

50376  
1975  
186

N° d'ordre :

50376  
1975  
186

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

Jacky ESTEVEZ

ETUDE DE LA TRANSITION HELICE - CHAINE DANS  
LES POLYPEPTIDES. COPOLYMERES STATISTIQUES D'ACIDE  
L GLUTAMIQUE ET DE L GLUTAMATE DE 2 NITROBENZYLE.



Soutenu le 31 Octobre 1975, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury :	Président :	M. C. LOUCHEUX
	Rapporteur :	Mme M.H. LOUCHEUX
	Examineur :	M. H. SLIWA
	Membre invité :	M. S. PREMILLAT
	Membre invité :	M. G. WEILL

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DEHEUVELS  
DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET,  
KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. L'HOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE,  
MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN,  
ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEFAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie

M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M.	COULON Jean	Electrotechnique
Mlle	DACHARRY Monique	Géographie
M.	DEBENEST Jean	Sciences Economiques
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme	EVRAUD Micheline	Chimie Appliquée
M.	FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie
M.	FROELICH Daniel	Chimie Physique
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle	KOSMAN Yvette	Géométrie
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mlle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M.	LEROY Yves	Electronique
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M.	LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
M.	MACKÉ Bruno	Physique
M.	MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
M.	MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M.	MESSÉLYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M.	NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M.	PAQUET Jacques	Biologie Générale
M.	PARSY Fernand	Mécanique
M.	PECQUE Marcel	Chimie Physique
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie
Mlle	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	STEEN Jean-Pierre	Informatique

M.	THERY Pierre	Electronique
M.	TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M.	TREANTON Jean-René	Sociologie
M.	VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M.	VILLETTE Michel	Mécanique
M.	MALLART Francis	Chimie
M.	WERNIER Georges	Informatique
M.	WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme	ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chimie Macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, dirigé par Monsieur le Professeur C.LOUCHEUX. Madame M.H.LOUCHEUX, Maître de Recherches au CNRS m'a proposé ce sujet et en a suivi le développement avec intérêt.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur C.LOUCHEUX, Madame M.H.LOUCHEUX ainsi qu'à Messieurs P.LE BARNY et M.MORCELLET, pour la formation de chercheur qu'ils m'ont donnée.

Je remercie Messieurs H.SLIWA, Professeur à l'Université de Lille I; S.PREMILLAT, Professeur à l'Université de Nancy I et G.WEILL, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Je suis heureux d'associer tous mes camarades de laboratoire qui m'ont aidé à la réalisation de ce travail dans une atmosphère chaleureuse et détendue.

Madame M.P.HILDEBRAND a assuré avec soin la dactylographie de ce mémoire, Mesdames SAINLEGER et THOMAS en ont réalisé l'impression. Je les en remercie vivement.

P L A N

--00 0 00--

INTRODUCTION (p.1)

PREMIER CHAPITRE (p.5)

Préparation et caractérisation des copolymères.

DEUXIEME CHAPITRE (p.12)

Etude par dichroïsme circulaire.

TROISIEME CHAPITRE (p.55)

Etude potentiométrique.

CONCLUSION (p.86)

## G L O S S A I R E

--00 0 00--

- PLGA Acide poly L glutamique.
- PLGB Polyglutamate de benzyle.
- NCA Anhydride N carboxyaminé (Anhydride de Leuchs).
- DMF Diméthylformamide.
- EtOH Ethanol.
- I Pr OH Isopropanol.
- $[\theta]$  Ellipticité molaire.
- $\lambda$  Longueur d'onde.
- $\alpha$  Coefficient de dissociation.
- $\Phi_{NO_2}$  Résidu glutamate de 2 nitrobenzyle.
- Lorsque la configuration des acides aminés n'est pas précisée il s'agit de la configuration L.



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

--00 0 00--

Les analogies entre les propriétés physicochimiques des poly  $\alpha$  acides aminés et des protéines ont permis de trouver de bons modèles pour l'étude des facteurs responsables de la stabilité conformationnelle des protéines. Les premières études par dispersion optique rotatoire (D.O.R.) ont été réalisées sur l'acide polyglutamique (PLGA) et sur le polyglutamate de benzyle (PLGB). (1-2).

La synthèse de PLGA de haute masse moléculaire (3-5) a permis l'étude de la transition hélice-chaîne dans des mélanges de solvants (2; 6-7). Comme le PLGA est le premier polypeptide sur lequel des études de DOR aient été réalisées beaucoup d'auteurs l'ont utilisé pour étudier la stabilité relative de l'hélice  $\alpha$  dans différentes conditions.

FASMAN (8) fut le premier à étudier les effets de l'incorporation d'un acide aminé à chaîne latérale non ionisable (la leucine) sur la stabilité de l'hélice  $\alpha$  d'une chaîne de PLGA en milieu aqueux. Cette étude a été réalisée du fait de l'importance des interactions hydrophobes observées dans les protéines natives (9-12). En effet les protéines globulaires contiennent en moyenne 35 à 45% d'acides aminés à chaîne latérale non ionisable, c'est à dire essentiellement alanine, leucine, isoleucine, phénylalanine, valine, tryptophane.

Les conséquences des interactions hydrophobes ont été examinées d'un point de vue thermodynamique (9-12) et il a été admis que ces interactions pouvaient jouer un rôle important dans la stabilisation de la structure secondaire des protéines.

Pour évaluer ces phénomènes les chercheurs ont étudié des modèles simplifiés. Pour cela ils ont synthétisé des copolymères constitués d'un acide aminé à chaîne latérale ionisable (acide glutamique, lysine) et d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe.

Deux types de copolymères ont été étudiés :

- copolymères statistiques : ces copolymères sont préparés par polymérisation du mélange des anhydrides de Leuchs (NCA's) des deux acides aminés. Des études cinétiques ont montré que les vitesses de réaction des anhydrides de Leuchs étaient identiques et indépendantes de la chaîne latérale (13;14), ce qui amenait une distribution statistique des deux types d'acides aminés.

C'est ainsi qu'ont été étudiés les copolymères suivants :

- acide glutamique - alanine (15) ; acide glutamique - leucine (8; 16-21); acide glutamique - phénylalanine (22); acide glutamique - proline (23); acide glutamique - tyrosine (24-25); lysine - alanine (26); lysine - leucine (27); lysine - phénylalanine (28-30). Citons également les récents travaux de H.A. ARFMANN (31-32) sur différents acides aminés à chaîne latérale hydrophobe.

- copolymères en bloc : dans ce cas une chaîne polypeptidique constituée d'acides aminés à chaîne latérale hydrophobe est mise en " sandwich " entre deux chaînes polypeptidiques constituées d'acides aminés à chaîne latérale ionisable. On a alors un copolymère de type A-B-A. Les copolymères de type A-B ont été également étudiés. Dans ces types de polymères la chaîne polypeptidique ionisable ne sert qu'à solubiliser la chaîne polypeptidique non ionisable et permettre ainsi son étude en milieu aqueux. La chaîne polypeptidique ionisable est constituée du mélange racémique ... ceci pour permettre l'étude en DOR ou en dichroïsme circulaire de la chaîne polypeptidique hydrophobe seule. Pour synthétiser ces produits on réalise une polymérisation des NCA's en trois étapes.

La méthode de Merrifield a également été utilisée pour préparer de tels polymères (33) : dans ce cas la séquence d'acides aminés hydrophobes de longueur voulue est préparée par cette méthode et est ensuite placée en "sandwich" entre les deux séquences qui la solubilisent préparées par NCA's. Les copolymères suivants ont été étudiés : -DL lysine - alanine - DL lysine (33); acide DL glutamique - phénylalanine - acide DL glutamique (34-35); acide DL glutamique - leucine - acide DL glutamique (34-35); DL lysine - valine - DL lysine (36); DL lysine - leucine - DL lysine (37); acide DL glutamique - alanine - acide DL glutamique (38).

Dans le travail présenté ici nous avons étudié des copolymères statistiques acide glutamique-glutamate de 2 nitrobenzyle. Les résidus glutamate de 2 nitrobenzyle jouent le rôle de groupements hydrophobes.

Nous avons synthétisé ces copolymères par estérification partielle d'un échantillon de PLGA. Cinq copolymères ont été ainsi préparés dont le pourcentage en résidus glutamate de 2 nitrobenzyle est compris entre 3 et 22% ( il ne nous a pas été possible de dépasser ce taux pour des raisons de solubilité des polymères).

RAO et MILLER (39) avaient préparé des copolymères statistiques acide glutamique - glutamate de benzyle par débenzylation partielle d'échantillons de PLGB et avaient observé lors d'une étude succincte en dichroïsme circulaire, une stabilisation de la structure hélicoïdale.

Le groupement 2 nitrobenzyle a été choisi pour plusieurs raisons :

- il possède un caractère hydrophobe marqué du à son cycle aromatique ( cet effet est partiellement compensé par l'effet de solubilisation du au groupement nitro ce qui permet d'avoir un polymère soluble jusqu'au taux de 22% de  $\Phi$  NO<sub>2</sub> ).

De plus ce groupement étant encombrant on pouvait s'attendre à des effets marqués.

- il possède des bandes d'absorption en lumière ultra violette (U.V), bien caractérisées, intenses et distinctes de celles du chromophore peptidique.

- enfin il est susceptible de présenter une activité optique dans ses bandes d'absorption; l'étude par dichroïsme circulaire pourra donc donner une indication sur le comportement de la chaîne latérale et permettra de relier ce comportement aux variations de la structure secondaire du polypeptide.

En effet des études réalisées sur l'homopolyglutamate de 2 nitrobenzyle (40) ainsi que sur des copolymères statistiques aspartate de 2 nitrobenzyle - aspartate de benzyle (41) dans des mélanges de solvants organiques avaient permis de relier les variations des bandes dichroïques extrinsèques aux variations de la structure secondaire des polymères.

Le dichroïsme circulaire nous a fourni des renseignements sur la structure secondaire de nos produits ainsi que sur le comportement de la chaîne latérale au cours des transitions chaîne statistique-hélice  $\alpha$ , induites par modification du pH. Cette étude nous a permis de préciser l'origine de l'effet Cotton extrinsèque de l'une des bandes dichroïques du groupement 2 nitrobenzyle.

L'étude potentiométrique nous a permis de préciser les paramètres thermodynamiques liés à la stabilisation de la structure secondaire observée en dichroïsme circulaire.

P R E M I E R   C H A P I T R E

-=00 0 00=-

Préparation et caractérisation des  
copolymères.

1-1. Préparation du PLGA.

1-2. Estérification du PLGA.

1-3. Caractérisation des produits.

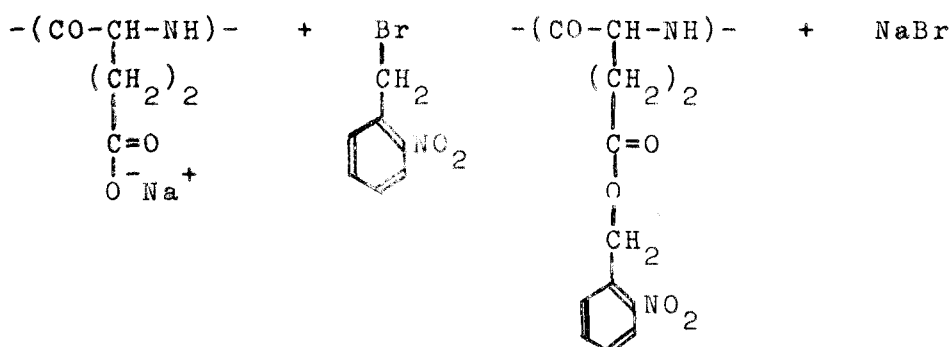
1-3-1. Détermination du taux d'estérification.

1-3-2. Mesure des masses moléculaires.

1-3-3. Stabilité de la fonction ester.

Nous avons synthétisé cinq copolymères dont le pourcentage en résidus glutamate de 2 nitrobenzyle est compris entre 3 et 22%.

Ces polymères ont été préparés par action du bromure de 2 nitrobenzyle sur le sel de sodium du PLGA.



Le bromure de 2 nitrobenzyle est soluble uniquement en milieu organique. Par contre le sel de sodium du PLGA n'est soluble qu'en milieu aqueux. Ces considérations nous ont amené à réaliser la réaction en solvant mixte (eau-diméthylformamide).

### 1-1. Préparation du PLGA.

Le PLGA est préparé à partir du polyglutamate de benzyle.

Le polyglutamate de benzyle (PLGB) est préparé par polymérisation de l'anhydride de Leuchs (NCA) du glutamate de benzyle dans le dioxanne (42). L'amorceur utilisé étant la triéthylamine. Le rapport molaire  $\frac{\text{monomère}}{\text{amorceur}}$  étant égal à 50.

Le PLGA est ensuite obtenu par débenzylation du PLGB par le bromure d'hydrogène anhydre, selon la méthode de Idelson et Blout (5).

La débenzylation a été contrôlée par spectrophotométrie U.V. En effet le chromophore benzylique présente un pic d'absorption à 260 nm ( $\epsilon = 170 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Le spectre U.V d'une solution de l'échantillon de PLGA ainsi préparé ( $c=6\text{g/l}$ ; NaOH 1N; cuve 1 cm) ne montre aucun épaulement du au chromophore benzylique. On peut donc en conclure que la débenzylation est totale.

La masse moléculaire du PLGA a été déterminée par viscosimétrie. Nous avons utilisé l'étalonnage de Wada (6) qui permet d'obtenir la masse moléculaire en poids  $M_w$ .

Les mesures ont été faites dans NaCl 0,2M à pH 7,3 la concentration étant de 1g pour 100 ml.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

$$\eta = 130,6 \text{ cm}^3/\text{g}; \quad M_w = 61.000$$

#### 1-2. Estérification du PLGA.

L'opération se fait en deux temps : le PLGA est tout d'abord salifié par la soude; on fait réagir ensuite le bromure de 2 nitrobenzyle sur le sel de sodium du PLGA.

L'expérience montre qu'il faut toujours mener la réaction en présence d'un excès de bromure par rapport au taux de nitrobenzyle désiré dans le polymère. Ceci est certainement dû à une hydrolyse par le DMF en milieu aqueux, la liaison ester de 2 nitrobenzyle étant peu stable à pH basique.

#### Mode opératoire. Tableau 1-1.

Dans une fiole de 100ml on dissout 1g de PLGA dans 50ml de DMF; on chauffe légèrement pour hâter la dissolution. Lorsque la solution est limpide on ajoute lentement et en agitant la quantité de soude voulue dissoute dans 50ml d'eau. La viscosité de la solution augmente alors. On ajoute enfin, et de la même manière, le bromure de 2 nitrobenzyle dissout dans 10ml de DMF. Il arrive parfois que le bromure précipite. La solution est maintenue à 40°C durant trois jours sous agitation ( le

bromure se dissout dès que la solution a atteint 40°C).

Au bout de trois jours on observe un précipité pour les copolymères les plus estérifiés; on ajoute alors du DMF jusqu'à limpidité. La solution est ensuite filtrée puis mise en dialyse trois jours contre l'éthanol. On élimine ainsi le bromure de nitrobenzyle en excès et le DMF.

Le départ du bromure en excès est suivi par spectrophotométrie U.V en observant l'intensité du maximum d'absorption du groupement 2 nitrobenzyle à 268 nm ( $\epsilon_{268} = 5630 \text{ l.mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Au bout de trois jours le copolymère commence à précipiter. On dialyse alors durant 24 heures contre une solution d'acide chlorhydrique 0,1N. (Le polymère précipite alors totalement) et 24 heures contre l'eau : on élimine ainsi NaBr, NaCl et HCl.

L'adialysat est enfin liophilisé.

Le produit est ensuite mis dans un extracteur de Soxhlet et lavé douze heures par l'éther éthylique. On élimine ainsi les traces de bromure de 2 nitrobenzyle qui n'avaient pas été enlevées au moment de la dialyse.

### 1-3. Caractérisation des produits.

#### 1-3-1. Détermination du taux d'estérification.

Le taux d'estérification de nos copolymères a pu être déterminé par spectrophotométrie U.V en exploitant le fait que le groupement 2 nitrobenzyle présente une bande d'absorption intense à 268 nm.

$$\epsilon_{268} = 5630 \text{ l.mole}^{-1} \text{ .cm}^{-1}.$$

La loi de Beer-Lambert relie la densité optique (DO) du composé à sa concentration:

$$DO = \epsilon lc$$



Tableau 1-1 : Conditions expérimentales de préparation.

	Masse de PLGA de départ g	Nombre de moles de PLGA de départ	Masse de bromure de 2 nitrobenzyle ajouté mg	Nombre de moles de bromure de 2 nitrobenzyle ajouté	Masse de co-polymère obtenu g	Rendement a)	Pourcentage d'estérification b)
Cope 03	1	$7,8 \times 10^{-3}$	380	$1,76 \times 10^{-3}$	0,9	89%	3,5%
Cope 06	1,15	$8,9 \times 10^{-3}$	524	$2,43 \times 10^{-3}$	1,05	85,2%	6%
Cope 010	1	$7,8 \times 10^{-3}$	688	$3,19 \times 10^{-3}$	1,04	94%	10%
Cope 016	1	$7,8 \times 10^{-3}$	902	$4,18 \times 10^{-3}$	1,05	89%	16%
Cope 022	1,15	$8,9 \times 10^{-3}$	1310	$6,06 \times 10^{-3}$	1,04	73,8%	22%

a) Nombre de résidus de départ / Nombre de résidus de fin.

b) Nombre de résidus glutamate de nitrobenzyle pour cent.



- coefficient d'extinction molaire du composé (en l. mole<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).
- l épaisseur de la cuve en cm.
- c concentration du soluté en g/l.

Les densités optiques étant additives nous pouvons écrire dans notre cas :

$$DO = DO_1 + DO_2 = l (\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2)$$

- Les indices 1 étant reliés aux résidus glutamate de 2 nitrobenzyle et les indices 2 étant reliés aux résidus acide glutamique.

$$A_{268 \text{ nm}} \begin{cases} \epsilon_1 = 5630 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1} \\ \epsilon_2 = 11,6 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1} \end{cases}$$

Si on appelle  $M$  la masse apparente du motif monomère et sachant que les masses moléculaires des résidus acide glutamique et glutamate de nitrobenzyle sont respectivement égales à 129 et 264, nous obtenons la relation:

$$M = 264 x + 129 (1-x) = 135 x + 129.$$

dans laquelle x représente la fraction molaire en résidus glutamate de 2 nitrobenzyle ( nombre de résidus nitrobenzyle pour cent) dans le polymère.

Nous obtenons alors les relations :

$$c_1 = \frac{cx}{M} = \frac{cx}{135 x + 129} \quad c_1 = \text{concentration en résidus glutamate de 2 nitrobenzyle.}$$

$$c_2 = \frac{c(1-x)}{M} = \frac{c(1-x)}{135 x + 129} \quad c_2 = \text{concentration en résidus acide glutamique.}$$

c : concentration du copolymère en g/l.

Le pourcentage d'estérification x devient alors :

$$x = \frac{129 DO - l c \epsilon_2}{l c (\epsilon_1 - \epsilon_2) - 135 DO}$$

Les valeurs de x pour les différents copolymères sont présentées dans le tableau 1-1.

### 1-3-2 - Mesure des masses moléculaires .

Une mesure faite par ultracentrifugation sur des copolymères de 4 nitrobenzyle dont la synthèse a été menée de la même façon a montré que la masse moléculaire ne variait pas beaucoup au cours de la synthèse .

Nous avons utilisé pour cela la technique de l'équilibre de sédimentation . La masse moléculaire de l'échantillon est donné par la relation :

$$M_W = \frac{2 \log \frac{c_2}{c_1} RT}{(1 - \bar{v}_\rho) \omega^2 (r_1^2 - r_2^2)}$$

- $c_1$  concentration du soluté à la distance  $r_1$  de l'axe.
- $c_2$  concentration du soluté à la distance  $r_2$  de l'axe.
- $v$  volume spécifique partiel du soluté

$$\bar{v} = 0,7 \text{ cm}^3/\text{g}$$

L'échantillon de PLGA de départ avait une masse moléculaire en poids de 40.000 (déterminée par viscosimétrie).

Les mesures des masses des copolymères par ultracentrifugation nous ont donné une valeur de 36.000 . Nous pouvons donc affirmer qu'il n'y a pas de dégradation importante de la chaîne principale du PLGA au cours de la synthèse des copolymères . Ceci n'est pas surprenant étant donné les conditions opératoires assez douces que nous avons utilisées .

### 1-3-3. Stabilité de la fonction ester .

La fonction ester de 2 nitrobenzyle est très instable en milieu basique . L'hydrolyse se fait d'une façon quasi instantanée dans la soude normale .

---

\*Je remercie Madame M. CONIEZ qui s'est chargée des mesures d'ultracentrifugation au laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE .

Ceci nous a amené à dissoudre nos copolymères dans la quantité juste suffisante de  $\text{NaHCO}_3$  0,1N pour salifier tous les groupements carboxyliques. On ne dépasse pas ainsi pH 8. Une étude cinétique nous a montré que nos copolymères restaient stables dans ces conditions tout au long des manipulations.

## DEUXIEME CHAPITRE

--00 0 00--

Etude par dichroïsme circulaire.

2-1. Rappels théoriques.

2-2. Spectres dichroïques des polypeptides.

2-2-1. Spectre dichroïque du chromophore peptidique.

2-2-1-1. L'hélice  $\alpha$  de Pauling et Corey.

2-2-1-2. La pelote statistique.

2-2-1-3. La structure  $\beta$ .

2-2-2. Spectre dichroïque de la chaîne latérale.

2-3. Etude des spectres des copolymères.

2-3-1. Origine des bandes.

2-3-2. Spectres expérimentaux.

2-3-2-1. Méthodes d'étude.

2-3-2-1-1. Appareillage.

2-3-2-1-2. Préparation des solutions.

Ajustement des pH.

2-3-2-2. Etude des spectres en fonction du pH.

2-3-2-2-1. Bandes intrinsèques.

2-3-2-2-2. Bandes extrinsèques.

2-4. Conclusion.

Le dichroïsme circulaire est une méthode intéressante pour connaître d'une façon précise la structure secondaire des polypeptides. En effet les trois structures secondaires rencontrées le plus fréquemment dans les polypeptides (hélice  $\alpha$ ; pelote statistique; chaîne  $\beta$ ) ont un spectre caractéristique et bien connu. Cette méthode est également capable de nous fournir des renseignements sur la chaîne latérale dans la mesure où celle-ci possède un chromophore absorbant en ultra-violet.

### 2-1. Rappels théoriques.

L'activité optique est due à une différence de vitesse pour les composantes droite et gauche ( $E_D$  et  $E_G$ ) du vecteur électrique, d'une lumière circulairement polarisée. Ce phénomène est appelé biréfringence circulaire.

Lorsqu'une lumière circulairement polarisée traverse un milieu contenant des chromophores optiquement actifs le phénomène de biréfringence circulaire est accompagné d'un phénomène de dichroïsme circulaire (les composantes  $E_D$  et  $E_G$  du vecteur électrique sont absorbées de façon différente). La lumière devient alors elliptiquement polarisée.

Si on appelle  $\Psi$  l'ellipticité, on peut la relier aux indices d'absorption  $\chi_G$  et  $\chi_D$  de la lumière circulairement polarisée droite et gauche:

$$\Psi = \frac{\pi}{\lambda} (\chi_G - \chi_D) l$$

- $\lambda$  étant la longueur d'onde de la lumière incidente.
- $l$  est la longueur de l'échantillon traversée par la lumière incidente.

Si on remplace  $\chi_G$  et  $\chi_D$  par leur expression en fonction de  $\epsilon_G$  et  $\epsilon_D$ , les coefficients d'extinction molaire pour la lumière polarisée gauche et la lumière polarisée droite :

$$\chi = 2,303 \epsilon c$$

$c$  étant la concentration du soluté en mole/l.

nous obtenons alors la relation :

$$[\psi] = \frac{\psi}{lc} = \frac{3300 (\epsilon_G - \epsilon_D)}{M_0}$$

$M_0$  est la masse moléculaire du produit.

$|\psi|$  est l'ellipticité spécifique.

L'ellipticité molaire est donnée par la relation :

$$[\theta] = M_0 [\psi] = 3300 \Delta \epsilon$$

$[\theta]$  s'exprime en degré.décimole<sup>-1</sup>.cm<sup>2</sup>.

## 2-2. Spectres dichroïques des polypeptides.

Deux types de chromophores sont susceptibles de présenter des effets Cotton dans les polypeptides et les protéines :

- le chromophore peptidique -CO-CH- qui présente dans la région 180-250 nm un spectre dichroïque caractéristique de la structure secondaire adoptée par le polymère. Ces bandes sont dites intrinsèques.

- lorsque la chaîne latérale des acides aminés possède un groupement chromophore (ex : tyrosine;phénylalanine; tryptophane ; cystéine ; histidine), ce chromophore peut présenter des effets Cotton dans sa zone d'absorption. Ces effets Cotton sont dits extrinsèques.

### 2-2-1. Spectre dichroïque du chromophore peptidique.

Entre 180 et 250 nm le chromophore peptidique présente deux bandes d'absorption :

- la bande  $n \rightarrow \pi^*$  due au -C=O, centrée vers 220 nm.
- la bande  $\pi \rightarrow \pi^*$  due au doublet libre de l'azote centrée vers 190 nm.

Lorsque le polypeptide adopte la structure  $\alpha$  hélicoïdale la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  peut prendre une allure plus complexe (Fig.2-1). Ceci est dû à la résonance excitonique née du couplage des moments de transition des chromophores.

Spectres UV et dichroïque d'un polypeptide sous  
forme hélice

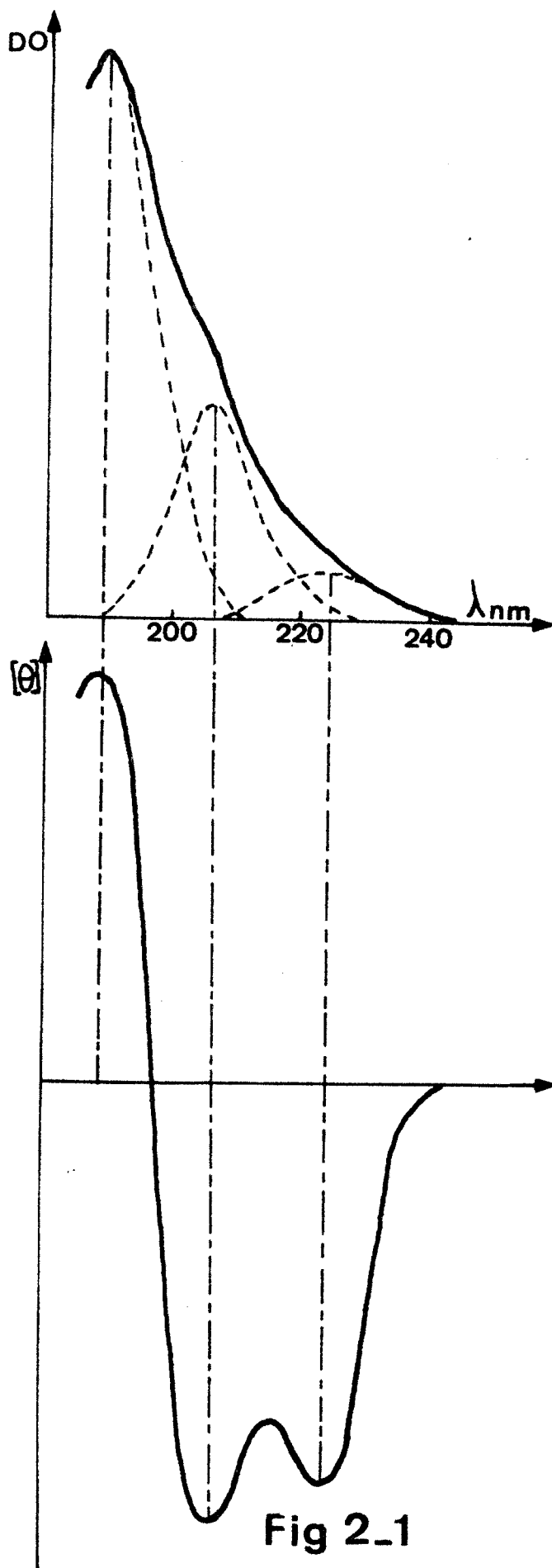


Fig 2\_1





On observe alors deux bandes :

- la bande  $\pi \rightarrow \pi^*$  // centrée à 208 nm.
- la bande  $\pi \rightarrow \pi^*$   $\perp$  centrée à 190 nm.

La bande  $n \rightarrow \pi^*$  ainsi que la bande  $\pi \rightarrow \pi^*$  (ou ses deux composantes dans le cas de l'hélice  $\alpha$ ) sont dichroïques et leur spectre est caractéristique de la structure secondaire du polypeptide.

Les polypeptides peuvent présenter trois types de structure secondaire dont les spectres dichroïques sont bien connus (Fig.2-2).

- l'hélice  $\alpha$  de Pauling et Corey.
- la structure  $\beta$  (en feuillet plissé).
- la pelote statistique.

D'après le figure 2-2 nous voyons que les spectres des trois structures peuvent varier assez bien. Ceci peut être du aux caractéristiques de l'appareil mais également à la nature du solvant utilisé. Le spectre de la chaîne statistique présenté dans la figure 2-2 est du type de celui obtenu à partir du PLGA en milieu basique ou de la polylysine en milieu acide. Quant au spectre de la structure  $\beta$  il n'est pas possible de faire la différence entre  $\beta$  parallèle et  $\beta$  antiparallèle.

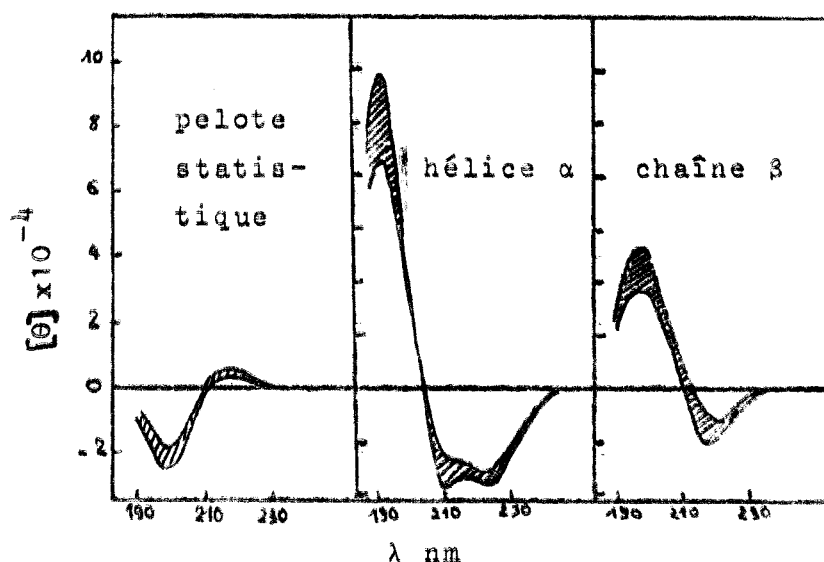


Fig.2-2. D'après W.B.GRATZER et D.A. COWBURN (43). Spectres dichroïques des homopolypeptides dans les trois conformations. Les surfaces hachurées indiquent le domaine des valeurs mesurées, d'après la littérature.

2-2-1-1. L'hélice  $\alpha$  :

L'hélice  $\alpha$  droite est la forme organisée rencontrée le plus souvent dans les polypeptides dont les acides aminés sont de configuration L. Cette structure est maintenue par des ponts hydrogène intramoléculaires.

Le spectre dichroïque est composé de trois bandes (Fig.2-1):

- une bande négative à 222 nm correspondant à la transition  $n \rightarrow \pi^*$  du chromophore peptidique.

- une bande négative à 209 nm et une bande positive à 190 nm correspondant respectivement aux transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisées parallèlement et perpendiculairement à l'axe de l'hélice.

La bande à 208 nm a sensiblement la même intensité que la bande à 222 nm. La bande à 190 nm est environ deux fois plus intense.

Dans le cas de l'hélice  $\alpha$  gauche (ex : polyaspartate de benzyle en solution dans le chloroforme) le signe des bandes est inversé mais l'intensité ne varie pas.

L'ellipticité au maximum de la bande  $n \rightarrow \pi^*$ , à 222 nm a souvent été utilisée pour calculer directement le pourcentage d'hélicité lorsque l'on a affaire au mélange des deux structures hélice  $\alpha$  -pelote statistique. En effet on observe que l'ellipticité à 222 nm est égale à  $-35.000 \pm 5.000$  dans le cas de polypeptides adoptant une configuration  $\alpha$  hélicoïdale (44-49), alors que l'ellipticité correspondant à la forme inordonnée est de l'ordre de  $+ 4.000 \pm 500$  à 222 nm.

Dans le cas de nos copolymères nous choisirons une valeur de  $[\theta]_{222}$  égale à  $-40.000$  lorsque le polymère est entièrement sous forme  $\alpha$  hélicoïdale, cette valeur ayant été observée sur le PLGA dans NaCl 0,2M (50).

On peut alors en déduire le pourcentage d'hélicité :

$$H \% = \frac{(4.000 - [\theta]_{222}) \times 100}{44.000}$$

Nous avons également calculé les pourcentages d'hélicité par la méthode des moindres carrés non linéaires\* à partir des spectres de référence des trois structures secondaires : hélice  $\alpha$  , chaîne statistique, structure  $\beta$  . Les spectres de l'hélice  $\alpha$  et de la chaîne statistique sont ceux du PLGA dans NaF 0,2M respectivement à pH 4,6 et pH 6,4. Celui de la structure  $\beta$  étant celui de la polylysine donné par GREENFIELD et FASMAN (45).

Ces calculs ne nous ont pas permis de mettre en évidence de structure  $\beta$  dans nos copolymères.

Les valeurs de l'hélicité sont reportées dans le tableau 2-1. Dans les études qui suivent nous utilisons les valeurs calculées par la deuxième méthode, plus rigoureuse.

Nous voyons qu'il existe des différences assez importantes entre les valeurs de l'hélicité calculées selon les deux méthodes, lorsque le taux d'hélicité est faible. Malgré les différences observées la transition se situe pour des valeurs de pH identiques.

#### 2-2-1-2. La pelote statistique.

Si le spectre de l'hélice  $\alpha$  est bien connu et bien défini il n'en est pas de même de celui de la pelote statistique (structure désordonnée).

La plupart des auteurs admettent comme spectre de la pelote statistique le spectre du PLGA à pH basique en présence d'un électrolyte fort (NaCl 0,2M) (47; 51-53). Selon BALASUBRAMANIAN ce spectre est caractérisé par une bande faible et positive vers 215 nm et une forte bande négative vers 190 nm (Fig 2-3).

D'autres auteurs (54-59) dont notamment TIFFANY et KRIMM proposent un autre spectre (Fig 2-3) caractérisé par une seule bande négative vers 200 nm. Ils obtiennent un tel spectre à partir du PLGA après chauffage ou en présence de  $\text{LiClO}_4$  4,5M ainsi que sur le collagène dénaturé par la chaleur. D'après eux

---

\*Je remercie Jean-Marie FREYSSINET, Chercheur à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, qui a bien voulu se charger de ces calculs sur ordinateur.

TABLEAU 2-1.

Copo 0 <sub>3</sub>	pH	6,8	5,54	5,38	5,29	5,14	5,00	4,86	4,70
	%H $\text{O} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix} 222$	4	10	20	26	44	70	92	98
	%H moindres carrés	0	0	4	11	36	66	91	100
Copo 0 <sub>6</sub>	pH	6,4	5,46	5,28	5,07	4,93	4,77		
	%H $\text{O} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix} 222$	5	20	30	50	87	100		
	%H moindres carrés	0	5	18	57	88	100		
Copo 0 <sub>10</sub>	pH	7,29	5,57	5,38	5,24	5,16	5,1	4,78	
	%H $\text{O} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix} 222$	6	19	33	42	61	70	100	
	%H moindres carrés	0	5	23	33	54	70	100	
Copo 0 <sub>16</sub>	pH	6,37	5,87	5,65	5,53	5,42	5,24	5	
	%H $\text{O} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix} 222$	11	19	28	35	48	72	96	
	%H moindres carrés	2	4	12	23	42	72	96	
Copo 0 <sub>22</sub>	pH	7,24	6,56	6,42	6,11	5,98	5,75	5,56	5,28
	%H $\text{O} \begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix} 222$	18	21	24	30	35	48	64	79
	%H moindres carrés	4	9	10	20	23	27	59	73

Valeurs du pourcentage d'hélicité calculées selon les deux méthodes.

le spectre comportant une bande positive serait dû à des fractions d'hélice étendue par analogie à celui obtenu sur la polyproline II (57). La polyproline II est sous forme hélice gauche à trois résidus par tour et dans laquelle les résidus proline sont en position trans.

Selon ces deux auteurs les répulsions entre groupements latéraux chargés de certains polypeptides tels que le PLGA en milieu basique ou la polylysine en milieu acide induiraient une conformation hélicoïdale étendue. Or le spectre comportant une bande positive a été également observé sur des polypeptides ne possédant pas de charges dans leur chaîne latérale (ex : polypeptides en présence de TFA ou ADC (60) ou bien polyglutamines N substituées en milieu aqueux (53)). L'acide poly  $\beta$  aspartique ainsi que l'acide poly  $\gamma$  glutamique, à pH 12 présentent également ce type de spectre, bien que les charges soient plus éloignées les unes des autres (52).

On ne peut donc dire que le spectre comportant une bande positive soit dû à une configuration étendue induite par répulsion de charge; car dans ce cas elle ne devrait pas apparaître dans des polypeptides non chargés et devrait être sensible à la distance entre charges, ce qui ne se produit pas dans le cas des acides poly  $\beta$  aspartique et poly  $\gamma$  glutamique.

QUADRIFOGLIO et URRY (61) obtiennent sur la polysérine dans LiCl 8M un spectre proche de celui obtenu par TIFFANY et KRIMM (54) sur le PLGA dans LiClO<sub>4</sub> 4,5M après chauffage à 50°C. Selon eux cette bande négative serait due aux ions Li<sup>+</sup> : il y aurait interaction spécifique avec le groupement -CO-NH ou bien les ions Li<sup>+</sup> amèneraient des valeurs des angles  $\phi$  et  $\psi$  telles qu'il y aurait apparition d'une bande négative vers 220 nm.

Les calculs théoriques (62-63) n'ont pas permis jusqu'à maintenant d'élucider le problème.

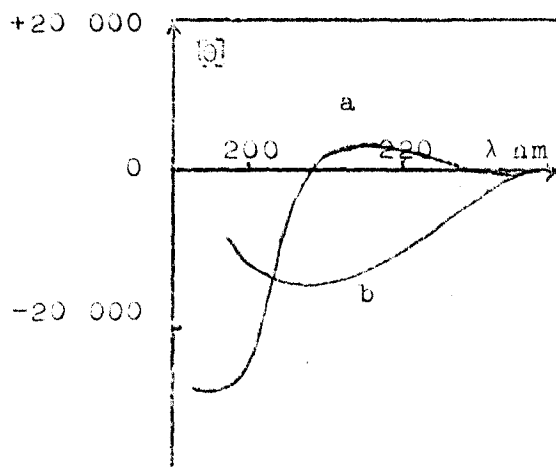


Fig.2-3. Spectre dichroïque de la pelote statistique.

a) selon BALASUBRAMANIAN.

b) selon TIFFANY et KRIMM.

#### 2-2-1-3. La structure $\beta$ (en feuillet plissé).

Cette structure se rencontre assez peu dans les polypeptides de synthèse. Elle est observée surtout sur des polymères de faible masse moléculaire. Elle est maintenue par des ponts hydrogène intermoléculaires.

Le spectre dichroïque est caractérisé par une bande négative vers 215 nm et une bande positive vers 195 nm (Fig 2-2). La littérature donne des spectres d'intensités très différentes selon les auteurs. Ceci est certainement dû au fait qu'il peut y avoir une structure  $\beta$  parallèle et une structure  $\beta$  anti-parallèle.

#### 2-2-2. Spectres dichroïques dus à la chaîne latérale.

Certains acides aminés naturels possèdent un chromophore dans leur chaîne latérale absorbant dans le proche ou le lointain U.V (tyrosine, phénylalanine, tryptophane, histidine, cystéine). Ces chromophores sont susceptibles de présenter des effets Cotton dits "extrinsèques" en dichroïsme circulaire.

On a proposé plusieurs origines possibles à ces effets Cotton :

- l'asymétrie créée par l'hélice induirait une asymétrie au niveau du chromophore de la chaîne latérale. BLOUT (64) signale qu'un polyglutamate de benzyle portant en bout de chaîne un seul chromophore présente aussi un effet Cotton induit dans la bande d'absorption de ce groupement. Dans des copolymères tyrosine acide glutamique on a également observé une augmentation de la bande dichroïque du résidu tyrosyl avec le taux d'hélicité (25).

- le carbone asymétrique pourrait être également responsable d'une asymétrie du chromophore de la chaîne latérale. Ceci a été observé sur des acides aminés à chaîne latérale aromatique (65-67).

- enfin les interactions entre chaînes latérales seraient capables d'induire également des effets Cotton du chromophore latéral (68-69).

Dans les cas des polypeptides ces trois effets se trouvent présents et les nombreux travaux réalisés sur des homopolypeptides ou des copolypeptides n'ont pas permis de séparer ces trois effets (40-41; 70-73).

### 2-3. Etude des spectres des copolymères.

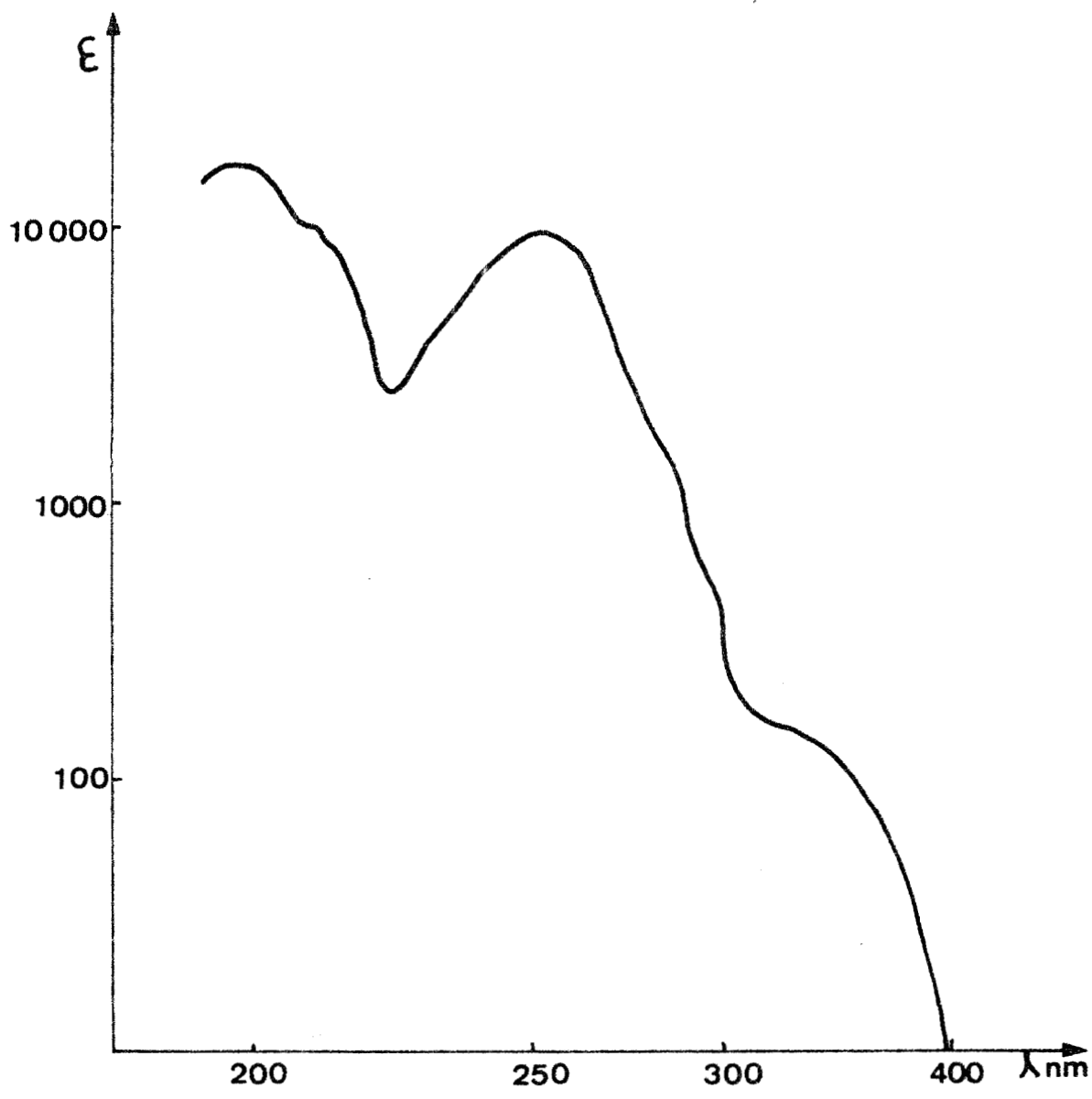
#### 2-3-1. Origine des bandes.

En plus des bandes dues au chromophore peptidique nous pouvons observer trois autres bandes dues au groupement 2 nitrobenzyle.

Si nous étudions le spectre U.V du nitrobenzène en solution dans un hydrocarbure saturé nous voyons quatre bandes d'absorption entre 200 et 400nm (Fig.2-4):

- une faible bande vers 330nm ( $\epsilon_{\max} = 140$ ) due à une transition  $n \rightarrow \pi^*$  d'un électron d'une orbitale non liante de l'atome d'oxygène du groupement nitro vers une orbitale anti-liante.

- un épaulement vers 280nm ( $\epsilon_{\max} = 640$ ). L'origine de cette bande est controversée. Certains auteurs affirment qu'il s'agirait de la bande  $\alpha$  du cycle aromatique (74). D'autres auteurs (75) considèrent cette bande comme étant due à une transition  $n \rightarrow \pi^*$  du groupement nitro.



Spectre UV du nitrobenzene

Fig 2.4





- une bande intense vers 250 nm. ( $\epsilon_{\max} = 8700$ ) interprétée comme une bande à transfert de charge intramoléculaire.

Cette bande est très sensible au solvant. On observe un effet bathochrome important lorsqu'on augmente la polarité du solvant (74) : Tableau 2-2.

Solvant	$\lambda_{\max}$ nm	$\epsilon_{\max}$
ϕ vapeur	240	8500
heptane	251,7	8660
méthanol	259,5	8270
eau	268,2	7710

Tableau 2-2 : Variations de  $\lambda_{\max}$  et  $\epsilon_{\max}$  de la bande à transfert de charge en fonction du solvant.

- enfin nous observons une bande très intense vers 200nm ( $\epsilon_{\max} = 15.500$ ) : la bande  $\beta$  du cycle aromatique. Les spectres dichroïques de nos copolymères entre 250nm et 400nm ont été décomposés en gaussiennes grâce au "Curve Resolver Du Pont"\*. Nous avons ainsi pu mettre en évidence trois bandes (Fig.2-5).

- une bande positive vers 250nm.
- une bande négative vers 300nm.
- une bande négative vers 340nm.

L'intensité de ces trois bandes varie avec la teneur en hélice du polymère. Ces bandes sont quasiment nulles lorsque les copolymères sont sous forme chaîne statistique.

La bande  $\beta$  du noyau aromatique située vers 200 nm ne semble pas active ou si elle existe, elle n'est pas décelable, les bandes du chromophore peptidique étant très intenses dans cette région. Ceci est en bon accord avec les résultats expérimentaux obtenus jusqu'ici à partir de polypeptides contenant

---

\*Les décompositions des courbes ont été réalisées au laboratoire de Monsieur LEROY, Professeur à l'École Nationale Supérieure de Chimie de Strasbourg. Je tiens à lui exprimer mes plus vifs remerciements.

des noyaux aromatiques dans leur chaîne latérale. (40-41;68).

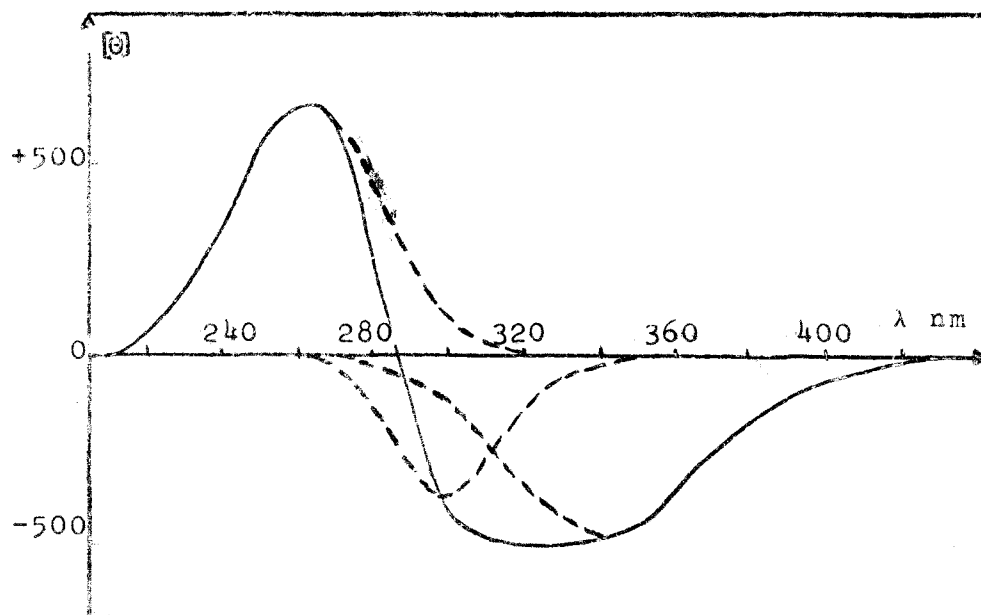


Fig.2-5: Bandes extrinsèques du copo  $O_{22}$  à pH 5,75.

### 2-3-2. Spectres expérimentaux.

#### 2-3-2-1. Méthodes d'étude.

##### 2-3-2-1-1. Appareillage.

Les mesures d'absorption U.V\* ont été réalisées sur le spectrophotomètre Cary modèle 118. Les mesures ont été faites dans des cuves de quartz de un millimètre d'épaisseur.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés sur le dichrographe Roussel Jouan III. Nous avons utilisé des cuves de quartz de 0,01cm pour l'enregistrement des spectres des bandes intrinsèques (180 à 250nm) et de 0,1; 0,2 et 0,5cm pour l'enregistrement des spectres des bandes extrinsèques (250 à 400nm).

---

\*Les mesures d'absorption U.V et de dichroïsme circulaire ont été réalisées à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille. Je tiens à remercier Monsieur le Professeur BISERTE ainsi que tout le personnel de l'Institut pour le bon accueil qui m'a été réservé.

L'ellipticité molaire  $[\theta]$  se calcule à partir de la formule suivante :

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

- $M$  est la masse moyenne du motif monomère.
- $c$  est la concentration du soluté en g/l.
- $d$  est l'épaisseur de la cuve en cm.
- $A_L - A_R$  est l'amplitude du signal fourni par l'appareil en mm.
- $s$  est la sensibilité de l'appareil.

$[\theta]$  s'exprime ainsi en degrés. décimole<sup>-1</sup>.cm<sup>2</sup>.

Pour les bandes intrinsèques  $[\theta]$  est ramené à un chromophore -CO-NH. Pour les bandes extrinsèques  $[\theta]$  est ramené à un résidu glutamate de 2 nitrobenzyle.

Les mesures de pH ont été faites sur un pH mètre Tacussel Modèle Isis au moyen d'une électrode de verre et d'une électrode de référence au calomel.

#### 2-3-2-1-2. Préparation des solutions. Ajustement des pH.

40 mg de produit sont dissous dans la quantité de NaHCO<sub>3</sub> 0,1N; NaF 0,2M suffisante pour salifier tous les groupes carboxyliques.

On utilise le NaHCO<sub>3</sub> plutôt que la soude pour éviter l'hydrolyse de la fonction ester de 2 nitrobenzyle très labile en milieu basique.

Lorsque le polymère est dissous, on complète à 20ml avec du NaF 0,2M. On a alors une concentration de 2g par litre.

Les mesures ont été faites dans NaF 0,2M pour diminuer les effets polyélectrolytes. Le NaF a été choisi pour la grande transparence des ions F<sup>-</sup> en UV lointain.

Les 20ml de solution sont ensuite placés dans un bécher de 25ml et le pH est ajusté en ajoutant de l'acide perchlorique (HClO<sub>4</sub>) concentré. En procédant de cette manière on peut estimer que la concentration ne varie pas au cours de la manipulation.

L'acide perchlorique a été choisi également pour la transparence des ions  $\text{ClO}_4^-$  en UV lointain

### 2-3-2-2. Etude des spectres en fonction du pH

#### 2-3-2-2-1. Bandes intrinsèques.

Les spectres des bandes intrinsèques (Fig.2-6 à 2-10) des cinq copolymères montrent tous un point isodichroïque situé vers 203-204nm ( $[\theta]_{16.000}$  à 18.000). Cela signifie que la transition observée correspond au passage d'une structure à une autre. Il n'y a donc pas intervention d'une troisième structure ( $\beta$ ) et la bande  $\beta$  du noyau aromatique ne semble donc pas active.

- en milieu basique les copolymères les plus pauvres en  $\text{NO}_2$  ( $0_3$ ;  $0_6$ ;  $0_{10}$ ) ont un spectre caractéristique de la pelote statistique : une faible bande positive centrée vers 217 nm (l'intensité de cette bande diminue lorsque le taux de  $\text{NO}_2$  augmente), cette bande est accompagnée d'une forte bande négative centrée vers 197 nm qui diminue également lorsque le pourcentage de  $\text{NO}_2$  augmente (Tableau 2-3).

	$[\theta]_{217}$ à pH>7	$[\theta]_{197}$ à pH>7
PLCA	+3500	-30000
Copo $0_3$	+3400	-29600
Copo $0_6$	+2200	-28400
Copo $0_{10}$	-400	-22400
Copo $0_{22}$	-2600	-18400

Tableau 2-3 : Variations des bandes à 217 et 197nm à pH basique pour les différents copolymères.

Les copolymères les plus pauvres en  $\text{NO}_2$  sont à peu près totalement sous forme pelote statistique à pH basique et quand le taux de  $\text{NO}_2$  augmente il y a apparition de zones hélicoïdales le long de la chaîne principale, ce qui se traduit par une distribution en valeur absolue des bandes intrinsèques de la pelote statistique et par l'apparition d'une bande positive vers 217nm caractéristique de l'hélice  $\alpha$ .

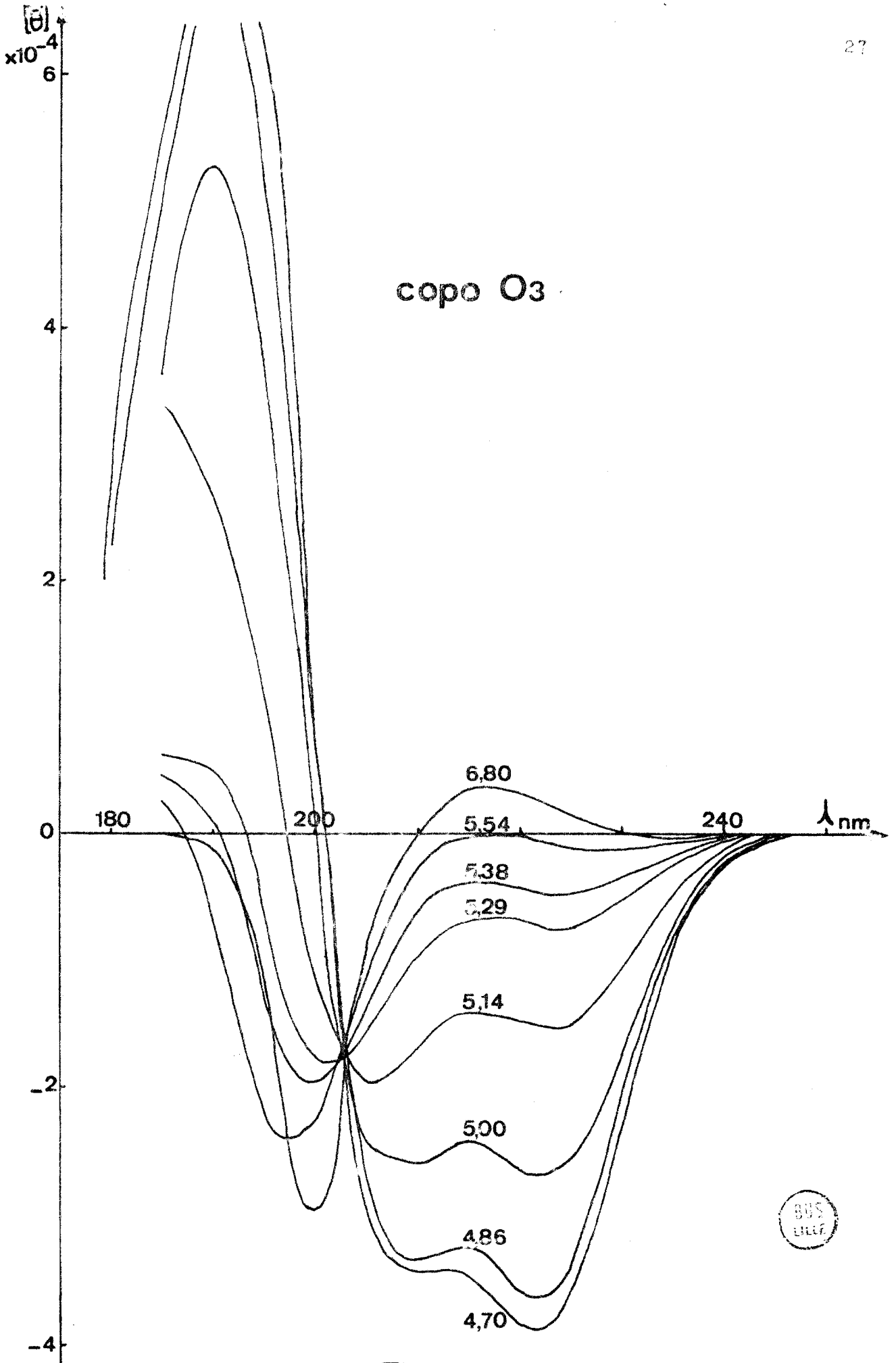


Fig 2-6

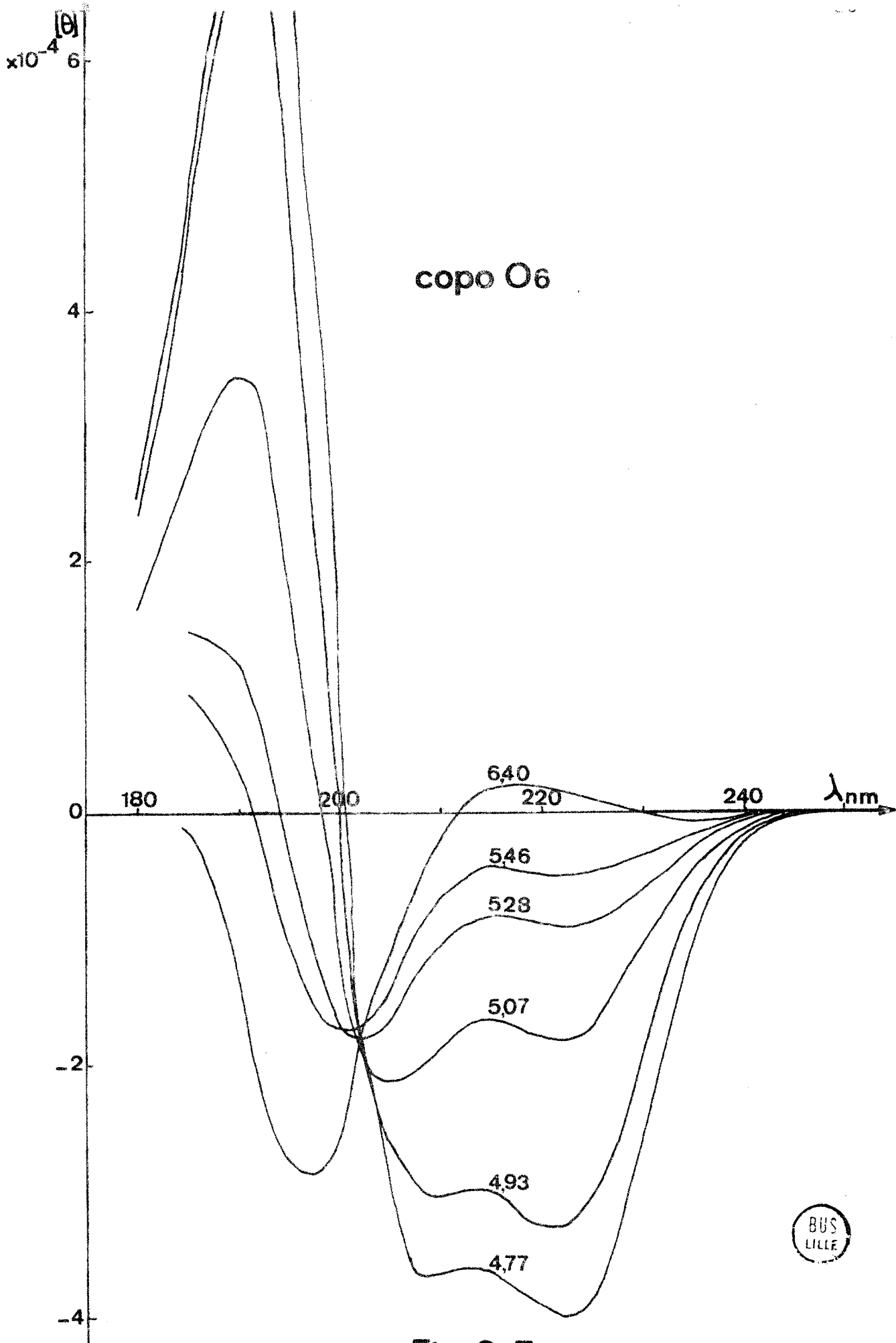


Fig 2.7

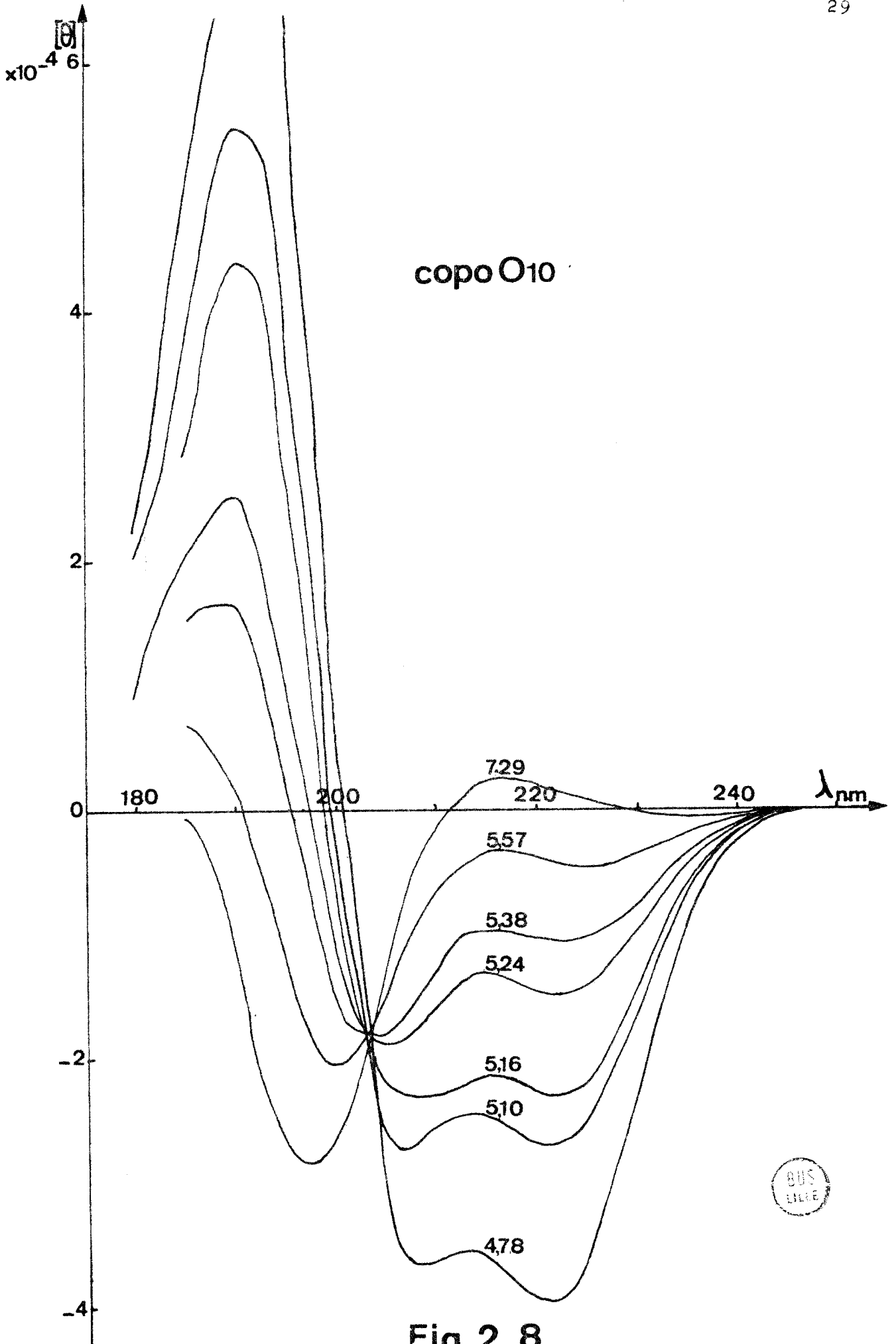


Fig 2.8

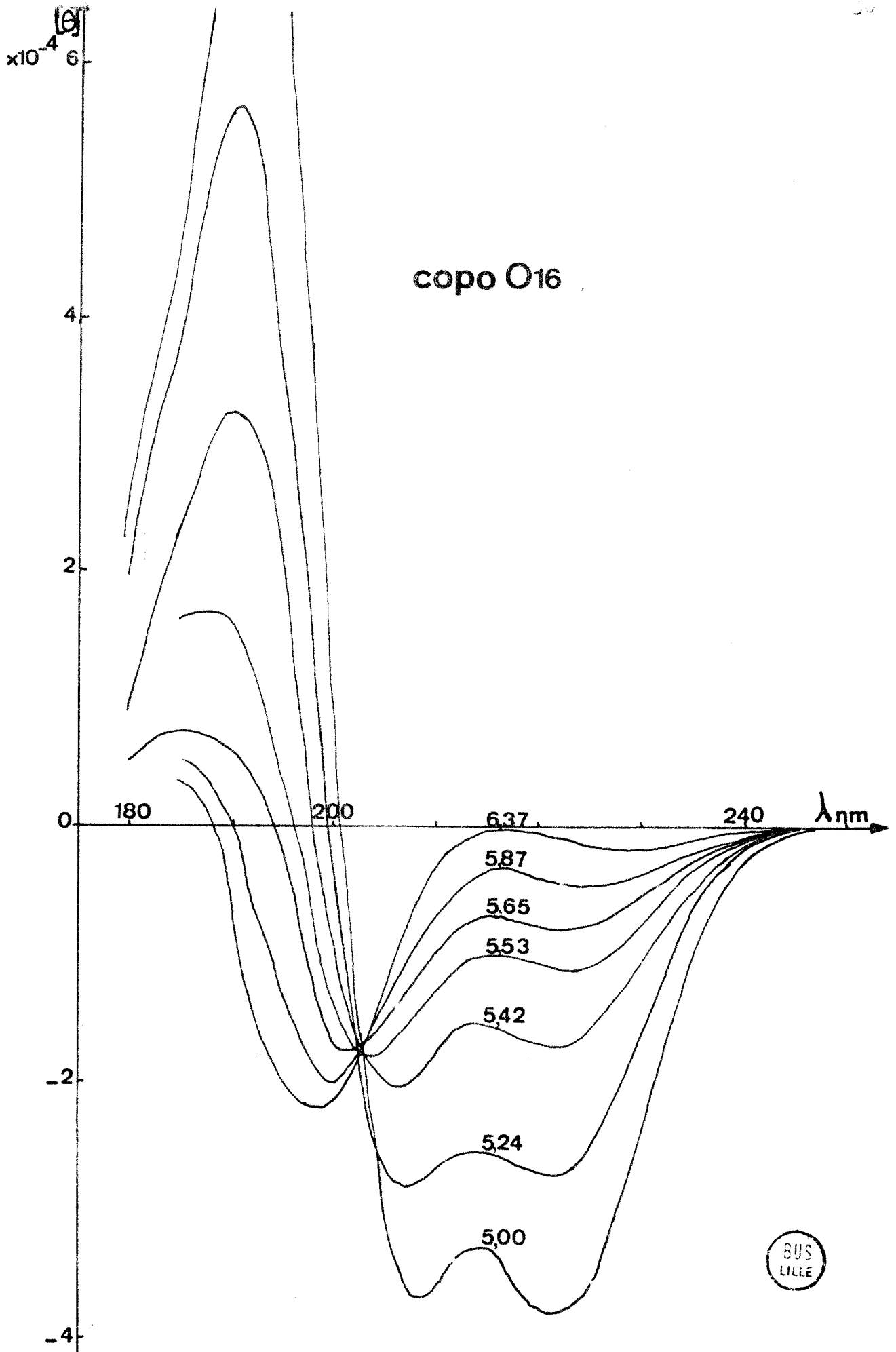


Fig 2\_9





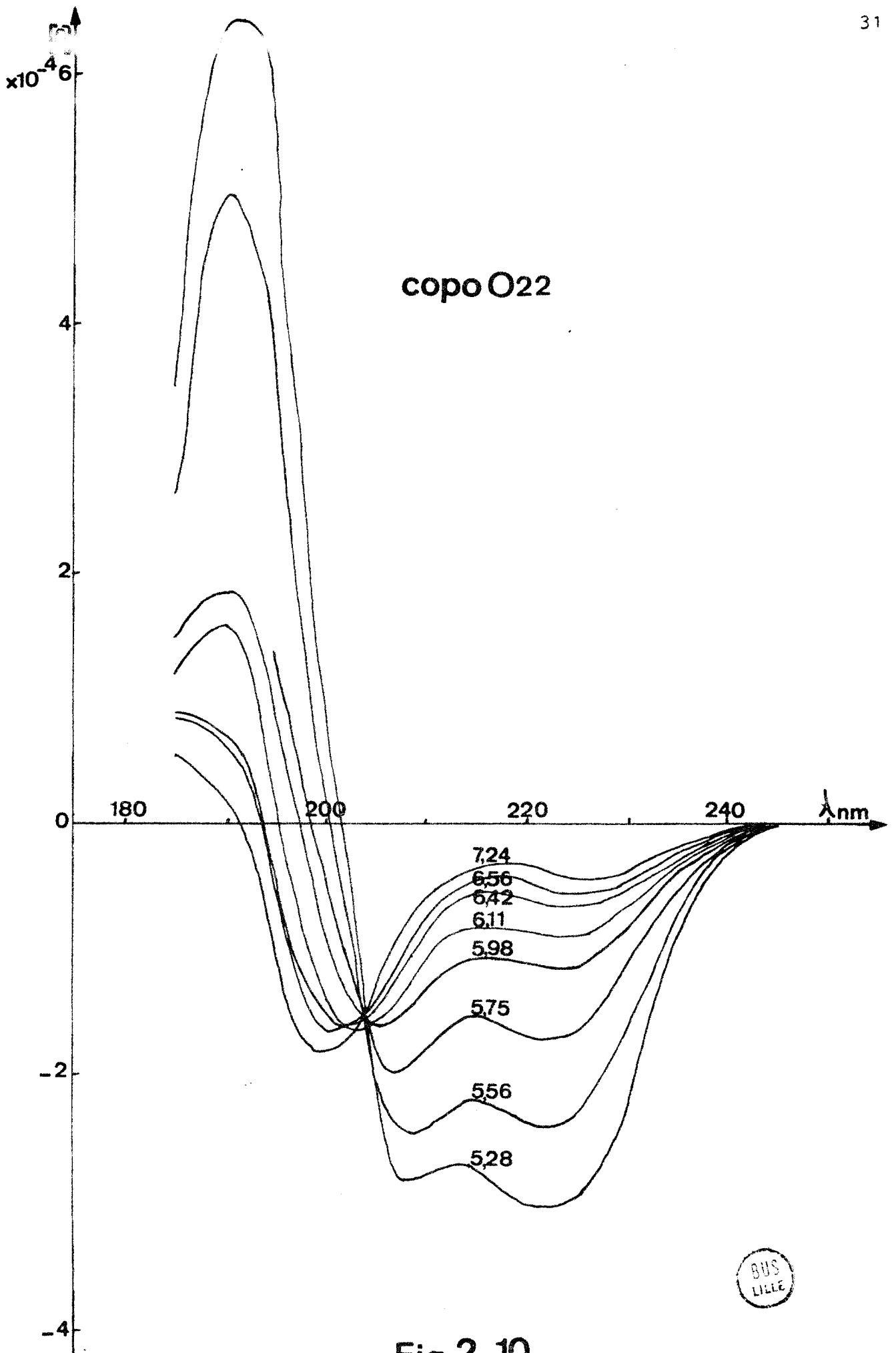


Fig 2-10



Pour le copolymère  $O_{22}$  nous observons un  $[\theta]_{222}$  de - 4400.

- en milieu acide les cinq copolymères présentent tous un spectre caractéristique de l'hélice  $\alpha$ . Pour les copolymères les plus riches en  $\text{NO}_2$  il semble que l'on ne puisse pas atteindre la valeur de -40000 à 222nm correspondant à 100% d'hélicité :

$$\begin{aligned} - \text{copo } O_{16} \quad [\theta]_{222} \text{ max} &= -38200 \\ - \text{copo } O_{22} \quad [\theta]_{222} \text{ max} &= -30600 \end{aligned}$$

Ceci peut être attribué à des phénomènes d'agrégation favorisés par la haute teneur en groupements hydrophobes et qui se produiraient avant que le polymère soit totalement sous forme hélicoïdale.

Nous pouvons donc conclure que les spectres de nos produits correspondent bien à une transition pelote statistique-hélice  $\alpha$  induite par diminution du pH. Le fait que nous observons un point isodichroïque nous indique qu'il n'y a pas formation de structure  $\beta$  au cours de la transition et qu'il n'y a pas intervention d'une bande due au groupement nitrobenzyle (bande  $\beta$  du noyau aromatique située vers 200nm).

Si nous traçons la variation du pourcentage d'hélicité en fonction du pH (Fig.2-11) nous observons que :

- plus le polypeptide est riche en groupements hydrophobes et moins la transition est coopérative (elle est échelonnée sur une plus large gamme de pH) et plus elle commence à pH basique. Ceci se traduit par une augmentation du pH du milieu de transition (50% d'hélicité) (Tableau 2-4).

	pH du milieu de transition
PLGA	5,04
Copo $O_3$	5,06
Copo $O_6$	5,10
Copo $O_{10}$	5,17
Copo $O_{16}$	5,35
Copo $O_{22}$	5,60

Tableau 2-4 : Variation du pH du milieu de transition pour les différents copolymères.

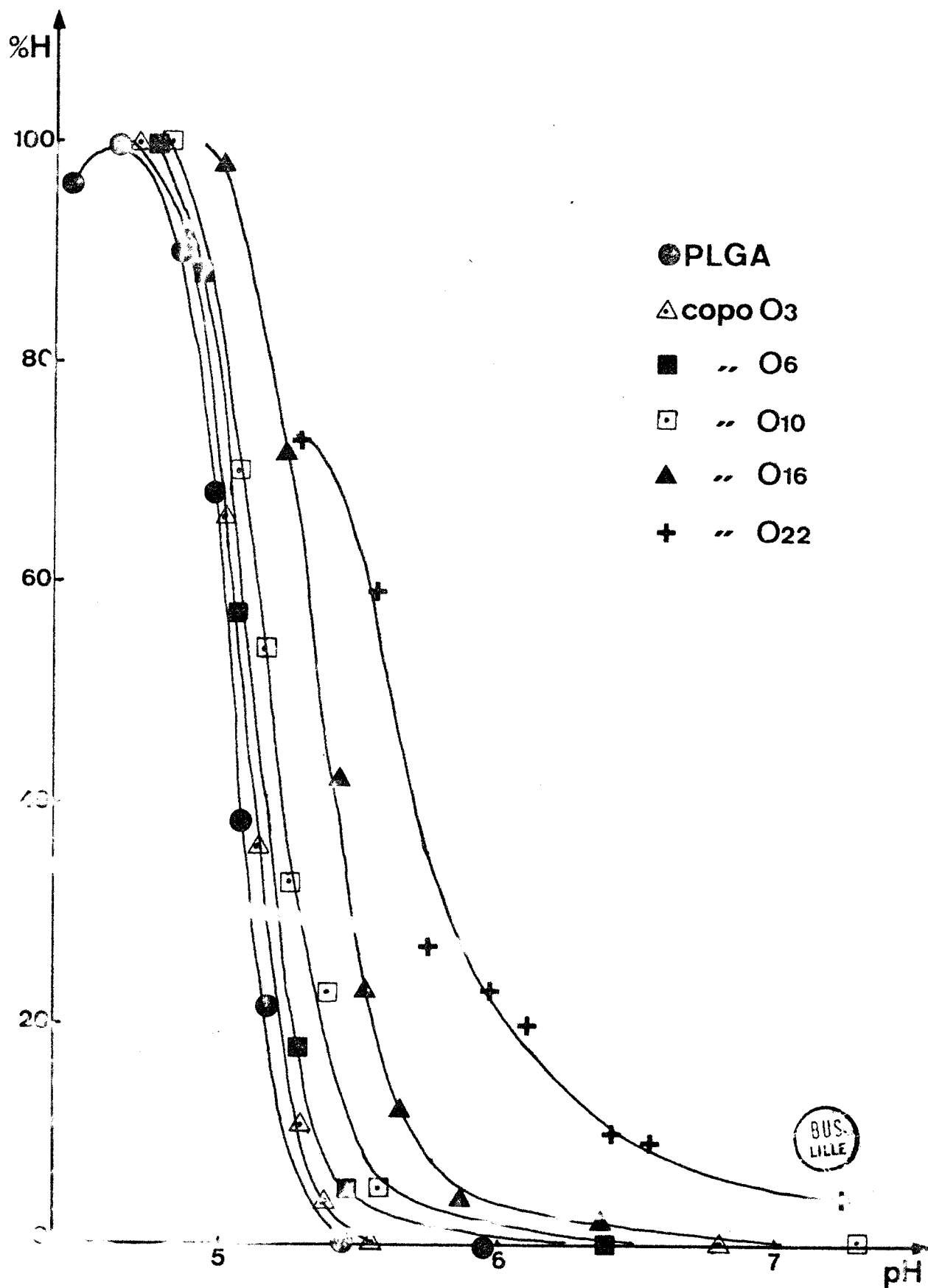


Fig 2\_11

D'après la figure 2-11 nous voyons également que les cinq copolymères tendent tous à être sous forme totalement hélicoïdale au même pH c'est à dire 4,8.

De tout ceci nous pouvons affirmer que les groupements nitrobenzyle semblent stabiliser l'hélice. Plus les copolymères sont riches en  $\Phi\text{NO}_2$  et plus la transition commence à pH élevé. Mais lorsque le taux de  $\Phi\text{NO}_2$  augmente les phénomènes de stabilisation sont concurrencés par des phénomènes d'agrégation et de précipitation particulièrement à pH acide.

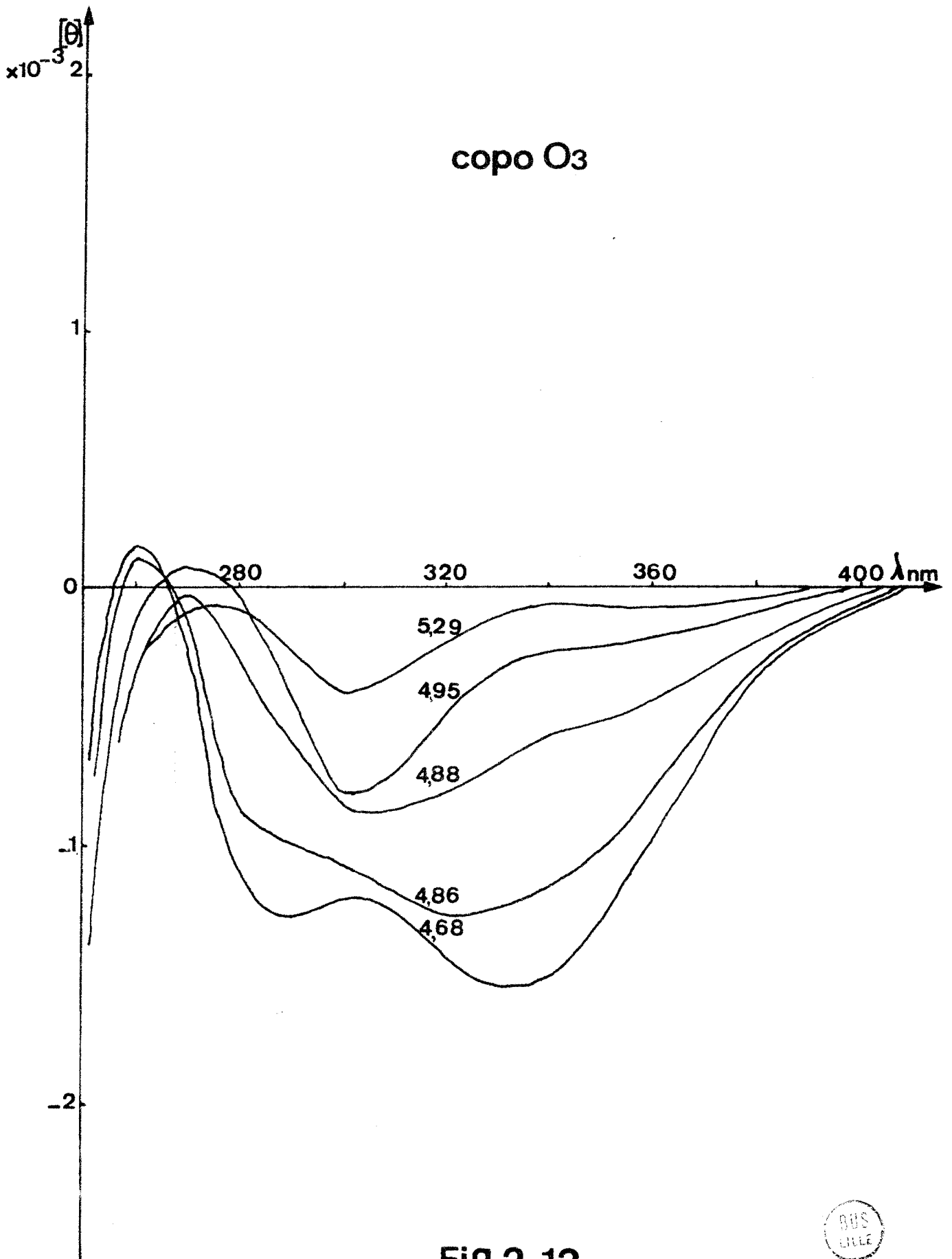
2-3-2-2-2. Bandes extrinsèques.  
(Fig 2-12 à 2-16)

Nous avons vu que le spectre du à la chaîne latérale était caractérisé par trois bandes : une bande négative vers 340nm, une bande négative vers 300nm et une bande positive vers 260nm. Dans ces trois bandes seule la bande vers 340nm (transition  $n \rightarrow \pi^*$  du groupement nitro) est exploitable du point de vue quantitatif. En effet il y a chevauchement des bandes à 260nm et 300nm. La bande à 260nm est difficile à observer car elle correspond à un coefficient d'absorption très élevé (5630) et une ellipticité très faible. La bande à 340nm n'est que faiblement perturbée à son maximum par la bande à 300nm.

Du point de vue qualitatif nous voyons que la bande à transfert de charge (260nm) augmente lorsque le pourcentage de  $\Phi\text{NO}_2$  augmente. Nous avons vu précédemment que cette bande était sensible à la polarité du solvant (Tableau 2-2).

Si nous observons le maximum de cette bande nous voyons un effet hypochrome lorsque le taux d'hélicité augmente dans le cas des copolymères les plus pauvres en  $\Phi\text{NO}_2$  ( $O_3$ ;  $O_6$ ;  $O_{10}$ ). Au cours de la transition pelote-hélice il y aurait donc un passage des chaînes latérales d'un milieu polaire (eau) à un milieu de plus faible polarité. Ce milieu de plus faible polarité étant la proximité de l'hélice.

Pour les copolymères  $O_{16}$  et  $O_{22}$  on n'observe pas ce phénomène : la bande reste centrée à 260nm quel que soit le taux d'hélicité. Dans ce cas la transition ne s'accompagnerait



**Fig 2.12**



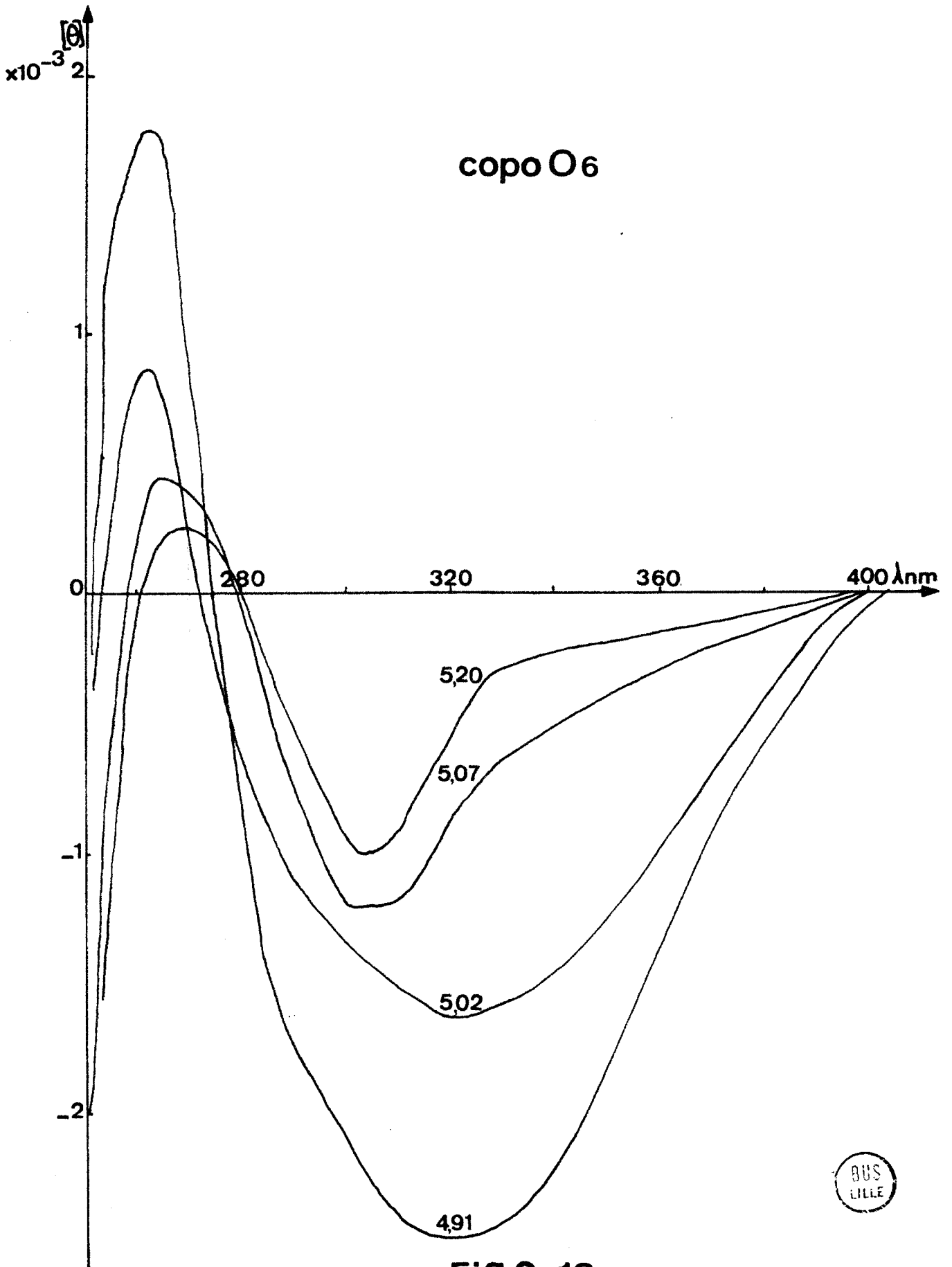
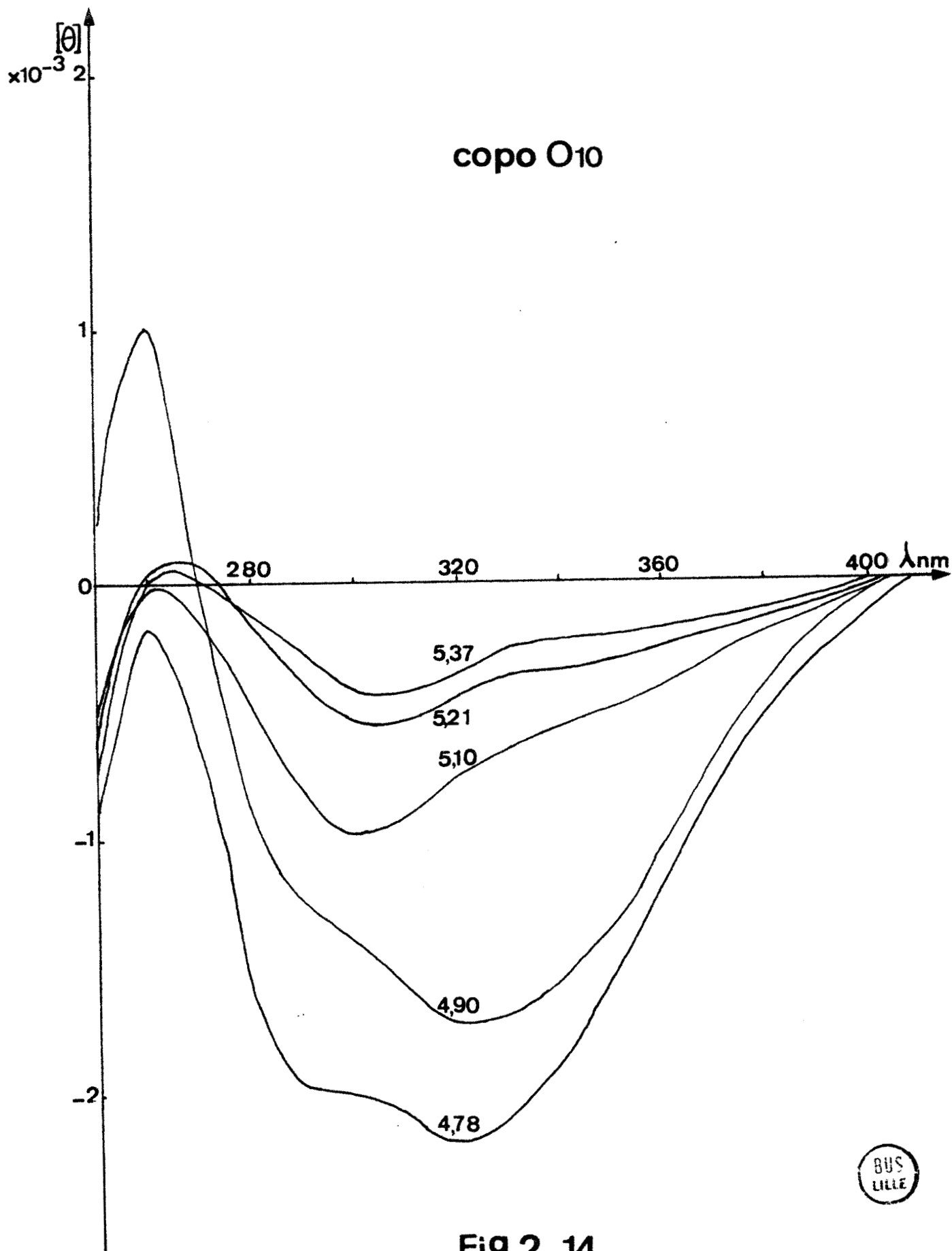
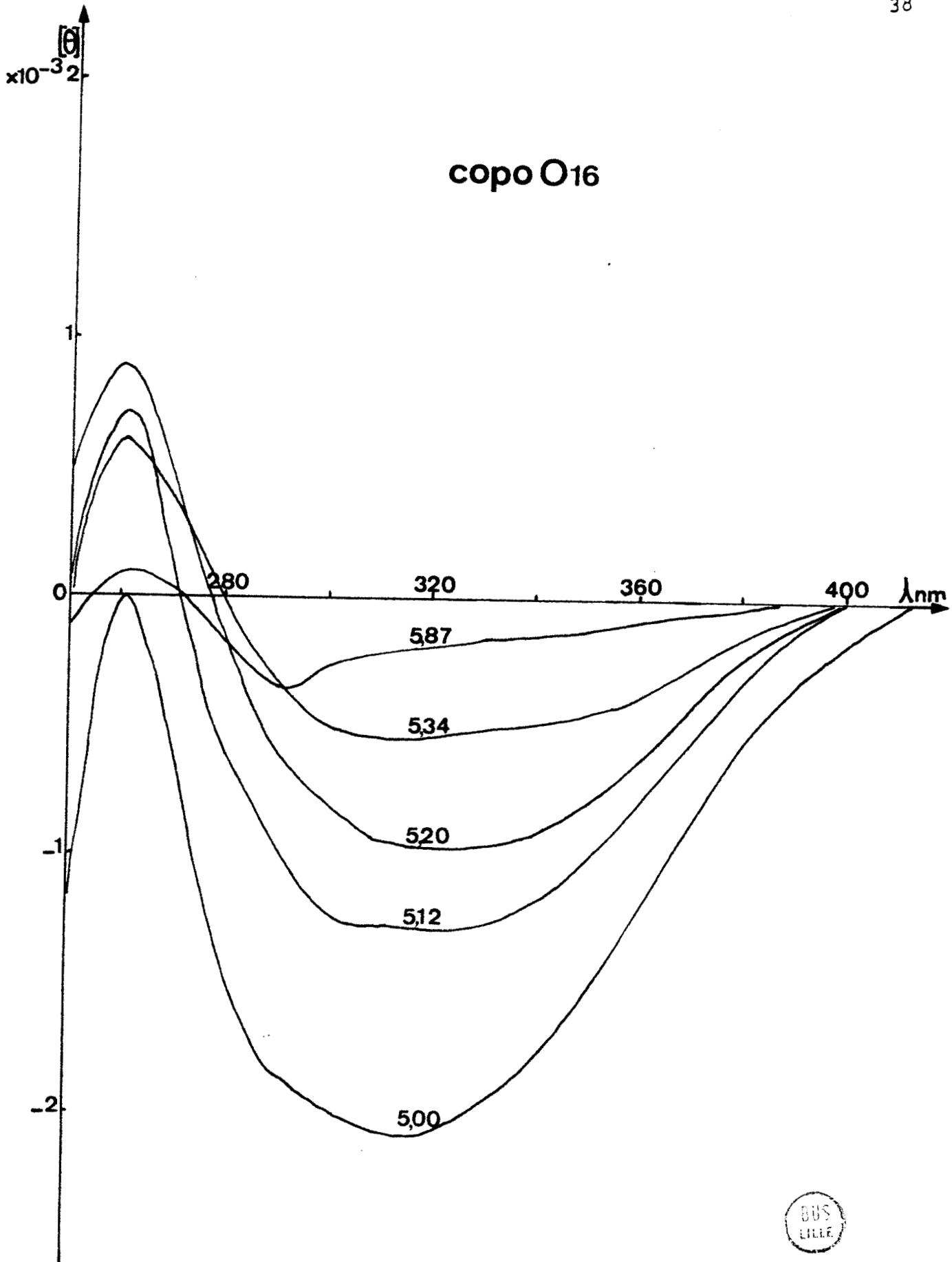


Fig 2\_13



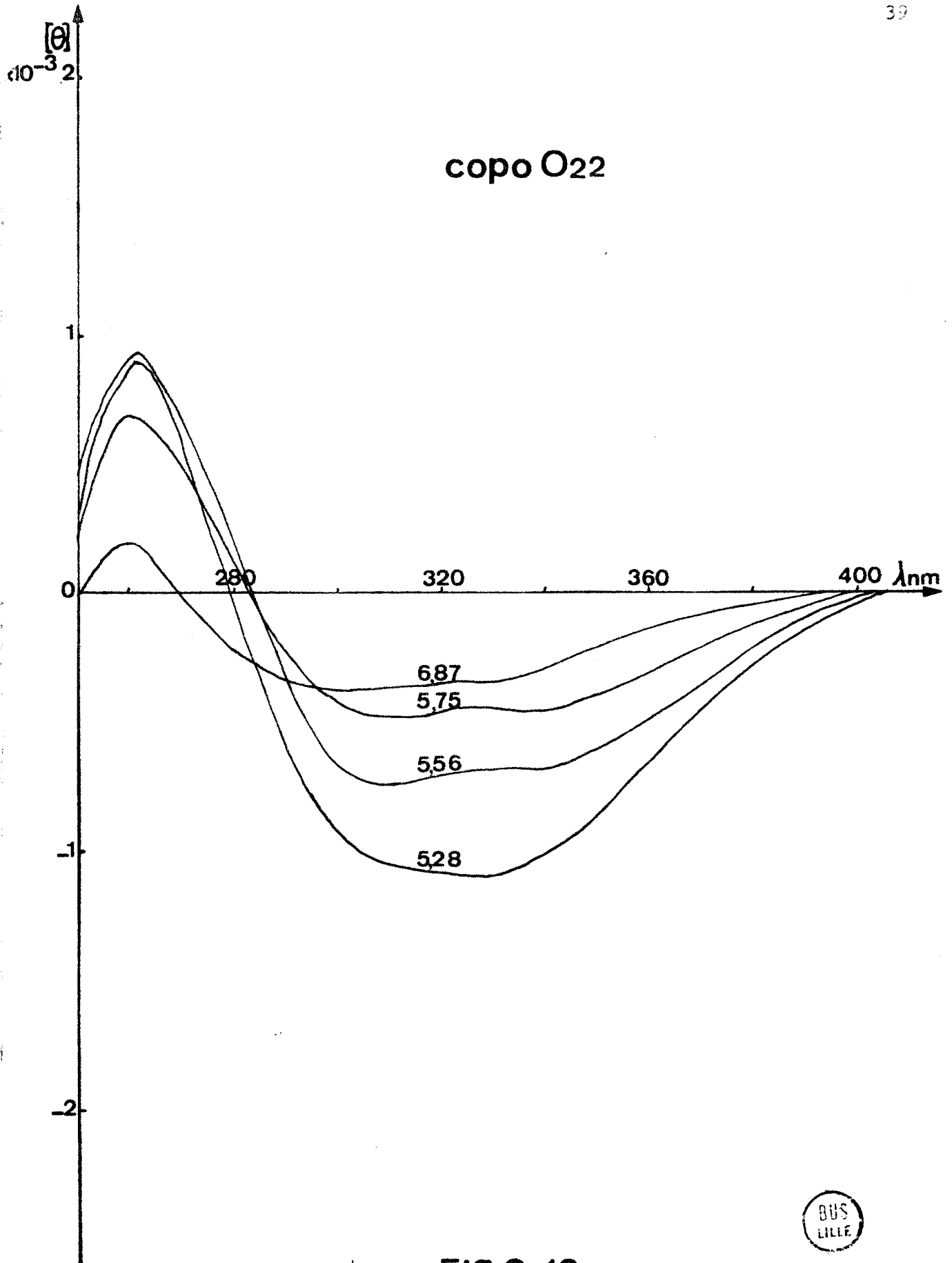




**Fig 2\_15**







**Fig 2\_16**



donc pas d'une variation du milieu environnant les groupements nitrobenzyle. Ceci pourrait être du au fait que, même lorsque le copolymère adopte une structure en pelote statistique, le nombre des groupements  $\Phi\text{NO}_2$  est suffisant pour que des interactions existent entr'eux et fassent baisser la polarité du milieu.

Nous avons calculé la force rotationnelle  $R_i$  de la bande à 340nm, en l'assimilant à une gaussienne, de la manière suivante (46; 76-77):

$$R_i = \frac{0,696 \times 10^{-42} [\theta]_{\max} \pi \Delta i}{\lambda_i^0}$$

Dans laquelle :

-  $[\theta]_{\max}$  est l'ellipticité à la longueur d'onde  $\lambda_i^0$  du maximum de la bande dichroïque (en degrés décimole<sup>-1</sup> cm<sup>2</sup>)

-  $\Delta i$  est la demi largeur de la courbe à  $\frac{[\theta]_{i \max}}{e}$

Les courbes obtenues en traçant  $[\theta]_{340}$  et  $R_{i340}$  en fonction du pH (Fig 2-17 à 2-21) ont une allure en S caractéristique d'une courbe de transition. De plus nous voyons qu'il existe une bonne corrélation entre les deux courbes et que par conséquent  $[\theta]_{340}$  peut être utilisée pour suivre la transition.

Nous avons comparé la variation de  $[\theta]_{340}$  et celle du taux d'hélicité dans les mêmes conditions (Fig 2-17 à 2-21). Les deux courbes ne sont pas superposées mais leur allure est identique :  $[\theta]_{340}$  augmente lorsque le pH diminue, donc lorsque le taux d'hélicité augmente. Elle est donc reliée à la structure secondaire du polypeptide.

Si nous portons  $[\theta]_{340}$  ou  $R_{i340}$  en fonction du pH, pour les cinq copolymères nous observons le même phénomène que pour le pourcentage d'hélicité : plus le polymère est riche en  $\Phi\text{NO}_2$ , moins la transition est coopérative et plus elle se produit à pH basique (Fig 2-22 et 2-23).

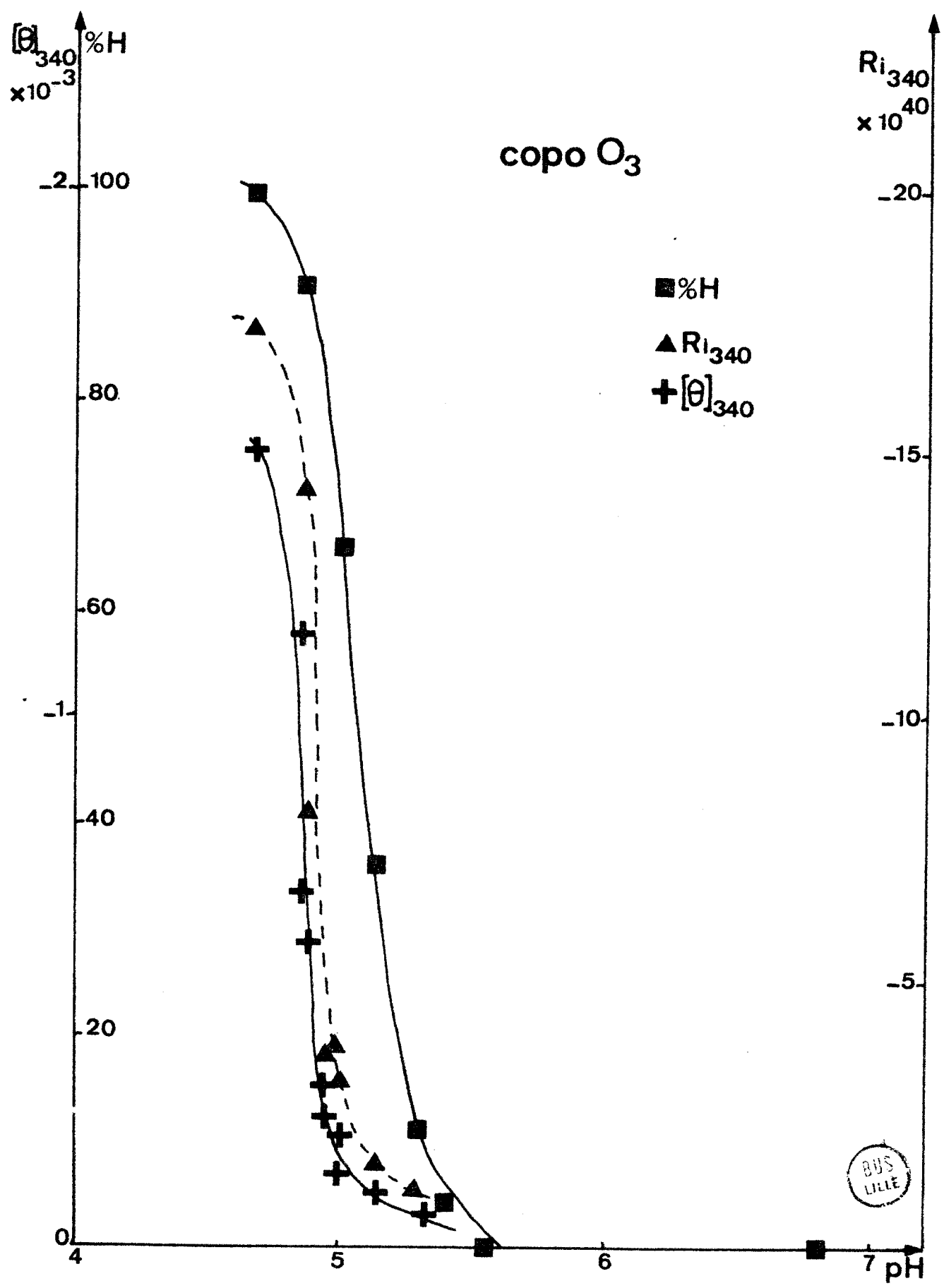


Fig 2\_17



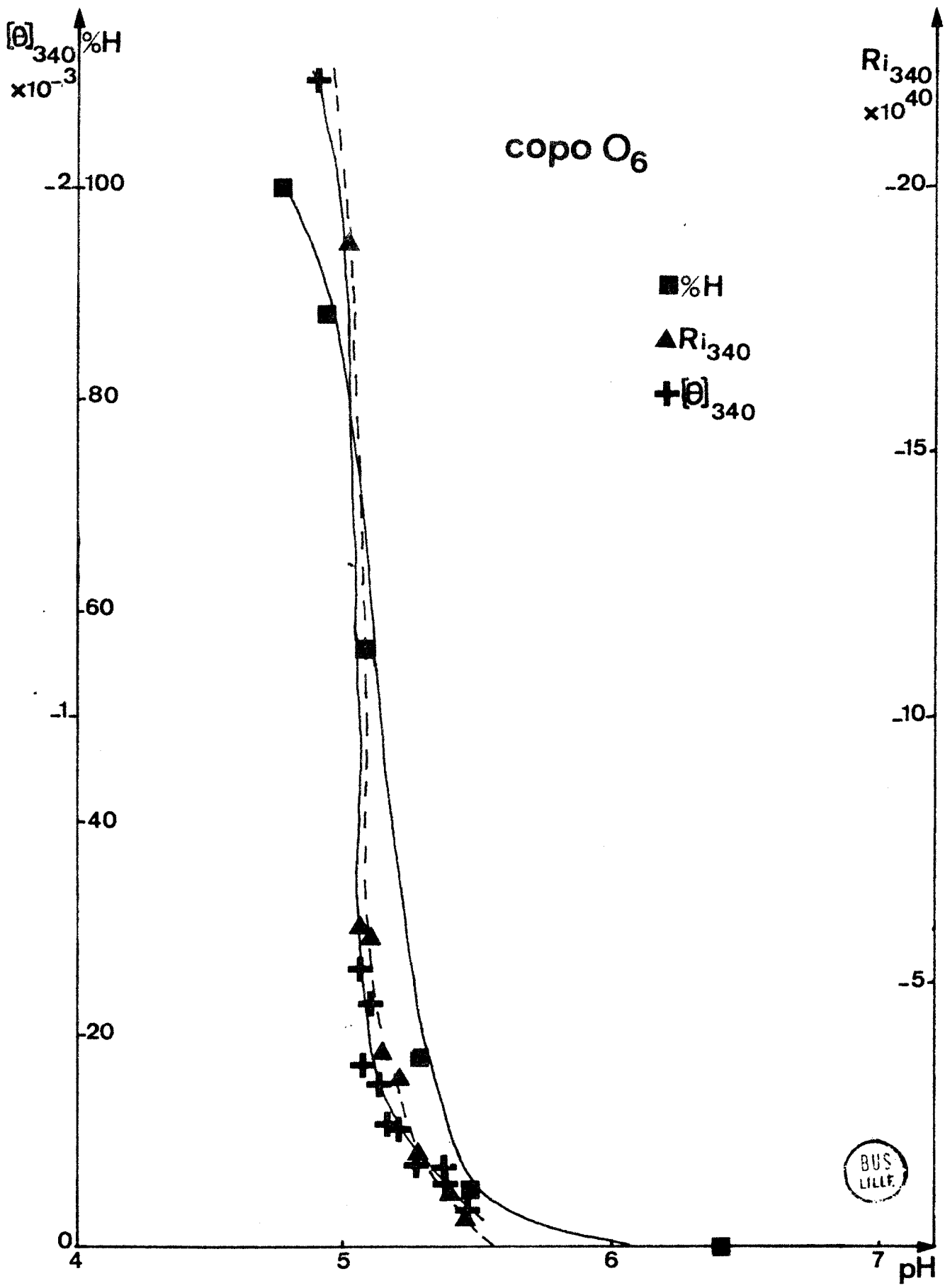


Fig 2-18



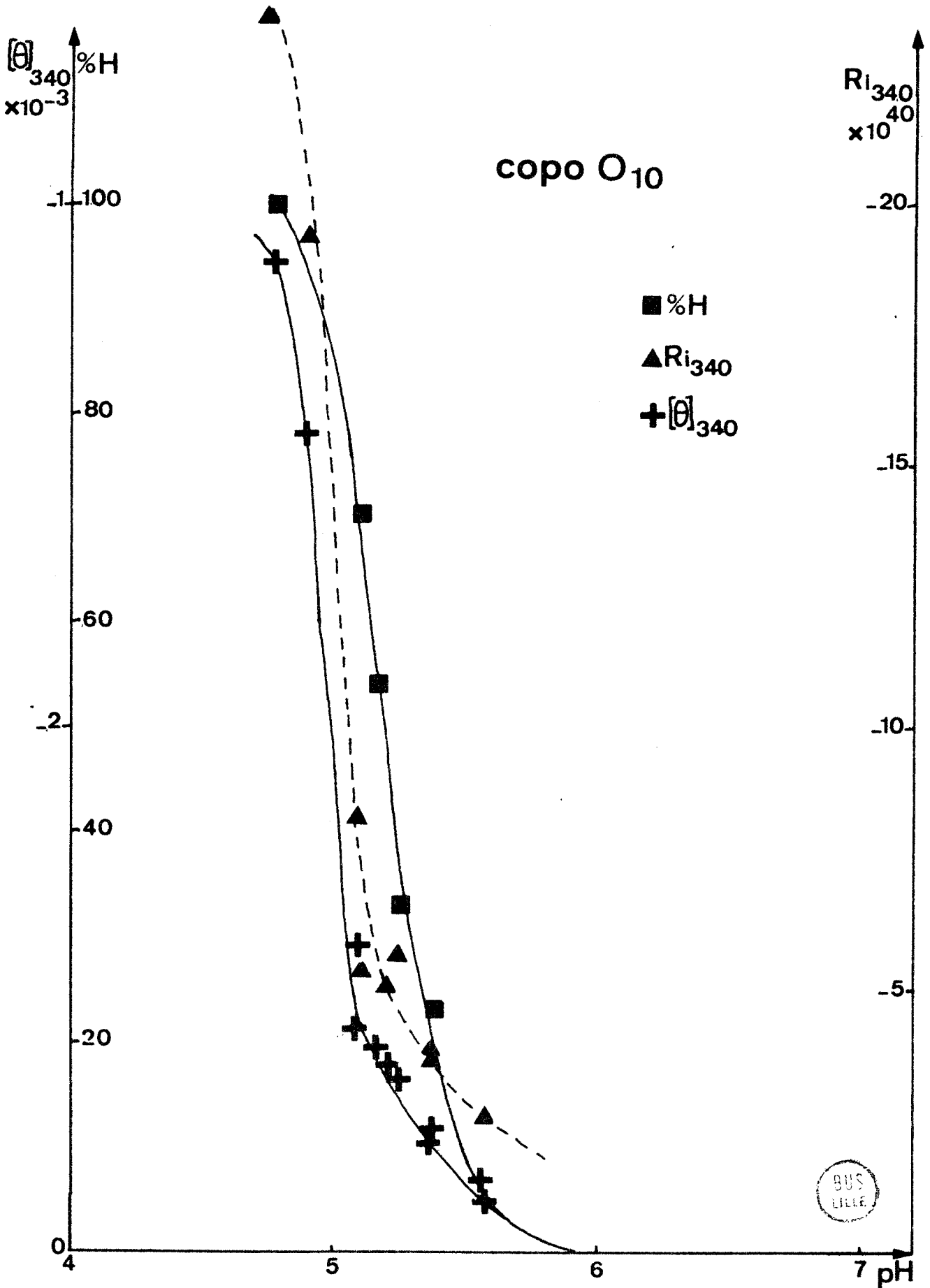


Fig 2-19

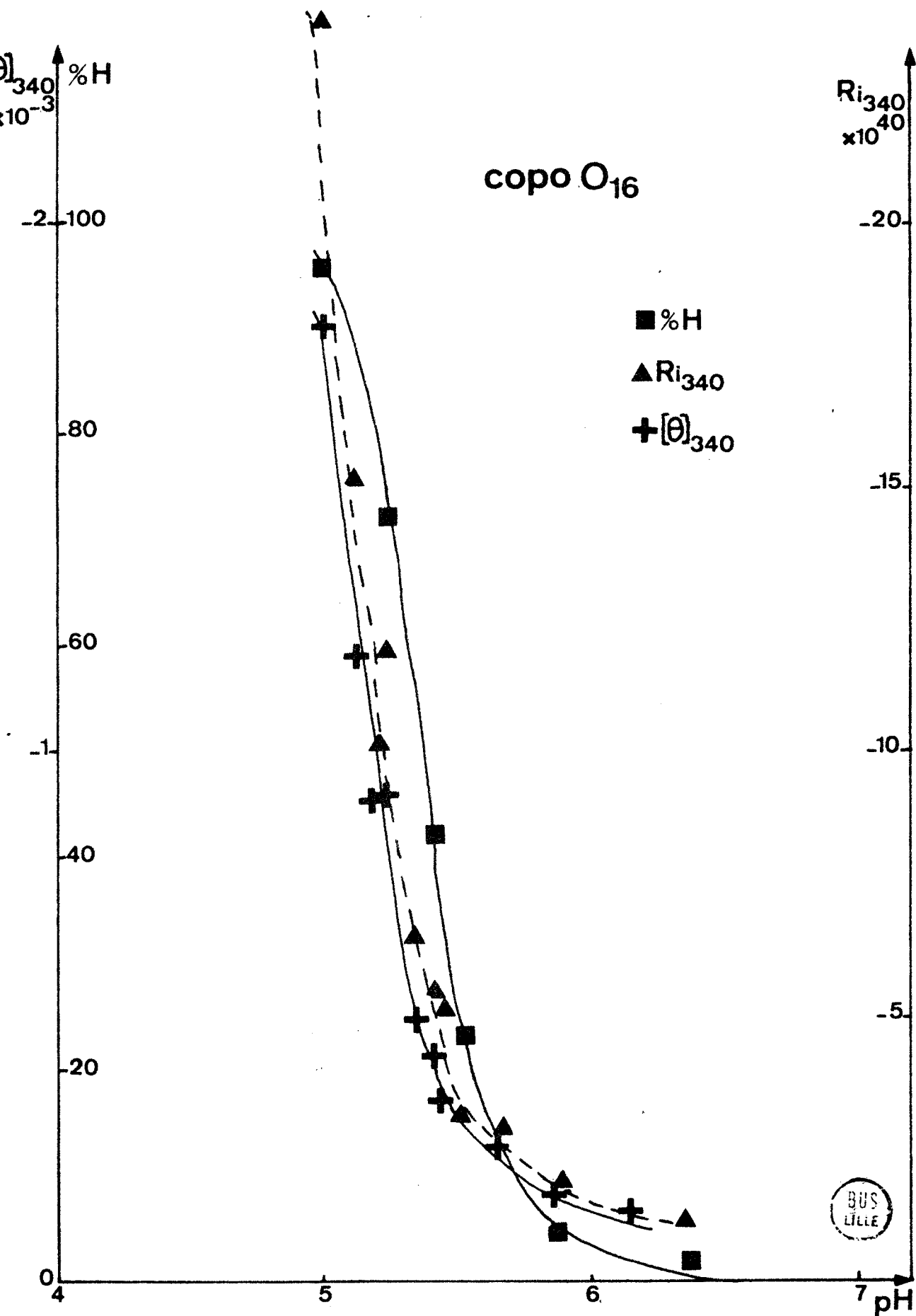


Fig 2-20

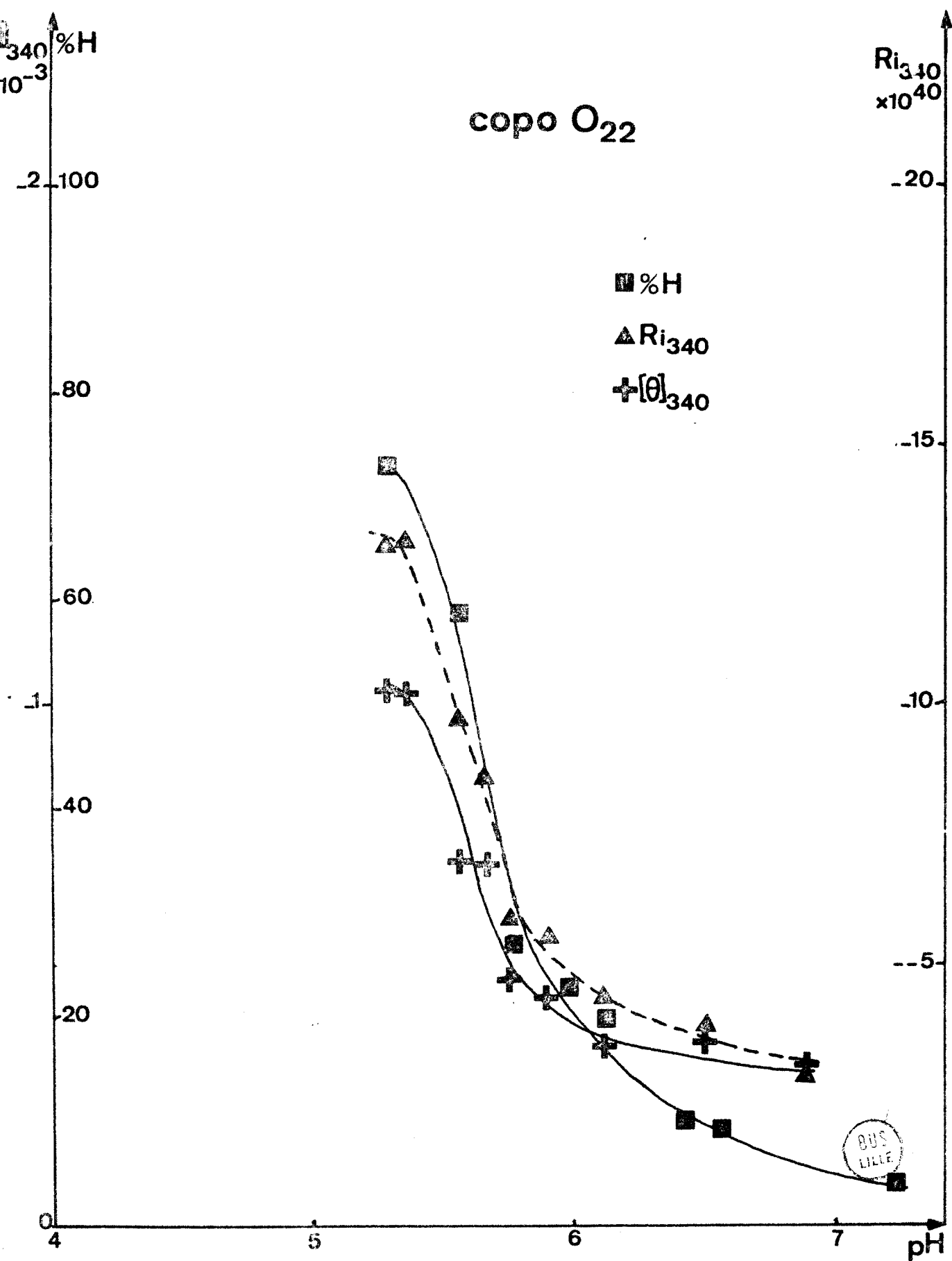


Fig 2\_21

Mais nous avons observé (Fig 2-17 à 2-21) qu'il existait un décalage sur l'échelle des pH entre les courbes représentant les variations de  $[\theta]_{340}$  et du taux d'hélicité pour chaque copolymère.

Pour expliquer ce phénomène nous avons tracé  $[\theta]_{340}$  en fonction du pourcentage d'hélicité (Fig 2-24), pour chaque copolymère. Nous observons alors une série de courbes se décomposant en deux parties bien distinctes :

- la partie I, pour des faibles pourcentages d'hélicité, est linéaire et de faible pente. La pente de cette droite augmente lorsque le taux de  $\Phi\text{NO}_2$  augmente.

- la partie II, pour de fortes valeurs du taux d'hélicité, est caractérisée par une brusque augmentation de pente. Cette "remontée" se produisant pour des valeurs du taux d'hélicité d'autant plus faibles que le polymère est riche en  $\Phi\text{NO}_2$ .

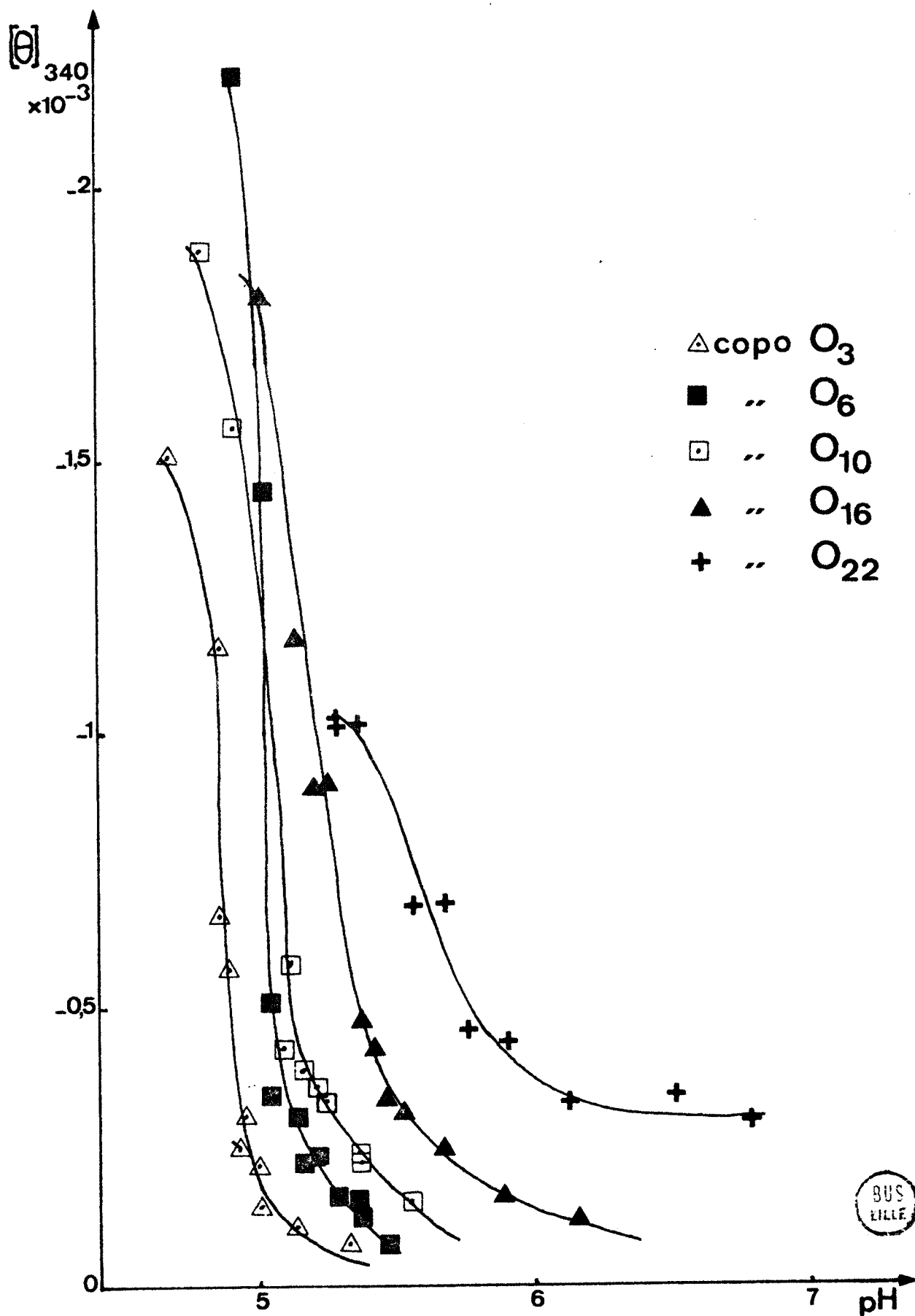
Si nous extrapolons la partie I à une hélicité nulle nous observons des valeurs de  $[\theta]_{340}$  non nulles qui varient dans le même sens que le taux de  $\Phi\text{NO}_2$  dans le polymère. On ne peut donc attribuer ces valeurs de  $[\theta]_{340}$  qu'à des interactions entre  $\Phi\text{NO}_2$ . En effet il n'y a pas d'hélice et si ces valeurs étaient dues à des interactions avec le carbone asymétrique elles seraient alors indépendantes du taux de  $\Phi\text{NO}_2$ .

Quand l'hélicité passe de 0 à 50% nous constatons que la pente de la partie I est proportionnelle au taux de  $\Phi\text{NO}_2$ . On peut proposer deux origines à cette partie du graphe :

- le champ asymétrique de l'hélice.
- les interactions entre groupements nitrobenzyle.

On peut extrapoler ces droites à 100% d'hélicité. Les valeurs de  $[\theta]_{340}$  ainsi obtenues sont reportées sur un graphe en fonction du pourcentage de  $\Phi\text{NO}_2$  (Fig 2-25). Nous constatons que la variation est linéaire et nous pouvons donc à partir de cette représentation déterminer l'activité optique d'un chromophore isolé porté par une hélice, c'est à dire quand





BUS  
KILLE

Fig 2-22

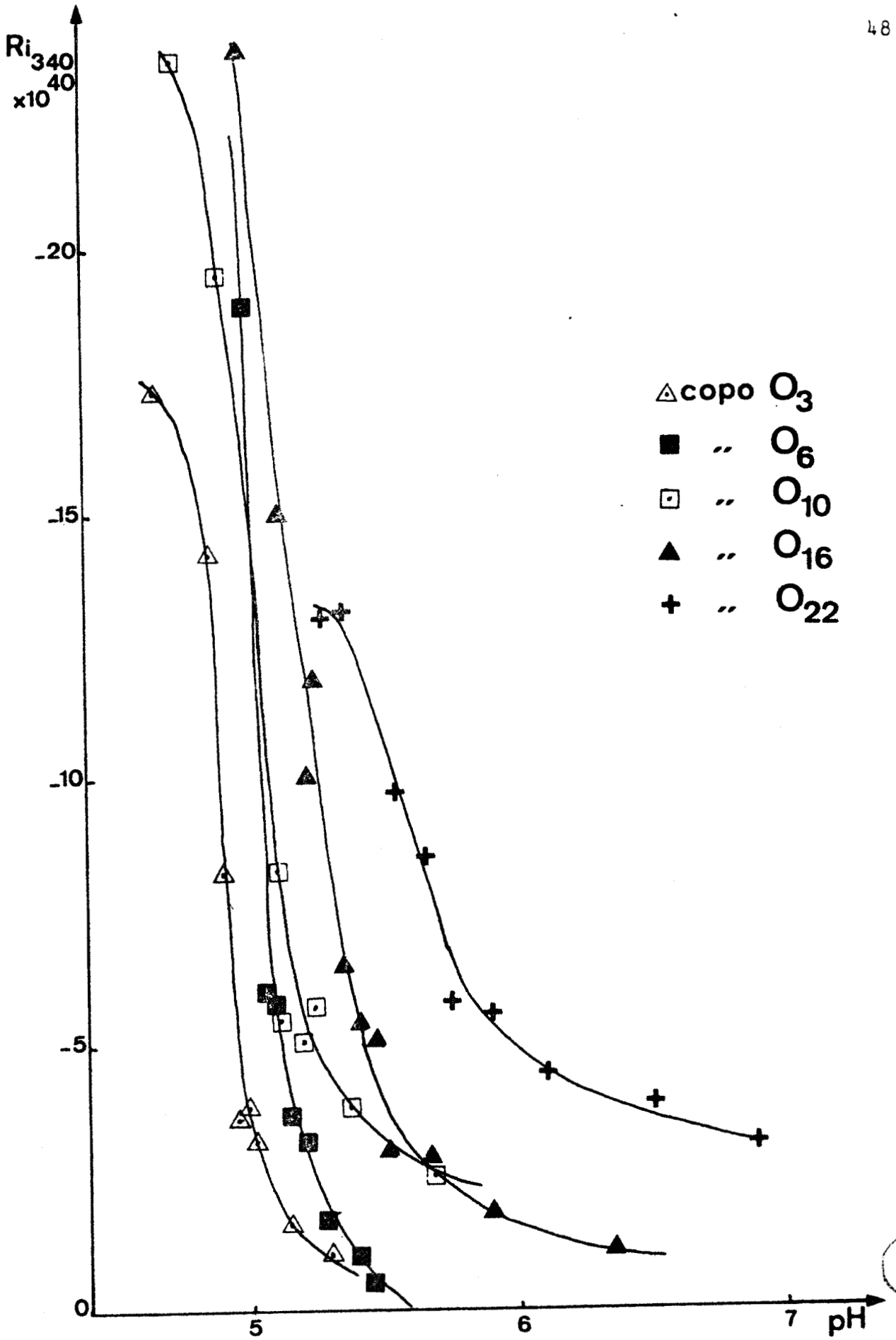


Fig 2-23



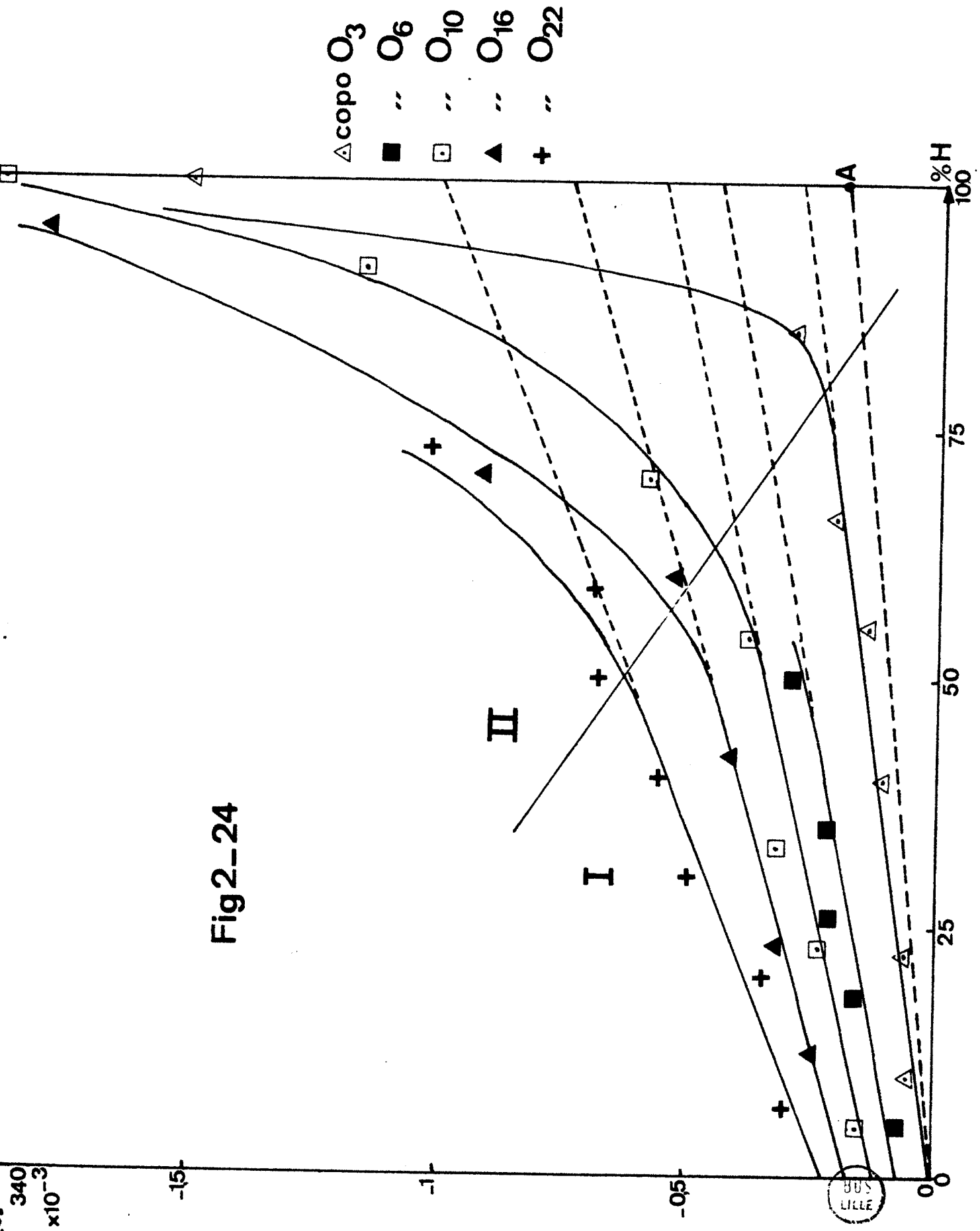
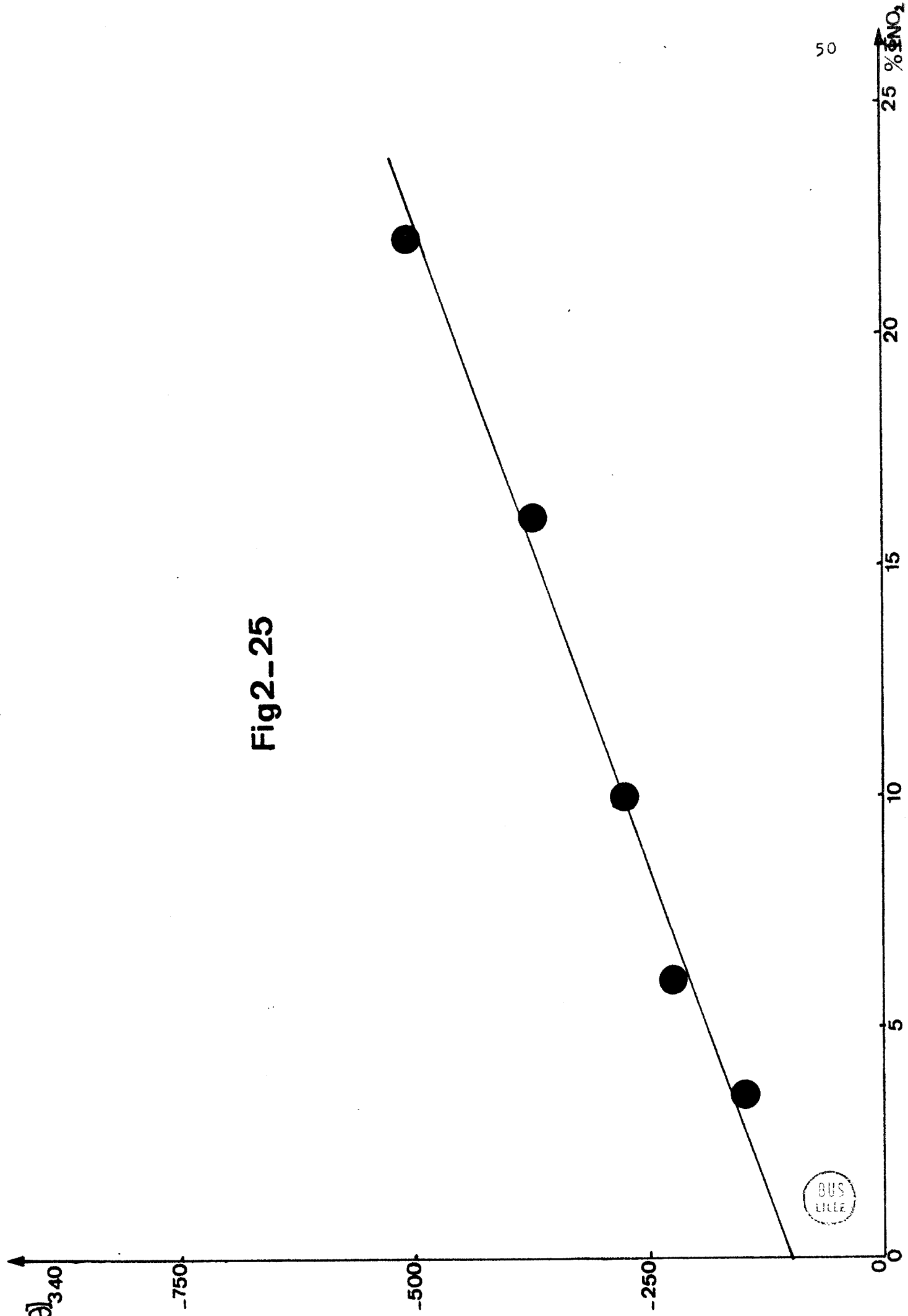


Fig 2--24

Fig 2-25



il n'existe aucune interaction entre différents  $\Phi_{NO_2}$ . Pour cela nous extrapolons la valeur de  $[\theta]_{340}$  à 100% d'hélicité à un pourcentage nul de  $\Phi_{NO_2}$ . Nous obtenons ainsi une valeur de  $[\theta]_{340}$  de -100 qui reportée sur la figure 2-24 est représentée par le point A.

Il n'est pas possible (Fig 2-24) de séparer les origines possibles de l'activité optique de ce chromophore isolé, en particulier celle due au champ asymétrique de l'hélice et celle due à l'interaction entre le groupement  $\Phi_{NO_2}$  et la chaîne principale. La droite OA représente la variation de la somme de ces deux effets en fonction du pourcentage d'hélicité.

La différence entre la droite OA et les parties I représenterait donc les interactions entre groupements nitrobenzyle. On constate que ces interactions augmenteraient à la fois avec le taux d'hélicité et avec le taux de  $\Phi_{NO_2}$  dans le polymère, ce qui qualitativement paraît logique, l'hélice servant dans ce cas à fixer la géométrie respective des différents  $\Phi_{NO_2}$ .

Nous avons cherché à interpréter la partie II des courbes de la figure 2-24. Ce comportement pourrait être dû à des phénomènes d'agrégation se produisant entre groupements hydrophobes de chaînes voisines. Les spectres des bandes intrinsèques ne semblent pas rendre compte de tels phénomènes. Ceci n'est pas étonnant. Ces phénomènes d'agrégation agissent peu sur le spectre des bandes intrinsèques (78-79), du moins au début. D'autre part s'il y a agrégation au niveau des  $\Phi_{NO_2}$  cela perturbera le spectre des bandes extrinsèques d'une façon très importante puisque tous les  $\Phi_{NO_2}$  seront impliqués dans une telle liaison. Par contre les bandes intrinsèques ne seront perturbées que dans un rapport égal au taux de  $\Phi_{NO_2}$  dans le polymère.

Pour lever cette indétermination nous avons réalisé des mesures dans un milieu où l'agrégation est diminuée c'est à dire dans des mélanges contenant des solvants organiques (80-81).

Dans les mélanges eau-alcools nous arrivons à reculer ces phénomènes mais pas à les supprimer totalement (Fig2-26).

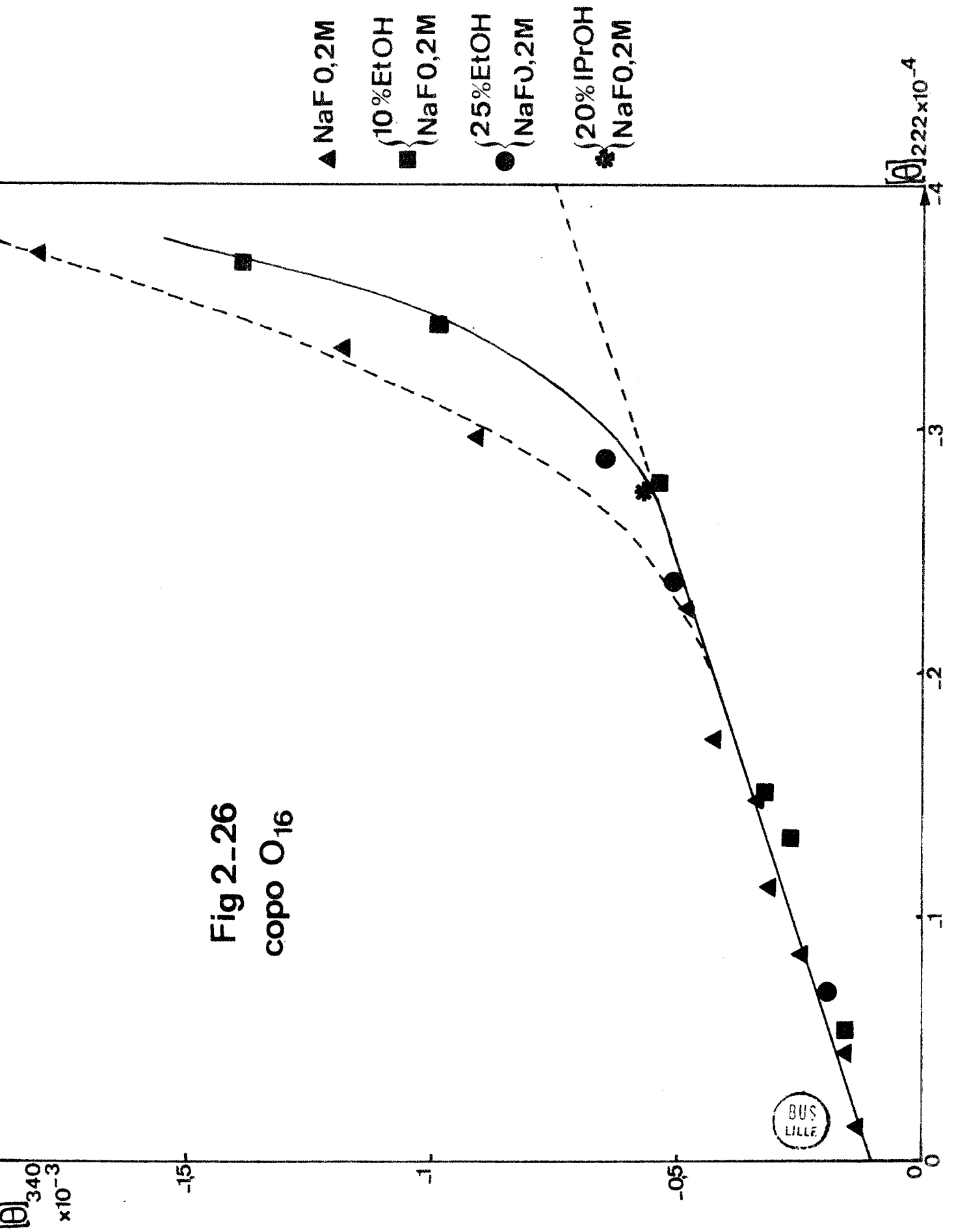
Seul le mélange 1/3 dioxanne-2/3 NaF 0,2M reconnu pour supprimer les phénomènes d'agrégation (25) a donné des résultats valables (Fig 2-27). En effet  $[\theta]_{340}$  varie linéairement en fonction du taux d'hélicité jusqu'à 100% d'hélicité.

Ce résultat est en bon accord avec l'hypothèse que nous avons faite et qui consistait à attribuer la partie II des courbes à des phénomènes d'agrégation entre les chaînes latérales. En effet les solvants organiques n'agissent pas sur la partie I du graphe. L'addition de solvant organique ne modifie donc pas les interactions intramoléculaires chaînes latérales-chaînes latérales et chaîne latérale-chaîne principale et n'a d'influence que sur l'agrégation.

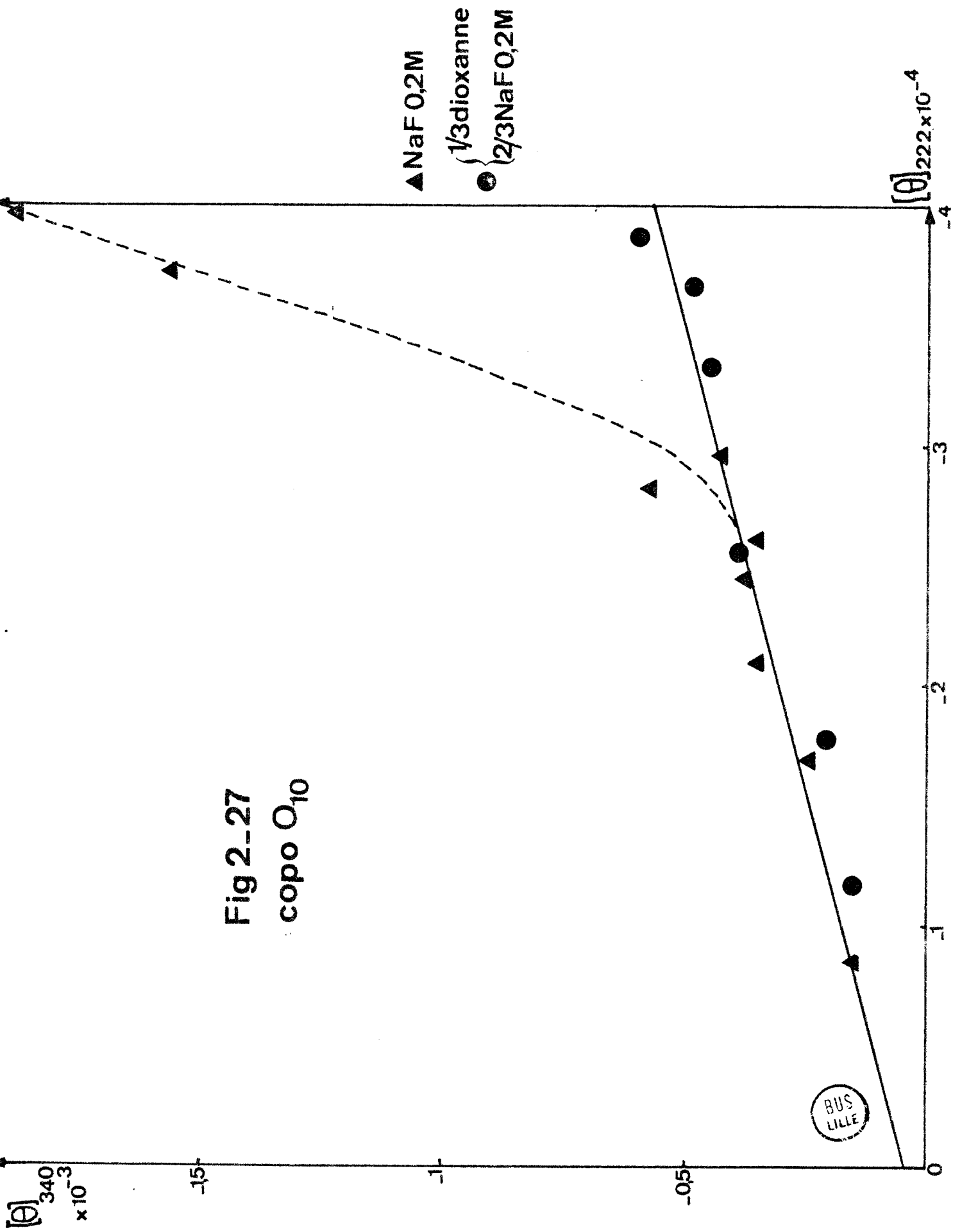
#### 2-4. Conclusion.

L'étude par dichroïsme circulaire nous a montré qu'il y avait stabilisation de la structure hélicoïdale par les groupements nitrobenzyle. Cette stabilisation est concurrencée par des phénomènes d'agrégation lorsque le pourcentage de groupements hydrophobes est élevé (20%) et lorsque le polymère est faiblement ionisé.

L'étude des bandes dichroïques extrinsèques nous a montré l'importance des interactions entre chaînes latérales hydrophobes tout au long de la transition hélice-chaîne. Ces interactions sont responsables de la majeure partie des effets Cotton observés sur le groupement 2 nitrobenzyle, et ceci d'autant plus que le taux d'hélicité est élevé.



BUS  
LILLE





## T R O I S I E M E   C H A P I T R E

- = 0 0 0 0 = -

Etude potentiométrique.

### 3.1. Rappels théoriques.

3-1-1. Théorie de ZIMM et RICE.

3-1-2. Calcul des paramètres thermodynamiques à partir des courbes de titration transformées.

### 3.2. Résultats expérimentaux.

3-2-1. Méthodes d'étude.

3-2-1-1. Appareillage.

3-2-1-2. Préparation des solutions.

3-2-2. Etude des courbes de titration. Détermination de la coopérativité de la transition.

3-2-3. Etude des courbes de titration modifiées.

3-2-4. Mesure des paramètres thermodynamiques de la transition.

### 3.3. Discussion.

L'intérêt majeur de l'étude potentiométrique est de pouvoir calculer les paramètres thermodynamiques de la transition hélice-chaîne.

Ces paramètres sont l'énergie libre  $\Delta G_{hc}^{\circ}$ , l'enthalpie  $\Delta H_{hc}^{\circ}$  et l'entropie  $\Delta S_{hc}^{\circ}$ .

Plusieurs théories ont été élaborées pour permettre le calcul de ces paramètres thermodynamiques :

- théorie de LIFSON et ROIG (32) basée sur l'étude de la variation du pourcentage d'hélicité en fonction de la température et du degré de polymérisation.

- théorie de ZIMM et RICE (83) dérivée de la théorie de ZIMM et BRAGG (84). Cette théorie permet d'étudier les polyélectrolytes à partir des courbes de titration potentiométrique. On a ainsi pu connaître les paramètres thermodynamiques de la transition hélice chaîne du PLGA à différentes forces ioniques et dans des mélanges de solvants (15, 18, 85, 89).

Cette méthode peut également permettre l'étude de polypeptides constitués d'acides aminés à chaîne latérale non ionisable en milieu aqueux. Il suffit pour cela de synthétiser des copolymères statistiques composés de l'acide aminé à chaîne latérale hydrophobe et d'un acide aminé à chaîne latérale ionisable (lysine, acide glutamique) dont les caractéristiques sont connues (15, 32).

C'est donc cette dernière méthode que nous avons utilisée pour étudier nos copolymères. Les paramètres du PLGA dans NaCl 0,2 M ont été calculés par MILLER et NYLUND (18).

Energie libre de transition à 25°C  $\Delta H_{hc}^{\circ} = -130$  cal/mole

Enthalpie de transition  $\Delta H_{hc}^{\circ} = -1000$  cal/mole

Entropie de transition  $\Delta S_{hc}^{\circ} = -2,8$  cal/mole/deg.

### 3.1. Rappels théoriques

#### 3.1-1. Théorie de ZIMM et RICE

Considérons un polyacide en solution diluée. Nous ne tiendrons compte que des interactions soluté-solvant (nous nous placerons dans des conditions telles que nous puissions négliger les interactions soluté-soluté). Chaque molécule

de polymère est composée de sous unités identiques, chacune d'elle pouvant s'ioniser ou former un pont hydrogène.

Un tel système peut être décrit par la fonction de partition Z :

$$\textcircled{1} \quad Z = \sum_{\{\mu_i\}} \sum_{\{\eta_i\}} \exp \left( - \frac{W(\{\mu_i\}\{\eta_i\})}{kT} \right) Q^0(\{\mu_i\}) \lambda^{\sum_i \eta_i}$$

- $\eta_i$  prend la valeur 1 ou 0 suivant que le site  $i$  est ou non chargé.
- $\mu_i$  prend la valeur 1 ou 0 suivant que le site  $i$  est ou non engagé dans un pont hydrogène.
- $Q^0(\{\mu_i\})$  est l'énergie libre de la chaîne non ionisée à un état donné de  $\mu_i$ .
- $W(\{\mu_i\}\{\eta_i\})$  est l'énergie libre d'interaction électrostatique correspondant à la configuration du squelette contenant  $\{\mu_i\}$  ponts hydrogène et à la distribution de charges spécifiée par  $\{\eta_i\}$ .
- $\lambda$  est défini en fonction de la concentration des ions  $H^+$  dans le solvant par la relation :

$$\textcircled{2} \quad 0,434 \ln \lambda = \text{pH} - \text{pKa}^0$$

dans laquelle

-  $\text{pH}$  est le cologarithme de la concentration des ions  $H^+$  dans la solution.

-  $\text{pKa}^0$  est le cologarithme de la constante intrinsèque de dissociation du groupement carboxylique (en absence d'interactions avec les autres groupements).

Le degré d'ionisation  $\alpha$  du polyion peut s'écrire:

$$\textcircled{3} \quad \alpha = \frac{1}{n} \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln \lambda}$$

où  $n$  est le nombre de sites chargés sur le polymère.

Si nous estimons que le polymère peut adopter soit une structure totalement hélicoïdale soit une structure totalement en chaîne statistique, il sera alors caractérisé par des fonctions de partition de la forme (1). Les degrés d'ionisation de ces deux formes hypothétiques pourront alors s'écrire:

$$(4) \quad \alpha_n = \frac{1}{n} \frac{\partial \ln Z_h}{\partial \ln \lambda} ; \quad \alpha_c = \frac{1}{n} \frac{\partial \ln Z_c}{\partial \ln \lambda}$$

Considérons pour le moment la molécule non chargée ( $\alpha=0$ ) et soit  $s$  la constante d'équilibre pour ajouter à un segment hélicoïdal un nouveau résidu qui appartient à un segment sous forme de chaîne statistique; on pourra donc écrire quand  $\alpha=0$  et que le polymère adopte une conformation 100% hélicoïdale:

$$(5) \quad (Z)_{\alpha=0} = s^n$$

A partir des équations (3) et (4) on obtient:

$$(6) \quad \ln m - \ln s = \int_{\lambda(0)}^{\lambda(\alpha)} \alpha d \ln \lambda$$

$$(7) \quad \ln c_0 = \int_{\lambda(0)}^{\lambda(\alpha)} \alpha_c d \ln \lambda ; \quad \ln h_0 = \int_{\lambda(0)}^{\lambda(\alpha)} \alpha_h d \ln \lambda$$

$$\text{avec } m = Z^{1/n}; \quad c_0 = Z_c^{1/n} \quad \text{et } h_0 = Z_h^{1/n} \quad (8)$$

$m$ ,  $c_0$  et  $h_0$  étant les fonctions de partition par résidu du mélange, de la chaîne pure et de l'hélice pure respectivement.

Si l'état entièrement chargé est supposé être complètement sous forme chaîne statistique nous avons alors :

$$(9) \quad (m)_{\alpha=1} = (c_0)_{\alpha=1}$$

et alors

$$(10) \quad \ln s = \int_{\lambda(0)}^{\lambda(1)} (\alpha_c - \alpha) d \ln \lambda$$

Pour les équations (6), (7) et (10) on utilise les conditions aux limites pour  $\alpha=0$ .

$$(11) \quad c_0 = 1; h_0 = 1$$

Les intégrales peuvent être transformées de la façon suivante:

$$(12) \quad \int_{\lambda(0)}^{\lambda(\alpha)} (\alpha_c - \alpha_h) d \ln \lambda = \int_{\lambda(0)}^{\lambda(\alpha)} \int_{\alpha_h}^{\alpha_c} d\alpha d \ln \lambda =$$

$$\int_{\ln \lambda(\alpha_h) - \ln(\alpha_h/1-\alpha_h)}^{\ln \lambda(\alpha_c) - \ln(\alpha_c/1-\alpha_c)} \int_{\alpha_h}^{\alpha_c} d\alpha d [\ln \lambda - \ln(\alpha/1-\alpha)]$$

Si on trace le graphe de  $[\text{pH} - \text{pK}_a^0 - \log(\alpha/1-\alpha)]$  en fonction de  $\alpha$  (Fig 3-1) la surface OACD est égale à  $\log s$ .

$\log s$  est relié à l'énergie de transition hélice-chaîne  $\Delta G_{hc}^0$  pour un polymère non ionisé par la relation :

$$(13) \quad \Delta G_{hc}^0 = -RT \ln s = 2,3 RT \log s$$

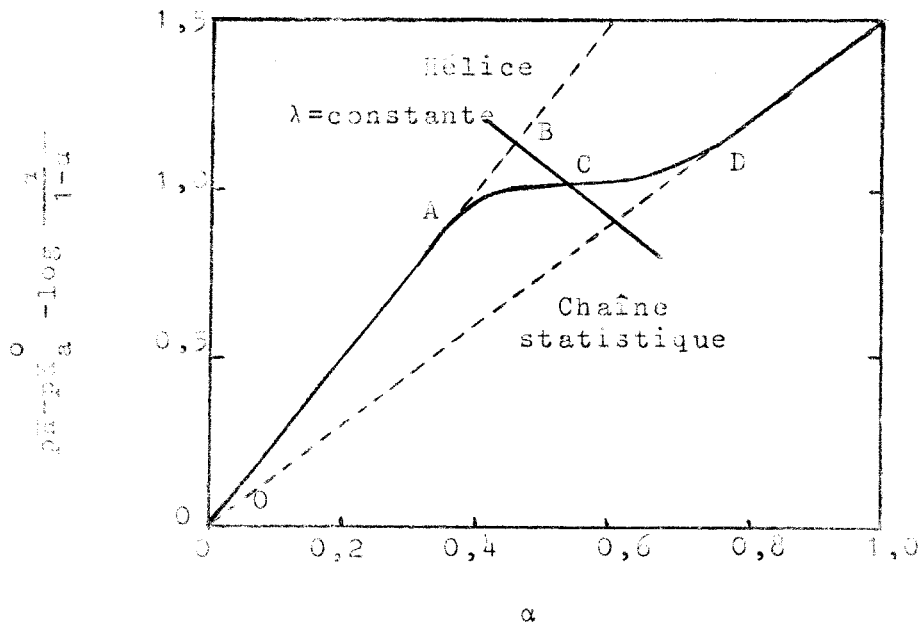


Fig 3-1. Graphe permettant de définir les paramètres thermodynamiques. La surface OACD est égale à  $\log s$ .

3-1-2. Calcul des paramètres thermodynamiques à partir des courbes de titration modifiées.

Les courbes de titration modifiées selon WADA (6) sont obtenues en traçant  $[pH - \log(\alpha/1-\alpha)]$  en fonction de  $\alpha$  (degré de dissociation) (Fig 3-2).

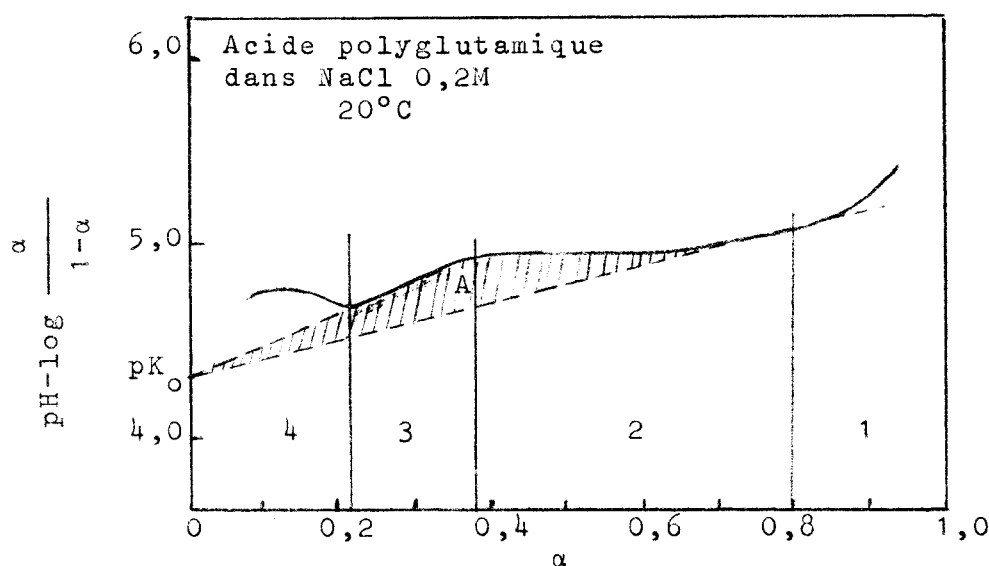


Fig 3-2. Courbe de titration modifiée selon WADA obtenue à partir du PLGA.

Sur ces courbes on peut distinguer quatre parties :

- la partie 1 correspond au dosage de la pelote statistique.
- la partie 2 correspond à la transition hélice-chaîne.
- la partie 3 correspond à l'hélice pure.
- la partie 4 est due à des phénomènes d'agrégation d'abord et de précipitation ensuite.

Le pH d'un polyacide est donné en terme de changement d'énergie libre électrostatique par l'expression :

$$(14) \quad pH = pK_0 - \log \left( \frac{1-\alpha}{\alpha} \right) + \left( \frac{0,434}{RT} \right) \left( \frac{\partial G_{el}}{\partial n} \right)$$

-  $pK_0$  est le cologarithme de la constante intrinsèque de dissociation du groupement carboxylique.

- $G_{el}$  est l'énergie libre électrostatique du polymère.
- $n$  est le nombre de charges sur le polyion.

L'équation (14) nous indique que l'extrapolation des parties de graphe des zones 1 et 3 à  $\alpha=0$  nous fournit  $pK_0$ . Il arrive souvent que l'on soit amené à faire des extrapolations courbes. Ce n'est pas seulement parce que la ligne courbe semble être le prolongement naturel des résultats expérimentaux mais également parce que la relation linéaire entre  $[pH + \log(1-\alpha/\alpha) - pK_0]$  et  $\alpha$  obtenue d'après l'approximation de DEBYE et HUCKEL (90-91), s'applique uniquement à des polyions ayant une densité de charge très faible, c'est à dire pour des valeurs de  $[pH + \log(1-\alpha/\alpha) - pK_0] < 0,434$ .

Il est également difficile de déterminer le  $pK_0$  correspondant à la chaîne statistique. L'extrapolation est grande et on a décidé d'une façon arbitraire (87) qu'elle couperait l'axe des ordonnées à  $\alpha=0$  au même point que celle de l'hélice.

NAGAZAWA et HOLTZER (87), d'après leur notation ont proposé la relation suivante permettant le calcul de l'énergie libre de la transition hélice-chaîne  $\Delta G_{hc}^0$  :

$$(15) \quad \Delta G_{hc}^0 = - \frac{RT}{0,434} A$$

A étant la surface hachurée sur la figure 3-2.

Si on admet que les résidus glutamate de 2 nitro-benzyle sont répartis d'une façon statistique le long de la chaîne principale de PLGA, le transfert d'un résidu acide glutamique de la structure chaîne statistique à la structure hélicoïdale amènera le transfert d'un résidu glutamate de 2 nitro-benzyle voisin, de la structure chaîne à la structure hélice.

Pour un taux de  $\Phi_{NO_2}$  inférieur à 25%, les interactions au moment de la transition peuvent être mises sous la forme (27):

$$\begin{aligned}
 (16) \quad \Delta G_{hc}^{\circ} = & \Delta G_{glu}^{\circ} + \frac{f \phi NO_2}{(1-f\phi NO_2)} \Delta G_{\phi NO_2}^{\circ} + \frac{2 f \phi NO_2}{(1-f\phi NO_2)} \Delta G_{glu-\phi NO_2}^{\circ} \\
 & + \frac{(1-2f\phi NO_2)}{(1-f\phi NO_2)} \Delta G_{glu-glu}^{\circ} + \frac{(1-2f\phi NO_2)}{(1-f\phi NO_2)} \Delta G_{glu-glu}^{\circ} \\
 & + \frac{(2f\phi NO_2)}{(1-f\phi NO_2)} \Delta G_{\phi NO_2-glu}^{\circ}
 \end{aligned}$$

-  $\Delta G_{glu-\phi NO_2}^{\circ}$  représente le changement d'énergie libre d'interaction entre un résidu acide glutamique et un résidu  $\phi NO_2$  adjacent dans la chaîne peptidique lors de la transition hélice non chargée-chaîne non chargée.

-  $\Delta G_{glu-\phi NO_2}^{\circ}$  représente l'énergie de la même interaction entre le  $n^{i\text{ème}}$  et  $n+4^{i\text{ème}}$  résidu de la chaîne peptidique. Nous avons la même notation pour ce qui concerne les interactions glu-glu.

Cette équation contient uniquement les termes concernant les interactions du type  $n, n+1$  et  $n, n+4$  ainsi que les termes de stabilité intrinsèque de l'acide glutamique et du glutamate de nitrobenzyle; toutes les autres interactions sont présumées faibles devant celles-ci.

MILLER et NYLUND (18) ont proposé une approximation : pour chaque résidu acide glutamique transféré nous avons

$$\frac{f \phi NO_2}{f glu} \text{ résidus } \phi NO_2 \text{ transférés dans le voisinage :}$$

$$(17) \quad \Delta G_{hc}^{\circ} = \Delta G_{hc}^{\circ} (glu) + \left( \frac{f \phi NO_2}{1-f\phi NO_2} \right) \Delta G_{hc}^{\circ} (\phi NO_2)$$

-  $\Delta G_{hc}^{\circ} (glu)$  et  $\Delta G_{hc}^{\circ} (\phi NO_2)$  étant les énergies libres de conversion d'un résidu acide glutamique et d'un  $\phi NO_2$  respectivement, d'une hélice  $\alpha$  non chargée à une chaîne statistique non chargée.



-  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  est l'énergie de transition observée sur le copolymère.  $\Delta G_{hc}^{\circ}(\text{glu})$  étant connue, on peut donc calculer  $\Delta G_{hc}^{\circ}(\phi\text{NO}_2)$  : l'énergie libre de transition d'une chaîne hypothétique de glutamate de 2 nitrobenzyle en milieu aqueux:

$$(18) \quad \Delta G_{hc}^{\circ}(\phi\text{NO}_2) = \left( \frac{\Delta G_{hc}^{\circ} - \Delta G_{hc}^{\circ}(\text{glu})}{f\phi\text{NO}_2} \right) f \text{ glu}$$

En étudiant la variation de l'énergie libre de transition  $\Delta G_{hc}^{\circ}(\phi\text{NO}_2)$  en fonction de la température, il est possible de connaître l'enthalpie  $\Delta H_{hc}^{\circ}(\phi\text{NO}_2)$  et l'entropie  $\Delta S_{hc}^{\circ}(\phi\text{NO}_2)$  de la transition à partir de la relation :

$$(19) \quad \Delta G_{hc}^{\circ}(\phi\text{NO}_2) = \Delta H_{hc}^{\circ}(\phi\text{NO}_2) - T \Delta S_{hc}^{\circ}(\phi\text{NO}_2)$$

### 3-2. Résultats expérimentaux.

#### 3-2-1. Appareillage et méthodes.

Les mesures de pH ont été réalisées au moyen d'un pH mètre Radiometer modèle 26. Nous avons utilisé une électrode de mesure en verre (Ref. Radiometer G 202 C) et une électrode de référence au calomel (Ref. Radiometer K 401).

##### - Préparation des solutions.

Pour chaque copolymère une solution stock est préparée. Elle servira à faire les mesures aux cinq températures (1°C, 11°C, 25°C, 40°C et 55°C).

Pour cela on dissout 150 mg de produit dans un léger excès de

$$\begin{cases} \text{NaHCO}_3 & 0,1\text{M} \\ \text{NaCl} & 0,2\text{M} \end{cases}$$

On travaille en présence d'un électrolyte fort pour diminuer les effets de polyélectrolyte.

Lorsque le produit est dissous, on complète à 100ml avec NaCl 0,2M. On fait alors un spectre U.V et on détermine le % exact de  $\phi\text{NO}_2$  ( voir chapitre I).

On met ensuite en dialyse contre NaCl 0,2M durant 12 heures ( on élimine ainsi l'excès de  $\text{NaHCO}_3$  et le  $\text{CO}_2$  qui pourraient perturber le dosage).

On refait un spectre U.V après dialyse. On observe souvent une diminution de densité optique. On suppose alors que la différence est due à une hydrolyse des groupements nitro-benzyle (en effet l'opération avait été réalisée au préalable sur le PLGA ayant servi à la préparation des copolymères et avait montré qu'il n'y avait aucune perte de poids au cours de la dialyse). On détermine alors le nouveau taux d'estérification.

On prélève 20ml de la solution que l'on met dans une cuve thermostatée et on dose avec une solution d'acide chlorhydrique 0,05N et de NaCl 0,2M au moyen d'une burette graduée au 100<sup>ème</sup> de ml.

Au début du dosage tous les groupements carboxyliques sont salifiés ( $\alpha=1$ ). Soit  $x$  le nombre de groupements carboxyliques présents dans la solution.

Lorsqu'on ajoute  $n$  ml d'acide chlorhydrique on a  $n \cdot 0,05 \cdot 10^{-3}$  résidus  $-COO^-$  qui passeront à l'état  $-COOH$ ; par conséquent le coefficient de dissociation  $\alpha$  sera :

$$\alpha = \frac{x - n \cdot 0,05 \cdot 10^{-3}}{x}$$

### 3-2-2. Etude des courbes de titration. Détermination de la coopérativité de la transition.

Les courbes de titration des cinq copolymères et du PLGA à 25°C sont représentées sur la figure 3-3. Nous voyons que lorsque le taux de  $\Phi NO_2$  augmente les courbes de titration sont déplacées vers les hauts pH avec un déplacement plus important pour les faibles valeurs de  $\alpha$ . (Notons le comportement anormal des copolymères  $O_{16}$  et  $O_{22}$  à  $pH < 5$ . Ce phénomène est certainement dû à la précipitation).

Donc pour un même pH nous avons un coefficient de dissociation  $\alpha$  d'autant plus faible que le copolymère est riche en  $\Phi NO_2$ . Les raisons de ce comportement sont difficiles à déterminer, la nature des forces électrostatiques à l'intérieur du polymère étant mal connue; mais il semble que la chaîne

latérale hydrophobe fasse varier la constante diélectrique du milieu à travers lequel les chaînes latérales chargées interagissent.

A partir des courbes de titration de la figure 3-3 il nous a été possible de tracer les différentes transitions observées en dichroïsme circulaire à partir de  $[\theta]_{222}$  en fonction du coefficient de dissociation  $\alpha$ . (Fig.3-4).

Pour avoir une meilleure comparaison entre les différentes courbes en forme de sigmoïde nous pouvons tracer  $\ln(f_h/1-f_h)$  en fonction de  $\alpha$ . ( $f_h$  étant le pourcentage d'hélicité) (Fig.3-5) en estimant que la courbe sigmoïde puisse être décrite par l'équation empirique de STEIGMAN et COSANI (92).

$$f_h = (1 + e^{-a+b\alpha})^{-1}$$

$$\frac{1}{f_h} - 1 = e^{-a+b\alpha}$$

$$\ln\left[\frac{1}{f_h} - 1\right] = -a+b\alpha$$

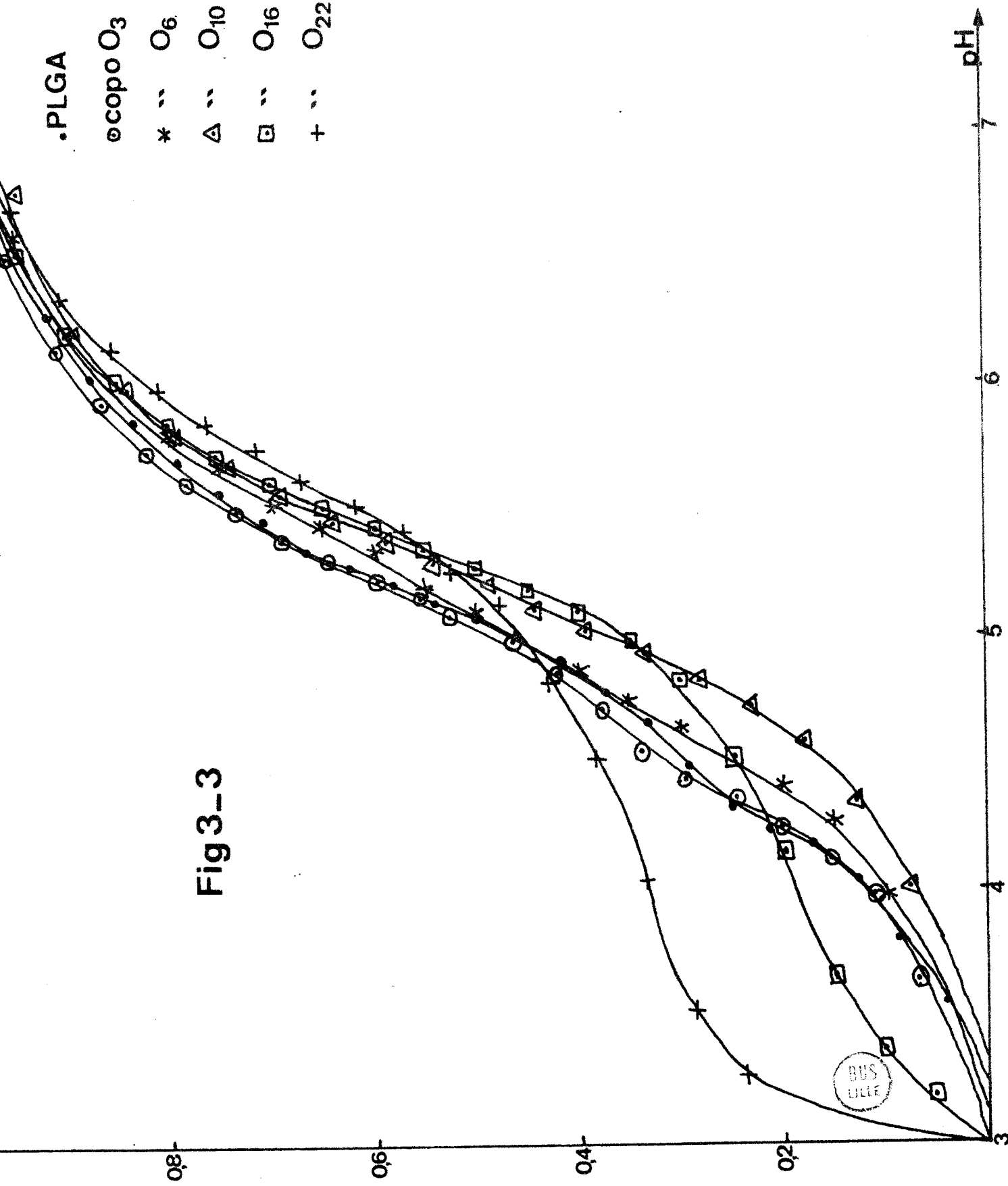
$$\ln \frac{f_h}{1-f_h} = a-b\alpha$$

Le graphe de  $\ln(f_h/1-f_h)$  en fonction de  $\alpha$  est donc une droite de pente  $b$  et dont l'ordonnée à l'origine est  $a$ .  $b$  est une mesure arbitraire de la coopérativité de la transition ( $b$  sera d'autant plus grand que la transition sera coopérative). Le rapport  $a/b$  nous fournit le  $\alpha$  du milieu de la transition.

Les valeurs de  $a$ ,  $b$  et  $a/b = \alpha_{1/2}$  sont reportées dans le tableau 3-1.

	a	b	$\alpha_{1/2}$
PLGA	3,15	7,81	0,4
Copo 0 <sub>3</sub>	3,25	7,5	0,51
Copo 0 <sub>6</sub>	3,25	6,65	0,49
Copo 0 <sub>10</sub>	2,95	6,05	0,49
Copo 0 <sub>16</sub>	3,65	6,00	0,61
Copo 0 <sub>22</sub>	4	5,65	0,71

Tableau 3-1. Valeurs de  $a$ ,  $b$ ,  $\alpha_{1/2}$  calculées à partir de l'équation de STEIGMAN et COSANI.



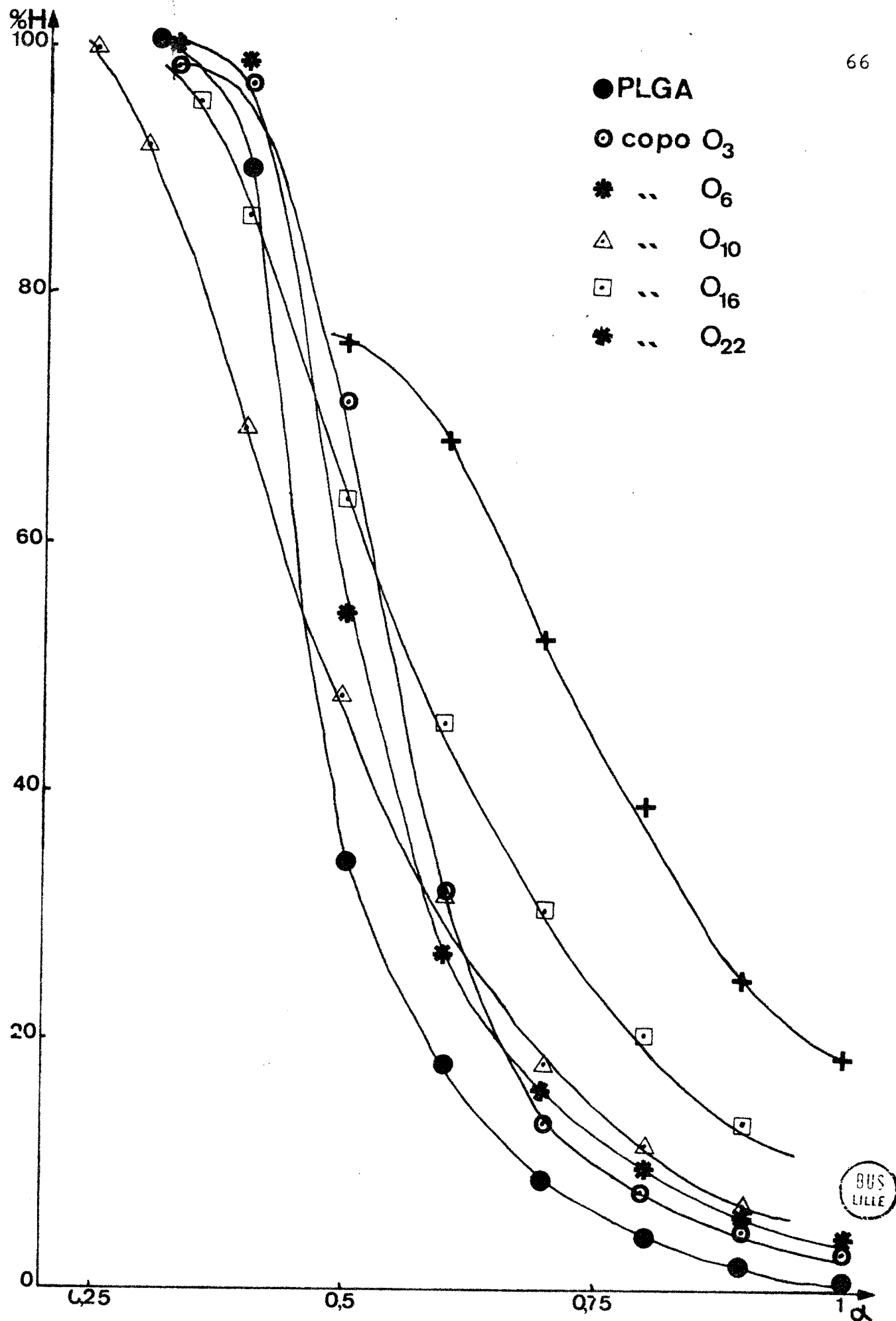
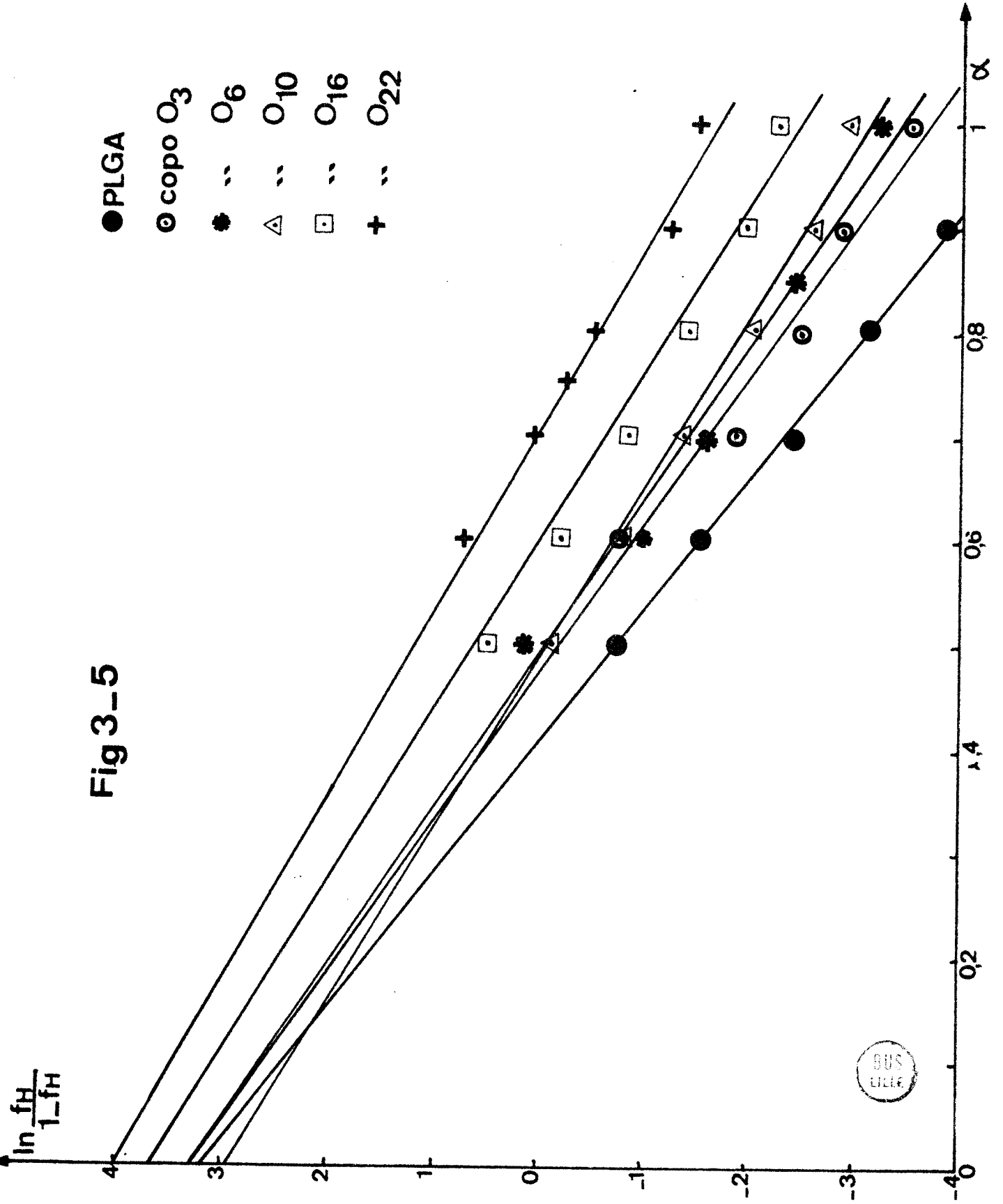


Fig 3\_4

Fig 3-5



SUS EICLÉ

Nous voyons que la coopérativité de la transition diminue lorsque le taux de  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$  augmente, mais semble tendre vers une limite (Fig.3-6). Un tel effet pouvait être attendu par l'introduction d'un résidu stabilisant l'hélice tel que le groupement nitrobenzyle. Lorsque le taux de  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$  augmente les interactions non électrostatiques entre charges lors de la transition hélice-chaîne diminuent. Ainsi la forme hélicoïdale va être rompue moins brusquement par une augmentation de  $\alpha$ . Ceci peut être extrapolé au cas du polyglutamate de nitrobenzyle qui, s'il est soluble dans l'eau, serait sous forme hélicoïdale et indépendant du pH.

La variation de  $\alpha_{1/2}$  en fonction de la teneur en  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$  est difficile à interpréter.  $\alpha_{1/2}$  augmente avec le pourcentage en  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$ , mais sa valeur est cependant la même pour 0,3, 0,6 et 0,10. Cela peut être considéré comme étant du domaine des erreurs expérimentales.

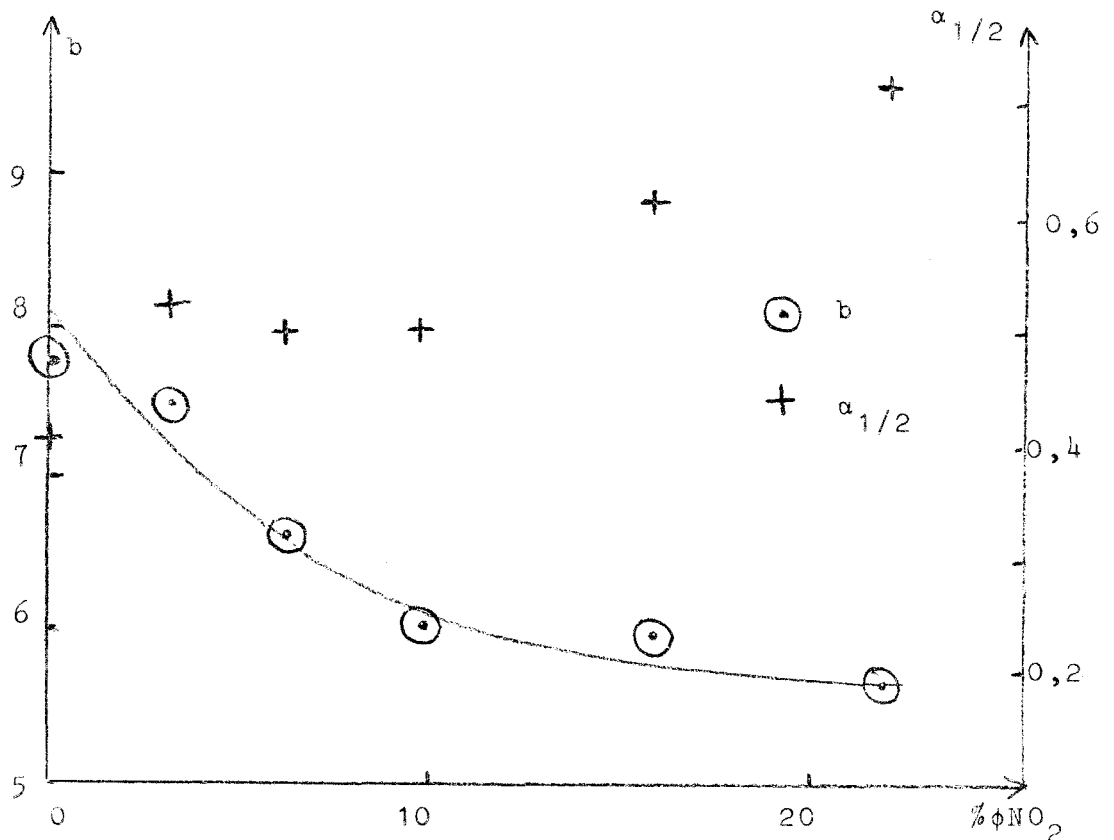


Fig.3-6. Variation du facteur b et de  $\alpha_{1/2}$  en fonction du pourcentage de  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$ .

3-2-3. Etude des courbes de titration modifiées.  
(Fig 3-7 à 3-11).

Les courbes de titration modifiées sont obtenues en traçant  $[\text{pH} - \log(\alpha/1-\alpha)]$  en fonction de  $\alpha$ . Nous voyons que leur allure est affectée par la présence des groupements  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$ . Les courbes dues au Copo  $0_3$  se rapprochent assez bien de celles obtenues à partir du PLGA (Fig 3-2).

Si nous reportons sur un même graphe les courbes obtenues à partir des cinq copolymères à 25°C (Fig 3-12) nous voyons que le pK apparent  $[= \text{pH} - \log(\alpha/1-\alpha)]$  augmente pour une valeur de  $\alpha$  donnée lorsque le taux de  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$  croît. On aurait pu s'attendre à l'effet inverse. En effet lorsque le taux de  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$  augmente la densité de charge diminue. Elles devraient donc interagir moins et ainsi fournir l'effet contraire; c'est à dire un pK apparent plus faible.

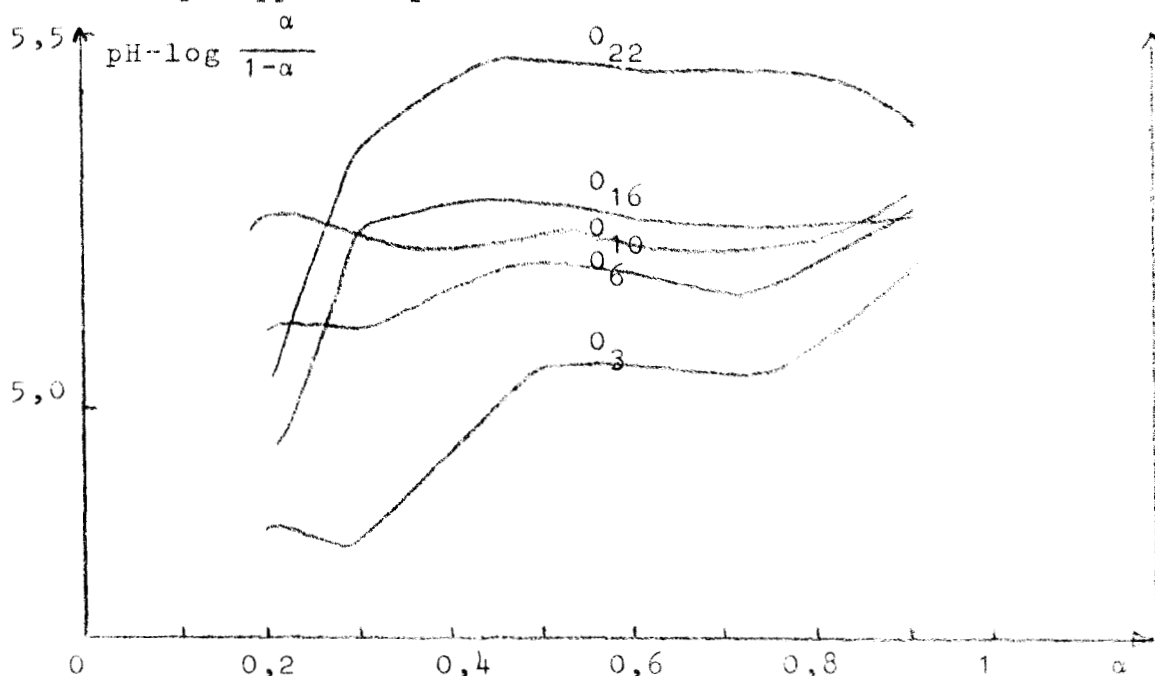


Fig 3-12. Courbes transformées des cinq copolymères à 25°C.

D'autre part on peut admettre d'après les figures 3-7 à 3-11 que le pK intrinsèque n'est pas affecté par l'incorporation de  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$  et qu'il est toujours de 4,5. Cette estimation n'est valable que si les groupements  $\bar{\Phi}\text{NO}_2$  ne modifient pas l'accessibilité du solvant aux groupements carboxyliques. Il semble raisonnable d'admettre cela car les groupe-



# copo O3

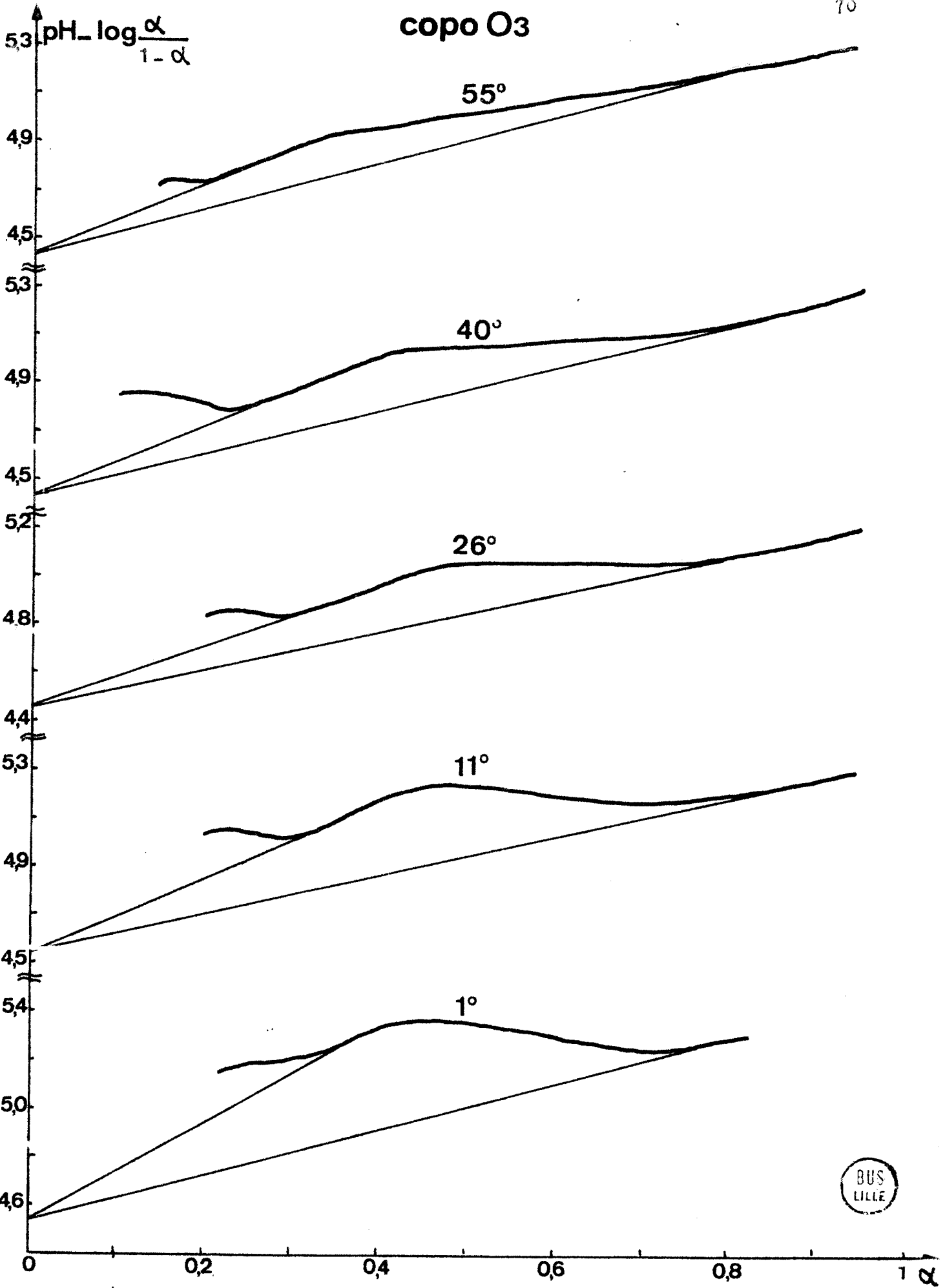


Fig3\_7



copo 06

71

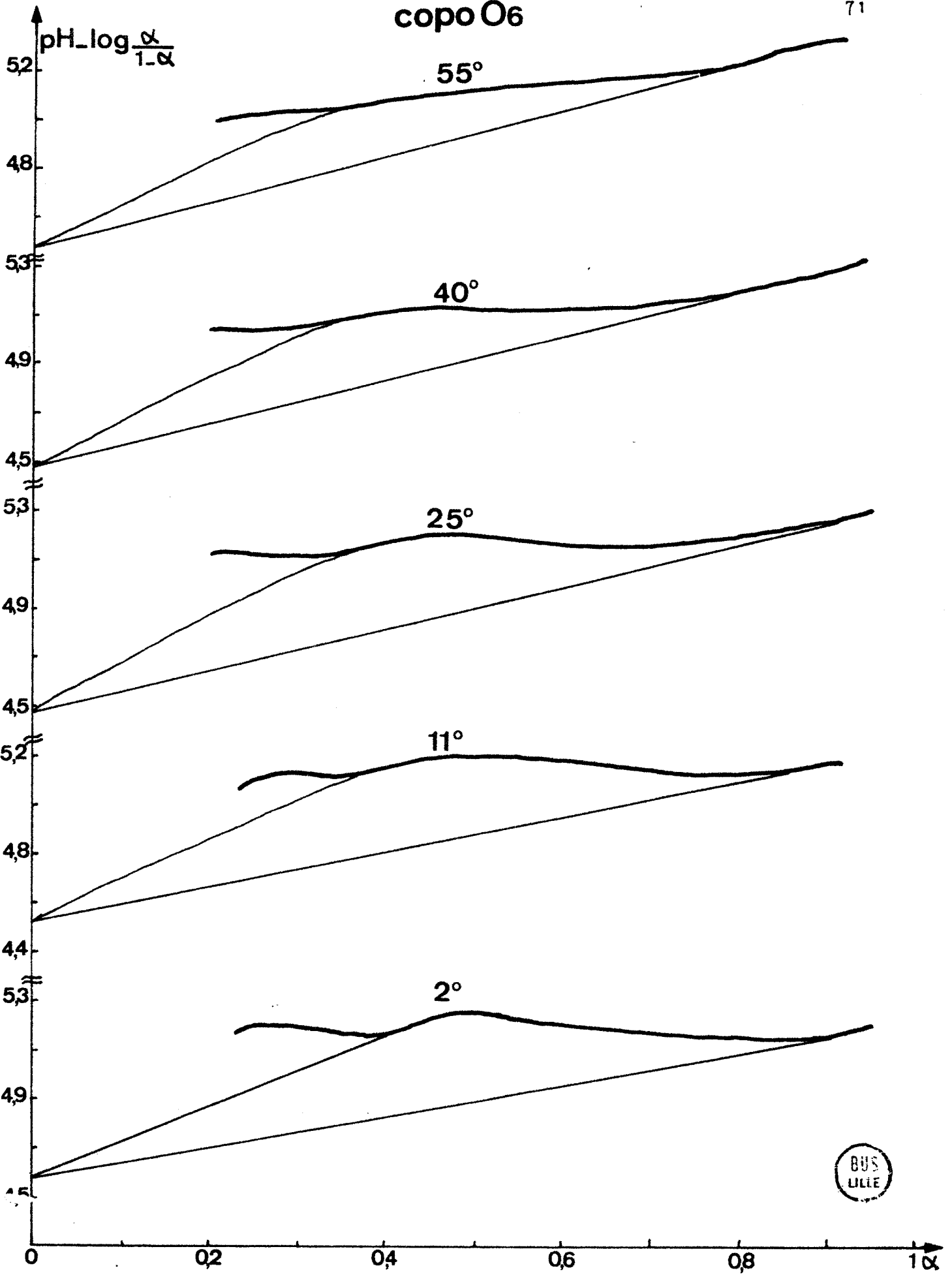
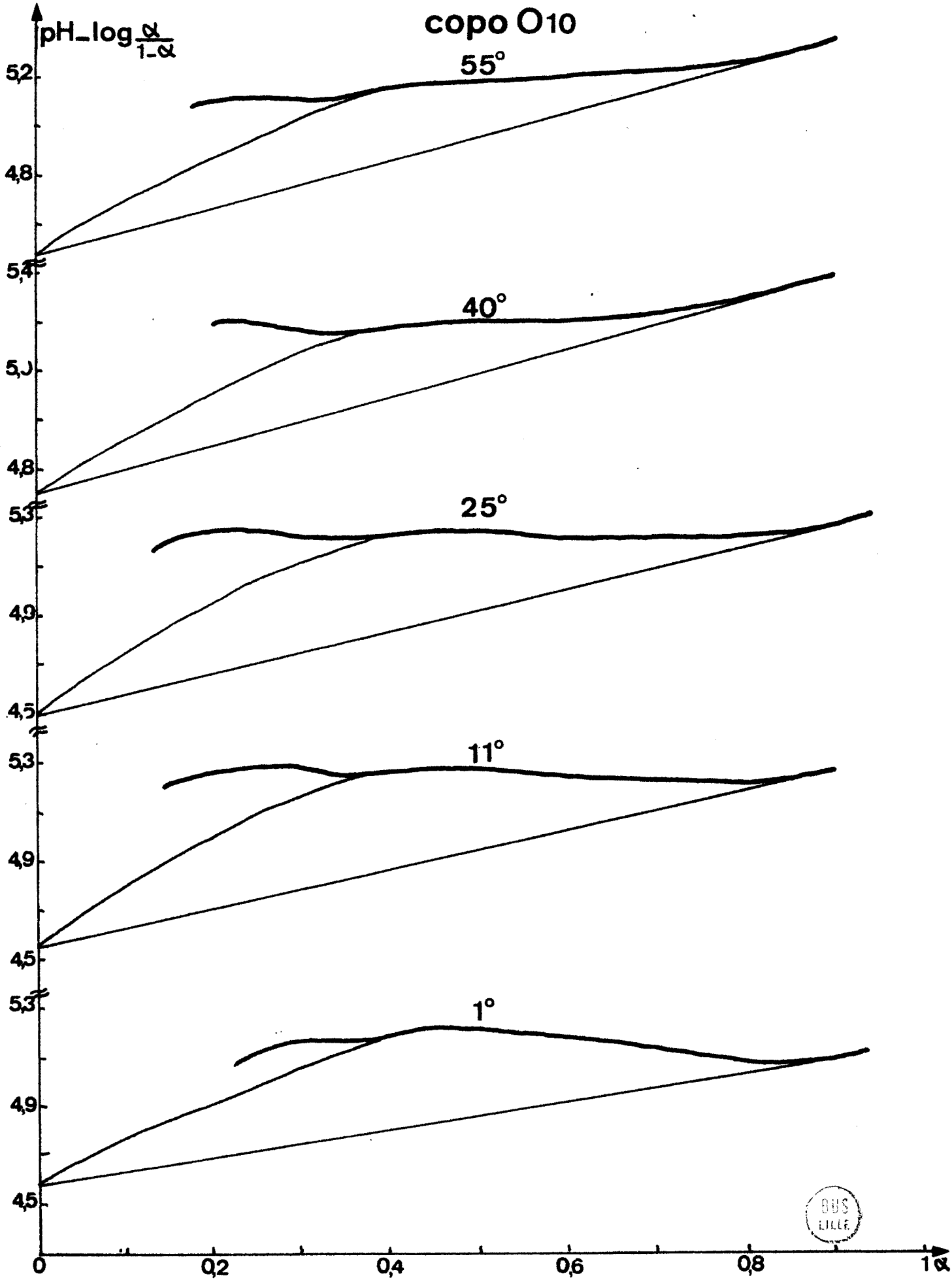


Fig3\_8



**Fig3\_9**



copo O16

55°

40°

26°

10°

1°

$\text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$

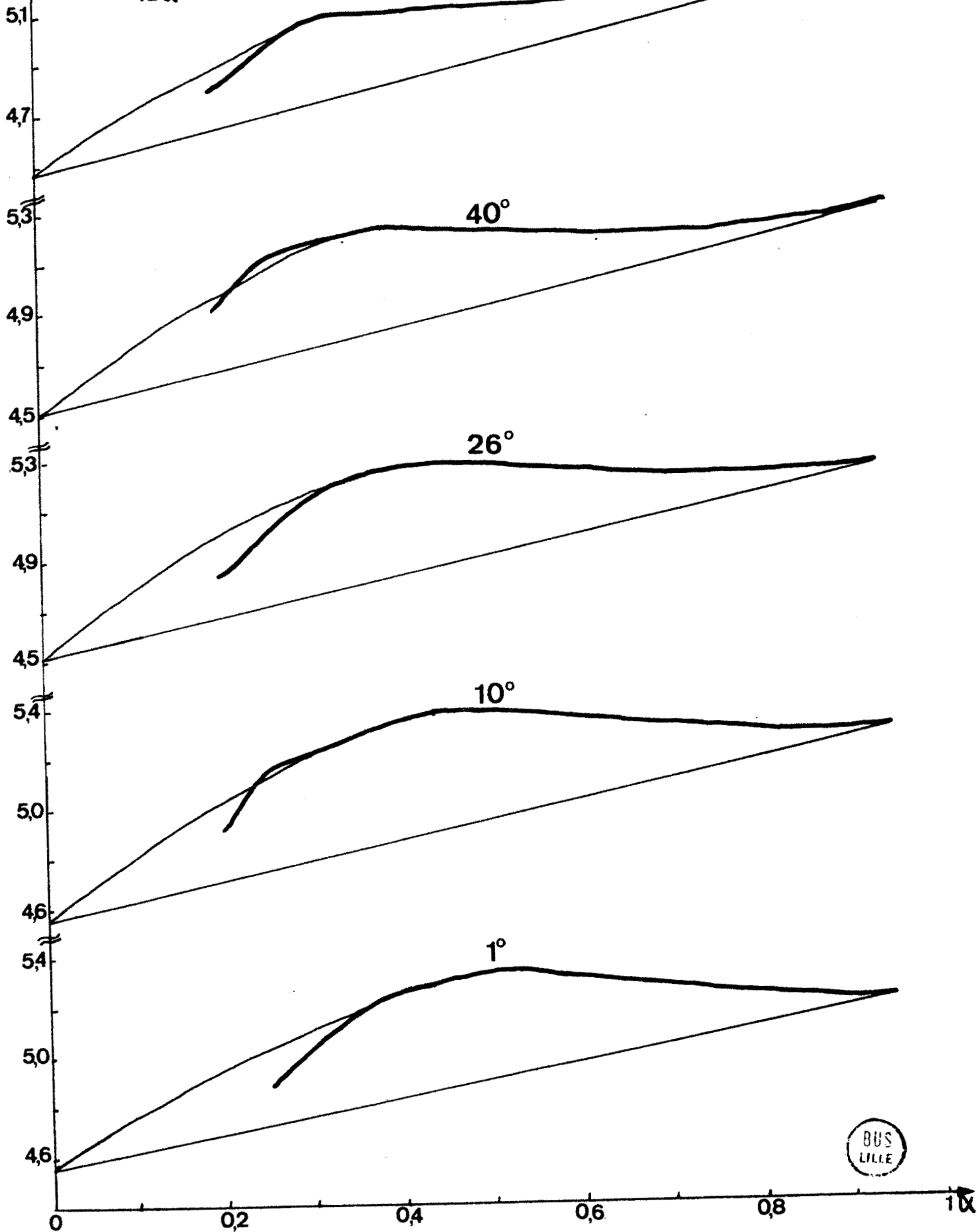


Fig 3\_10

copo O<sub>22</sub>

54°

40°

25°

10°

1°

$\text{pH} - \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$

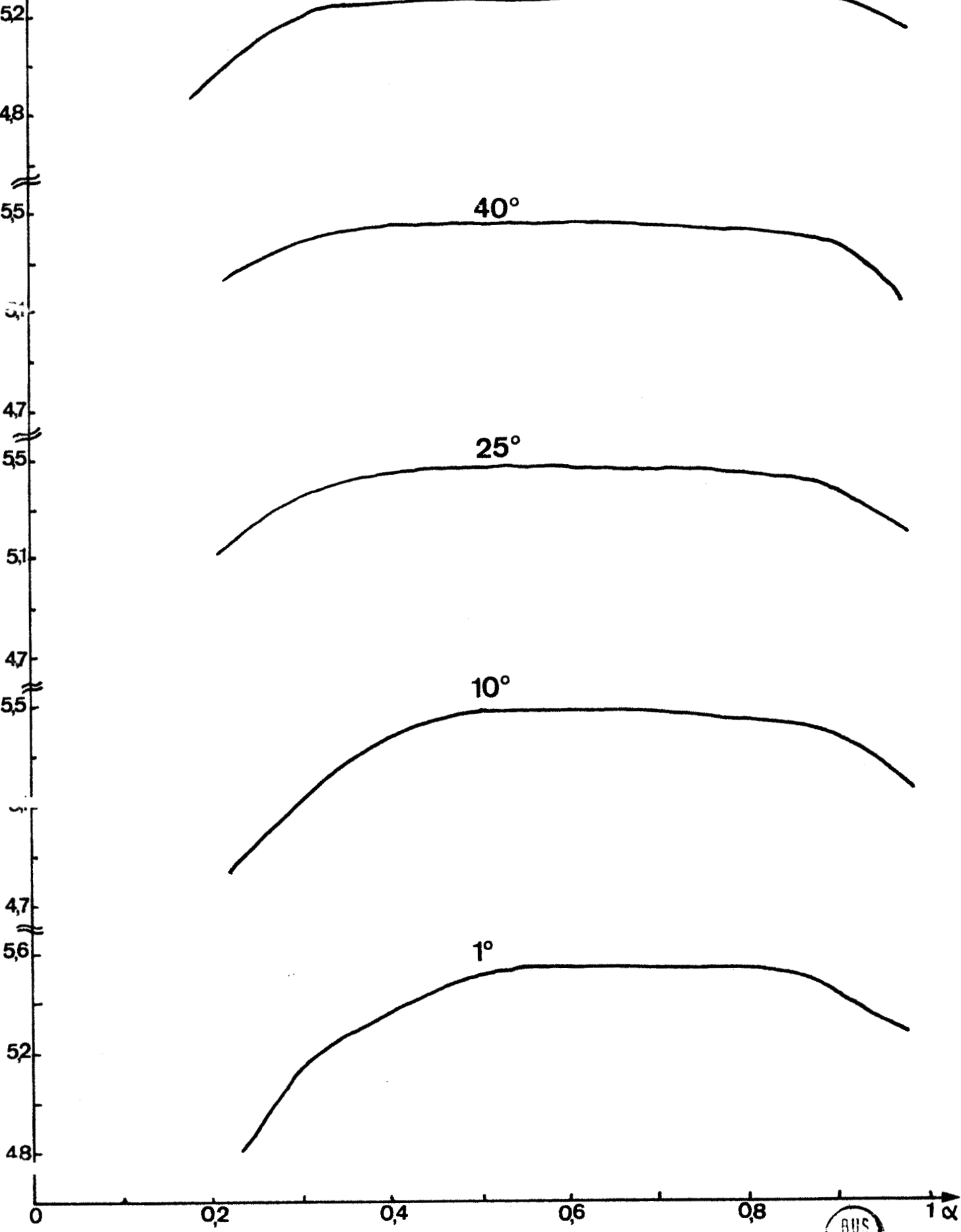


Fig 3-11



ments carboxyliques ainsi que les groupements nitrobenzyle sont portés par une chaîne latérale suffisamment longue et flexible pour que l'accessibilité du solvant aux groupements -COOH ne soit pas gênée.

Pour tenter d'expliquer ce phénomène, certains auteurs ont proposé plusieurs modèles :

- NAGASAWA et HOLTZER (93) ont calculé les interactions électrostatiques dues aux charges réparties sur la surface d'un cylindre. Ces calculs ne peuvent expliquer l'augmentation des interactions électrostatiques lorsque le taux de groupements hydrophobes augmente, à moins que la constante diélectrique du solvant soit traitée arbitrairement comme un paramètre que l'on puisse ajuster. Dans cette théorie les charges sont considérées comme des moyennes, ce qui n'est pas réaliste. Ces auteurs ont donc essayé de réaliser leurs calculs en utilisant les équations du potentiel électrostatique de charges discrètes portées sur un cylindre, mais sans succès.

- Par contre TANFORD et KIRKWOOD (10) ont résolu le problème pour des charges discrètes mais attachées à des sphères et en posant l'hypothèse suivante : l'intérieur posséderait une faible constante diélectrique et ces sphères seraient immergées dans un solvant de forte constante diélectrique. Quand les charges discrètes sont déplacées depuis la surface de la sphère et qu'elles sont enfoncées de plus en plus profondément, donc qu'elles pénètrent dans un milieu de faible constante diélectrique, les interactions électrostatiques semblent alors augmenter d'une façon considérable. L'introduction des charges dans la sphère amènerait un plus grand nombre de lignes de force électrostatique à agir à travers le milieu de faible constante diélectrique et conduirait ainsi à une augmentation des interactions électrostatiques.

Cette théorie peut être appliquée à nos copolymères : puisque dans ce cas les chaînes latérales correspondant aux groupements acide glutamique et glutamate de nitrobenzyle ont des longueurs comparables, on peut considérer que les groupements nitrobenzyle agissent en diminuant la constante diélectrique effective du milieu à travers lequel les charges inter-

agissent (10), donc il y a bien augmentation des interactions électrostatiques.

### 3-2-4. Calcul des paramètres thermodynamiques.

La transition hélice-chaîne réalisée par variation du pH est une transition induite par différence de charges; la variation d'énergie libre  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  correspondant au passage d'un groupement carboxylique non chargé de la structure pelote statistique à la structure hélicoïdale. Lorsqu'on applique les procédés de calcul de  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  à partir des courbes de titration expérimentales obtenues sur les copolymères acide glutamique-glutamate de 2 nitrobenzyle, ce sera bien cette valeur de  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  que l'on obtiendra puisque par la méthode potentiométrique les résidus nitrobenzyle ne peuvent être observés. Cependant, étant donné que les  $\Phi NO_2$  sont répartis de façon statistique et que la transition hélice-chaîne est coopérative (84), le transfert d'un groupement carboxylique (résidu acide glutamique) de la structure chaîne à la structure hélice va également amener le transfert d'un résidu glutamate de nitrobenzyle voisin, de la structure chaîne à la structure hélice. Ceci va se refléter sur les valeurs expérimentales de  $\Delta G_{hc}^{\circ}$ .

Pour chaque résidu acide glutamique transféré nous allons donc avoir  $f \Phi NO_2 / f$  glu résidus glutamate de nitrobenzyle également transférés. Ceci étant vrai tout le long de la transition.

Comme nous l'avons vu précédemment l'énergie libre de transition d'une chaîne hypothétique de glutamate de 2 nitrobenzyle est donnée par la relation :

$$\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2) = \left( \frac{\Delta G_{hc}^{\circ} - \Delta G_{hc}^{\circ} (\text{glu})}{f \Phi NO_2} \right) f \text{ glu}$$

Nous avons essayé de déterminer cette valeur de  $\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2)$  à partir des courbes expérimentales. Cette détermination a été faite à partir des courbes des copolymères  $O_3$ ;  $O_6$ ;  $O_{10}$  et  $O_{16}$ , les courbes correspondant au copolymère  $O_{22}$  étant inexploitable.

Nous avons reporté les valeurs de  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  des différents copolymères à plusieurs températures suivant deux représentations : pour chaque copolymère en fonction de la température (Fig 3-13) et pour chaque température en fonction de la teneur en  $\Phi NO_2$  (Fig 3-14). Dans les deux cas les courbes obtenues peuvent être assimilées à des droites. D'après la relation donnée précédemment ceci nous permet de calculer  $\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2)$  aux différentes températures (Tableau 3-2).

Température	$\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2)$ cal/mole
1°C	-752
11°C	-775
25°C	-900
40°C	-1142
55°C	-1328

Tableau 3-2. Valeurs de  $\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2)$  pour différentes températures.

Si nous reportons ces valeurs de  $\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2)$  en fonction de la température (Fig 3-15) il est possible de calculer les paramètres thermodynamiques d'après la relation :

$$\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2) = \Delta H_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2) - T \Delta S_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2)$$

- la pente de la droite  $\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2) = f(T)$  fournit  $\Delta S_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2)$  c'est à dire l'entropie de la transition d'une chaîne de polyglutamate de 2 nitrobenzyle.

- l'ordonnée à l'origine est égale à  $\Delta H_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2)$  c'est à dire l'enthalpie de la transition.

Ainsi les paramètres thermodynamiques de la transition chaîne statistique-hélice du polyglutamate de 2 nitrobenzyle dans NaCl 0,2M sont :

$$\Delta G_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2) \text{ à } 25^{\circ}C = -956 \text{ cal/mole.}$$

$$\Delta H_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2) = +2200 \text{ cal/mole}$$

$$\Delta S_{hc}^{\circ} (\Phi NO_2) = + 10,6 \text{ cal/mole/deg.}$$



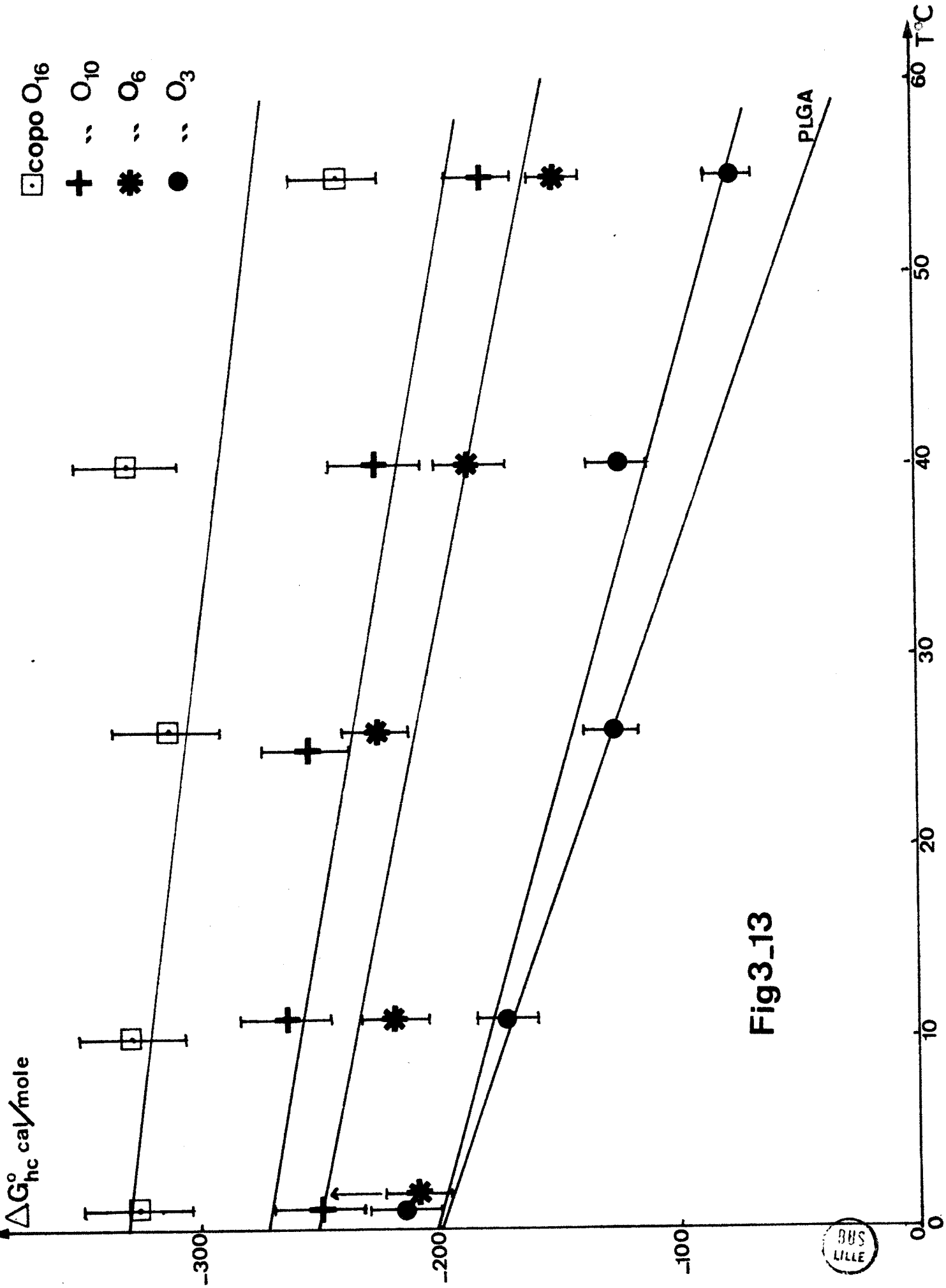
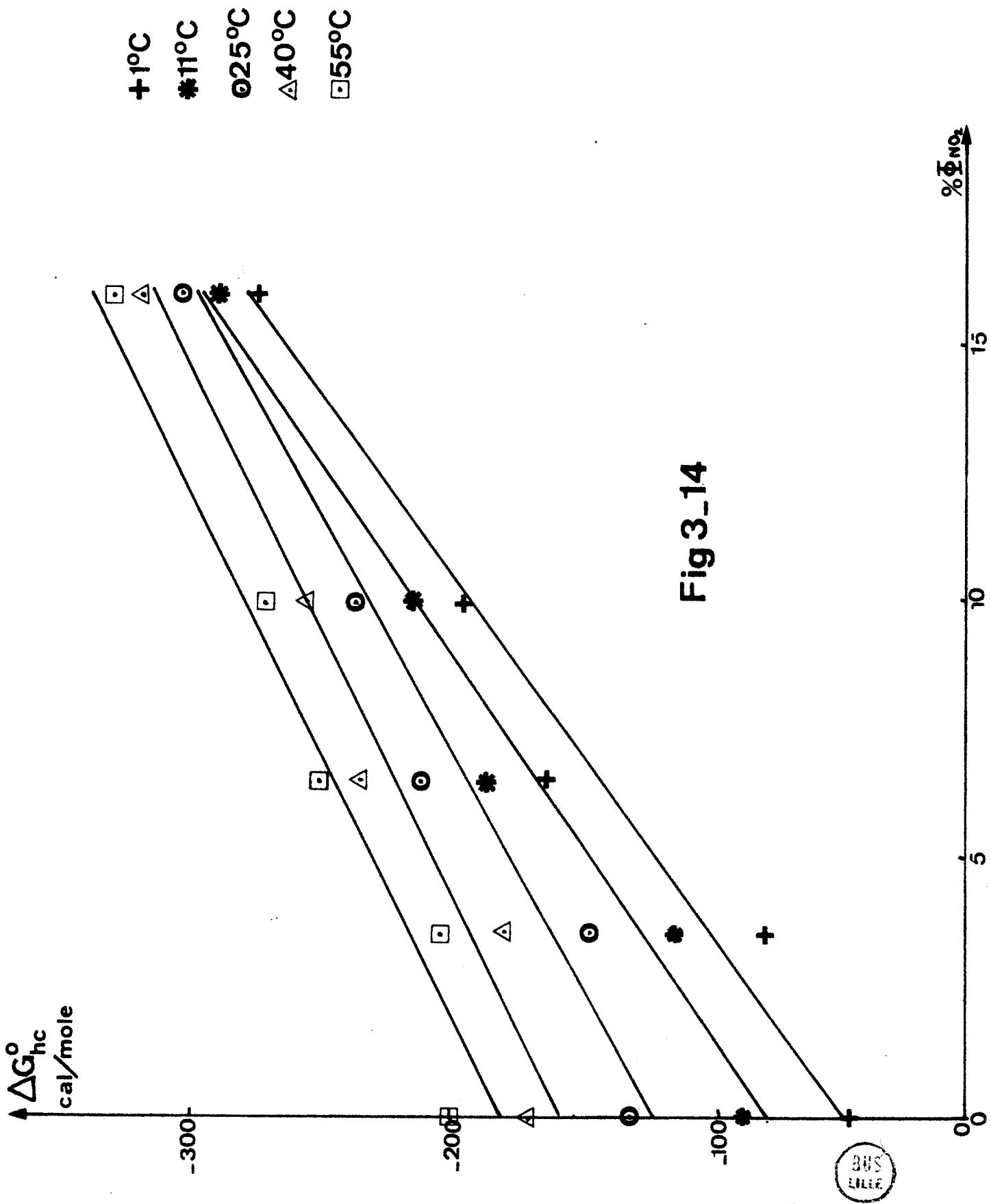


Fig 3\_13



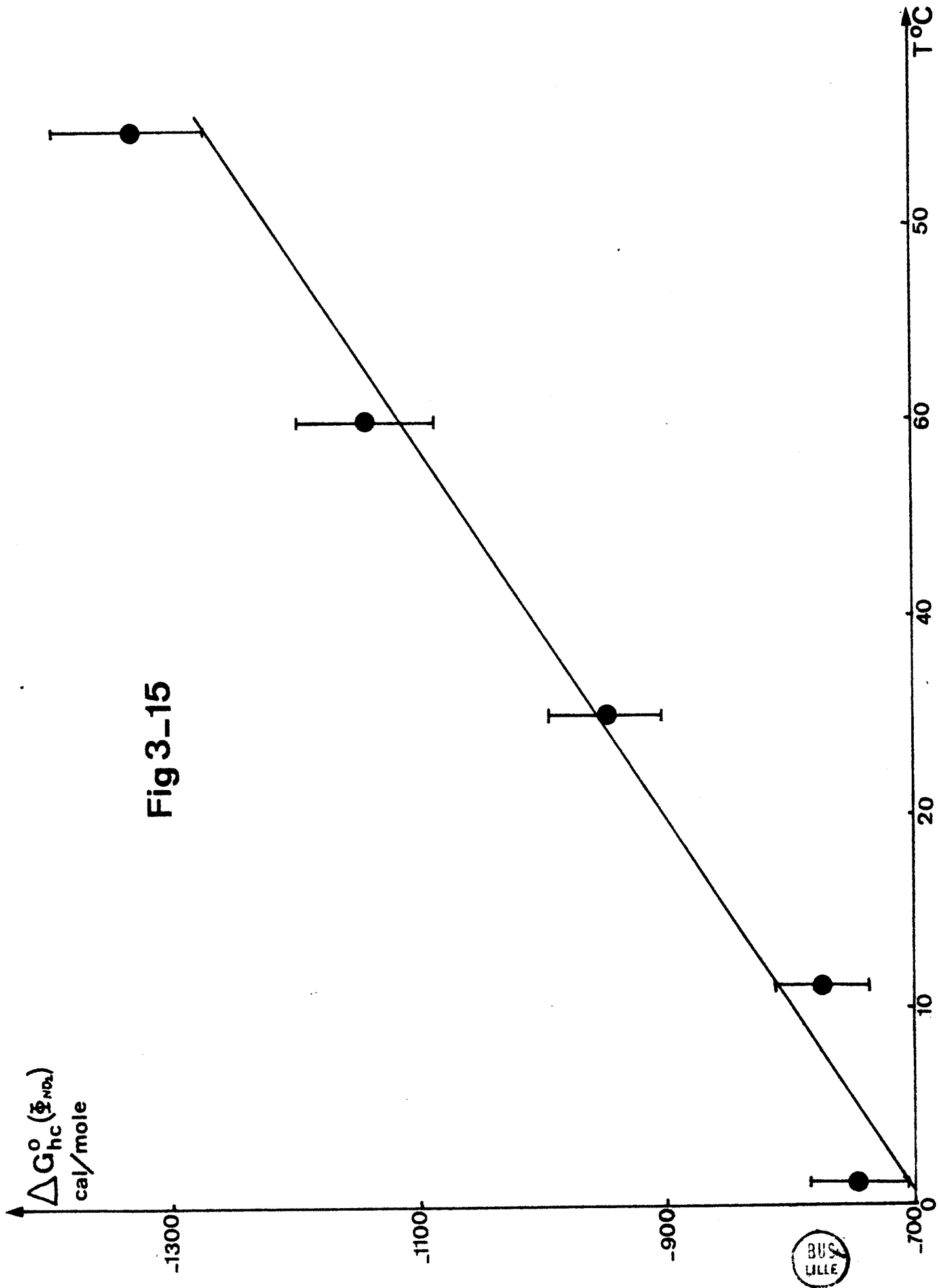


Fig 3-15

BUS LILLE

Nous voyons donc que l'hélice de polyglutamate de 2 nitrobenzyle qui possède une énergie libre à 25°C  $[\Delta G_{hc}^{\circ}(\phi NO_2)]$  de -956 cal/mole est beaucoup plus stable dans NaCl 0,2M que l'hélice de PLGA qui possède une énergie libre à 25°C  $[\Delta G_{hc}^{\circ}(\text{glu})]$  de -130 cal (18). Ceci explique donc l'effet stabilisant des groupements  $\Phi NO_2$  observé en dichroïsme circulaire.

Nous voyons également que l'hélice de polyglutamate de 2 nitrobenzyle possède une enthalpie  $[\Delta H_{hc}^{\circ}(\phi NO_2)]$  et une entropie  $[\Delta S_{hc}^{\circ}(\phi NO_2)]$  positives alors que ces deux paramètres étaient négatifs dans le cas du PLGA:  $\Delta H_{hc}^{\circ}(\text{glu}) = -1000$  cal/mole,  $\Delta S_{hc}^{\circ}(\text{glu}) = -2,8$  cal/mole/degré. (18)

### 3-3. Discussion.

La potentiométrie nous a permis de calculer les paramètres thermodynamiques d'une chaîne de polyglutamate de 2 nitrobenzyle dans NaCl 0,2M.

Nous avons reporté dans le tableau 3-3 les valeurs des paramètres thermodynamiques de différents acides aminés dans différentes conditions, trouvées dans la littérature.

Dans ce tableau nous voyons que l'énergie libre de transition à 25°C est d'autant plus importante, donc l'hélice d'autant plus stable, que la chaîne latérale est encombrante. Notons cependant que la valine ne semble pas obéir à cette règle : elle a une énergie plus importante que la leucine, dans l'eau pure. Mais étant donné que les méthodes d'étude sont différentes pour ces deux acides aminés, la différence observée n'est pas forcément significative. D'autre part il se peut cependant que cet effet soit dû au fait que la valine est ramifiée plus près de la chaîne principale que ne l'est la leucine.

Nous voyons également que l'énergie libre de transition augmente en valeur absolue lorsque la force ionique de la solution augmente, ce qui était attendu puisqu'une élévation de la force ionique favorise les interactions hydrophobes.

Tableau 3-3. Valeurs des paramètres thermodynamiques de la transition hélice chaîne pour différents acides aminés en solution dans l'eau.

'Acide aminé	Solvant	Méthode d'étude	$\Delta G_{hc}^{\circ}$ 25°C cal/mole	$\Delta H_{hc}^{\circ}$ cal/mole	$\Delta S_{hc}^{\circ}$ cal/mole/deg	Ref
Glycine	H <sub>2</sub> O	Calculée d'après la théorie de LIFSON-ROIG	+451	-488	-3,15	37
	H <sub>2</sub> O	Calculée d'après la théorie de LIFSON-ROIG	+202	-588	-2,65	33
Alanine	H <sub>2</sub> O	Mesurée d'après la théorie de LIFSON-ROIG. Copo bloc lys-ala-lys	-24	-188±40	-0,55±0,12	33
	NaBr 0,06M	Titration sur copo statistique ala-lys	-50	-	-	26
Valine	H <sub>2</sub> O	Calculée d'après la théorie de LIFSON-ROIG.	-220	+212	+1,45	37
Leucine	H <sub>2</sub> O	Mesurée d'après la théorie de LIFSON-ROIG. Copo bloc lys-leu-lys	-150	+100	+0,7 à 1	37
	KF 0,05M	Titration sur copo statistique lys-leu	-385	-	-	27
	NaCl 0,2M	Titration sur copo statistique glu-leu	-840	≈-500	légèrement positive	18
Glutamate de 2 nitro benzyle	NaCl 0,2M	Titration sur copo statistique glu- φNO <sub>2</sub>	-956	+2200	+10,6	Ce travail
Acide glutamique	NaCl 0,1M	Titration	-125	-1020	-3	15
	KCl 0,1M	Titration	-105	-1120	-3,43	85
	NaCl 0,2M	Titration	-170	-	-	20
		Titration	-167 ±20	-975 ±50	-1,67 ±0,20	86
		Titration	-130 ±9	-1000	-2,8	18
		Titration	-130	-	-	87
		Titration	-107	-1200	-3,3	88
Titration	-106	-	-	89		

PTITSYN et ses collaborateurs, à l'occasion d'un travail récent (20) ont remis en cause la valeur des paramètres thermodynamiques de la transition hélice-chaîne d'acides aminés hydrophobes en solution aqueuse à partir de courbes potentiométriques. Ces auteurs reprennent une étude de copolymères statistiques acide glutamique-leucine déjà entreprise par MILLER et NYLUND (17-19).

Selon PTITSYN et son équipe, on peut distinguer deux types de copolymères :

- ceux qui contiennent moins de 4% de leucine. Ces copolymères ne subissent pas de phénomènes d'agrégation. Ils ont un comportement identique à celui du PLGA.

- ceux qui contiennent plus de 4% de leucine par contre subissent des phénomènes d'agrégation. Ces auteurs ont réussi à séparer par chromatographie sur "Biogel" des fractions ne subissant pas d'agrégation intermoléculaire. Mais sur ces fractions non agrégées ils mettent tout de même en évidence des phénomènes d'agrégation intramoléculaire par des mesures de luminescence polarisée (21).

Sur le premier type de copolymères ils constatent une très légère déstabilisation de l'hélice lorsque la composition en leucine augmente. (Il faut remarquer cependant que la valeur de  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  donnée par PTITSYN pour le PLGA, c'est à dire -170 cal, est élevée par rapport aux chiffres trouvés dans la littérature. Tableau 3-3.)

Sur le second type de copolymères ils observent une très forte augmentation de  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  lorsque le taux de leucine augmente. Ils attribuent cette augmentation importante de  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  à des phénomènes d'agrégation intramoléculaire. Par contre, le fait que les copolymères pauvres en leucine soient légèrement déstabilisés lorsque la teneur en leucine augmente a été interprété par PTITSYN comme une preuve que la leucine ne favorisait pas la formation de la structure hélicoïdale lorsqu'elle n'était pas agrégée.

Dans le cas de nos copolymères nous ne mettons pas en évidence de diminution de  $\Delta G_{hc}^{\circ}$  pour le copo 0<sub>3</sub>.

Il serait intéressant d'étudier de façon plus précise ces phénomènes d'agrégation intramoléculaire. PITTSYN et ses collaborateurs mettent bien en évidence une agrégation intramoléculaire pour un copolymère à 17% de leucine. Mais comme le montrent les mesures de fluorescence (21), ce phénomène n'apparaît qu'à la fin de la transition, alors que le polypeptide est totalement sous forme hélicoïdale. Il paraît donc difficile d'admettre que cette agrégation puisse perturber les courbes de titration potentiométrique et ainsi fausser les mesures de la transition hélice-chaîne.

Comparons maintenant les valeurs obtenues pour l'enthalpie et l'entropie. Dans notre cas nous observons pour ces deux grandeurs des valeurs fortement positives, ce qui n'avait pas été mis en évidence jusqu'à maintenant. Les deux seuls cas où l'on observe également  $\Delta H$  et  $\Delta S > 0$  sont obtenus pour la valine et la leucine. Mais dans ce cas, ces valeurs ne sont que très légèrement positives et elles ont été obtenues dans l'eau pure et non en solution saline comme dans notre travail. Quant aux résultats donnés par MILLER et NYLUND (18) sur la leucine dans NaCl 0,2M ils manquent de précision et sont plus qualitatifs que quantitatifs.

D'autre part, nous voyons que l'entropie de transition du polyglutamate de 2 nitrobenzyle est positive. On pourrait donc s'attendre à une stabilisation de la structure hélicoïdale de nos copolymères par augmentation de la température. Malheureusement il ne nous a pas été possible de réaliser une étude par dichroïsme circulaire en fonction de la température. En effet ceci n'est pas réalisable techniquement actuellement sur le dichrographe dont nous disposons.

Une valeur positive de  $\Delta S_0$  est également obtenue pour la leucine (18; 37) et effectivement FASMAN et col. ont bien trouvé une stabilisation de l'hélice par augmentation de la température (8; 16). Cette étude a été réalisée sur des copolymères statistiques acide glutamique-leucine contenant 20 à 33% de leucine. Ils ont constaté une augmentation du coefficient  $b_0$  de MOFFITT et YANG lorsque la température augmentait.

Ces résultats peuvent être mieux compris si l'on examine l'action de la chaleur sur les différentes interactions présumées responsables de la stabilité de l'hélice et qui ont des comportements différents par augmentation de la température, c'est à dire les liaisons hydrogène, les interactions électrostatiques et les interactions hydrophobes.

- il a été montré que la contribution des liaisons hydrogène entre groupements amide dans la stabilité de l'hélice en milieu aqueux diminuait lorsque la température augmentait (94). Il est également probable qu'un effet similaire de la température se produise sur les ponts hydrogène des paires de groupements carboxyliques non ionisés de la chaîne latérale(2) jouant un grand rôle dans la stabilisation conformationnelle.

- les répulsions électrostatiques entre groupements carboxyliques chargés responsables de la déstabilisation de l'hélice doivent diminuer faiblement par chauffage étant donné la faible diminution de l'ionisation (observée à partir de la diminution du  $pK_o$ ) par augmentation de la température (86).

- le troisième type d'interactions envisagé (interactions hydrophobes) semble être plus important à température élevée. Ces interactions non-électrostatiques entre chaînes latérales ont été étudiées par KAUFMANN (9) et par d'autres auteurs (10-12). Ils déterminent le  $\Delta S$  correspondant au transfert d'une chaîne latérale aliphatique d'un milieu aqueux à un milieu non polaire : ils constatent que cette valeur est positive. Or la transition chaîne hélice correspond au passage d'une chaîne latérale hydrophobe d'un milieu aqueux à un milieu plus hydrophobe. En effet dans ces régions de chaîne statistique, à température ambiante, les chaînes latérales sont solvatées par l'eau. Lorsque le polypeptide voit sa teneur en hélice augmenter il y a également une augmentation des interactions entre chaînes latérales puisque l'hélice par sa géométrie augmente la probabilité de rapprochement des chaînes latérales le long du squelette polypeptidique.



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

--00 0 00--

Nous avons préparé cinq copolymères statistiques acide glutamique-glutamate de 2 nitrobenzyle dont le taux de résidus hydrophobes est compris entre 3 et 22%.

Une étude par dichroïsme circulaire en fonction du pH a permis de mettre en évidence l'importance du rôle des groupements nitrobenzyle sur la stabilisation de l'hélice à partir de l'observation des bandes intrinsèques de nos copolymères. Simultanément grâce à l'étude des bandes extrinsèques il nous a été également permis de montrer que des interactions importantes entre chaînes latérales existaient et étaient en grande partie responsables de la stabilisation de la structure hélicoïdale. Ces phénomènes de stabilisation sont concurrencés par des phénomènes d'agrégation lorsque le taux de  $\Phi\text{NO}_2$  devient important (20%) : en effet lorsque le polymère est faiblement ionisé il se produirait alors des interactions hydrophobes intermoléculaires.

De plus cette étude nous a permis de préciser, pour une des bandes extrinsèques, celle située aux environs de 340 nm, l'origine de l'effet Cotton qui serait induit dans un seul groupement nitrobenzyle porté par une chaîne polypeptidique sous forme hélicoïdale.

L'étude potentiométrique a confirmé les résultats obtenus par dichroïsme circulaire grâce à la mesure des paramètres thermodynamiques, elle a permis de chiffrer l'action stabilisante des groupements nitrobenzyle. En effet nous observons une énergie libre de transition pour les  $\Phi\text{NO}_2$  près de sept fois plus importantes que celle observée par d'autres auteurs sur l'acide polyglutamique.

L'entropie de transition est positive ce qui serait en accord avec une stabilisation de la structure hélicoïdale par la chaleur, comme cela avait été observé par PASMAY et col. lors d'une étude sur des copolymères statistiques acide glutamique-leucine.

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

--oo 0 oo--

1. P.DOTY, J.T.YANG; J.A.C.S.; 78 (1956), 498-500.
2. P.DOTY, A.WADA et J.T.YANG; E.R.BLOUT; Journal of Polymer Science; 23 (1957), 851-861.
3. E.R.BLOUT, R.H.KARLSON, P.DOTY, B.HARGITAY; J.A.C.S.; 76 (1954), 4492-4493.
4. E.R.BLOUT, M.IDELSON; J.A.C.S.; 78 (1956), 497-498.
5. M.IDELSON et E.R.BLOUT; J.A.C.S.; 80 (1958), 4631-4634.
6. A.WADA; Molecular Physics; 3 (1960), 409-416.
7. L.GOLDSTEIN et E.KATCHALSKI; Bulletin of the Research Council of Israel; 9 (1960), 138-142.
8. G.D.FASMAN, C.LINDBLOW, E.BODENHEIMER; J.A.C.S.; 84 (1962), 4977-4979.
9. W.KAUZMANN; Advances in Protein Chemistry; 15 (1959), 1-63.
10. C.TANFORD et J.G.KIRKWOOD; J.A.C.S.; 79 (1957) 5333-5352.
11. H.A.SCHERAGA, G.NEMETHY et I.Z.STEINBERG; Journal of Biological Chemistry; 237 (1962), 2506-2508.
12. G.NEMETHY et H.A.SCHERAGA; Journal of Physical Chemistry; 66 (1962), 1773-1789.
13. C.H.BAMFORD, A.ELLIOTT, W.E.HANBY; "Synthetic Polypeptides" Academic Press; New-York (1956).

14. M.SWARC; *Advances in Polymer Science*, 4 (1965), 1-65.
15. A.WARASHINA et A.IKEGAMI; *Biopolymers*, 11 (1972) 529-547.
16. G.D.FASMAN, C.LINDBLOW et E.BODENHEIMER; *Biochemistry*, 3 (1964) 155-166.
17. R.E.NYLUND et W.G.MILLER; *J.A.C.S.*, 87 (1965) 3537-3542.
18. W.G.MILLER et R.E.NYLUND; *J.A.C.S.*, 87 (1965); 3542-3547.
19. R.L.SNIPP, W.G.MILLER et R.E.NYLUND; *J.A.C.S.*, 87 (1965) 3547-3553.
20. V.E.BYCHKOVA, A.T.GUDKOV, W.G.MILLER, Y.V.MITIN, O.B.PTITSYN et I.L. SHPUNGIN; *Biopolymers*, 14 (1975) 1739-1753.
21. E.V.ANUFRIEVA, V.E.BYCHKOVA, M.G.KRAKOVYAK, V.D.PAUTOV et O.B.PTITSYN; *Febs Letters*, 55 (1975) 46-49.
22. H.J.SAGE et G.D.FASMAN; *Biochemistry*, 5 (1966) 286-296.
23. R.SAKAI et T.ISEMURA; *Bulletin of the Chemical Society of Japan*; 42 (1969) 1337-1342.
24. A.PESCE, E.BODENHEIMER, K.NORLAND et G.D.FASMAN; *J.A.C.S.*, 86 (1964) 5669-5675.
25. W.B.GRATZER; *Biopolymers*, 11 (1972) 689-705.
26. H.SUGIYAMA et H.NODA; *Biopolymers*, 9 (1970) 459-469.
27. C.R.SNELL et G.D.FASMAN; *Biopolymers*, 11 (1972) 1723-1744.
28. E.PEGGION, A.COSANI, M.TERBOJEVICH et G.BORIN; *Biopolymers*, 11 (1972) 633-643.
29. E.PEGGION, A.S.VERDINI, A.COSANI et E.SCOFFONE; *Macromolecules*, 3 (1970) 194-198.

30. G. SEIPKE, H.A. ARFMANN et K.G. WAGNER. *Biopolymers*; 13 (1974) 1621-1633.
31. H.A. ARFMANN, R. LABITZKE et K.G. WAGNER; *Biopolymers*; 14 (1975) 1381-1393.
32. H.A. ARFMANN, R. LABITZKE, R. LAWACZECK et K. WAGNER; *Biochimie*; 56 (1974) 53-60.
33. R.T. INGWALL et H.A. SCHERAGA, N. LOTAN, A. BERGER et H. KATCHALSKI; *Biopolymers*; 6 (1968) 331-368.
34. H.E. AUER et P. DOTY; *Biochemistry*; 5 (1966) 1708-1715.
35. H.E. AUER et P. DOTY; *Biochemistry*; 5 (1966) 1716-1725.
36. R.F. EPAND et H.A. SCHERAGA; *Biopolymers*; 6 (1968) 1551-1571.
37. S.E. OSTROY, N.H. LOTAN, R.T. INGWALL et H.A. SCHERAGA; *Biopolymers*; 9 (1970) 749-764.
38. W.B. GRATZER et P. DOTY; *J.A.C.S.*; 85 (1963) 1193-1197.
39. S.P. HAO et W.G. MILLER; *Biopolymers*; 12 (1973) 835-843.
40. P. LE BARNY et M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE; *Biopolymers*; 12 (1973) 2831-2852.
41. M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE et C. DUFLOT et G. WILLY; *Biopolymers*. 14 (1975) 469-485.
42. E.R. BLOUE et R.H. KARLSON; *J.A.C.S.*; 78 (1956) 941-946.
43. W.B. GRATZER, D.A. COWBURN, *Nature*; 222 (1969) 426-431.
44. G. HOLZWARTH et P. DOTY; *J.A.C.S.*; 87 (1965) 818-823.
45. N. GREENFIELD et G.D. FASMAN; *Biochemistry*; 8 (1969) 4108-4116

46. J.P.CARVER, E. SHECHTER et E.R.BLOUT; J.A.C.S.; 88 (1966) 2550-2561.
47. J.R.PARRISH Jr et E.R.BLOUT; Biopolymers; 10 (1971) 1491-1512.
48. W.B.GRATZER; Proceedings of the Royal Society; 297 (1967) 163-170.
49. Y.P.MYER; Macromolecules; 2 (1969) 624-628.
50. M.MORCELLET; Thèse 3ème cycle; Lille (1972).
51. D.BALASUBRAMANIAN et R.S.ROCHE; Chemical Communications (1970) 862-863.
52. D.BALASUBRAMANIAN; Biopolymers; 13 (1974) 407-410.
53. A.J.ADLER, R.HOVING, J.POTTER, M.WELLS et G.D.FASMAN; J.A.C.S.; 90 (1968) 4736-4738.
54. M.L.TIFFANY et S.KRIMM; Biopolymers; 6 (1968) 1767-1770.
55. M.L.TIFFANY et S.KRIMM; Biopolymers; 6 (1968) 1379-1382.
56. M.L.TIFFANY et S.KRIMM; Biopolymers; 8 (1969) 347-359.
57. M.L.TIFFANY et S.KRIMM; Biopolymers; 11 (1972) 2309-2316.
58. M.L.TIFFANY et S.KRIMM; Biopolymers; 12 (1973) 575-587.
59. W.B.RIPPON et A.G.WALTON; Biopolymers; 10 (1971) 1207-1212.
60. F.QUADRIFOGLIO, D.W.URRY; Journal of Physical Chemistry; 71 (1967) 2364-2366.
61. F.QUADRIFOGLIO et D.W.URRY; J.A.C.S.; 90 (1968) 2760-2765

62. A.E.TORELLI; *Macromolecules*; 2 (1969) 635-637.
63. V.A.ZUBKOV, T.M.BIRSHEIN et I.S.MILEVSKAYA, M.V.VOLKENSTEIN; *Biopolymers*; 10 (1971) 2051-2061.
64. E.R.BLOUT; *Biopolymers Symposia*; 1 (1964) 397-407.
65. N.SAKOTA, K.OKITA et Y.MATSUI; *Bulletin of Chemical Society of Japan*; 43 (1970) 1138-1141.
66. T.M.HOOKER Jr et J.A.SCHELLMAN; *Biopolymers*; 9 (1970) 1319-1348.
67. A.MOSCOWITZ, A.ROSENBERG et A.E.HANSEN; *J.A.C.S.*; 87 (1965) 1813-1815.
68. M.H.LOUICHEUX et S.GRAFF; *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris*; 269 (1969) 1509-1512.
69. D.F.BRADLEY, M.GOODMAN, A.FELIX et R.RECORDS; *Biopolymers*; 4 (1966) 607-621.
70. J.DCOOMBES, E.KATCHALSKI et P.DOTY; *Nature*; 185 (1960) 534-535.
71. V.N.DAMLE; *Biopolymers*; 9 (1970) 937-954.
72. A.K.CHEN et R.W.WOODY; *J.A.C.S.*; 93 (1971) 29-37.
73. E.PEGGION, A.COSANI, A.S.VERDINI, A.DEL PRA et M.MAMMI; *Biopolymers*; 6 (1968) 1477-1486.
74. H.SUZUKI; "Electronic Absorption Spectra and Geometry in Organic Molecules" Academic Press; New York (1967).
75. C.TONOLIO, M.L.FALXA et M.GOODMAN; *Biopolymers*; 6 (1968) 1579-1603.
76. A.MOSCOWITZ; *Advances in Chemical Physics*; 4 (1962) 67-111.

77. J.P.CAWER, E. SHECHTER et E.R.BLOUT; J.A.C.S.; 88 (1966) 2562-2573.
78. J.Y.CASSIM et J.T.YANG; Biochemical and Biophysical Research communications; 26 (1967) 58-64.
79. D.W.URRY " Spectroscopic Approaches to Biomolecular conformation; American Medical Association; Chicago (1969).
80. D.S.OLANDER et A.HOLTZER; J.A.C.S.; 90 (1968) 4549-4560.
81. J.HERMANS Jr; J.A.C.S.; 88 (1966) 2418-2422.
82. S.LIFSON et A.ROIG; Journal of Chemical Physics.; 34 (1961) 1963-1974.
83. B.H.ZIMM et S.A.RICE; Molecular Physics; 3 (1960) 391-407.
84. B.H.ZIMM et J.K.BRAGG; Journal of Chemical Physics; 31 (1959) 526-535.
85. J.HERMANS Jr; Journal of physical Chemistry; 70 (1966) 510-515.
86. D.S.OLANDER et A.HOLTZER; J.A.C.S.; 90 (1968) 4549-4560.
87. M.NAGAZAWA et A.HOLTZER; J.A.C.S.; 86 (1964) 538-543.
88. A.CIFERRI, D.PUETT et L.RAJAGH et J.HERMANS Jr; Biopolymers; 6 (1968) 1019-1036.
89. M.MORCELLET et C.LOUICHEUX; Polymer; sous presse.
90. K.LINDERSTRØM-LANG; Comptes Rendus Travaux. Lab.Carlsberg, Ser.Chim; 15 N°7 (1924).
91. T.HILL; Arch.Biochem.Bioph. 57 (1955) 229-238.



92. J.STEIGMAN et A.COSANI; Biopolymers; 10 (1971) 357-377.
93. M.NAGASAWA et A.HOLTZER; J.A.C.S.; 86 (1964) 531-538.
94. J.FOSS et J.A.SCHELLMAN; Journal of physical Chemistry.  
63 (1959) 2007-2012.

