (1).

	$\alpha\text{CH}$	:	$\text{NH}$
Hélice $\alpha$ gauche :	4,30	:	8,75
Hélice $\alpha$ droite :	4,40	:	8,20
Pelote statistique :	4,80	:	8,00

Glissements chimiques en ppm des bandes  $\text{NH}$  et  $\alpha\text{CH}$  dans le mélange 99,5%  $\text{CDCl}_3$ /0,5% ATF.

.../...

Dans notre cas, on s'intéressera beaucoup plus à la bande  $\alpha\text{CH}$  pour étudier la structure secondaire car la bande  $\text{NH}$  est très souvent masquée par la bande correspondant aux protons en ortho du cycle nitroaromatique.

- Spectres des chaînes latérales (2).

. protons  $\beta\text{CH}_2$  : ils présentent une bande à environ 3 ppm. Lorsque le polymère est sous forme de pelote statistique, la bande est étroite mais elle est dédoublée quand le polymère adopte une conformation en hélice  $\alpha$  gauche.

. protons  $\text{CH}_2$  benzyle ; la résonance est située à environ 5,15 ppm. La bande se présente sous la forme d'un quartet si on a affaire à une pelote statistique, mais sous forme d'une bande unique mais large quand le polymère est sous forme hélicoïdale.

. protons du cycle aromatique : leur bande de résonance est située à environ 7 ppm et elle est toujours étroite quelle que soit la conformation.

Les spectres RMN des copolymères statistiques,  $\beta$  L Aspartate de benzyle -  $\beta$  L Aspartate de 4 nitrobenzyle en solution dans  $\text{CDCl}_3$ , sont bien connus et les valeurs des glissements chimiques sont reportées dans le tableau ci-dessous (22).

Polymère	$\alpha\text{CH}$	$\text{NH}$	$\beta\text{CH}_2$	$\text{CH}_2$ benzyle	Conformation
15% $\text{NO}_2$	4,3	invisible	2,75 3,06	5,05	H $\alpha$ G
28% $\text{NO}_2$	4,35	invisible	2,8 3,14	5,04	50% H $\alpha$ G 50% H $\alpha$ D
40% $\text{NO}_2$	4,38	8,18	2,92	5,06	80% H $\alpha$ D 20% H $\alpha$ G

Glissements chimiques en ppm des différents protons des copolymères statistiques  $\beta$  L Aspartate de benzyle -  $\beta$  L Aspartate de 4 nitrobenzyle ( tous les copolymères cités sont sous forme hélicoïdale).

L'étude RMN permet donc une étude fine de la structure secondaire et de la position des chaînes latérales.

.../...



## II) Résultats

Les spectres RMN ont été faits sur différents appareils: Le Brucker Spectrospin 270 MHz, le Thomson Cameca 250 MHz à transformée de Fourier et le Thomson Cameca 250MHz par accumulation de spectres.

Les concentrations des solutions étudiées sont de l'ordre de 10mg/1ml. L'ATF utilisé n'est pas deutéré.

### 1) Etude dans le DMF

Les spectres ont été réalisés dans le DMF d6 et l'étude a été faite en fonction de la température et en fonction de la quantité d'ATF ajoutée.

Dans notre cas, la ou les bandes dues aux protons  $\beta\text{CH}_2$  sont invisibles. Ce pic est caché par les bandes du DMF non deutéré.

A la température de 21°C, la position des bandes est la suivante (Fig 22).

$\alpha\text{CH}$  4,74 ppm

$\text{NH}$  7,63 ppm

$\text{CH}_2$  benzyle 5,11 et 5,26 ppm

$\text{H}$  aromatique 7,32 ppm

$\text{H}$  ortho du cycle nitroaromatique 8,20 ppm

Le passage de 20°C à 100°C ne change absolument pas la position des bandes.(Fig 22).

Les bandes correspondant à  $\alpha\text{CH}$  et  $\text{NH}$  sont bien définies. La bande  $\alpha\text{CH}$  reste toujours large alors que la bande  $\text{NH}$  est étroite.

Or on sait, à partir d'études sur les copolymères statistiques correspondants, que la bande due au  $\text{NH}$  n'est bien visible que dans le cas où le polymère est sous forme de pelote statistique. Nous concluons donc que c'est cette structure que le polymère adopte.

Ce résultat est en bon accord avec le fait que l'on n'observe pas de transition par effet de température.

De même, lorsqu'on ajoute des quantités croissantes d'ATF, le spectre est rigoureusement inchangé (Fig 23).

.../...

Figure 22

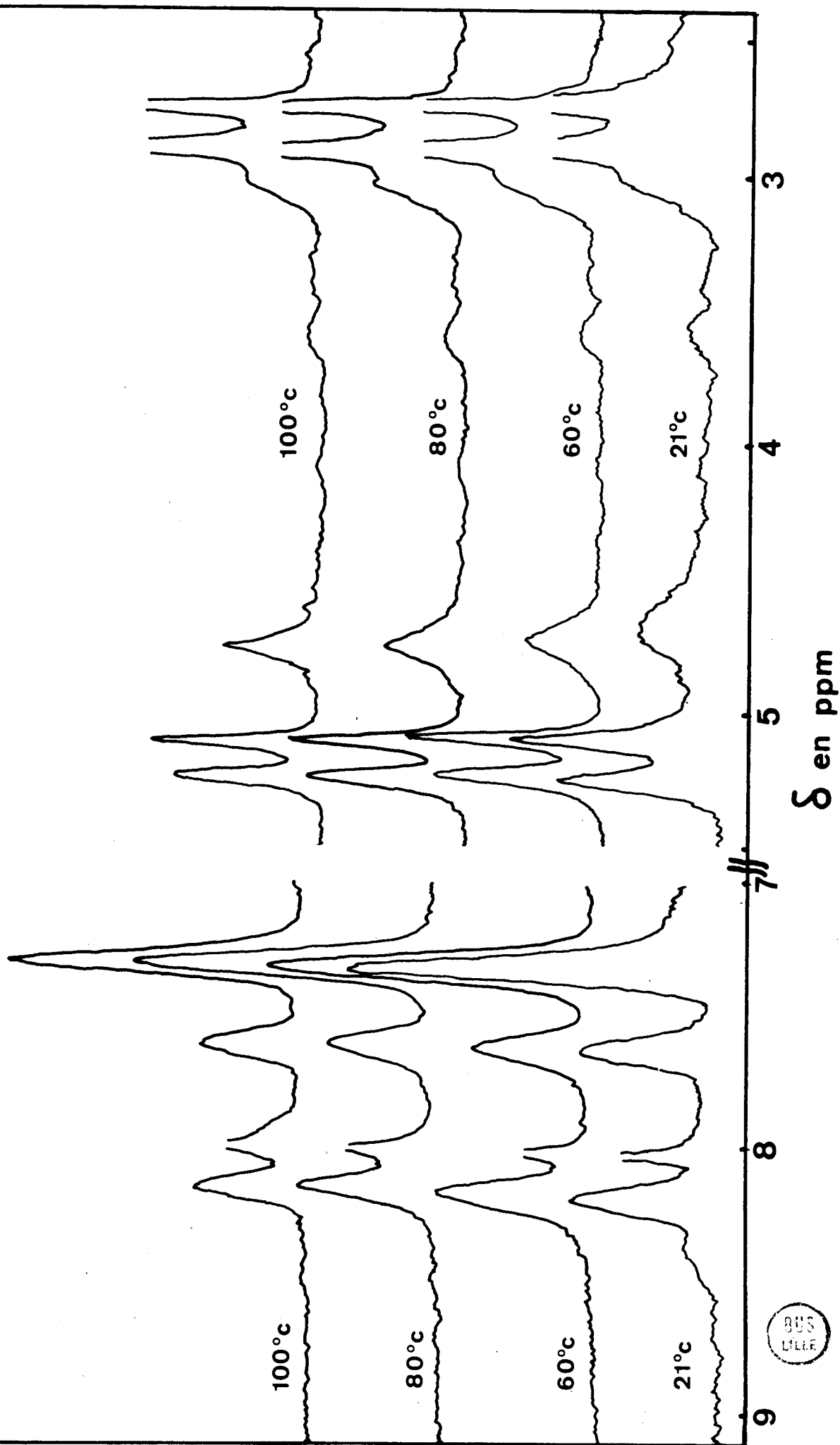
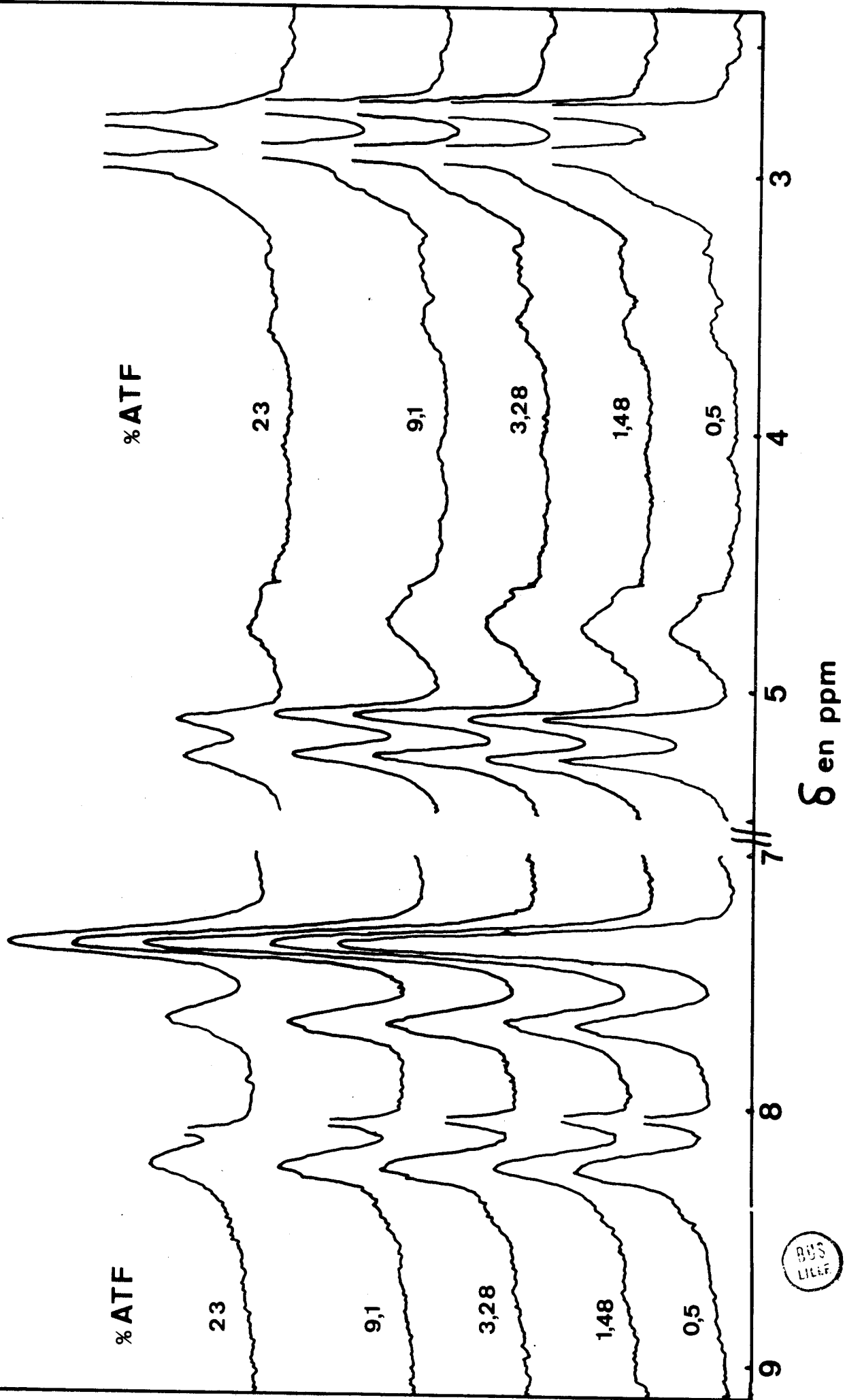


Figure 23



Généralement la bande correspondant aux protons  $\text{CH}_2$  benzyle est unique dans le cas où le polymère est sous une forme organisée et se présente sous la forme d'un quartet si le polymère est sous forme de pelote statistique. Dans notre cas, nous observons un doublet aussi bien dans le DMF pur que dans les mélanges DMF-ATF jusque 50% en ATF. Cela veut donc dire, que même avec des concentrations aussi élevées en ATF, les  $\text{CH}_2$  benzyle ne sont pas équivalents. Puisque les pics du doublet ont la même surface, le spectre permet de mettre en évidence le  $\text{CH}_2$  benzyle correspondant à chacun des constituants. Comme également le pic du  $\alpha\text{CH}$  reste large, cela signifierait que des conformations préférentielles des chaînes latérales doivent exister même quand le polymère adopte une structure en chaîne statistique.

## 2) Etude dans le TMP

Les spectres ont été réalisés à partir d'une solution dans le TMP d9 auquel on ajoute de l'ATF. Puisque le polymère précipite au cours de l'addition d'ATF, les spectres n'ont été réalisés que jusqu'à une teneur de 6,9%.

Les positions des bandes en ppm sont les suivantes : (Fig 24)

$\alpha\text{CH}$  une bande large 4,44 ppm

NH une bande 7,5 ppm

$\beta\text{CH}_2$  une bande 2,9 ppm

$\text{CH}_2$  benzyle : 2 bandes 5,05 et 5,18 ppm

H aromatique : une bande 7,25 ppm

H ortho du cycle nitroaromatique 8,1 ppm

La bande du proton  $\alpha\text{CH}$  est très large et semble être la résultante de plusieurs bandes correspondant à différentes structures. La bande du  $\beta\text{CH}_2$  n'est pas dédoublée mais elle est assez large.

La bande du  $\text{CH}_2$  benzyle forme un doublet comme dans le cas du DMF.

Nous pensons être en présence d'un mélange de structures.

.../...

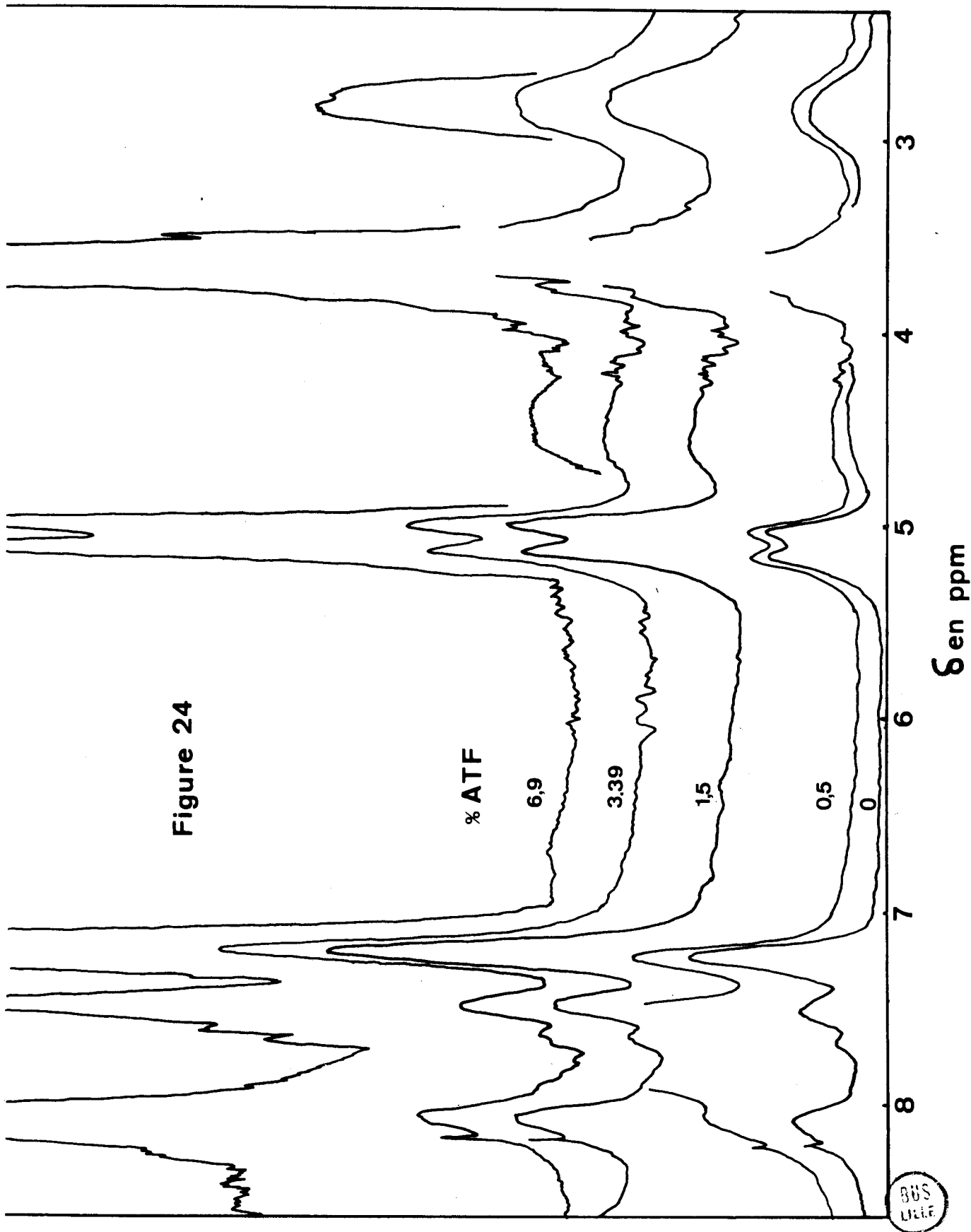


Figure 24

% ATF

3) HFIP.

Les résultats sont ininterprétables car il est très difficile d'obtenir de l'hexafluoroisopropanol parfaitement deutéré.

4) CHCl<sub>3</sub>.

L'étude a été faite dans le chloroforme d1 auquel on a ajouté de l'ATF (Fig 25).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-dessous. Les valeurs des glissements chimiques sont données en ppm.

% ATF	0	0,5	0,75	0,95	2,5	5	10
Protons							
$\alpha\text{CH}$	4,30	4,34	4,36 4,63	4,35 4,66	4,74	4,85	4,86
	3,42	3,5	3,5	3,52	3,54	3,65	3,63
	3,63	3,66	3,66	3,66	3,69	3,73	3,75
NH	invi- sible	invi- sible	invi- sible	invi- sible	7,88	7,96	7,95
$\beta\text{CH}_2$	2,92	2,95	2,95	2,96	2,97	2,98	2,98
CH <sub>2</sub> benzyle	5,05	5,06	5,06	5,06	5,08	5,1	5,09
H ortho	8,04	8,05	8,05	8,05	8,06	8,06	8,05
H aroma- tique	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25	7,25

La bande du proton  $\alpha\text{CH}$  est centrée à 4,30 ppm quand il n'y a pas d'ATF.

Cette position est caractéristique de l'hélice  $\alpha$  gauche. Nous savons par l'étude des copolymères statistiques correspondants que lorsqu'on a affaire à cette structure, le pic  $\beta\text{CH}_2$  est dédoublé et le pic du proton NH est centré à 8,75 ppm. Or nous n'observons ni dédoublement de la bande  $\beta\text{CH}_2$  ni pic à 8,75 ppm.

.../...

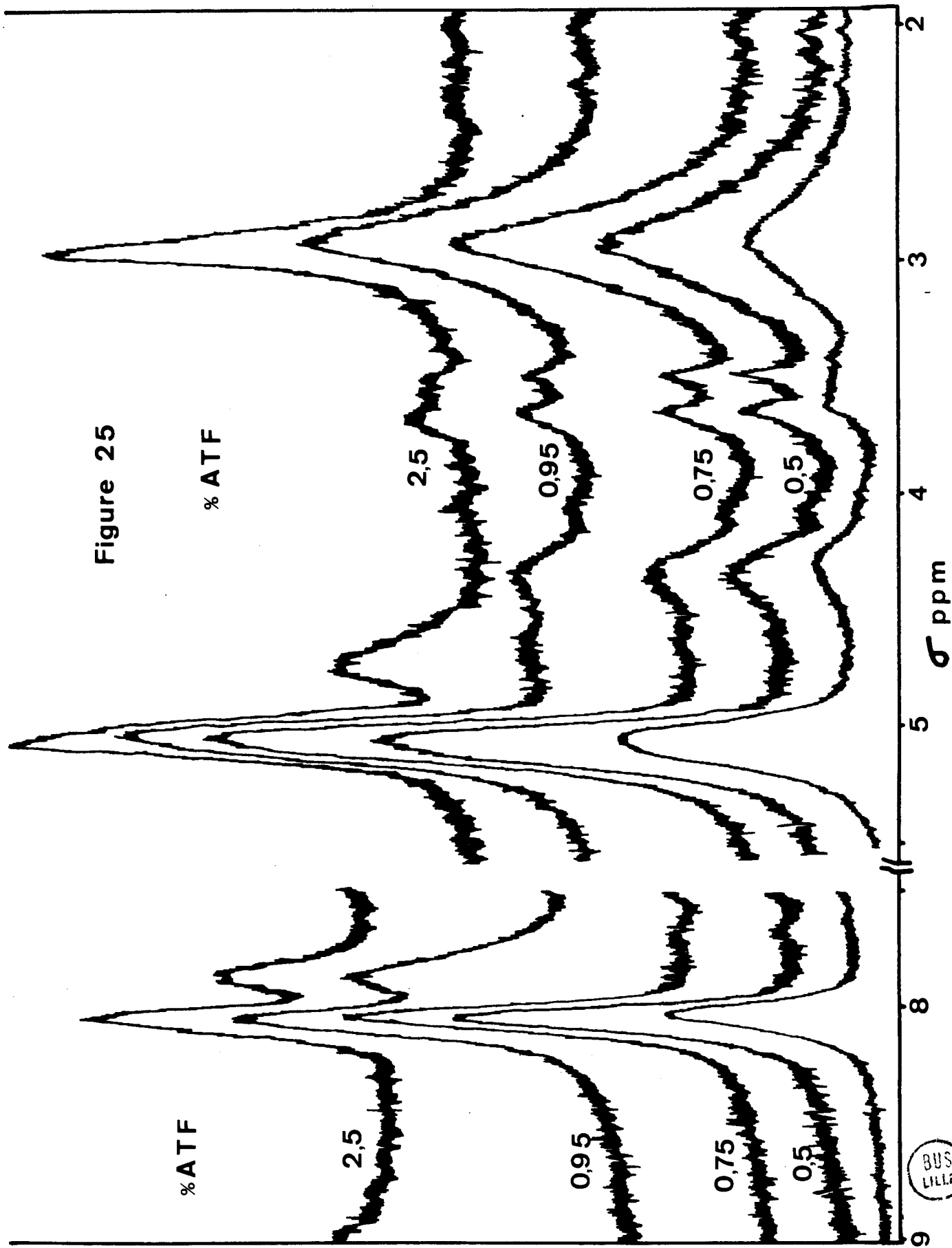


Figure 25

% ATF

% ATF

2.5

0.95

0.75

0.5

2.5

0.95

0.75

0.5

BUS  
LILLE

Nous avons vérifié par intégration que dans  $\text{CDCl}_3$  pur la bande  $\text{NH}$  ne se trouve pas sous la bande des protons en ortho du cycle nitroaromatique. Au cours de l'addition d'ATF, elle vient se mélanger en partie à cette bande. Puisqu'une bande correspondant au  $\text{NH}$  n'est jamais observable dans le domaine des champs faibles au delà de 8,1 ppm, nous pensons qu'elle est très peu visible tant que le polymère adopte une conformation assez rigide. Elle ne devient observable que par addition d'ATF. Cela rejoint les observations déjà faites sur les copolymères statistiques: Quand les polymères sont sous forme d'hélice  $\alpha$  gauche, la résonance de  $\text{NH}$  attendue à 8,75 ppm se présente plus comme un épaulement que comme une bande.

Au fur et à mesure que l'on ajoute de l'ATF, le pic du proton  $\alpha\text{CH}$  se dédouble pour venir se centrer à 4,85 ppm vers 10% en ATF. Nous admettons que ce phénomène de double pic est caractéristique d'une transition et que par conséquent dans  $\text{CDCl}_3$  nous sommes bien en présence d'une structure définie.

Le pic à 4,85 ppm est caractéristique de la pelote statistique. Parallèlement on constate l'apparition d'une bande à 7,95 ppm caractéristique elle aussi du proton  $\text{NH}$  quand le polymère est sous forme de pelote statistique.

Il existe également 2 autres bandes dans le domaine de résonance du proton  $\alpha\text{CH}$ .

D'après l'intégration des 3 pics obtenus dans cette zone, il semblerait que, sans ATF, le polymère possède 70% de la structure organisée dont nous venons de parler. Les deux autres pics, qui sont déplacés vers les champs forts, correspondraient à des interactions entre certaines portions de la chaîne principale et la chaîne latérale.

Le fait que ces 2 pics soient d'égale intensité permet de penser que chacun des deux correspond à un des constituants. L'intensité de ces 2 nouveaux pics diminue au fur et à mesure que l'on ajoute de l'ATF en même temps que leur position se déplace vers les bas champs.

.../...



La bande due aux protons  $\beta\text{CH}_2$  se déplace tout doucement vers les bas champs.

Cela semble vouloir dire que lorsque le polymère est sous forme organisée, les protons du cycle aromatique de l'acide aminé  $n+1$  et aussi  $n+2$  font effet d'écran sur les protons

$\beta\text{CH}_2$  de l'acide aminé  $n$ . Cet effet diminue au fur et à mesure que l'on ajoute de l'ATF.

Si on compare les chiffres que nous obtenons à ceux des copolymères statistiques (22), nous constatons que la position du pic  $\beta\text{CH}_2$  est encore davantage déplacée vers les bas champs : elle est à 3,06 ppm. Cela serait en accord avec l'existence d'interactions entre chaînes latérales spécifiques à notre polymère. (Fig 26).

Les protons  $\text{CH}_2$  benzyle sont stabilisés à 5,07 ppm. Lorsque le polymère est sous forme pelote, le pic devrait se présenter sous la forme d'un quartet.

Il n'en est rien et cela veut peut-être dire que le polymère n'est pas encore totalement sous forme pelote statistique après 10% en ATF ou que des interactions continuent à exister même sous forme chaîne.

Les protons en ortho du cycle nitroaromatique sont centrés à 8,05 ppm. Leur position est stable de même que celle des protons aromatiques.

Il n'existe donc pas d'interactions entre les différents noyaux aromatiques.

### III) Conclusions.

Dans le diméthylformamide, le polymère adopte une conformation en pelote statistique.

Dans le triméthylphosphate, il existe un mélange de structures. Dans ces deux solvants la bande due aux protons  $\text{CH}_2$  benzyle est dédoublée.

Dans le chloroforme l'étude RMN confirme que nous ne sommes en présence ni d'hélice  $\alpha$  droite ni d'hélice  $\alpha$  gauche. Elle met en évidence l'existence d'au moins une nouvelle structure qui pourrait être la  $\beta_{aa^*}$ .

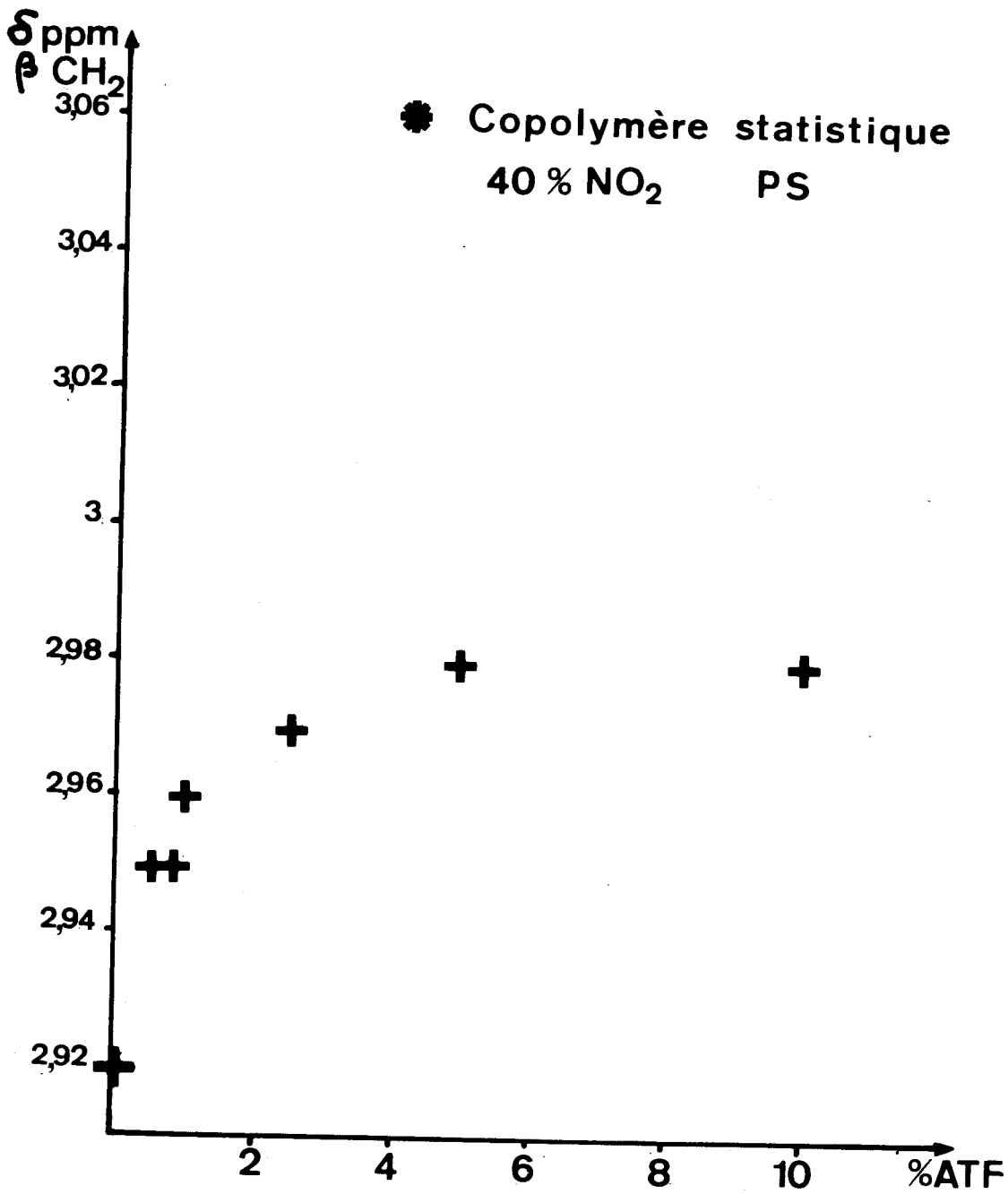


Figure 26



Par manque d'éléments de comparaison, il ne nous est pas possible de l'affirmer complètement.

Par contre tous les résultats de l'étude RMN semblent prouver que d'importantes interactions existent aussi bien entre les chaînes latérales qu'entre les chaînes latérales et la chaîne principale.

## C O N C L U S I O N

---

Nous avons synthétisé un copolymère alterné : le poly  $\beta$  L Aspartate de 4 nitrobenzyle- $\beta$  L aspartate de benzyle. Ce polymère a été obtenu en polycondensant le dimère correspondant par la méthode de l'ester actif.

Nous l'avons étudié par trois techniques (DOR, DC, RMN) dans des solvants différents (ATF, DMF, TMP, HFIP,  $\text{CHCl}_3$ ).

La dispersion optique rotatoire ne nous a pas apporté beaucoup de renseignements du point de vue structural.

La présence du chromophore nitrobenzyle perturbe les calculs de  $b_0$  et des coefficients de Shechter et Blout.

Par contre, elle nous a permis de mettre en évidence le fait qu'une représentation linéaire de Moffitt-Yang ou de Shechter-Blout n'était pas une condition suffisante pour permettre l'utilisation des coefficients  $b_0$ ,  $A_{193}$  et  $A_{225}$ .

On peut cependant dire que dans le DMF et l'ATF, le polymère est sous forme de pelote statistique.

De plus, la méthode est utilisable pour observer des variations de conformations. Ceci nous a permis d'observer une certaine stabilité de la structure adoptée par le polymère en solution dans le TMP; cette stabilité ne se retrouve pas dans le  $\text{CHCl}_3$ .

Le dichroïsme circulaire apporte plus de renseignements :

- dans l'acide trifluoroacétique, le polymère est sous forme de pelote statistique.
- le triméthylphosphate favorise un mélange de structures.
- dans l'hexafluoroisopropanol, les résultats sont beaucoup plus difficiles à interpréter. En effet, HFIP est légèrement acide et doit interagir avec les groupements 4 nitrobenzyle, comme l'ont d'ailleurs montré des études par spectroscopie ultra-violette.
- dans le chloroforme, l'étude met en évidence une structure qui n'est ni une hélice  $\alpha$ , ni une pelote statistique, ni l'hélice  $\pi_{D,L}$ .

.../...

Les chaînes latérales présentent des effets Cotton dont l'intensité peut être reliée à la structure secondaire; mais il n'est pas possible de dire s'ils sont dus à des interactions chaîne latérale-chaîne latérale ou chaîne latérale-chaîne principale.

. La résonance magnétique nucléaire a confirmé tous ces résultats.

Nous avons mis en évidence une nouvelle structure quand le polymère est en solution dans le chloroforme.

Comme nous l'avons vu précédemment, cette structure, que nous avons appelée  $\beta_{aa}^*$ , pourrait exister au niveau des complexes DNA-poly L lysine.

L'étude RMN nous a également montré qu'il doit exister des interactions chaîne principale-chaînes latérales ainsi que des interactions chaînes latérales entr'elles.

Par contre, les noyaux aromatiques ne doivent pas interagir. Il ne restait plus qu'à donner les coordonnées exactes de cette structure. Pour cela une étude de diffraction des RX aurait terminé ce travail. Nous avons rencontré plusieurs difficultés matérielles pour réaliser cette étude; en particulier, la faible masse de nos produits constitue un sérieux obstacle.

ANNEXE



SYNTHESE

## I. PREPARATION DU β L ASPARTATE DE 4 NITROBENZYLE

### 1) L Aspartate de cuivre.

Dans 4 l d'eau portée à 90°C, on dissout 66,5 g (0,5 mole) d'acide L aspartique. On ajoute lentement 100 g d'acétate de cuivre monohydraté en solution dans 1l d'eau bouillante. Le tout étant placé sous agitation vigoureuse, on laisse le mélange revenir à température ambiante. On filtre le précipité obtenu, lave à l'eau jusqu'à ce que le filtrat soit incolore puis à l'alcool.

Le précipité est séché sous vide à 110°C. On obtient 111g de produit et si l'on admet que l'aspartate de cuivre cristallise avec 6 molécules d'eau, le rendement est de 89%.

### 2) L Aspartate de cuivre et de lithium.

On dissout à froid 19,6g (0,8 mole) d'hydroxyde de lithium à 98% dans 3,5l d'eau. Puis on ajoute 53,2g (0,4 mole) d'acide L aspartique.

Lorsque la solution d'aspartate de lithium est limpide, on ajoute 99,4g (0,2 mole) d'aspartate de cuivre. On agite à température ambiante pendant 6 heures puis on filtre l'aspartate de cuivre qui n'a pas réagi. On concentre sous vide le filtrat à un volume de 500ml et on précipite l'aspartate de cuivre et de lithium par l'alcool éthylique.

On filtre, lave à l'éthanol et sèche sous vide à 110°C.

On obtient 122,5g de produit, soit un rendement de 90%.

$\epsilon_{630\text{nm}} = 41,8 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ , solvant  $\text{H}_2\text{O}$ .

.../...

### 3) Aspartate de cuivre et de 4 nitrobenzyle

33,95 g (0,1 mole) d'aspartate de cuivre et de lithium sont dissous dans 400 ml d'eau. 43,2 g (0,2 mole) de bromure de 4 nitrobenzyle sont dissous dans 400 ml de DMSO.

On mélange les deux solutions pendant 24 heures à la température de 35°C. ( Si le bromure précipite lors du mélange, on ajoute du DMSO jusqu'à obtenir une solution de départ limpide).

On ajoute ensuite de l'acétone, on filtre, lave à l'acétone puis à l'eau puis on sèche sous vide à 40°C.

On obtient 23,9 g soit un rendement de 40%.

### 4) Aspartate de 4 nitrobenzyle

On ajoute 5,975 g (0,1 mole) d'aspartate de cuivre et de 4 nitrobenzyle à une solution de sel disodique de l'EDTA à pH=4,5 bouillante.

On filtre à chaud et l'aspartate cristallise à froid. On filtre et sèche. On recristallise dans l'eau bouillante ( 10 g pour 100 ml).

On obtient 4,4 g soit un rendement de 82%.

## II. PREPARATION DU $\beta$ L ASPARTATE DE BENZYLE.

Dans un ballon on introduit 75 g (0,565 mole) d'acide L aspartique et 0,75 l d'alcool benzylique.

Ce ballon est placé dans un bain d'huile à 100°C. On y fait barboter de l'acide chlorhydrique jusqu'à obtention d'une solution limpide. On précipite par de la triéthylamine.

On filtre, lave à l'éthanol et sèche. Le produit est recristallisé dans l'eau bouillante (10 g pour 100 ml).

Rendement : 38,5g (0,172 mole), 31%.

.../...



### III. PREPARATION DES MONOMERES PROTEGES.

#### 1) Préparation du tertiobutylazidoformiate

Une solution de 26,4 g (200 mmoles) de tertiobutylcarbazate, 22,5 ml d'acide acétique glacial et 36,5 ml d'eau est refroidie dans un bain de glace.

En agitant vigoureusement, on ajoute 15,16 g (220 mmoles) de nitrite de sodium en solution dans 150 ml d'eau. Cette addition se fait en 20 mn en maintenant la température entre 9 et 13°C.

On agite le mélange 1 heure dans la glace et on ajoute 40 ml d'eau. On sépare la couche azide jaune d'or de la couche aqueuse. Celle-ci est extraite 4 fois par 50 ml d'éther éthylique. On combine les couches organiques et on les lave 3 fois avec 50 ml de bicarbonate de sodium 1 M et 3 fois avec 50 ml d'eau. On sèche la solution sur sulfate de magnésium et on évapore le solvant sous vide.

Rendement 27,15g, 95%.

#### 2) Préparation du N tertiobutyloxycarbonate $\beta$ L aspartate de 4 nitrobenzyle (I).

On mélange 37 g (138 mmoles) de  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle, 700 ml de DMSO, 38 ml (276 mmoles) de triéthylamine et 25 ml de tertiobutylazidoformiate pendant 20 heures à la température de 25°C.

On dilue la solution limpide par 1,2 l d'eau. On extrait 3 fois avec 50 ml d'éther éthylique pour éliminer l'azide qui n'a pas réagi. On acidifie la phase aqueuse avec de l'acide citrique jusqu'à pH=3,5. On extrait 5 à 7 fois par 100 ml d'AcOEt.

Les phases organiques sont lavées 3 fois par 100 ml d'eau puis séchées sur sulfate de magnésium. On concentre la solution sous vide et on la précipite par l'éther de pétrole. Le produit séché est recristallisé par dissolution dans l'acétate d'éthyle et précipitation dans l'éther de pétrole.

3) Préparation du N tertiobutyloxycarbonate  $\beta$  L aspartate de benzyle (II).

On prépare le produit II de la même façon que le I.

Quantités utilisées :

38 g (170 mmoles) de  $\beta$  L aspartate de benzyle.

850 ml de DMSO.

47 ml (340 mmoles) de  $\text{Et}_3\text{N}$ .

25,6 ml de tertiobutylazidoformiate.

4) Préparation du sel dicyclohexylamine du N tertiobutyloxycarbonate  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle (III).

On dissout 36g (98 mmoles) de I dans 250 ml d'AcOEt et on ajoute goutte à goutte 18 g (99,5 mmoles) de DCHA. On agite pendant 15 heures. On filtre et sèche.

5) Préparation du sel de dicyclohexylamine du N tertiobutyloxycarbonate  $\beta$  L aspartate de benzyle (IV).

Même mode opératoire que pour le produit III.

Quantités utilisées:

50 g (155 mmoles) de II.

28,4 g (157 mmoles) de DCHA.

6) Préparation de l'ester  $\alpha$  pentachlorophénylique du N tertiobutyloxycarbonate  $\beta$  L aspartate de benzyle (V)

On dissout 59 g (183 mmoles) de II dans 600 ml d'AcOEt.

On refroidit par un mélange glace + sel.

On ajoute 65 g (244 mmoles) de pentachlorophénol et 50 g (240 mmoles) de DCCI. On laisse le mélange revenir à température ambiante et on agite 24 heures. On filtre l'urée qui a précipité.

.../...

Le filtrat est lavé avec  $K_2CO_3$  1M (3-4 fois) et 4 à 5 fois avec de l'eau. On sèche sur sulfate de magnésium. On évapore le solvant sous vide. L'huile ou les cristaux sont repris par l'acétate d'éthyle. Au bout de 2 heures, on filtre à nouveau l'urée. On évapore une partie du solvant et on précipite par l'éther de pétrole.

7) Préparation du chlorhydrate de l'ester  $\alpha$  pentachlorophénylique du  $\beta$  L aspartate de benzyle (VI).

On dissout 59 g (103 mmoles) de V dans 1 l d'AcOEt. On fait barboter HCl dans la solution jusqu'à un début de cristallisation. On laisse sous agitation 2 heures. On filtre et sèche.

IV PREPARATION DU DIMERE ET DU TRIMERE PROTEGES.

1) N tertiobutyloxycarbonyle  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle- $\beta$  L aspartate de benzyle ester  $\alpha$  pentachlorophénylique (VII).

On dissout 31,8 g (58 mmoles) de III dans 1,5l de  $CHCl_3$ . On refroidit la solution dans un mélange glace + sel. On ajoute ensuite 29,4 g (58 mmoles) de VI. Après dissolution complète on ajoute 18,6 g (100 mmoles) de DCCI. On laisse le mélange revenir à température ambiante puis sous agitation pendant 24 heures. On filtre la dicyclohexylurée. On évapore le solvant sous vide. On reprend l'huile par 600 ml d'un mélange Acétate d'éthyle; chloroforme (4;1). On laisse sous agitation 2 heures. On filtre à nouveau l'urée. On évapore le solvant sous vide et on précipite par l'éther de pétrole.

2) Préparation du chlorhydrate de  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle- $\beta$  L aspartate de benzyle ester  $\alpha$  pentachlorophénylique (VIII).

Le produit VIII est préparé de la même façon que le produit VI.

Quantités utilisées

26 g (31,6 mmoles) de VII.

500 ml de  $\text{CHCl}_3$ .

3) Préparation du N tertiobutyloxycarbonate  $\beta$  L aspartate de benzyle-  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle-  $\beta$  L aspartate de benzyle ester  $\alpha$  pentachlorophénylique (IX).

Même mode opératoire que pour le produit VII.

Quantités utilisées.

1 g ( $1,98 \cdot 10^{-3}$  moles) de IV.

1,5 g ( $1,98 \cdot 10^{-3}$  moles) de VIII.

0,7 g ( $3,36 \cdot 10^{-3}$  moles) de DCCI.

4) Préparation du chlorhydrate  $\beta$  L aspartate de benzyle-  $\beta$  L aspartate de 4 nitrobenzyle-  $\beta$  L aspartate de benzyle ester  $\alpha$  pentachlorophénylique (X).

Même mode opératoire que pour le produit VI.

Quantités utilisées :

1 g ( $0,975 \cdot 10^{-3}$  mole) de IX.

15 ml  $\text{CHCl}_3$ .

## V. POLYMERISATION.

1) du dimère :

A la température de  $25^\circ\text{C}$ , les polymérisations ont duré 3 jours et à la température de  $8^\circ\text{C}$ , 8 jours.

Les polymères récupérés ont été dialysés 48 heures contre la DMF pour éliminer les petites masses puis 24 heures contre l'eau pour éliminer les sels formés et enfin 48 heures contre le méthanol pour les précipiter.

D'après le tableau I, le meilleur rendement est obtenu pour le polymère III B. La triéthylamine donne de meilleurs résultats que la dicyclohexylamine.

La température semble également jouer un rôle important. A basse température la formation de cycles intramoléculaires

.../...

est beaucoup plus faible.

En nous plaçant dans les conditions III B nous avons repris la polycondensation sur 5 g de produit et nous avons obtenu un rendement de 45 %.

Tableau I : Conditions de polymérisation.

( Polymère	: C	: T°C	: Equivalents	: Solvant:	: Rendement
(	: g/100ml	:	: d'initiateur	:	: %
( I A	: 3	: 25	: 1,5 TEA	: Benzène:	: 0
( I B	: 3	: 8	: 1,5 TEA	: Benzène:	: 0
( I C	: 3	: 8	: 1,5 TEA	: D.M.F.:	: 8,25
( I D	: 3	: 8	: 2 DCHA	: D.M.F.:	: 8,7
( I E	: 3	: 25	: 2 DCHA	: D.M.F.:	: 5,2
( II A	: 35	: 25	: 1,5 TEA	: Benzène:	: 5,2
( II B	: 35	: 8	: 1,5 TEA	: Benzène:	: 16,2
( II C	: 35	: 8	: 1,5 TEA	: D.M.F.:	: 18,8
( II D	: 35	: 8	: 2 DCHA	: D.M.F.:	: 11,9
( III A	: 70	: 25	: 1,5 TEA	: Benzène:	: 6,4
( III B	: 70	: 8	: 1,5 TEA	: Benzène:	: 26,6
( III C	: 70	: 8	: 1,5 TEA	: D.M.F.:	: 22,6
( III D	: 70	: 8	: 2 DCHA	: D.M.F.:	: 10,8

2) du trimère :

Nous avons fait des essais à 2 concentrations différentes. A faible concentration, on obtient un rendement quasiment nul. A plus forte concentration (60%) le rendement est de l'ordre de 25%.

Ce polymère n'a pu être utilisé pour une étude physicochimique car il y avait des coupures du groupement 4 nitrobenzyle.

La coupure de la protection tBOC du trimère se fait mal et ce chlorhydrate semble moins résistant en milieu basique.

## BIBLIOGRAPHIE.

---

- (1) M-H.LOUCHEUX-LEFEBVRE, A.FORCHIONI et C.DUFLLOT.  
Polymer, (1974), 15, 474.
- (2) E.M.BRADBURY, B.G.CARPENTER, C.CRANE-ROBINSON et H.  
GOLDMAN. Macromolecules (1971), 4, 557.
- (3) M.GOODMAN, A.M.FELIX, C.M.DEBER, A.R.BRAUSE et G.  
SCHWARTZ, Biopolymers (1963), 1, 371.
- (4) F.HEITZ, Thèse d'Etat. (1974) Orléans.
- (5) E.M.BRADBURY, B.G.CARPENTER et H.GOLDMAN. Biopolymers  
(1968), 6, 837.
- (6) M.GOODMAN, F.BOARDMAN et L.LISTOWSKI, J.A.C.S.(1963)  
85, 2483.
- (7) E.M.BRADBURY, B.G.CARPENTER et R.M.STEPHENS.  
Macromolecules, (1972), 5, 8.
- (8) C.TONIOLO, M.FALXA et M.GOODMAN. Biopolymers.  
(1968), 6, 1579.
- (9) F.A.BOVEY. Pure and Applied Chemistry, (1968), 16, 417.
- (10) M.HASHIMOTO et J.ARITOMI, Bull.Chem.Soc.Japan.  
(1966), 39, 2707.
- (11) M.HASHIMOTO, Bull.Chem.Soc.Japan (1966), 39, 2713.
- (12) M.GOODMAN, C.DEBER et A.M.FELIX, J.A.C.S. (1962), 84, 3773.
- (13) R.H.KARLSON, K.S.NORLAND, G.D.FASMAN et E.R.BLOUT.  
J.A.C.S. (1960), 82, 2268.

- (14) E.R.BLOUT, R.H.KARLSON. J.A.C.S. (1958), 80, 1259.
- (15) E.M.BRADBURY, A.R.DOWNIE, A.ELLIOTT et W.E.HANBY  
Proc.Roy.Soc. (1960), A259, 110.
- (16) E.M.BRADBURY, L.BROWN, A.R.DOWNIE, A.ELLIOTT, W.E.  
HANBY et T.R.R.Mc DONALD Nature, (1959), 183, 1786
- (17) E.M.BRADBURY, A.R.DOWNIE, A.ELLIOTT et W.E.HANBY  
Nature (1960), 187, 320.
- (18) E.SHECHTER, G.SPACH et H.BENOIT. J.Chim.Phys. (1962)  
1179.
- (19) M.HASHIMOTO et S.ARAKAWA. Bull.Chem.Soc.Japan.(1967);  
40, 1698.
- (20) E.R.BLOUT. Biopolymers Symp (1964), 1, 397.
- (21) J.B.ARAGÃO et M-H.LOUICHEUX. J.Chim.Phys. (1971), 1578.
- (22) C.DUFLOT-DEWAELE Thèse 3ème cycle Lille (1973).
- (23) D.F.BRADLEY, M.GOODMAN, A.FELIX et R.RECORDS.  
Biopolymers (1966), 4, 607.
- (24) M.GOODMAN, A.M.FELIX, C.M.DEBER et A.R.BRAUSE.  
Biopolymers (1964), 1, 409.
- (25) J.B.ARAGÃO Thèse 3ème cycle. Strasbourg (1970).
- (26) G.SPACH, F.HEITZ. C.R.Acad.Sci.Paris (1973), t276,  
C, 1373.
- (27) G.SPACH, A.BRACK et F.HEITZ. C.R.Acad.Sci.Paris.  
(1968), t267, C, 809.

.../...

- (28) F.HEITZ et G.SPACH. *Macromolecules* (1971), 4, 429.
- (29) F.A. BOVEY, J.J. RYAN, G.SPACH et F.HEITZ. *Macromolecules*. (1971), 4, 433.
- (30) J.T. EDSALL, P.J. FLORY, J.C. KENDREW, A.M. LIQUORI, G. NEMETHY et G.N. RAMACHANDRAN. *J. Mol. Biol.* (1966), 15, 399.
- (31) F.T. HESSELINK, H.A. SCHERAGA. *Macromolecules* (1972), 4, 455.
- (32) P. DE SANTIS, R. RIZZO et M. SAVINO. *Macromolecules* (1973) 4, 520.
- (33) P. DE SANTIS, E. FORNI et R. RIZZO. *Biopolymers* (1974), 13, 313.
- (34) P. DE SANTIS, S. MOROSETTI et R. RIZZO. *Macromolecules*. (1974), 1, 52.
- (35) E.R. BLOUT et R.H. KARLSON. *J.A.C.S.* (1956), 78, 941.
- (36) F. FUCHS. *Ber.* (1922), 55, 2943.
- (37) A.C. FARTHING. *J. Chem. Soc.* (1950), 32, 13.
- (38) E. FISCHER et K. OTTO. *Ber. Deut. Chem. Ges.* (1903), 34, 2106.
- (39) Pour une revue concernant ce problème voir par exemple : "The Peptides" Vol I. E. SCHRÖDER et K. LÜBKE. Academic Press (1965).
- (40) G. AMIARD, R. HEYMES, L. VELLUS, *Bull. Soc. Chim. France*. (1955), p 191.
- (41) K. RUHLMANN et U. KAUFMANN. *Ann. Chem. Liebigs.* (1962), 656 p22.



- (42) S.G.WALEY. Chim.Ind (London) (1953),107.
- (43) J.C.SHEEMAN et V.S.FRANK.J.A.C.S. (1949),71, 1856.
- (44) L.ZERVAS, D.BOVORAS et E.GAZIS.J.A.C.S. (1963),85, 3660.
- (45) M.BERGMAN et L.ZERVAS. Ber.Deut.Chem.Ges. (1932),65,  
1192.
- (46) F.C.Ma.KAY et N.F.ALBERTSON.J.A.C.S. (1957),79, 4686.
- (47) J.CURTIUS.Ber (1902),35, 3236.
- (48) N.IZUMIYA et M.MURAOKA, J.A.C.S. (1969),91, 2391.
- (49) N.IZUMIYA et S.MAKISUMI. J.Chem.Soc.Japan (1957), 78,  
662, p.1768.
- (50) T.WIELAND, W.KERN et R.SHRING.Ann. (1950), 117, 569.
- (51) R.A.BOISSONAS. Helv.Chim.Acta (1951), 34, 874.
- (52) R.D.COWELL et J.H.JONES. J.Chem.Soc. (1971),C, 1082.
- (53) Y.TRUELLE. Chem.Comm. (1971),639.
- (54) J.KOVACS, M.Q.CEPRINI, C.A.DUPRAZ. G.N.SCHMIT.  
J.Org.Chem. (1967), 32, 3696.
- (55) J.KOVACS, G.N.SCHMIT et B.J.JOHNSON. Can.J.Chem.  
(1969), 47, N19.
- (56) J.KOVACS, L.KISFALUDY, M.Q.CEDRINI.J.A.C.S. (1967),  
89, 183.
- (57) G.SPACH, A.BRACK.C.R.Acad.Sci.Paris. (1967), t264, C  
2023.

- (58) E.DELLACHERIE, P.HUBERT, J.NEEL.C.R.Acad.Sci.Paris.  
(1972), t274, C,556.
- (59) J.H.JONES et G.T.YOUNG. J.Chem.Soc. (1968),C, 436.
- (60) J.R.Mc DERMOTT et N.L.BENOITON. Can.J.Chem. (1973),  
51, n° 15, 2562.
- (61) H.G.KHORANA. Chem.Rev. (1953),53, 145.
- (62) M.GOODMAN et K.C.STUEBEN.J.Org.Chem. (1962),27, 3409.
- (63) M.GOODMAN et M.J.Mc.GAHREN. Tetrahedron (1967),23, 2031.
- (64) M.BODANSKY et M.A.ONDETTE " Peptide Synthesis" John  
Wiley and sons, New York (1966).
- (65) F.C.STEWART et R.LEDGER. Aust.J.Chem. (1965),18, 1477.
- (66) M.H.LOUICHEUX et J.PARROD. C.R.Acad.Sci.Paris. (1968),  
267, 614.
- (67) A.BRACK et G.SPACH.Bull.Soc.Chim.France (1971),12, 4481.
- (68) W.G.MILLER, D.A.BRANT et P.J.FLORY. J.Mol.Biol. (1967),  
23, 67.
- (69) P.HUBERT et E.DELLACHERIE.J.Chromatography (1973),80, 144.
- (70) D.L.PETERSON, W.T.SIMPSON.J.A.C.S. (1953),79, 2375.
- (71) W.MOFFITT et J.T.YANG. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. (1956),  
42, 596.
- (72) E.SHECHTER et E.R.BLOUT.P.N.A.S. (1964), 51, 974.
- (73) G.HOLZWARTH et P.DOTY.J.A.C.S. (1965), 87, 218.

- (74) M.L.TIFFANY et S.KRIMM. Biopolymers (1969), 8, 347.
- (75) P.LE BARNY. Thèse 3ème cycle (1972).Lille.
- (76) P.LE BARNY et M.H.LOUCHEUX. Biopolymers (1973), 12, 2831.
- (77) N.GREENFIELD et G.D.FASMAN. Biochemistry (1969), 8, 4108.
- (78) F.QUADRIFOGLIO et D.W.URRY.J.A.C.S. (1968), 90, 2760.
- (79) B.LOTZ, F.HEITZ et G.SPACH. C.R.Acad.Sci.Paris. (1973), t276, C, 1715.
- (80) S.MIZUSHIMA. Structure of Molecules and internal rotation. Academic Press, New York (1954).
- (81) J.P.AUBERT.D.E.A. (1973) Lille.
- (82) D.W.URRY. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. (1971), 68, 672.
- (83) T.MIYAZAWA.E.R.BLOUT.J.A.C.S. (1961), 83, 712.
- (84) S.KRIMM. J.Mol.Biol. (1962),4, 528.

