

50 376  
1 977  
102

N° d'ordre

50376  
1977  
102

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

**Philippe LAGANT**

## CONTRIBUTION A L'ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ACIDE POLY $\alpha$ -L-ASPARTIQUE



Soutenu le 21 MAI 1977, devant la COMMISSION D'EXAMEN

- |                   |                     |                         |
|-------------------|---------------------|-------------------------|
| Membres du Jury : | Président :         | M.A. LABLACHE - COMBIER |
|                   | Rapporteur :        | M.C. LOUCHEUX           |
|                   | Examineur :         | M.M. MORCELLET          |
|                   | Membre invité :     | M.G. FLEURY             |
|                   | Membre invité : Mme | M.H. LOUCHEUX           |
|                   | 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, DECUYPER  
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE  
KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT,  
MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, 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. M. MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN 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. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
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. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
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
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. RACZY Ladislav	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (Et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie

M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Géologie
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
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
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GERVAIS Michel	Gestion des Entreprises
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
M <sup>lle</sup> LEGRAND Denise	Algèbre
M <sup>lle</sup> LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NOTELET Francis	Electrotechnique
M. NUSSEMBAUM Maurice	Sciences Economiques
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique
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

M <sup>lle</sup> SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLEZ Roger	Biologie
M. THERY Pierre	Electronique
M. TOP Gérard	Sciences Economiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILLETTE Michel	Mécanique
M. WALLART Francis	Chimie
M. WERNER Georges	Informatique
M <sup>me</sup> ZIN-JUSTIN Nicole	Algèbre

*Cette thèse est dédiée à mes parents.*

*Qu'ils trouvent dans ce travail,  
une façon personnelle de les remercier pour  
la confiance et l'affection qu'ils me portent...*

Ce travail a été effectué au laboratoire de chimie macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille où Monsieur le Professeur C. LOUCHEUX a bien voulu m'accueillir. Je lui présente mes sincères remerciements et lui exprime mes sentiments dévoués et respectueux.

Monsieur A. LABLACHE-COMBIER, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse ; Qu'il veuille bien accepter mes plus respectueux remerciements.

Je tiens à exprimer ma profonde et respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur C. LOUCHEUX, qui a bien voulu accepter de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

C'est aussi un plaisir pour moi d'associer Monsieur M. MORCELLET à mes remerciements, à la fois pour avoir accepté d'examiner ce travail et aussi pour les nombreux conseils qu'il m'a prodigués. Qu'il trouve ici l'expression de mes sentiments amicaux.

C'est aussi tout particulièrement que je tiens à remercier Madame M.H. LOUCHEUX, Maître de Recherches au C.N.R.S. à l'Institut du Cancer de Lille de m'avoir permis d'effectuer les mesures de dichroïsme circulaire et de résonance magnétique nucléaire dans son Laboratoire et de juger ici ce travail.

J'associe également dans cette pensée M.G. FLEURY, Directeur du Laboratoire de physique à la Faculté de Pharmacie de Lille qui a bien voulu m'accepter dans son laboratoire pour effectuer les mesures de spectroscopie Raman et de faire partie de ce jury. Qu'il reçoive ici l'expression de mes profonds remerciements.

Monsieur Gilbert WEILL, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg a bien voulu faire partie de ce jury. Je le remercie vivement de m'avoir dirigé lors des études en Résonance Magnétique Nucléaire effectuées à la Faculté des Sciences de Strasbourg. Je tiens particulièrement à le remercier pour sa profonde chaleur humaine et lui exprime mes sentiments respectueux.

Je tiens également à associer à ce travail de nombreux amis qui m'ont aidé dans ma tâche, en particulier M. G. VERGOTEN, chercheur au laboratoire de physique de la Faculté de Pharmacie pour la spectroscopie Raman, Madame B. BONIFACE et M. J.P. HUVESNES, chercheurs au laboratoire de physique de la Faculté de Pharmacie de Lille pour les études en Infra-Rouge lointain ; Madame J. CLEMENTZ, technicienne au Centre de Recherches des Macromolécules de Strasbourg pour les études en infra-rouge proche, M. LEGRAND Maître Assistant en chimie physique pour m'avoir permis les études en infra-rouge fondamental et lointain, MM. TREHOUX, et CA ONNE, chercheurs à l'E.N.S.C.L. pour l'aide apportée à mes études en R.X. et densitométrie.

Je tiens également à prouver ma gratitude à Mademoiselle N. HELBECQUE et Monsieur J. ROUSSEAUX chercheurs à la Faculté de Médecine de Lille pour l'aide qu'ils m'ont apporté lors des analyses chromatographiques et enzymatiques.

Je tiens à prouver ma profonde gratitude à mon ami J. ESTEVEZ pour les conseils qu'il m'a prodigués lors de la synthèse et les discussions nombreuses que nous avons eues.

J'associe à ces remerciements, tous mes amis des laboratoires de chimie et physique macromoléculaire pour la chaude ambiance dans laquelle nous avons travaillé. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde amitié.

Je remercie aussi tout particulièrement Mlle A. OLIVIER qui a dactylographié cette thèse ainsi que Mme SAINLEGER qui a procédé à la photocopie de ce travail. Qu'elles recueillent ici mes remerciements pour leur excellent travail.

Enfin j'associe tous mes amis, étrangers à ce laboratoire, mais avec qui j'ai travaillé pendant deux ans avant d'effectuer ce travail, en particulier TIÊN et KIM. Qu'ils trouvent ici les marques de toute mon amitié.

## INTRODUCTION

- A - Description des polypeptides et protéines
- B - Travaux antérieurs sur l'acide poly  $\alpha$  L aspartique.

## CHAPITRE I SYNTHESE STEREOSPECIFIQUE DE L'ACIDE POLY $\alpha$ ASPARTIQUE - CARACTERISATION ET PURETE DU POLYPEPTIDE.

## CHAPITRE II ETUDES EN INFRA ROUGE.

- A - Infra-Rouge fondamental
  - B - Infra-Rouge lointain par transformée de Fourier
  - C - Conclusions
- Bibliographie.

## CHAPITRE III ETUDES EN SPECTROSCOPIE RAMAN

- A - Introduction
  - B - Résultats. Etude à l'état solide en milieu aqueux
  - C - Calculs des fréquences de vibration par la méthode des perturbations
- Bibliographie.

CHAPITRE IV ETUDES EN RAYONS X.

- A - Rappels théoriques
  - B - Etude du réseau cristallin
  - C - Relation avec l'infra-rouge
  - D - Recherche d'une autre structure
  - E - Travaux de BIRSHTAIN-PTITSYN
  - F - Conclusions
- Bibliographie.

CHAPITRE V ETUDES EN RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU PROTON.

- A - Rappels bibliographiques - Système  $AB\alpha$
  - B - Résultats
    - I - Etude en fonction du pH
    - II - Etude en fonction de la concentration
    - III - Modèles des chaînes latérales  
Relation avec l'infra-rouge
  - C - Etude en solvant organique (DMSO)
    - I - Constantes de couplages  $J_{NH-C^{\alpha}H}^3$
    - II - Découplages des protons par irradiation
    - III - Mise en évidence de  $\beta$ -Turns II.
  - D - Discussions
- Bibliographie.

CHAPITRE VI ETUDES EN DICHROISME CIRCULAIRE

- A - Rappels théoriques
  - B - Etude en fonction du pH. Reconstitution des spectres dichroïques
  - C - Paramètres influençant l'allure des spectres dichroïques
    - a - Influence de la masse moléculaire
    - b - Influence de la température
    - c - Influence de la nature et de la taille des contre-ions.
  - D - Conclusions
- Bibliographie.

CHAPITRE VII SOLVATATION DE L'ACIDE POLY  $\alpha$  L ASPARTIQUE

- A - Rappels bibliographiques et exposés succincts des différentes méthodes d'investigation
  - B - Etudes en Infra-Rouge proche - Discussions
- Bibliographie.

CONCLUSIONS GENERALES.

## INTRODUCTION

A - Description des polypeptides et des protéines.

B - Travaux antérieurs sur l'acide Poly  $\alpha$  -L-Aspartique

L'utilisation des polypeptides comme moyen d'approche de l'étude des structures secondaires et tertiaires des protéines est une technique fort utilisée depuis déjà quelques décennies (PAULING et COREY 1951).

Les structures secondaires des polypeptides sont pour la plus grande part tributaires de la configuration des chaînes latérales (le squelette peptidique restant le même).

Il nous a paru intéressant, après l'étude dans notre laboratoire de divers polyaminoacides (tel l'acide poly-L-glutamique) de comparer et d'établir des relations de structure entre ce polyacide (ayant deux groupes méthylène dans sa chaîne latérale) et l'acide poly  $\alpha$ -L-aspartique (un seul groupe méthylène dans la chaîne latérale entre le squelette peptidique et le groupement carboxylique) et ainsi de déterminer l'influence de la présence d'un groupe chargé sur la structure secondaire du polypeptide.

Pour ce faire, nous disposons de différentes techniques et des propriétés rotatoires du carbone asymétrique ( $\alpha$  CH) du squelette peptidique.

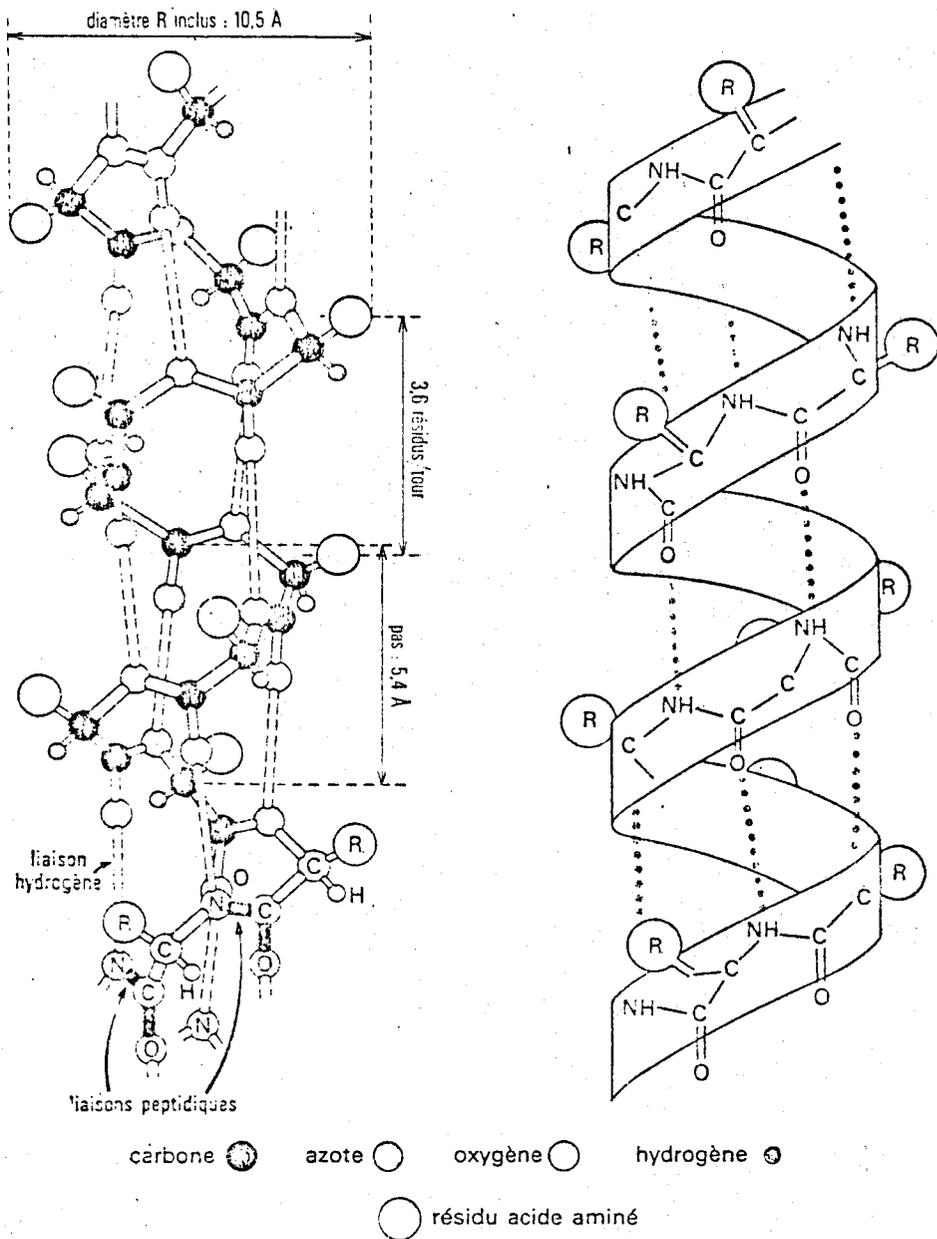
Cependant, avant d'exposer nos résultats, nous exposerons brièvement les structures primaire (séquences) et secondaire que l'on trouve généralement dans les polypeptides.

#### A - DESCRIPTION DES POLYPEPTIDES ET DES PROTEINES.

Les protéines sont constituées d'unités peptidiques : les acides aminés. Ces acides aminés, existant dans les protéines sous la forme -L- exclusivement, sont au nombre d'une vingtaine. Dans les polypeptides par contre, les unités peptidiques peuvent être aussi bien formées de résidus L que de résidus D puisque ce sont des polymères synthétiques.

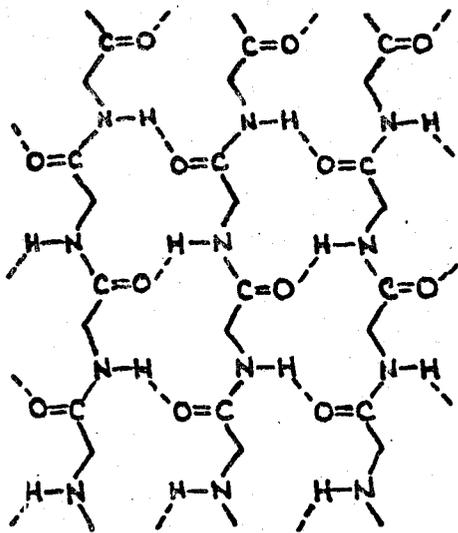
La séquence des acides aminés dans les protéines constitue la structure primaire. La séquence linéaire de la chaîne

MORPHOLOGIE DES PROTÉINES NATIVES

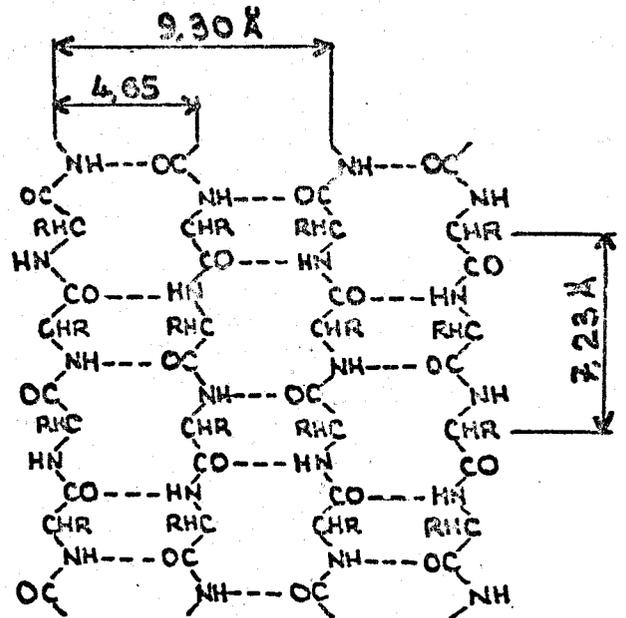


Modèle de l'hélice  $\alpha$  droite, les acides aminés ont la configuration L

fig 1



CHAINES  $\beta$  PARALLELES



STRUCTURE  $\beta$  ANTIPARALLELE

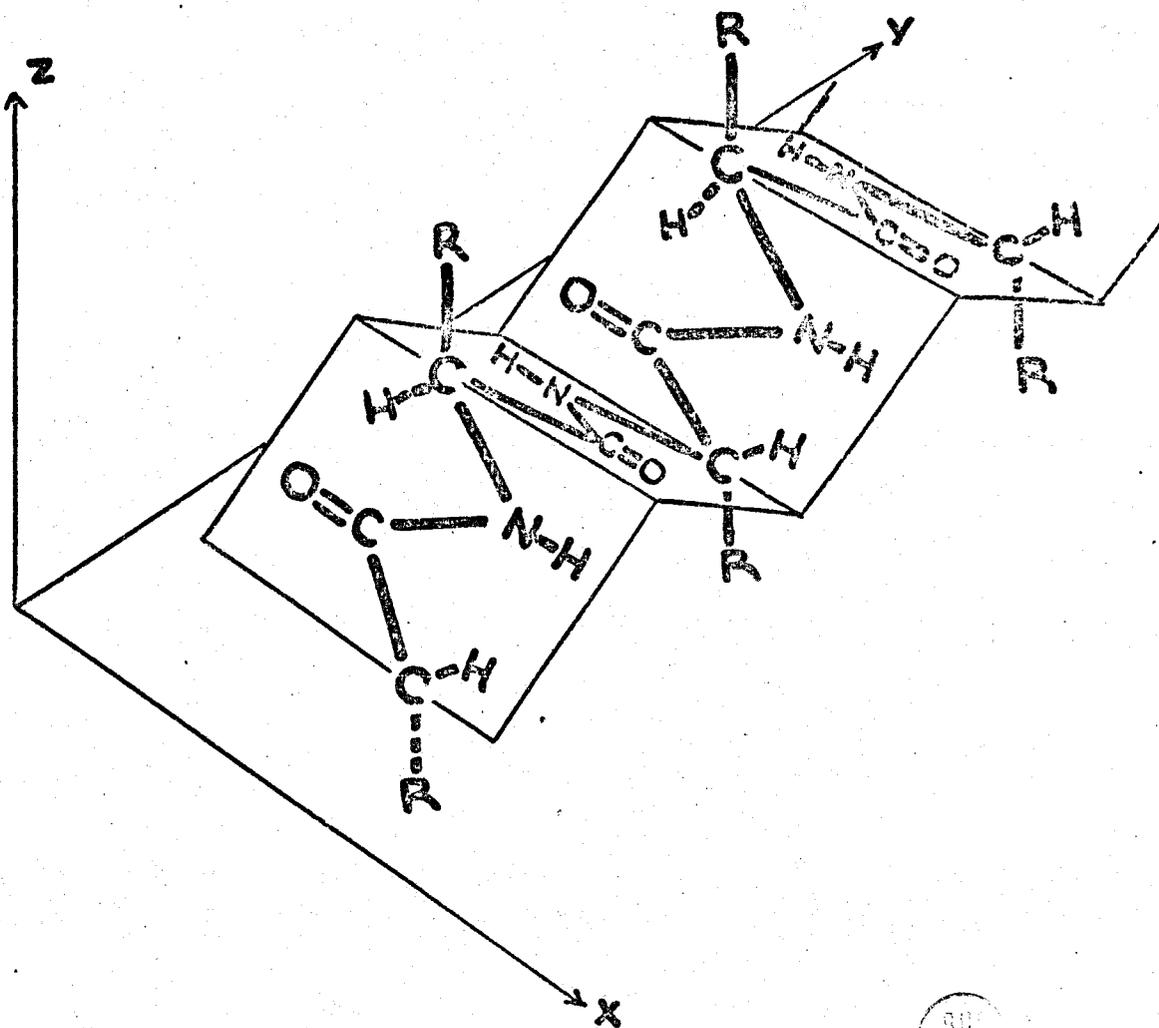


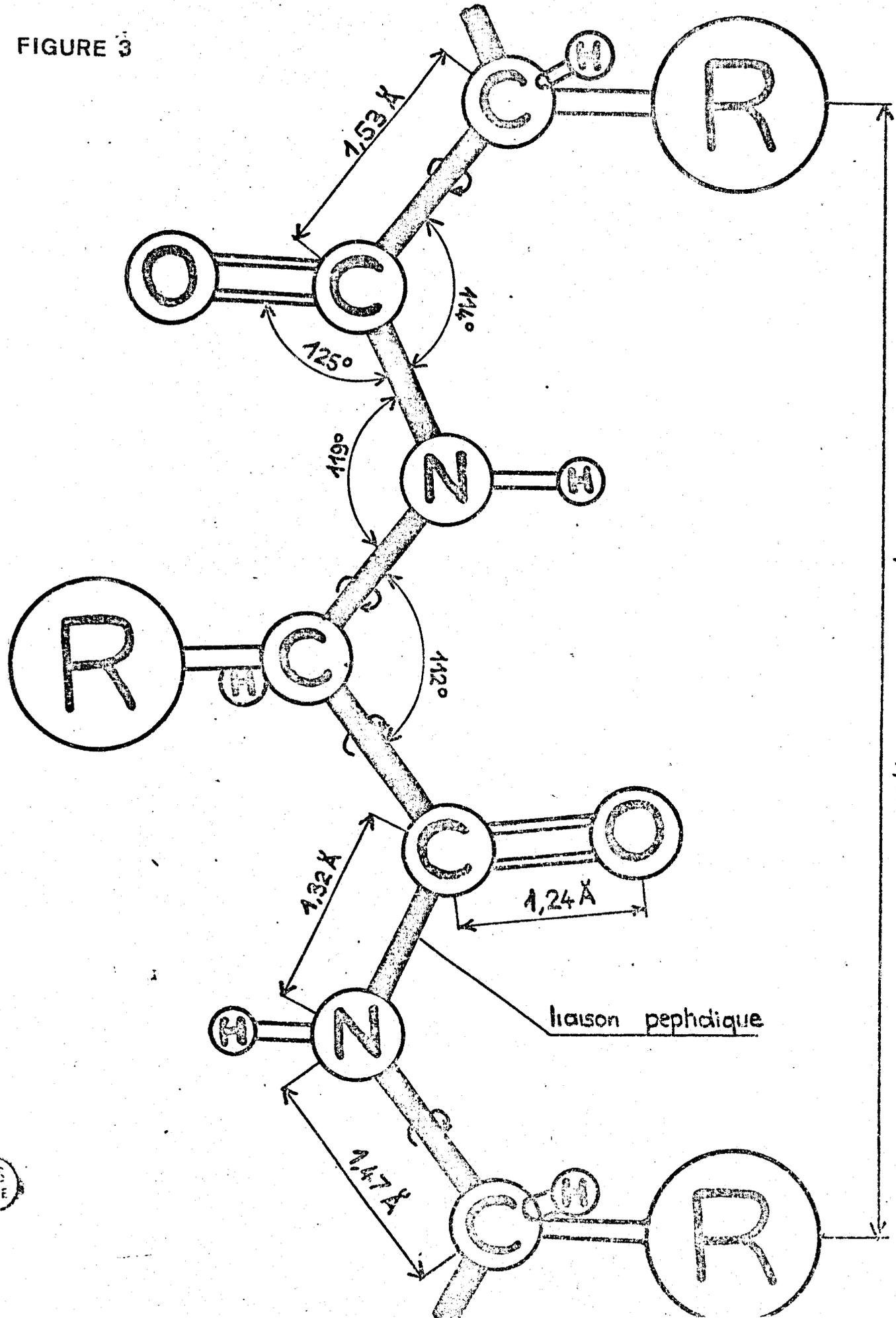
FIGURE 2

STRUCTURE  $\beta$  PLISSÉE DES PROTEINES

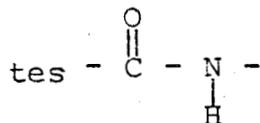


# Dimension d'une chaîne polypeptidique complètement étendue

FIGURE 3



polypeptidique est assurée par les liaisons peptidiques covalen-



La structure secondaire des protéines et des polypeptides résulte le plus souvent de la possibilité de formation de liaisons hydrogène entre l'oxygène du carbonyle et l'hydrogène de l'azote aminé de la liaison peptidique



L'agencement de la chaîne polypeptidique en une structure ordonnée peut s'effectuer selon différents modèles, par exemple selon l'hélice  $\alpha$  de PAULING et COREY (fig. 1) ou en feuillets plissés (forme  $\beta$ ) (fig. 2).

Les hélices  $\alpha$  sont essentiellement droites pour les polypeptides biologiques. Les données obtenues avec des polypeptides de synthèse apportent une contribution importante à l'étude de la structure des protéines. La figure 3 montre les dimensions d'une chaîne polypeptidique complètement étendue. La nature cis ou trans du groupe amide plan dépend de la nature de l'acide aminé (cis pour les résidus proline et hydroxyproline, trans pour tous les autres résidus peptidiques). La chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire se replie sur elle-même pour former une molécule compacte présentant une configuration spatiale bien déterminée. C'est cette géométrie tridimensionnelle qui forme la structure tertiaire.

La méthode la plus employée pour analyser la structure tertiaire reste l'analyse par les rayons X (diagramme sur des monocristaux).

Les protéines sont souvent constituées de sous-unités (protomères) qui s'associent entre elles et constituent la structure quaternaire. L'activité d'un grand nombre d'enzymes dépend étroitement de cette structure (1) (2).

B - TRAVAUX ANTERIEURS EFFECTUES SUR L'ACIDE POLY  $\alpha$ -L-ASPARTIQUE

L'acide poly- $\alpha$ -L aspartique est un polypeptide de synthèse dont on peut voir sur la figure 4 la géométrie du résidu L (réf. 3).

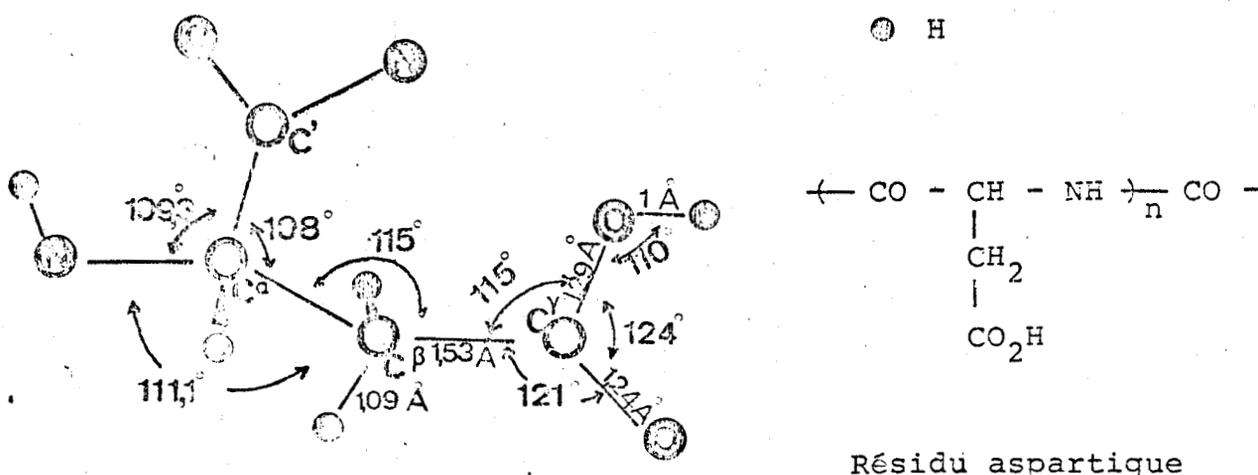


FIG 4

Les premiers travaux effectués sur ce polypeptide furent ceux de KOVACS et collaborateurs (4). En fait, ces premiers travaux de synthèse devaient les mener à l'acide poly  $\alpha$ -L-aspartique de masse faible et souvent sous la forme de copolymère  $\alpha$ - $\beta$  L-Aspartique avec formation de cycles succinimides.

En 1963, BRAHMS et SPACH donnaient le spectre dichroïque des acides poly  $\alpha$ -L-Aspartique et poly  $\alpha$ D aspartique (5). Ils observaient déjà une faible valeur de  $(-b_0)$  en dispersion optique rotatoire et une faible force rotationnelle indiquant un taux d'hélicité beaucoup plus faible que celui de l'acide poly  $\alpha$ -L-glutamique ou la Poly-L-Lysine.

Plus tard, JACOBSON (6) étudiant en dispersion optique rotatoire le pourcentage d'hélicité dans des solutions de chlorure de magnésium et de chlorure de tétraméthylammonium. Il estimait à 20 % le taux d'hélicité pour l'acide poly  $\alpha$ -L-Aspartique à pH 4. Il trouvait que la force de la liaison ionique des sels sur les groupes carboxyliques était double de celle observée pour l'acide poly  $\alpha$ -L-glutamique.

PATRONE, CONIO et collaborateurs (7) effectuaient un travail semblable mais dans un mélange de solvants eau - méthanol (80 - 20 % en volume), et dans des solutions de chlorures alcalins. Leurs courbes potentiométriques et leurs études en dispersion optique rotatoire les menaient à ne trouver que 20 % au maximum d'hélicité en pH acide ; ils estimaient les pK apparents dans KCl 0,1 M à 3,98 à 25°C et 4,08 à 5°C.

D'autres investigations, de nature mathématique ont été effectuées par YAN-SCHERAGA (8) et MAIGRET-PULLMAN (9). La première (8) par des calculs semi-empiriques montrant que l'hélice  $\alpha$  droite était préférée par rapport à l'hélice  $\alpha$  gauche pour l'acide poly  $\alpha$  L aspartique sous sa forme neutre, avec une préférence pour la chaîne latérale à adopter une configuration longitudinale plutôt que transverse.

La seconde (9), basée sur des calculs quantiques P.C.I.L.O., établissait la carte conformationnelle pour les résidus glutamyl et aspartyl. Pour le résidu aspartyl, les calculs conformationnels montraient que, à l'encontre de tous les autres résidus (glutamyl, Lysyl) il fallait augmenter considérablement les domaines énergétiques pour obtenir toutes les structures secondaires usuelles,  $\alpha$  hélice,  $\beta$  sheet (de l'ordre de 4 Kcal/mole). Ainsi, il apparaissait que pour des chaînes latérales très courtes (possédant une charge, la structure secondaire variait considérablement de celle de leurs homologues (acide poly  $\alpha$ -L-glutamique) à chaîne latérale plus longue.

Notre travail de D.E.A. avait consisté à synthétiser l'acide poly  $\alpha$ -L-Aspartique et d'en analyser le contenu hélicoïdal en pH acide par potentiométrie et dispersion optique rotatoire (D.O.R.). Nous en étions arrivés aux mêmes conclusions que JACOBSON (6), PATRONE (7), c'est-à-dire un taux maximum d'hélicité de 20 %.

L'analyse en dispersion optique rotatoire, notamment dans l'établissement des droites de SCHECHTER-BLOUT pour les systèmes polymère - eau et polymère - solvant organique nous laissait présager (fig. 5) que nous n'avions pas un mélange simple

de structure  $\alpha$  hélicoïdale et de structure désordonnée. En effet, aucun système polymère - solvant aqueux ne se retrouvait sur les droites de SCHECHTER BLOUT pour lesquelles la rotation molaire s'exprime en fonction de deux paramètres  $A_{193}$  et  $A_{225}$  selon l'équation :

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

avec :

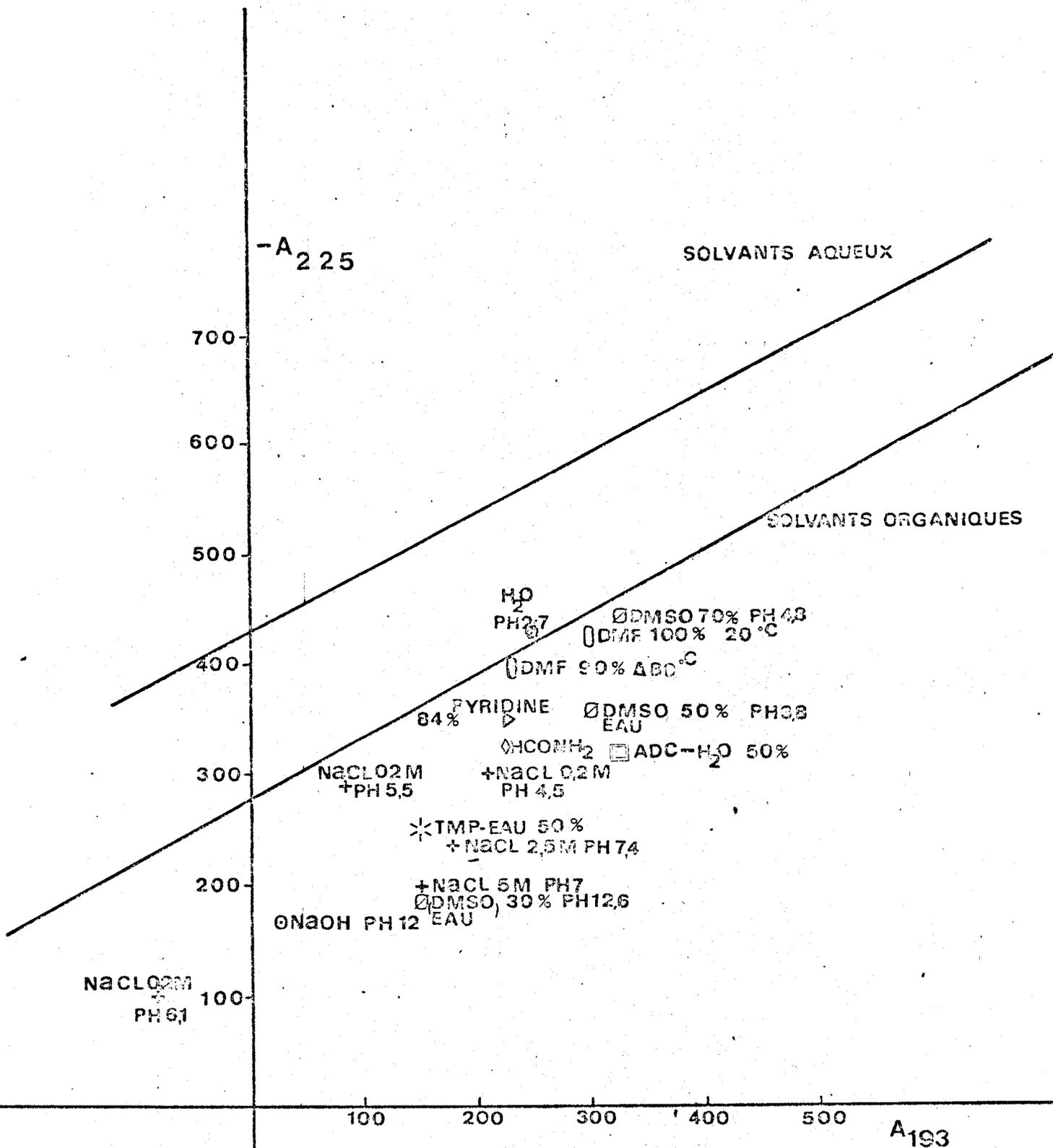
$$A_{225} = - 0,55 A_{193} - 430 \quad (\text{solutions aqueuses})$$

$$A_{225} = - 0,55 A_{193} - 280 \quad (\text{solutions organiques})$$

Aucun système polymère - solvant organique n'était également satisfaisant (fig. 5).

L'allure des spectres dichroïques n'amenait que fort peu de renseignements, et les études en Résonance Magnétique Nucléaire montraient primitivement un système fort complexe où des bandes de rotation de l'eau venaient perturber le spectre. Les études par infra rouge sur ce polypeptide à l'état solide indiquaient peu la nature des structures secondaires en présence. Nous avons repris ces études d'infra rouge et de R.M.N. et nous les avons complétées par d'autres techniques, telles la spectrométrie Raman et les rayons X...

Aucune des techniques n'était suffisante pour expliquer seule les structures en présence (Raman et infra-rouge...) aussi nous proposerons nous de rédiger le résultat de nos travaux de la même façon que fut conçue au fur et à mesure la structure complète de ce polypeptide, à partir d'une idée générale (obtenue par les techniques Raman et infra-rouge) à une structure plus détaillée (Rayons X, Résonance Magnétique Nucléaire). Les spectres dichroïques ne sont discutés qu'à l'avant dernier chapitre, où nous avons pu les reconstituer grâce aux renseignements amenés par les autres techniques.



DROITES DE SCHECTER-BLOUT



Fig 5

C H A P I T R E I

SYNTHESE STEREOSPECIFIQUE DE L'ACIDE POLY- $\alpha$ -L-ASPARTIQUE

## CHAPITRE I.

### SYNTHESE STEREOSPECIFIQUE DE L'ACIDE POLY - $\alpha$ - L ASPARTIQUE

A - Synthèse par l'ester actif du pentachlorophénol.

B - Synthèse par les N-carboxyanhydrides (anhydrides de LEUCHS).

C - Pureté optique - Caractérisation après débenzylation.

- pouvoir rotatoire  $[\alpha]$  , U.V., I.R.

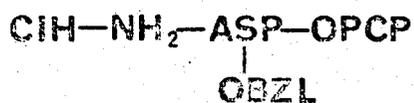
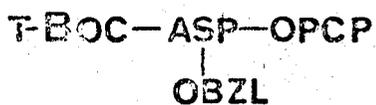
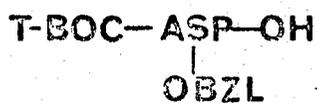
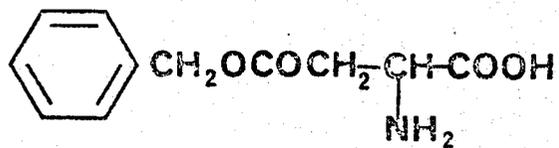
- mesure des masses moyennes par tonométrie et osmométrie

- digestion par l'aminopeptidase M

- dichroïsme circulaire.

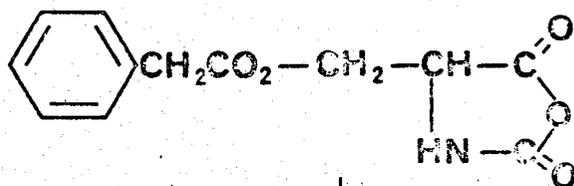
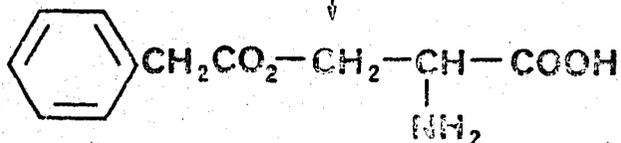
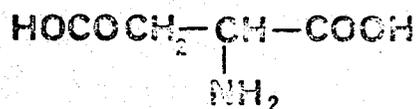
SYNTHESE PAR

ESTER ACTIF



POLYCONDENSATION (TEA)

SYNTHESE PAR  
N-CARBOXYANHYDRIDE



POLYMERISATION

(TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

DEBENZYLATION HBr, ALCOOL BENZYLIQUE

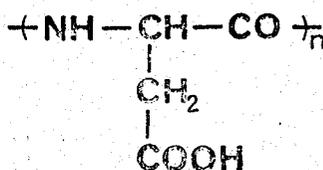


FIG.1-1



Pour synthétiser l'acide poly  $\alpha$ -L-Aspartique il faut tenir compte de la pureté optique du polypeptide final. Pour cela nous avons employé deux méthodes de synthèse qui n'amènent pas de racémisation, c'est-à-dire soit par une synthèse par les esters actifs du pentachlorophénol, soit par une polymérisation par ouverture de cycle à l'aide des N-carboxyanhydrides (anhydrides de Leuchs).

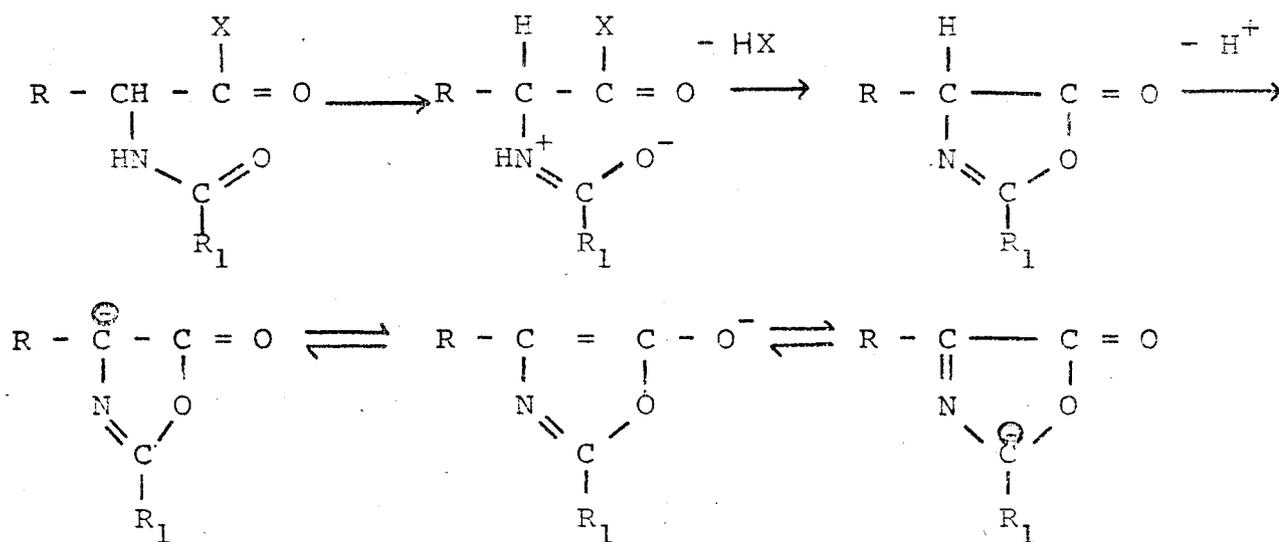
Les deux premières parties décriront les deux méthodes (Schéma Fig I.1), la troisième montrera la caractérisation du produit.

#### A - SYNTHÈSE DU POLY $\alpha$ L ASPARTATE DE $\beta$ BENZYLE PAR LES ESTERS ACTIFS.

Nous avons employé l'ester pentachlorophénylique qui possède l'avantage de se coupler sans racémisation, la vitesse de réaction du couplage étant du second ordre au début puis du premier ordre (1).

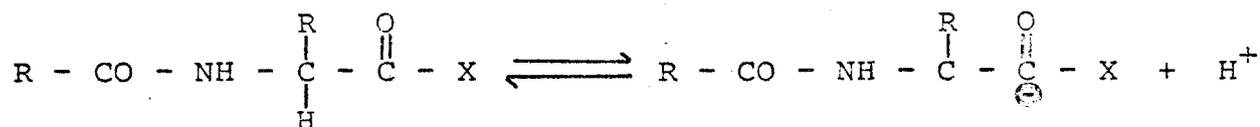
##### 1 - Mécanisme de la réaction.

Le carbone en  $\alpha$  du groupe carbonyle activé peut perdre son activité optique lors de la formation de la liaison peptidique. La racémisation de ce carbone se fait par l'intermédiaire d'une 5-oxazolone (azlactone).



La formation même à un taux très faible d'oxazolone suffit à la racémisation.

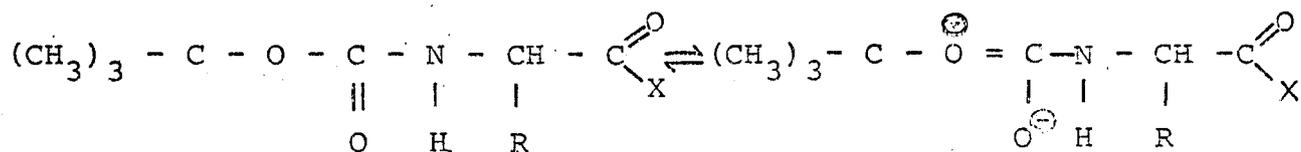
Même lorsque la formation d'azlactone est impossible, on peut observer des racémisations, car dans ce cas une ionisation directe du proton porté par le carbone  $\alpha$  du dérivé de l'acide aminé intervient.



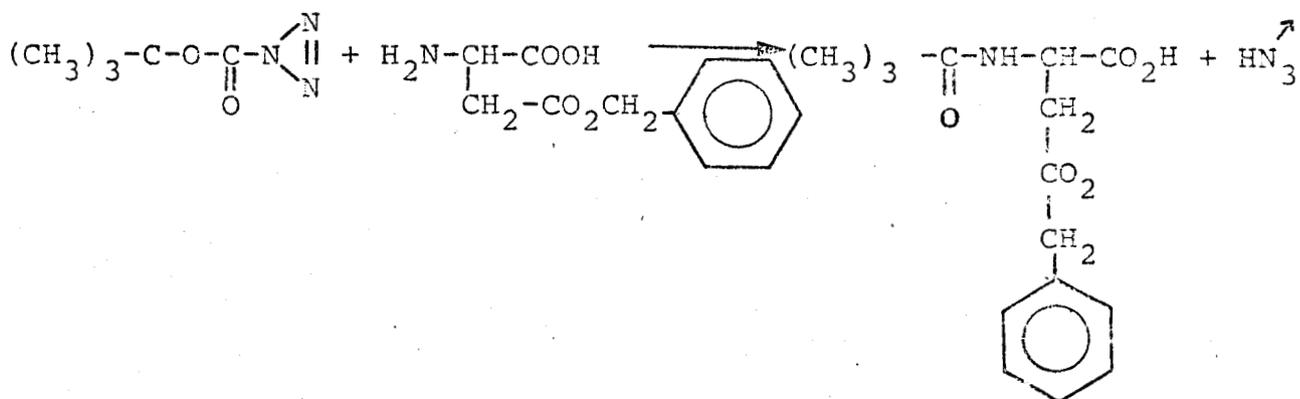
L'anion étant stabilisé par résonance et ne pouvant retenir l'asymétrie (2).

## 2 - Préparation de tertiobutyloxycarbonyl azidoformiate (t BOC azidoformiate).

Le t.BOC empêche une racémisation éventuelle du carbone asymétrique en stabilisant son hydrogène.



La préparation du t BOC azodoformiate doit s'effectuer sous la hotte



On refroidit une solution de 28 g tBOC carbazate, d'acide acétique glacial (24 ml) et d'eau (40 ml) dans un bain de glace. On ajoute 16 g de nitrite de sodium (0,23 mole) en solution à 10 % dans l'eau goutte à goutte pendant une demi-heure en conservant le bain à 10°C. Le mélange est agité une heure dans la glace et on rajoute 40 ml d'eau. La couche supérieure de l'azide est séparée par décantation de la couche aqueuse et on l'extrait trois fois à l'éther (50 ml). On combine les couches organiques et on les lave avec 50 ml d'eau trois fois et trois fois avec 50 ml de bicarbonate de sodium 1 M.

La solution est séchée sur sulfate de magnésium et on évapore sous vide l'éther.

### 3 - Préparation du β-L aspartate de benzyle.

Dans un ballon de 1 l on introduit 60 g d'acide L Aspartique (0,45 mole) et 600 ml d'alcool benzylique.

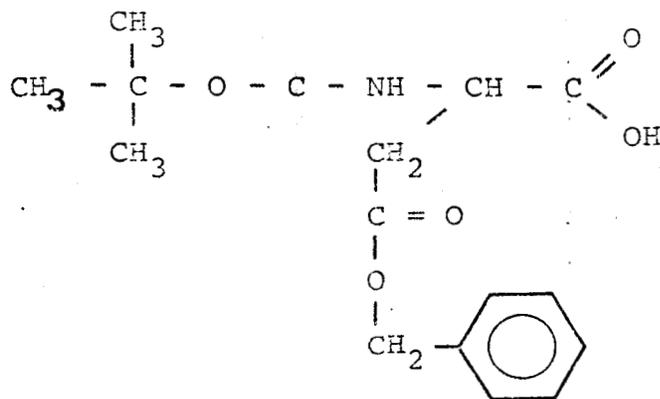
Le ballon est chauffé sur agitateur magnétique à 100°C et on fait barboter HCl gazeux jusqu'à limpidité de la solution. L'ester est précipité par 2 l de triéthylamine et lavé à l'éthanol après filtration.

On recristallise à 10 % dans l'eau à 80°C

rendement 45 %

point de fusion : 224°C

4 - Préparation du t.BOC β-L Aspartate de benzyle



On mélange 25 g de β L Aspartate de benzyle à 560 ml de DMSO, 32 ml de triéthylamine et 17 ml de t BOC azidoformiate pendant 20 h à T°C ambiante.

On dilue avec 1,6 l d'eau, puis on extrait trois fois avec 150 ml d'éther pour enlever l'azide restant.

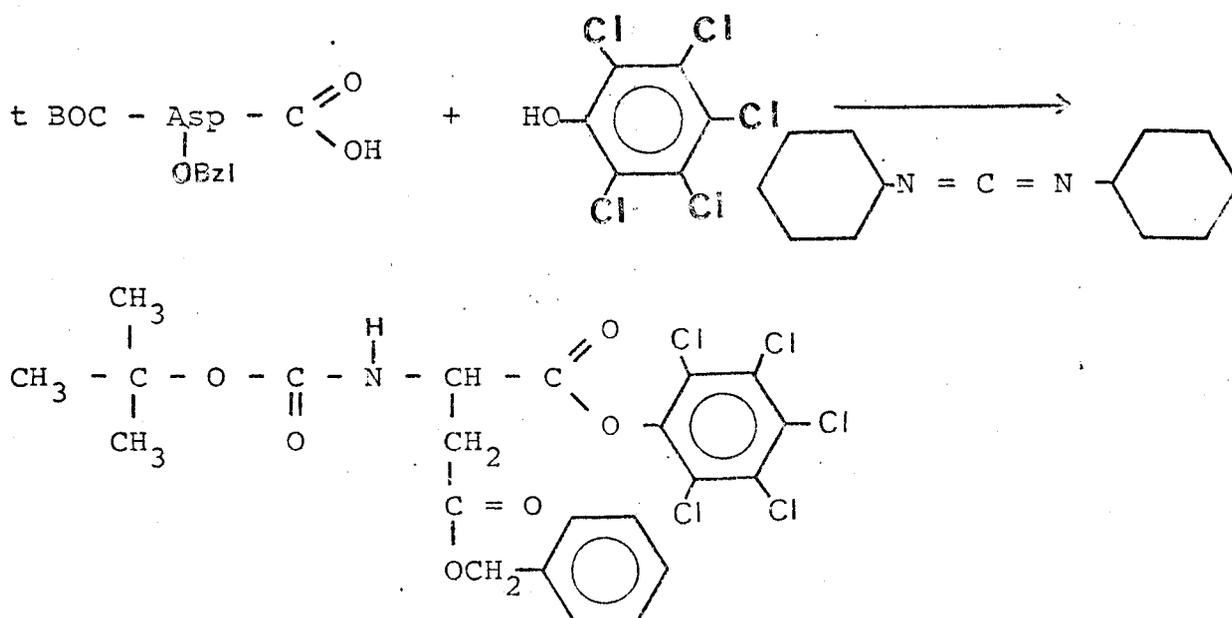
On acidifie la phase aqueuse à pH 3,5 avec l'acide citrique et on extrait plusieurs fois avec 300 ml d'acétate d'éthyle jusqu'à l'obtention de la phase organique incolore.

On lave trois fois à l'eau. On sèche sur sulfate de magnésium. On évapore le solvant en grande partie. L'huile obtenue est précipitée par l'éther de pétrole. On filtre et sèche.

Point de fusion : 102°C

5 - Préparation de l'ester pentachlorophénylique du t BOC L Aspartate de β benzyle.

On forme l'ester pentachlorophénylique par couplage avec la dicyclohexylcarbodiimide (DCCI).



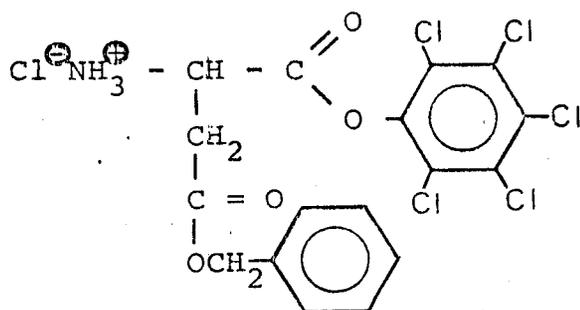
On dissout 10,5 g de t BOC  $\beta$  L Aspartate de benzyle dans 50 ml d'acétate d'éthyle en refroidissant par un mélange glace + el. On ajoute 10,5 g de pentachlorophénol et 7,5 g de DCCI en mélangeant 2 h à 0°C puis 24 heures à T°C ambiante. On filtre et on lave à l'acétate d'éthyle (qui enlève le restant de dicyclohexylurée formée).

Les filtrats réunis sont lavés 3 fois à  $K_2CO_3$  1 M et 4 à cinq fois à l'eau. On sèche sur sulfate de magnésium. On évapore jusqu'à cristallisation.

Rendement 70 %

Point de fusion 132°C.

6 - Préparation du chlorhydrate de l'ester pentachlorophénylique du L-Aspartate de  $\beta$  benzyle.



P.M. 508

On dissout 13 g de l'ester pentachlorophénylique du t BOC  $\beta$  L Aspartate de benzyle dans 500 ml d'acétate d'éthyle. On fait barboter HCl dans la solution pendant une demi-heure puis on agite

deux heures. On filtre et on sèche.

Rendement : 72 %

Point de fusion : 151°C

En infra-rouge on observe la disparition de la bande à 3300 cm<sup>-1</sup> (Amide A) caractéristique de la liaison peptidique (protection t-BOC).

7 - Polycondensation de l'ester pentachlorophénylique du L - α Aspartate de β benzyle.

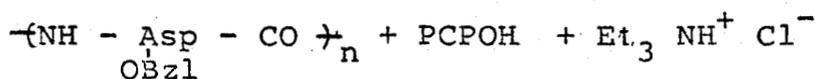
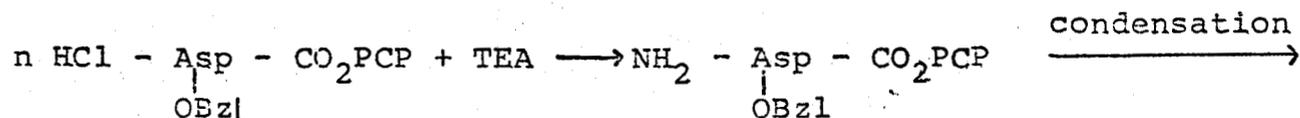
La polycondensation est obtenue (3) par régénération de la fonction amine terminale par la triéthylamine dans différentes conditions de solvants, de quantités d'amorceur et à différentes températures.

Parmi les solvants utilisés citons le DMF, le benzène, CCl<sub>4</sub> et des concentrations en triéthylamine (TEA) de 1, 2, 3 équivalents par mole d'ester. Les températures peuvent varier de 5°C à 50°C.

Le spectre Infra rouge obtenu après polycondensation (10<sup>-3</sup> mole HCl - Asp - OPCP / 5 ml C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> et 2 équivalents TEA  
OBzl  
montre l'apparition des bandes amide A à 3300 cm<sup>-1</sup> et amide I et II à 1650 cm<sup>-1</sup> et 1540 cm<sup>-1</sup> de même que l'apparition du pentachlorophénol dégagé par condensation (fig. I-2 et I-3).

Les polycondensats sont d'abord dialysés contre le DMF pour éliminer les oligomères formés puis contre l'eau et ensuite contre le méthanol.

Nous n'avons obtenu qu'avec très faible rendement le poly α-L-Aspartate de Benzyle quelles que soient les conditions de la polycondensation.



$$[\alpha]_{20}^{546} = -16,4^\circ \quad C = 1 \% \text{ dans ADC}$$



POLYCONDENSATION DE

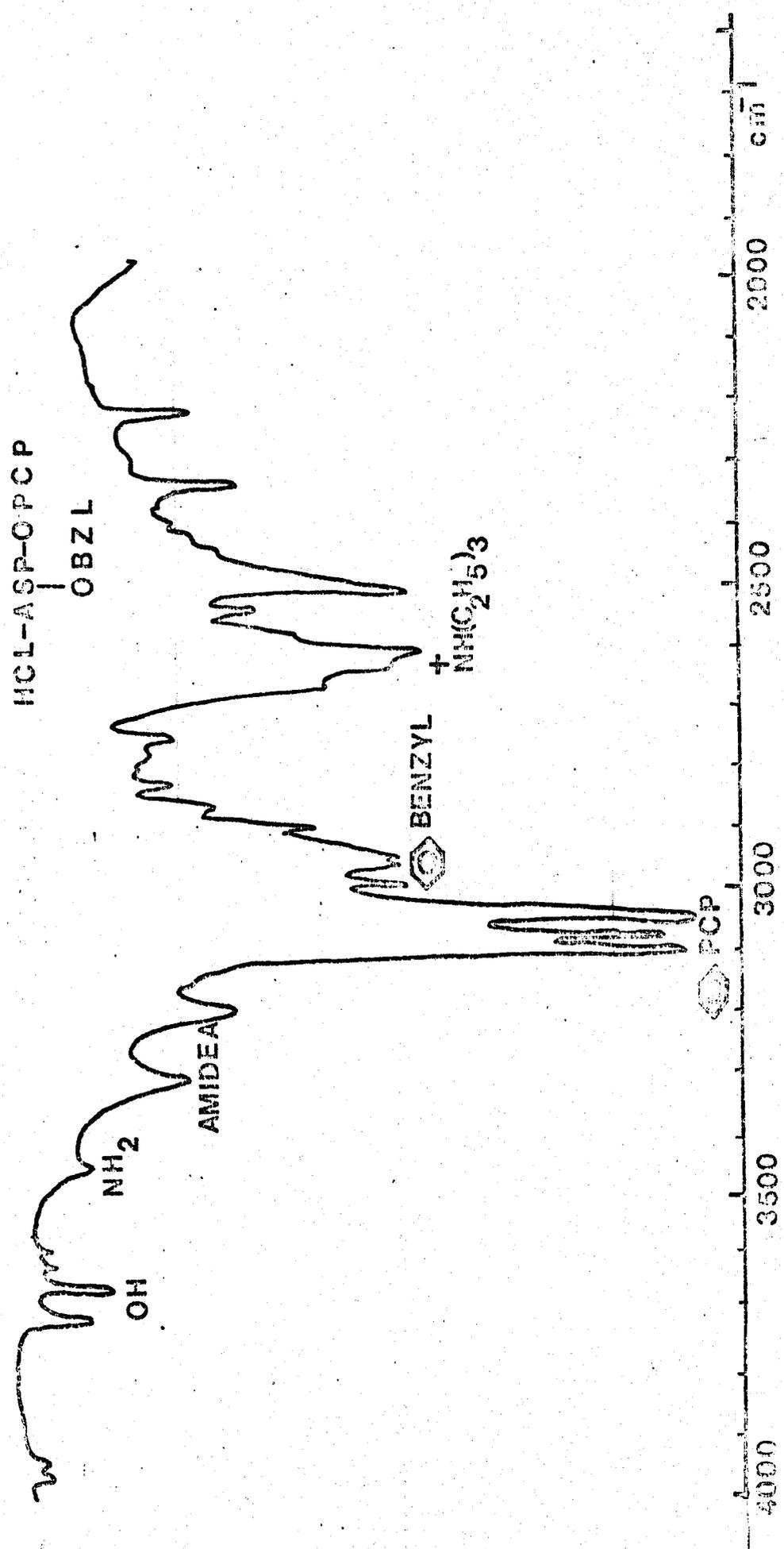


FIG.1-2

POLYCONDENSATION DE

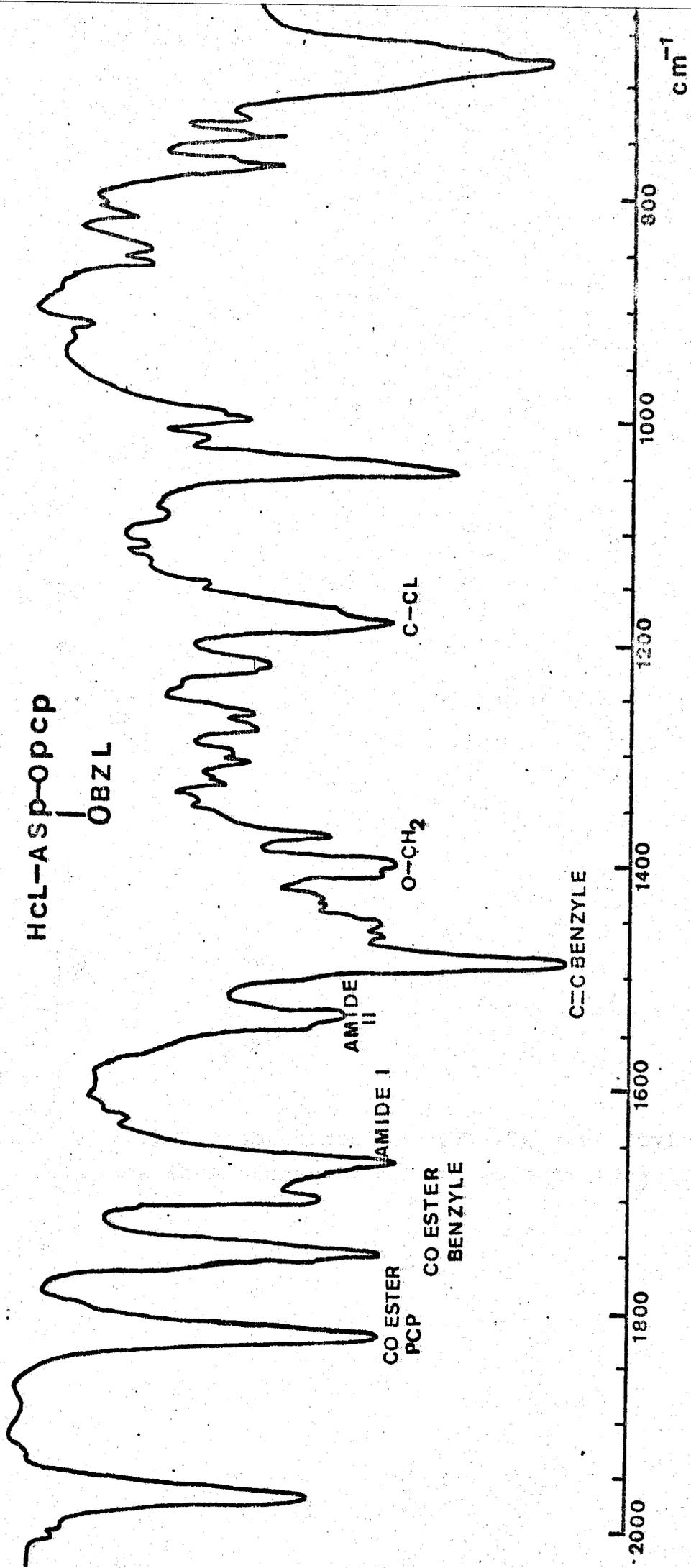


FIG. 1-3

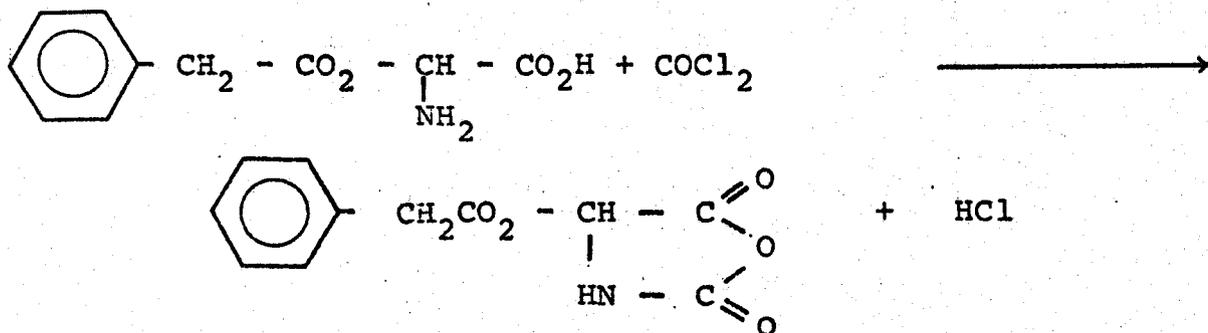


Ayant obtenu de meilleurs résultats avec les N - carboxyanhydrides nous avons abandonné ces synthèses (ainsi que l'ester actif du monocathéchol).

Des mesures viscosimétriques (0,1 % dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) donnent des masses de 11 000 et 13 000.

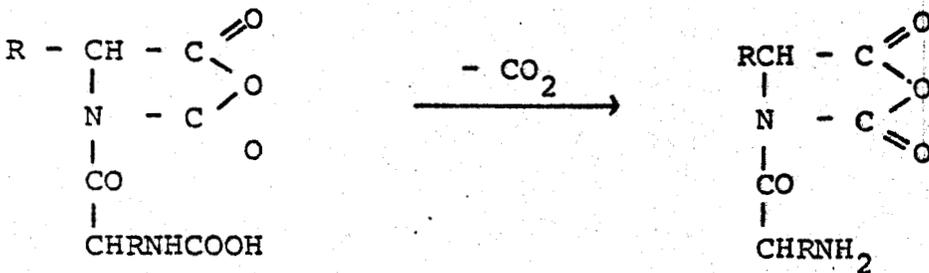
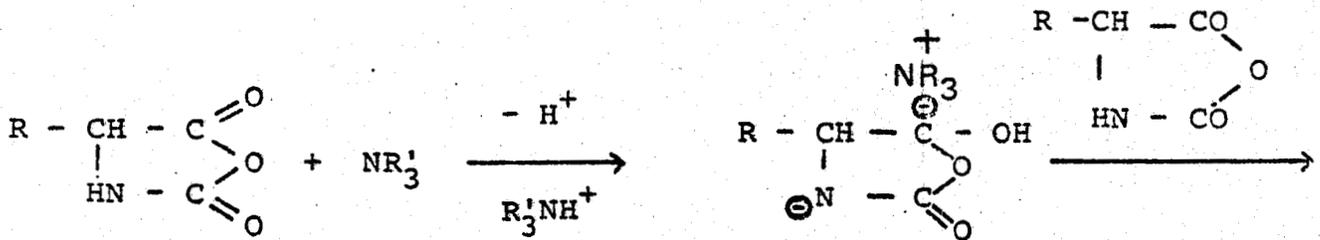
B - PREPARATION DU POLY  $\alpha$ -L-ASPARTATE DE  $\beta$ . BENZYLE PAR LES N - CARBOXYANHYDRIDES (NCA).

L'un des intérêts de la méthode par les NCA est qu'il n'y a pas d'isomérisation du carbone  $\alpha$  lors de la polymérisation. La méthode de préparation consiste à protéger les groupes fonctionnels de la future chaîne latérale par des esters benzyles et de former l'anhydride de Leuchs par phosgénéation.

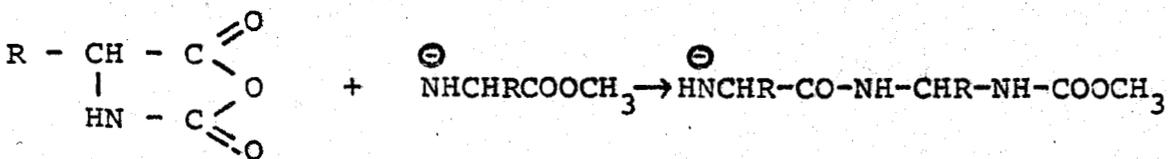
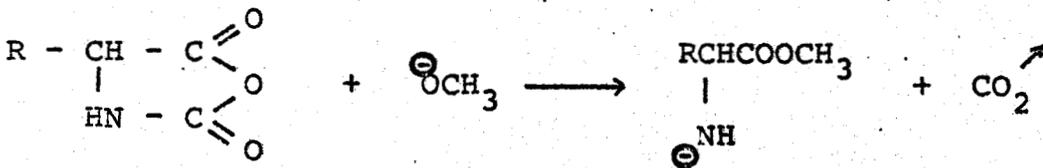


La polymérisation a été effectuée dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  par initiation avec la triéthylamine et par le méthanolate de sodium.

1 - Initiation par le TEA.

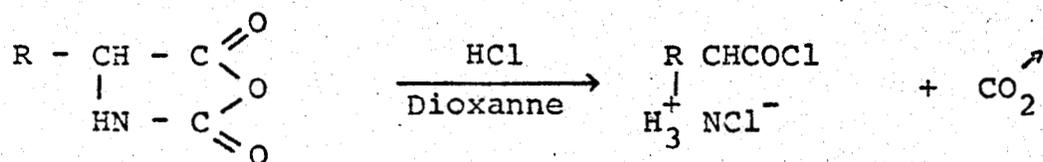


2 - Initiation par le méthanolate de sodium.



La polymérisation peut se faire thermiquement s'il subsiste quelques ppm d'eau ; l'eau présente entraîne aussi la dégradation de l'anhydride de Leuchs en acide aminé de départ.

En milieu aprotique (dioxanne,...) HCl formé peut donner le chlorure d'acide.



Il convient donc de purifier par recristallisations successives au maximum l'anhydride de Leuchs.

### 3 - Synthèse du NCA de l'aspartate de benzyle.

On met 14,7 g (0,57 mole) de  $\beta$  L Aspartate de benzyle dans un tricol (branché sur réfrigérant avec tube de KOH) et 150 ml de dioxanne. On fait passer un courant d'azote pendant une demi-heure en chauffant dans un bain d'huile à 40°C. Ensuite on fait passer le phosgène jusqu'à dissolution du NCA et on laisse à 40°C une heure. On chasse le phosgène résiduel pendant une demi-heure en changeant fréquemment les tubes à potasse. On distille sous vide jusqu'à cristallisation. On dissout avec le minimum d'acétate d'éthyle et on précipite avec 1,5 l d'heptane fraîchement distillé.

On laisse une nuit à 4°C et on recristallise plusieurs fois ainsi après filtration sous azote, dissolution dans l'acétate d'éthyle et précipitation dans le n-heptane.

Le NCA est séché dans un dessiccateur sous vide avec KOH ou CaCl<sub>2</sub> à 20°C. Rendement : 35 %.

### 4 - Polymérisation de l'anhydride de Leuchs ; formation du poly $\alpha$ L Aspartate de $\beta$ benzyle.

On prend le 1,2 - Dichloroéthane (1,2 DCE) comme solvant et la triéthylamine comme amorceur.

De nombreux essais ont été effectués dans différents solvants (1,2 DCE, CHCl<sub>3</sub>, Dioxanne, acétate d'éthyle) à différentes températures (20°C à 60°C) et à différentes concentrations en amorceur (A/I = 0, 10, 20, 50, 100, 200, 400, 500, 1000). Des

résultats identiques sont notés pour les polymérisats précipités dans le méthanol.

L'emploi d'un réactif de couplage entre les fonctions amino et acide terminales, tel que la DCCI n'a donné aucun résultat.

Rendement de polymérisation : 47 %

$[\eta] = 0,26$  dl/g (C = 1 % dans  $\text{CHCl}_3$  - ADC (2 % en volume) à  $25^\circ\text{C}$  ).

$\bar{M}_w = 23\ 000$  (4) (d'après étalonnage par sédimentation).

#### C - DEBENZYLATION DU POLY $\alpha$ -L-ASPARTATE DE $\beta$ BENZYLE (PLAB) .

On dissout 17 g de P.L.AB à 10 % dans  $\text{CHCl}_3$ . On fait passer un courant de HBr gazeux préalablement séché sur benzène très sec jusqu'à saturation. On laisse 24 h en agitation à  $25^\circ\text{C}$ . L'acide Poly-L-Aspartique est filtré, lavé à l'acétone par distillation sur extracteur Soxhlet.

On dissout dans NaOH 0,1 N et on dialyse 2 à 3 jours contre NaOH 0,1 N pour enlever les petites masses (oligomères), puis contre HCl 0,05 N pendant 2 jours pour neutraliser la soude restante et enfin contre l'eau.

Afin de contrôler le rendement de débenzylation on précipite une petite partie par l'alcool éthylique. L'étude en U.V. montre une débenzylation totale (taux de groupements benzyle résiduels  $< 0,5$  %  $\epsilon = 200$  l mole<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> à 260 m $\mu$  ).

L'acide poly- $\alpha$ -L Aspartique est alors lyophilisé.

L'étude rapide en Infra-Rouge (pastille KBr) donne les bandes

Amide A	3300 cm <sup>-1</sup>	
(C=O) stretching acide	1720 cm <sup>-1</sup>	
Amide I	1650 cm <sup>-1</sup>	(-CO-NH-stretching)
Amide II	1520 cm <sup>-1</sup>	(-NH stretching)

Caractérisation et pureté de l'acide Poly  $\alpha$ -L-Aspartique

a - Mesures des masses moléculaires

Par tonométrie et osmométrie, le polymère obtenu par NCA a une masse en nombre de 7000  $6700 < \bar{M}_n < 7300$  (DPn 56).

Par tonométrie                    Solvant DMF, référence benzyle (masse 210)  
K<sub>étalonnage</sub> : 8830 kg/mole  
K pL Aspartique 1,21 kg/mole  
 $7000 < M_m < 7500$

Par osmométrie                    Solvant NaCl 0,2 M  
 $6700 < M_n < 7300$

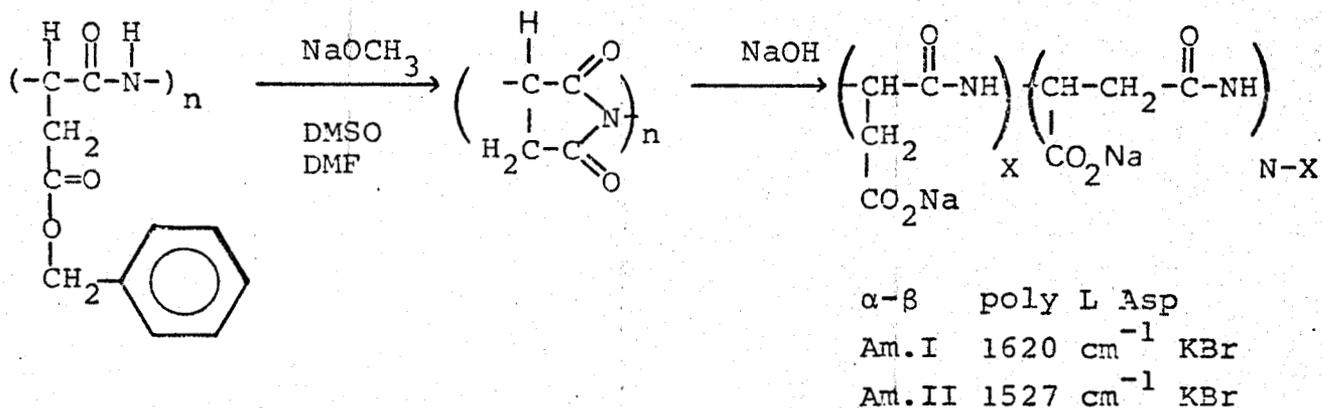
Etude viscosimétrique  $[\eta] = 0,163$  dl/g à pH 7,3 dans NaCl 0,2 M.

b - Etudes U.V. et I.R. : Recherche des cycles succinimides

En U.V. on observe une débenzylation totale  
( $\epsilon = 200$  l.mole<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> à 260 m $\mu$      $\tau \% < 0,5$ )

En I.R. apparition des bandes Amide A, I et II.

La formation possible de cycles succinimides lors de la débenzylation du poly L Aspartate de benzyle doit être contrôlée. NOGUCHI J. (5), KOVACS et al. (6), ADLET et FASMAN (7) ont reporté les spectres I.R. des cycles succinimides (1782 cm<sup>-1</sup> faible 1715 cm<sup>-1</sup> (s) 1670 cm<sup>-1</sup> (s) : cycle pyrrolidone) formés lors de la débenzylation du PLAB (dans l'acide acétique glacial) ou lors de sa polymérisation dans des solvants tels que DMSO ou DMF (7).



Cependant ADLER et FASMAN (7) n'ont pas rapporté la présence de cycles imides lors de la polymérisation dans  $\text{CHCl}_3$  et solvants chlorés.

De plus ADLER et FASMAN (7) signalent l'existence d'un large effet Cotton négatif en Dichroïsme circulaire à  $258 \pm 2 \text{ m}\mu$  et  $242 \text{ m}\mu$  dû à l'absorption du cycle imide.

Aucune des bandes I.R. et dichroïques n'est venue confirmer dans notre polymère la présence de tels cycles ou du copolymère  $\alpha$ - $\beta$ -L poly Aspartate de sodium, ni un restant de groupe benzyle ( $1734 - 1673 - 1527 \text{ cm}^{-1}$ ).

c - Etudes en D.O.R.

Les études en dispersion optique rotatoire ont amené pour le poly L Aspartate de benzyle les valeurs suivantes selon le mode de polymérisation utilisé.

Pour l'ester actif du pentachlorophénol (polycondensation) :

$$\left| \alpha \right|_{20^\circ\text{C}}^{546 \text{ m}\mu} = -16,4^\circ \quad (\text{C} = 1 \% \text{ dans A.D.C.})$$

Pour les N carboxyanhydrides (polymérisation)

$$\left| \alpha \right|_{20^\circ\text{C}}^{546 \text{ m}\mu} = -16,8^\circ \quad (\text{C} = 1 \% \text{ dans A.D.C.})$$

Deux solutions peuvent se présenter :

- ou les deux polymères ont racémisé de la même façon
- ou les deux polymères n'ont pas du tout racémisé et

ne contiennent que des résidus L. C'est cette dernière solution que nous avons préféré prendre car en effet il paraîtrait très étonnant que deux façons aussi différentes (par synthèse peptidique ou par polymérisation par ouverture de cycles) puissent récémiser de la même façon.

d - Recherche des cycles succinimides par méthode enzymatique :  
Digestion de l'acide poly L-Aspartique par l'aminopeptidase M.

Des cycles succinimides n'ayant pas été décelés (ou décelables) par des méthodes optiques, nous avons essayé de les mettre éventuellement en évidence par une méthode de digestion enzymatique. L'hydrolyse à partir des extrémités aminées s'effectue par l'aminopeptidase M. L'hydrolysât a été ensuite déposé sur une plaque d'électrophorèse à basse tension, puis une chromatographie a été effectuée avec la ninhydrine (révélation du L - Aspartique) et l'Ortho-Tolidine - Chlorine (8) (révélation des cycles succinimides). Seule une tache révélée par la ninhydrine apparaît et est caractéristique de l'acide L - Aspartique. La révélation par l'O. Tolidine n'a donné aucune tache. Il semblerait donc qu'aucun cycle succinimide n'existe dans le polymère (auquel cas on aurait eu un polypeptide dont la migration est proportionnelle à la masse).

Mode opératoire: hydrolyse par l'aminopeptidase M.

0,1 - 0,5 p mole de peptide lyophilisée est dissous dans 0,2 - 1 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M à pH 8.

L'hydrolyse est effectuée avec l'aminopeptidase M (0,5 mg p mole de peptide) pendant 24 h - 48 h en présence d'une goutte de toluène. L'hydrolysât est ensuite lyophilisé. Les acides aspartique et glutamique ainsi que leurs amides respectives sont identifiées par électrochromatographie sur papier.

Réactifs : 3 mg Acide poly L Aspartique + 1 ml Bicarbonate  $\text{NH}_4$  0,1 M pH 8 sont ajoutés à 5 mg Aminopeptidase M dans 1 ml de bicarbonate  $\text{NH}_4$ . L'hydrolyse s'effectue pendant 24 h à 37°C.

L'électrophorèse se fait à basse tension 400 V pH 3,9 en présence d'un témoin (L-Aspartique).

La chromatographie se fait dans le Butanol - acide acétique - eau et la révélation à la fluoroscamine (ou la ninhydrine) et révélation par la chlorine - O. Tolidine (8).

C H A P I T R E    I I

ETUDES EN INFRA-ROUGE

## CHAPITRE II

### ETUDES EN INFRA-ROUGE.

#### A - Infra-Rouge fondamental

- a - Rappels bibliographiques
- b - Mode opératoire
- c - Attribution des pics - influence de la concentration
- d - Discussions.

#### B - Infra-Rouge lointain par transformée de Fourier

- a - Théorie et techniques opératoires
- b - Discussions - Etudes sur le (L Asp)<sub>n</sub> et (L-Glu)<sub>n</sub>

#### C - Conclusions générales.

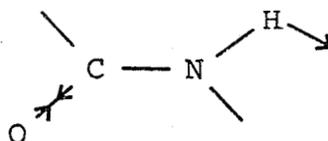
A - ETUDES EN INFRA-ROUGE FONDAMENTAL.

a - Rappels bibliographiques.

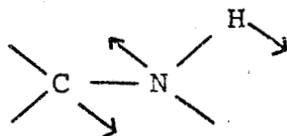
L'infra-rouge fondamental (région  $4000 \text{ cm}^{-1}$  -  $250 \text{ cm}^{-1}$ ) est une technique puissante d'investigation de la structure des protéines et des polypeptides. De nombreuses études, tant qualitatives (1), (2) que théoriques (3), (4), (5) ont fait de cette méthode d'investigation une source riche de renseignements sur la structure conformationnelle des protéines, principalement dans l'étude des bandes amides A, B, I, III, V et VII. (Afin de bien situer le problème), nous avons reporté les caractéristiques des bandes Amides.

- Les bandes Amide A ( $3300 \text{ cm}^{-1}$ ) et B ( $3100 \text{ cm}^{-1}$ ) proviennent de la résonance de Fermi entre le premier état excité de la vibration stretching N - H et la vibration Amide II.

- L'Amide I ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ) est un mode stretching  $(\text{C}=\text{O})_S$  78 %,  $(\text{C}-\text{N})$  10 % et N-H bend 10 %.

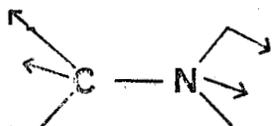


- Amide II ( $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ ) NH bending (63 %) dans le plan et  $(\text{C}-\text{N})$  stretching 44 %



l'Amide II et l'amide III viennent de l'interaction du groupe  $\text{O}=\text{C}-\text{N}$  et  $\text{N}-\text{H}$ .

- l'Amide III est due à l'interaction  $(\text{C}-\text{N})_{st}$  35 %, et  $(\text{N}-\text{H})_S$  29 % (couplage de phases opposées).



la bande Amide III ( $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$ ) se situe dans la région des  $(\text{C} - \text{C})_{\text{st}}$  et  $(\text{C} - \text{N})$  stretching ainsi que des déformations des  $\text{CH}_\alpha$  et  $\text{CH}_2$ .

- L'Amide IV est un mode bending  $\text{O} = \text{C} - \text{N}$  peu déplacé par  $\text{D}_2\text{O}$ . Les fréquences amide IV sont sensibles aux interactions vibrationnelles sur les groupes  $\text{CONH}$  d'une chaîne polypeptidique. (région  $600 - 650 \text{ cm}^{-1}$ ).

- Amide V ( $\sim 700 \text{ cm}^{-1}$  (N H) bending hors du plan. Cette bande est déplacée vers  $500 \text{ cm}^{-1}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  ; elle est de plus très sensible à la force des liaisons H.

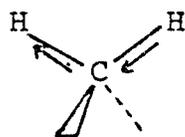
- Amide VI ( $\sim 600 \text{ cm}^{-1}$ ) ( $\text{C} = \text{O}$ ) bending hors du plan

- Amide VII : cette bande est associée à la rotation interne autour de la liaison  $\text{C} - \text{N}$  (vers  $210 \text{ cm}^{-1}$ )

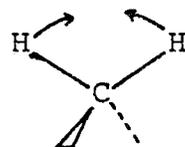
Symbolisme employé pour les vibrations en I.R. et Raman.



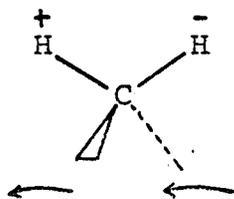
$\nu_s ( )_s$  (Vibration de valence symétrique)  
Stretching Symetric



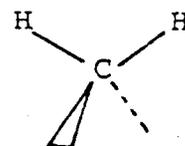
$\nu_s ( )_a$  (Vibration de valence antisymétrique)  
Antisym stretching.



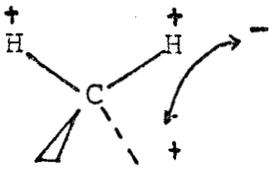
$\delta ( )$  (Déformation angulaire)  
Binding



$\gamma_t ( )$  (Torsion).  
Twisting



$\gamma_r ( )$  (Rotation dans un plan)  
Rocking



$\gamma_W$  (Balancement)  
Wrigging

Expressions des potentiels de torsion autour des liaisons  
(N - C $^\alpha$ ) et C $^\alpha$  - CO)

N - C $^\alpha$        $V_\phi = \frac{1}{2} V_\phi^0 (1 + \cos 3\phi)$        $V_\phi^0 = 1,5$  Kcal/mole

C $^\alpha$  - C' (= O)       $V_\psi = \frac{1}{2} V_\psi^0 (1 - \cos 3\psi)$        $V_\psi^0 = 1$  Kcal/mole

Les spectres infra rouges des protéines dans les régions des bandes amide I et II sont caractérisés par des fréquences qui sont déplacées suivant la nature de la structure secondaire de ces protéines (hélice , structure désordonnée (ou Random Coil) ) chaînes plissées parallèles ou antiparallèles). Le tableau I résume l'ordre de ces fréquences suivant la structure secondaire des protéines.

Conformation	mode	Amide I		Amide II H <sub>2</sub> O cm <sup>-1</sup>	Solide cm <sup>-1</sup> Am I
		D <sub>2</sub> O cm <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> O cm <sup>-1</sup>		
$\beta$ antiparallèle ( $\beta \nparallel$ )	$\nu(\pi, 0)_A$	1632 F 1630	1632	1540	1632
	$\nu(0, \pi)_A$	1675	1690	1550 $\nu(\pi, \pi)$	1690-95
$\beta$ parallèle ( $\beta \parallel$ )	$\nu(0, 0)$	1648			
	$\nu(\pi, 0)$	1632 F			
hélice $\alpha$	$\nu(0)_\alpha$	1650	1652	1516 faible	1650-53
	$\nu(\theta)$			1646 F	
non ordonnée	$\nu(n.o.)$	1660	1656	1535 F	1660-64

TABLEAU I

Fréquences Infra-Rouge observées pour les protéines.

Le tableau II donne les fréquences observables pour des polypeptides comme la Poly-L-Lysine et l'acide Poly - L - Glutamique.

Polypeptide	$\nu(0)_{\alpha}$ hélice $\text{cm}^{-1}$	$\nu$ (non ordonnée) $\text{cm}^{-1}$
Poly L Lysine Solution dans $\text{D}_2\text{O}$	1635	1645
Acide Poly L Glutamique solution dans $\text{D}_2\text{O}$	1640	1643
film (non deutéré)	1652	1657

TABLEAU II (réf 2)

Bandes amide I ( $\text{H}_2\text{O}$ ) et I' ( $\text{D}_2\text{O}$ ) de la poly L-Lysine et de l'acide poly L-glutamique dans les conformations hélice  $\alpha$  et non ordonnée.

b - Mode opératoire

Les spectres infra-rouges ont été obtenus soit en pastille KBr pour la forme solide, soit en solution à différentes concentrations dans l'oxyde de deutérium ( $\text{D}_2\text{O}$ ) plutôt que dans l'eau, celle-ci ayant de nombreux pics dans la région étudiée (entre  $2000 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ ). Une cellule à épaisseur variable comportant des fenêtres de bromure d'argent (60 % ABS jusqu'à  $250 \text{ cm}^{-1}$ ) a été utilisée pour enregistrer les spectres sur un appareil Perkin-Elmer 257).

Les plus fortes concentrations (70 % en poids dans  $\text{D}_2\text{O}$ ) ont été enregistrées avec des pastilles d'AgCl, et des concentrations de 1,5 % à 0,75 % ont été enregistrées dans une cellule à épaisseur variable (fenêtres en AgBr) afin d'obtenir la meilleure définition possible des spectres.

c - Résultats et interprétation.

1 - Forme solide

Le tableau III et les figures 1 et 2 donnent l'allure des spectres de l'acide poly L aspartique ainsi que son sel de sodium sous la forme solide (pastille KBr).

Poly-L-Aspartate Na (en $\text{cm}^{-1}$ )		Poly-L-Aspartique $\text{H}^+$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Attributions
		3610-3490	Bande OH associé intra et intermoléculaire
		3310	Amide $\text{H}$
		2959 f	$\text{CH}_2$
		2600 f	COOH
		2320	= $\text{NH}^+$
	(groupement $\text{COO}^-$ )	1730	(C=O) stretch. acide
1690 M	$\nu_{\text{C=O}}$ non solvaté	1650 F	Am I ( $\alpha$ hélice)
1672 M	Am I $\beta$ <del>h</del>	1520 F	Am II ( $\alpha$ h)
1555 M	Am I (RC ou PG II)	1410 F	$\delta$ CH, Am III
1595 F	Am I ( $\beta$ <del>h</del> (forme $\beta_2$ ))	1310	$\gamma_t$ $\text{CH}_2$
1560 M	( $\text{COO}^-$ ) <sub>a</sub>	1230 f	$\text{CH}_2$ w
1535 M	Am II (R.C + $\beta$ <del>h</del> )	1140 f	$\text{CH}_2$
1420 TF	$\delta$ CH + Am III + ( $\text{COO}^-$ ) <sub>S</sub>	975 f	
1337 M	$\gamma_t$ $\text{CH}_2$	925	( $\text{C}_\alpha$ - C - N) stretch
1270 M		835 F	(C-N) $\text{str} + \text{CH}_2$ r
1140		775 F	$\text{CH}_2$ r
945 F	$\nu$ (C-C) <sub>S</sub> ch. latérale	695 M	Am V ( $\beta$ <del>h</del> )
925 f		670	
810 M		650 F	Am V (R. coil)
770 M	$\text{CH}_2$ r	595 M	Am IV ( $\alpha$ hélice)
680 M		537 f	
625		450 M	
520		405	
450 M		335	Déformation du squelette ( $\alpha$ hélice)
420	$\alpha$ hélice (C-C-N)		
375 f	Am VII (hélice $3_1$ )		
335 M	(hélice $\alpha$ )		
195	Déformation du squelette		
163	hélice $3_1$ (I.R. lointain)		

TABLEAU III

Spectres infra-rouge à l'état solide de l'acide poly L aspartique et de son sel de sodium.



PL-ASPARTATE de SODIUM

(SOLIDE)

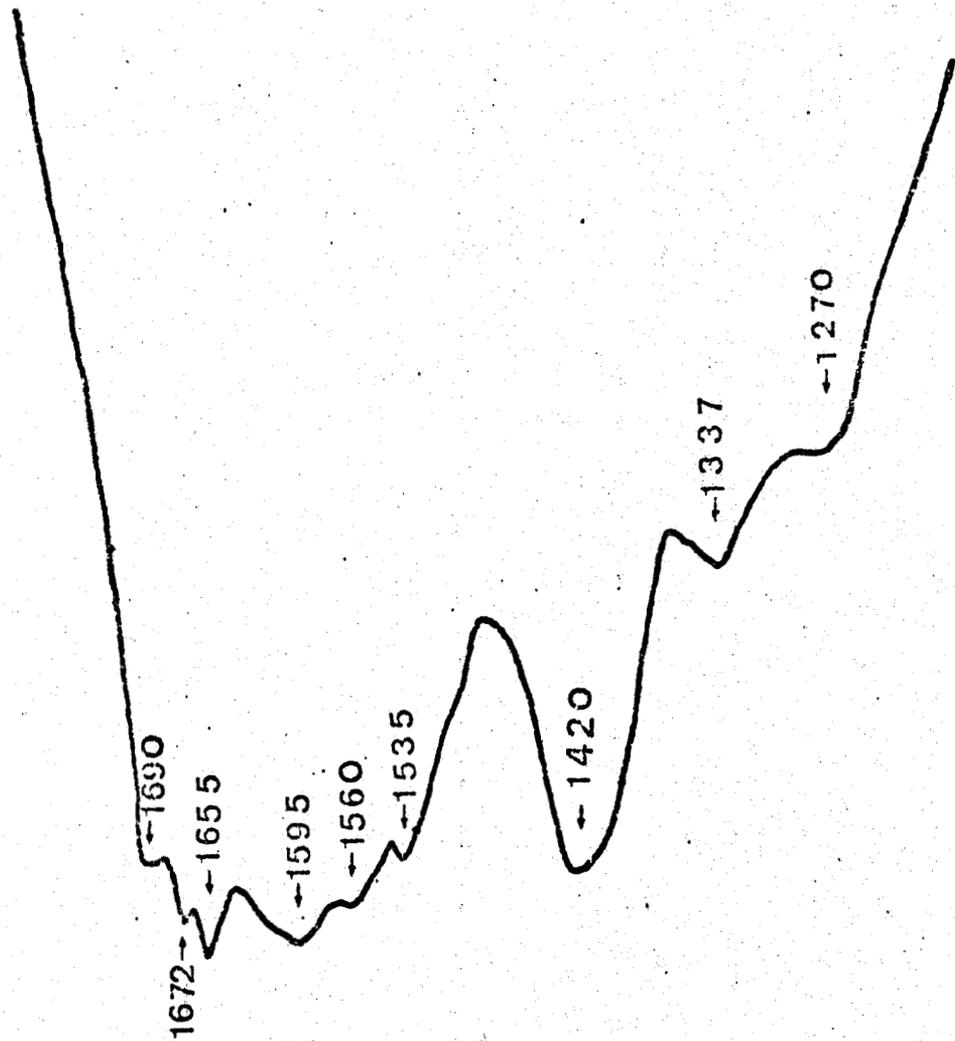
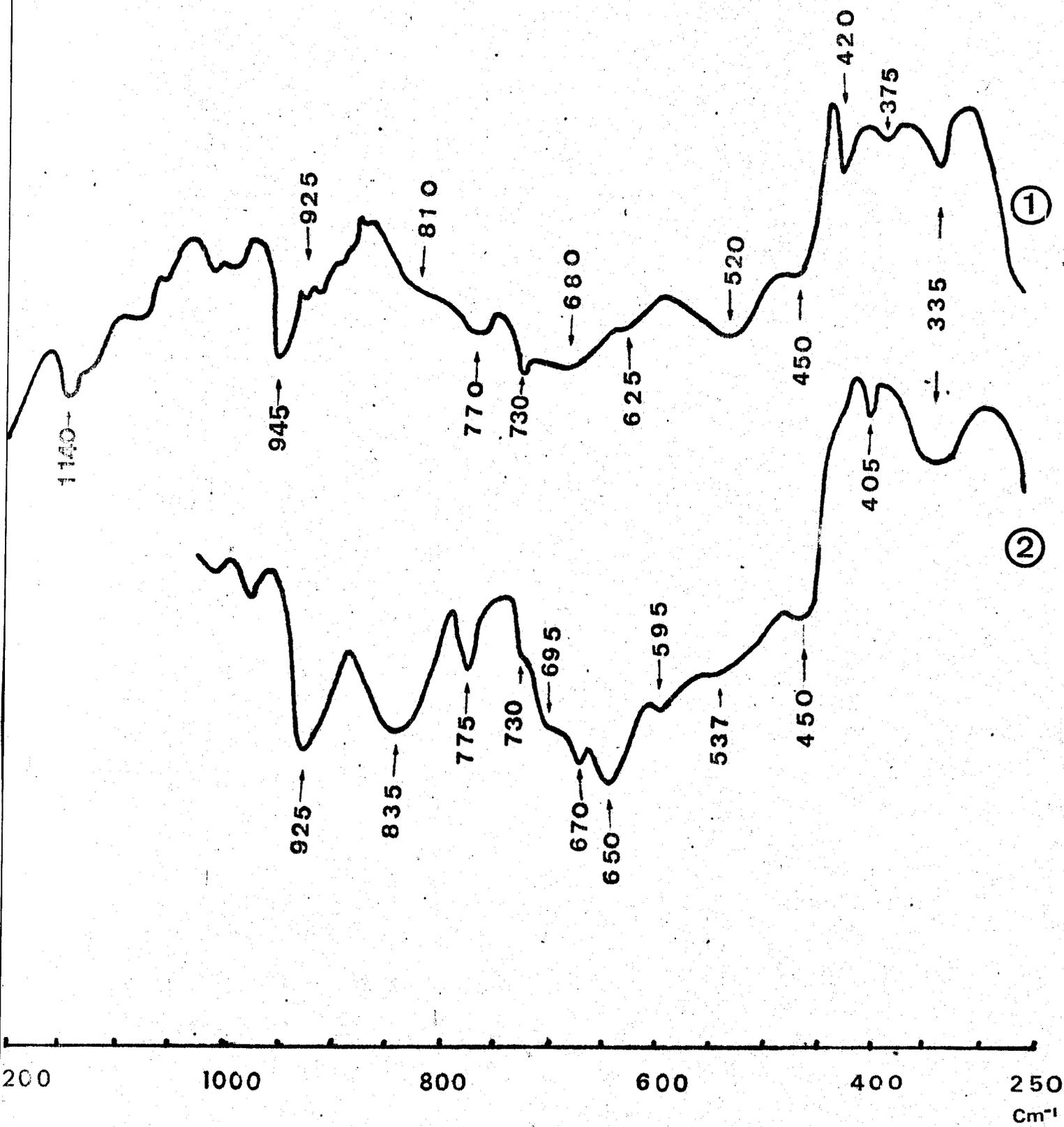


FIG. II-1

RHS  
LILLE



①  $[\text{L-ASP-Na}]_n$  SOLID

②  $[\text{L-ASP}]_n$  SOLID

FIG. II-2



Sous sa forme sel de sodium, le polypeptide (solide) (fig II-1) montre des bandes amide I à 1690, 1672, 1655, 1595  $\text{cm}^{-1}$  caractéristiques des formes  $\beta$  antiparallèles (1690 - 1672  $\text{cm}^{-1}$ ) (réf 5), non ordonnées (1655  $\text{cm}^{-1}$ ) et une dernière bande très intense à 1595  $\text{cm}^{-1}$ .

Sous sa forme neutre, l'acide Poly L-Aspartique  $|(L\text{-Asp})_n|_{\text{OH}}$  voit sa bande à 1655  $\text{cm}^{-1}$  se déplacer à 1650  $\text{cm}^{-1}$ , valeur caractéristique d'une structure en hélice  $\alpha$ . Pour le sel de sodium, la bande amide III est très intense et semble contenir plusieurs pics ( $\delta(\text{CH})$ , Am III,  $\nu(\text{COO}^-)_s$ ). La bande à 1560  $\text{cm}^{-1}$   $|(COO^-)_a|$  disparaît complètement sous la forme acide, en relation avec l'absorption du groupement carboxylate observée par CHIRGADZE, FEDOROV et TRUSHINA (7). La bande à 945  $\text{cm}^{-1}$ , caractéristique de la vibration stretching  $\nu(\text{C-C})_s$  de la chaîne latérale portant le groupement carboxylate est déplacée à 925  $\text{cm}^{-1}$  quand on passe au groupement carboxylique non ionisé (17) (hélice  $\alpha$ ) (fig II-2).

Dans la région (1000 - 250  $\text{cm}^{-1}$ ) (fig. II-2), région des vibrations du squelette peptidique, la région amide V offre une grande diversité de fréquences ; la bande du polyacide non ionisé à 650  $\text{cm}^{-1}$  est celle d'une hélice  $\alpha$  (17) (voir tableau IV).

Sous forme sel de sodium, les bandes à 625, 595 et 520  $\text{cm}^{-1}$  sont caractéristiques d'une structure  $\beta$  antiparallèle (tableau V). Les bandes à 945  $\text{cm}^{-1}$  et 375  $\text{cm}^{-1}$  peuvent être attribuées à une structure proche d'une hélice  $3_1$  comme de la polyglycine II (365  $\text{cm}^{-1}$ ) (1) et le pic large vers 520  $\text{cm}^{-1}$  pouvant aussi être attribué à cette structure (559  $\text{cm}^{-1}$  et 352  $\text{cm}^{-1}$  pour (L-Ala-Gly-Gly) $_n$  (17) qui est aussi une hélice  $3_1$  (tableau VI).

La bande à 335  $\text{cm}^{-1}$  ne se déplace pas lorsqu'on passe du sel de sodium à la forme neutre mais est fortement élargie (région hélice  $\alpha$  335 - 350  $\text{cm}^{-1}$  (1) ).

La bande à 945  $\text{cm}^{-1}$  (sel de Na) disparaît complètement lorsqu'on passe à la forme non ionisée, et la bande à 925  $\text{cm}^{-1}$  augmente fortement en intensité (hélice  $\alpha$ ) (tableau IV).

Infra-Rouge	Raman	Attributions
908 (//)	909 (A)	$C^{\alpha}-C^{\beta}$ stretching (C -N) et (C -C') modes
893 ( $\perp$ )	889 ( $E_1$ )	stretching en phase
	700 ( $E_2$ )	déformation de l'hélice
691 (//)	695 (A)	
658 ( $\perp$ )		C = O vibration hors du plan (bending)
616 ( $\perp$ )		NH bending hors du plan (Amide V)
528 (//, $\perp$ )	531 (A)	C=O bending dans le plan
	536 ( $E_1$ )	
	379 ( $E_2$ )	
371 ( $\perp$ )	376 ( $E_1$ )	Déformation de l'hélicé
324 ( $\perp$ )		$C^{\alpha} - C^{\beta}$ bending
284 (//)	294 (A)	
	268 (A)	Déformation de l'hélice
	216 ( $E_1$ )	
	195 ( $E_2$ )	Déformation de l'hélice +
185 ( $\perp$ )	194	$C^{\alpha}-C^{\beta}$ bending
163 ( $\perp$ )	170	
120 (//)		
113 ( $\perp$ )		Déformation de l'hélice

TABLEAU IV

Fréquences observées ( $cm^{-1}$ ) et attributions des bandes pour la poly L Alanine ( $\alpha$  hélice) (réf 17) (SHIMANOUSHI - KOYAMA - ITOH)



I R	Attributions
613 ( $\perp$ )	C' = O bending hors du plan
622 (//) ( $B_1$ )	NH bending hors du plan (Am V)
528	Déformation du squelette peptidique
434 (//) ( $B_2$ )	$C^\alpha - C^\beta$ bending
447 ( $\perp$ ) ( $B_1$ et $B_3$ )	(résidu alanine)
329 ( $\perp$ , //)	$C^\alpha - C^\beta$ bending
242 (//) ( $B_2$ )	déformation de la chaîne principale.

TABLEAU V

Fréquences observées ( $\text{cm}^{-1}$ ) et attribution de la poly-L-alanine avec la structure  $\beta$  antiparallèle (réf 17).

Forme	(L Ala-Gly) <sub>n</sub>	L Ala Gly Gly) <sub>n</sub>
$\beta$	443	427
	259	260
PG II (hélice $3_1$ )		559
		352
$\alpha$ hélice	527	
	375	

TABLEAU VI

Fréquences observées ( $\text{cm}^{-1}$ ) et attribution des bandes pour les copolymères (L-Ala-Gly)<sub>n</sub> (forme  $\beta$ ) et (L-Ala-Gly-Gly)<sub>n</sub> (forme PG II) en infra rouge lointain (réf 17).



A  $1000\text{ cm}^{-1}$  on observe une faible bande, intéressante par le fait qu'elle redonne par combinaison avec les bandes amide V les bandes amide I.

Pour l' $\alpha$ hélice	$650\text{ cm}^{-1}$	+	(Am IV) <sub>1</sub> ( $1000\text{ cm}^{-1}$ )	→	$1650\text{ cm}^{-1}$
Pour les $\beta$ //	625			→	$1625\text{ cm}^{-1}$
	595			→	$1595\text{ cm}^{-1}$
	520			→	$1520\text{ cm}^{-1}$

2 - Etude en milieu deutéré de la transition en fonction du pH :

Nous avons choisi de prendre  $D_2O$  comme solvant "aqueux" les bandes de l'eau pure étant importantes dans la région étudiée ( $2000 - 1400\text{ cm}^{-1}$ ) alors que l'oxyde de deutérium n'offre pas ces inconvénients.

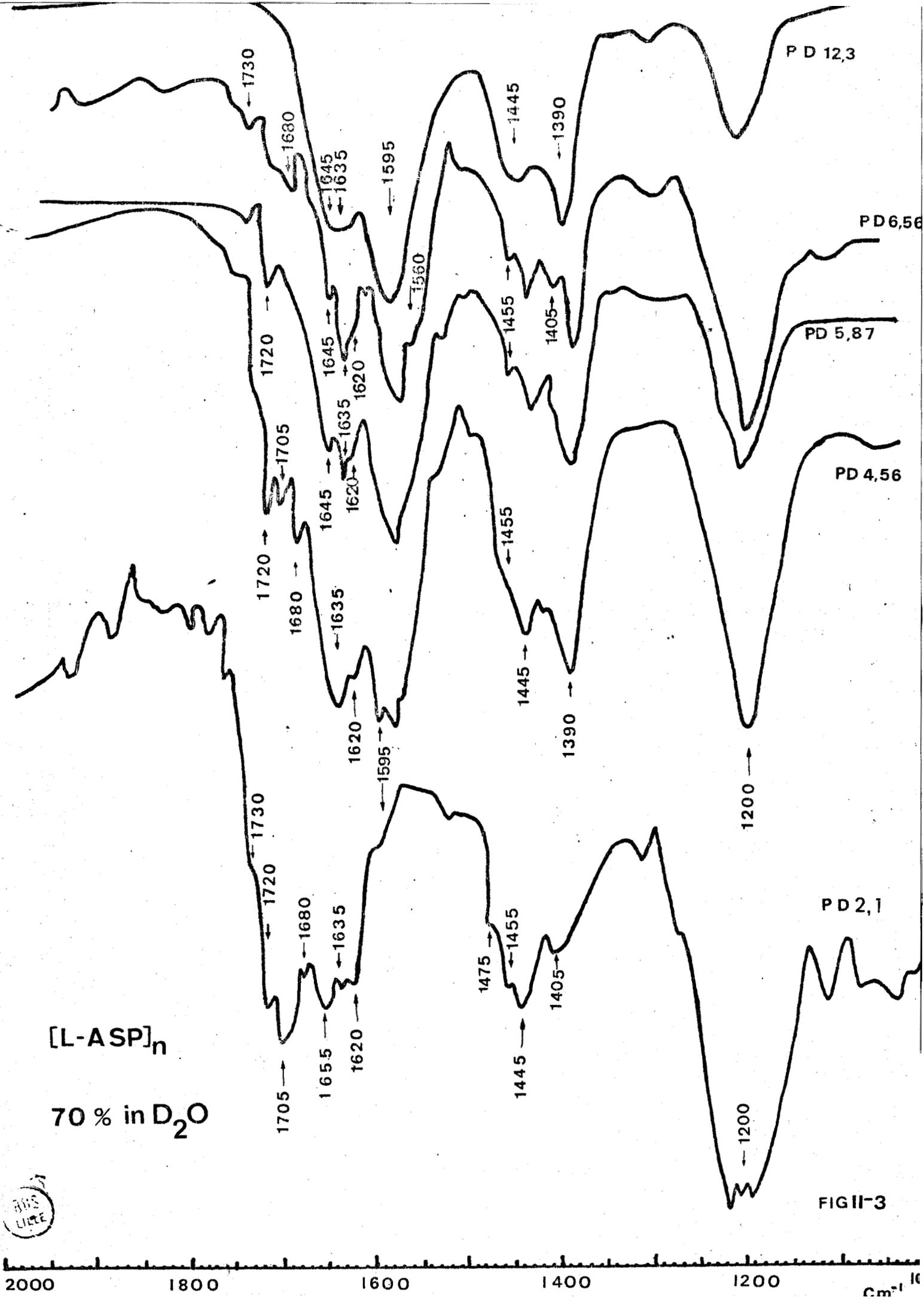
Deux types de spectre infra rouge ont été observés suivant que l'on s'est placé à forte concentration (fig. II-3) ou en milieu dilué (fig. II-4 et II-5).

En milieu très concentré (fig. II-3) une bande à  $1635\text{ cm}^{-1}$  (intense) subsiste pendant toute la transition en fonction du pH ; en plus de la bande à  $1445 - 1455\text{ cm}^{-1}$  il apparaît alors une bande à  $1475\text{ cm}^{-1}$  lorsqu'on baisse le pH, bande qui est retrouvée seule, en milieu dilué (bande Amide II'). La bande à  $1635\text{ cm}^{-1}$  a été attribuée à une chaîne  $\beta$  parallèle (5), la bande à  $1445\text{ cm}^{-1}$  à l'amide II' de la forme antiparallèle et celle à  $1475\text{ cm}^{-1}$  à l'amide II' d'une structure hélicoïdale.

Le fait qu'en milieu dilué, la bande à  $1475\text{ cm}^{-1}$  subsiste en milieu basique semble indiquer la présence d'une structure proche d'une hélice  $\alpha$ . SMALL, FANCONI et PETITCOLAS ont rapporté pour l'hélice  $3_1$  de la polyglycine II une bande à  $1476\text{ cm}^{-1}$  en milieu deutéré (13). Cette structure tend à décroître en intensité (en milieu dilué 0,75 % dans  $D_2O$ ) lorsqu'on abaisse le pH.

[L-ASP]<sub>n</sub>

70% in D<sub>2</sub>O



FIGII-3



En milieu concentré, la région amide I' montre une relative complexité. En milieu basique, on observe des bandes faibles à  $1680\text{ cm}^{-1}$  et à  $1620\text{ cm}^{-1}$  qui augmentent en intensité lorsqu'on abaisse le pH à 2,1, et une bande à  $1720 - 1730\text{ cm}^{-1}$  de faible intensité, accompagnée d'une bande de très forte intensité à  $1595\text{ cm}^{-1}$ , cette dernière disparaissant presque totalement en milieu acide.

La bande à  $1645\text{ cm}^{-1}$ , d'intensité moyenne disparaît et est remplacée en milieu acide par une bande de forte intensité à  $1655\text{ cm}^{-1}$  (hélice  $\alpha$ ). Nous avons attribué cette bande ( $1645\text{ cm}^{-1}$ ) à une structure désordonnée (incluse dans une structure  $\beta$ -antiparallèle (tableaux VII et VIII)).

En milieu dilué (fig. II-4 et II-5, les bandes sont conservées à  $1730$  et  $1595\text{ cm}^{-1}$  à  $1680 - 1610\text{ cm}^{-1}$ . La bande à  $1665\text{ cm}^{-1}$  a été assimilée à la partie chaîne non ordonnée solvée par  $\text{D}_2\text{O}$ .

La bande à  $1595\text{ cm}^{-1}$  diminue en intensité lorsqu'on passe à un pH acide et en même temps apparaît une bande étroite et intense à  $1705\text{ cm}^{-1}$  ( $(\text{C}=\text{O})_s$  du groupe COOD) alors que disparaît la bande à  $1560\text{ cm}^{-1}$   $(\text{COO}^-)_a$  (fig. II:4)

Les bandes infra rouges à  $1730$ ,  $1595\text{ cm}^{-1}$  et  $1680 - 1620\text{ cm}^{-1}$  ont été attribuées en prenant en considération le travail de ITOH, FOXMAN et FASMAN (9) sur les deux formes  $\beta$  de l'acide poly-L-glutamique obtenus par précipitation en milieu acide. Ces deux formes  $\beta$ -antiparallèles dépendant de la température de chauffage à partir des hélices  $\alpha$  agrégées :  
forme  $\beta_1$  obtenue à  $40^\circ\text{C}$  ( $1681\text{ cm}^{-1}$  et  $1615\text{ cm}^{-1}$ ) structure monoclinique avec  $d_{001} = 9,03\text{ \AA}$ ,  $\nu(0,\pi)$  et forme  $\beta_2$  obtenue en chauffant la forme  $\beta_1$  à  $80^\circ\text{C}$  ( $1728\text{ cm}^{-1}$  et  $1597\text{ cm}^{-1}$ ), de réseau monoclinique  $d_{001} = 7,83\text{ \AA}$  (structure très compacte).

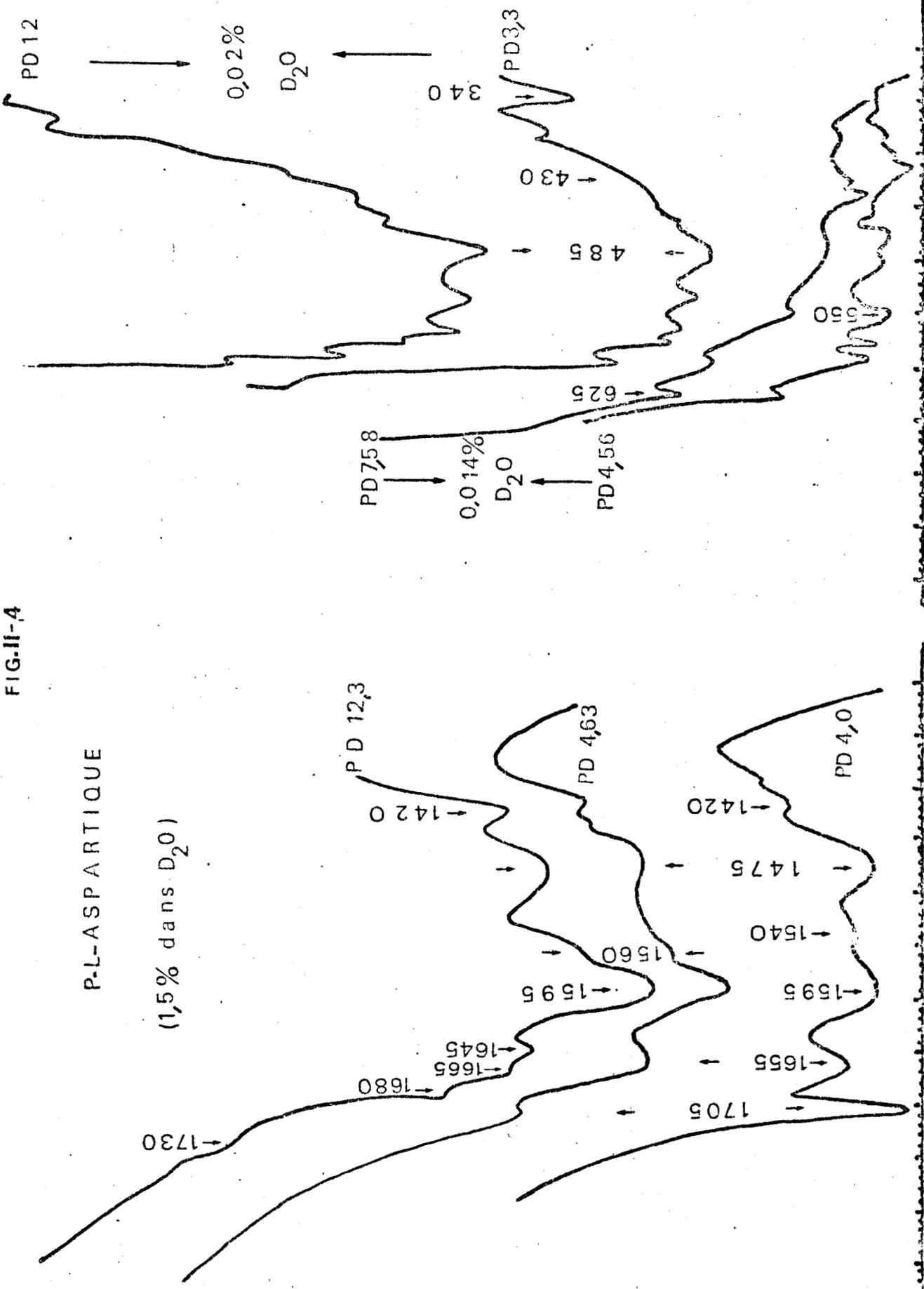
Ce résultat a été confirmé pour l'acide polyaspartique tout au moins sous la forme sel de sodium comme nous le verrons dans le chapitre traitant de l'étude de la structure cristalline de ce polypeptide par rayons X.

5777  
LILLE

FIG. II-4

P-L-ASPARTIQUE

(1,5% dans D<sub>2</sub>O)



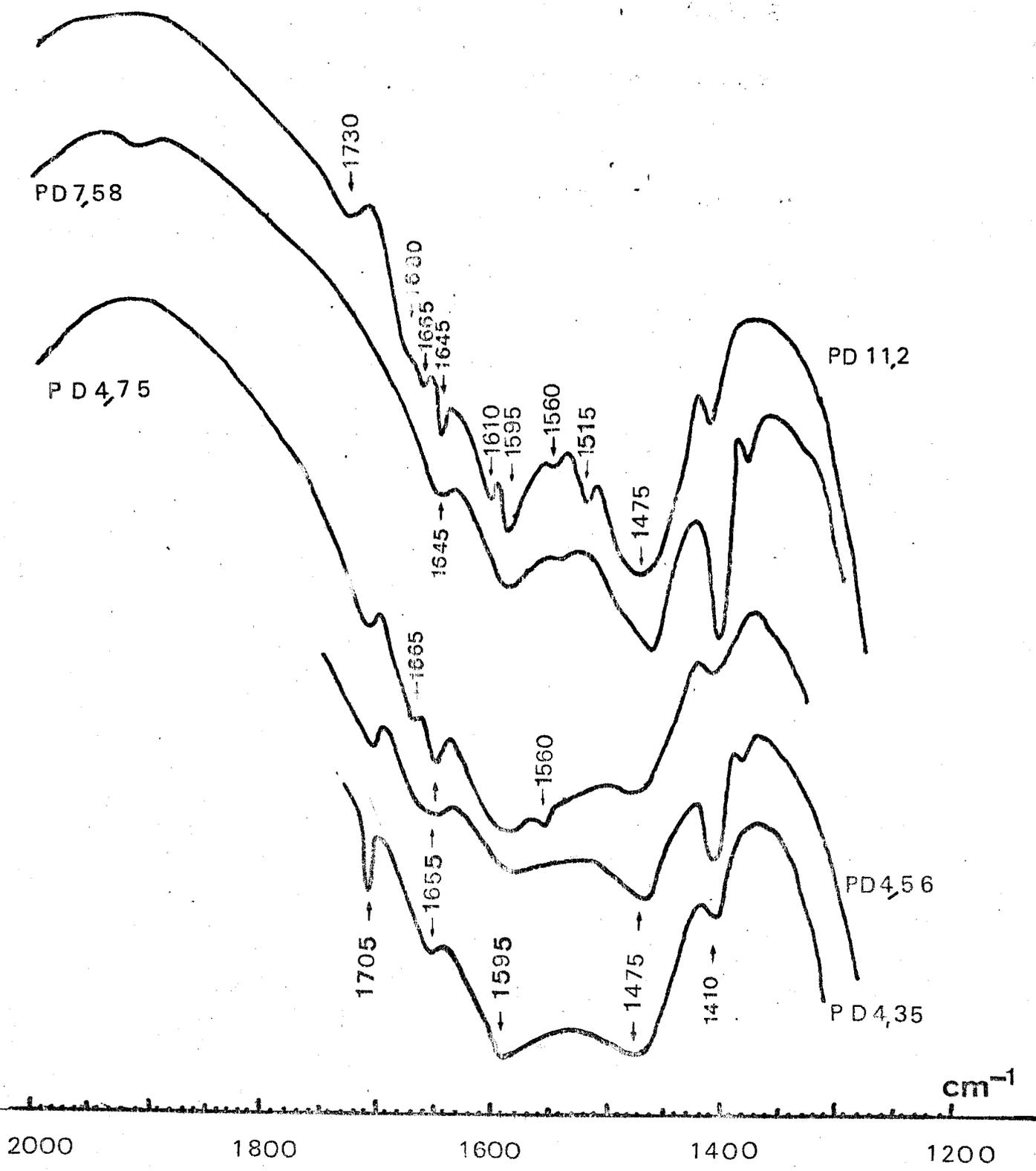


FIG. II-5  
 [L-ASP]<sub>n</sub> in 0.75% D<sub>2</sub>O



Forme	Am I	Am II	COO <sub>a</sub> <sup>-</sup>	COO <sub>S</sub> <sup>-</sup>	humidité relative %	
β'	1625 ⊥	1525 //	1570-75	1408	< 10	H <sub>2</sub> O
β''	1615 ⊥	1525 //	1560-65	1408	30-70	H <sub>2</sub> O
α'	1645-50//	1550 ⊥	1570-75	1410	< 10	H <sub>2</sub> O
α''	1635-40	1550 ⊥	1560	1410	> 90	H <sub>2</sub> O
β'	1620	1445	1570-75	1410	< 10	solide
β''	1610	1445	1565	1410	60	solide
α D <sub>2</sub> O	1625-40	1445 tf	1565	1410	90	solide
σ	1660	1445	1565	1405	100	PD 7,3
β	1615	1445	1565		100	PD 4,7

TABLEAU VII

Spectres I R de films de polyglutamate de sodium (référence 8).  
et // indiquent le dichroïsme perpendiculaire et parallèle.

Polypeptide	α hélice cm <sup>-1</sup>	R.C cm <sup>-1</sup>	β <sub>1</sub> // cm <sup>-1</sup>	C=O COOD	Am. II	Am. III	Référence
PLGA D <sub>2</sub> O Am I'	1639	1660  1638 dans β <sub>2</sub>	β <sub>1</sub> (1681 ν(0, π) 1615 ν(π, 0) β <sub>2</sub> 1728 1597	1705	1460		ITOH, FOXMAN FASMAN (9)
PLGA D <sub>2</sub> O Am I' hélices ag.	1640		1720 1595	1705	1460		MENDELKEE (10) ZIMMERMAN
Poly L Ly- sine D <sub>2</sub> O 1 M NaClO <sub>4</sub> D <sub>2</sub> O 4 M NaCl <sub>2</sub> D <sub>2</sub> O	1635 1638	1659 1647	1671				PAINTER KOENIG (11)
Poly Pro- line II D <sub>2</sub> O	1610 hélice 3 <sub>1</sub> 1650 (H <sub>2</sub> O)						(12) (1)
Poly gly- cine II D <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> O	1639 (h 3 <sub>1</sub> )				1476 1554	1035 987 1249	(13)

TABLEAU VIII

CONCLUSIONS:

Il apparaît donc deux phénomènes suivant la concentration du polymère. En milieu très concentré on observe une transition classique chaîne non ordonnée - hélice  $\alpha$ , mais de plus une transition dans les structures  $\beta$  antiparallèles  $\beta_2 \rightarrow \beta_1$  (en abaissant le pH) les différents feuilletts s'écartant lorsqu'on abaisse le pH et permettant ainsi une solvataation de la chaîne latérale, résultat compatible avec les études de solvataation.

En milieu dilué, il apparaît que les phénomènes ne sont pas si nets. En effet, en milieu acide la structure  $\beta_2$  diminue en pourcentage mais reste présente. Nous avons pensé que cela signifiait qu'il existe une association intermoléculaire en milieu concentré et intramoléculaire en milieu dilué. Ceci reste à confirmer par des études de sédimentation et de RMN comme nous le verrons dans le chapitre consacré à ces méthodes. Le tableau IX résume les bandes Infra Rouge pour l'acide poly Aspartique.

pH 6,56 D <sub>2</sub> O		pH 2,1 D <sub>2</sub> O
1730 g		1730 M
1680 f		1720 M
1645 M	Am I' (chaîne non ordonnée)	1705 TF $\nu_S$ (COOD)
1635 F	milieu concentré Am' $\beta$ //	1680 F $\beta_1$ // Am I'
1620 f	Am I' $\beta_1$ antiparallèle	1655 F Am I' hélice $\alpha$
1595 F	Am I' $\beta_2$ antiparallèle	1635 F Am I' $\beta$ //
1560 F	$\nu_S$ (COO <sup>-</sup> ) <sub>a</sub>	1620 M Am I' $\beta_1$ //
1455 f		1595 f Am I' $\beta_2$ //
1445 M		1475 M
1390 F		1455 M
1200 TF		1445 M Am II'
		1405 f
		1200 TF

TABLEAU IX

Fréquences et attributions du spectre Infra-Rouge de l'acide poly - L - Aspartique. Région bandes Amides I' et II'.

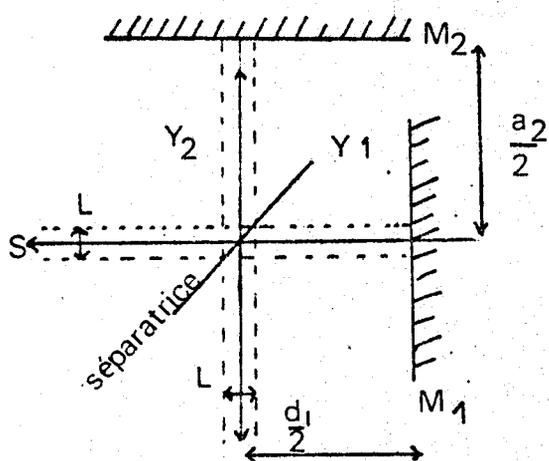
B - ETUDE DES VIBRATIONS DU SQUELETTE:INFRA ROUGE LOINTAIN PAR TRANSFORMEE DE FOURIER.

La région Infra-Rouge lointain n'est pas accessible par les techniques infra rouges habituelles à cause de la forte absorption des polypeptides dans ce domaine de fréquences. SCHOTTS et SIEVERS (14) ont enregistré les spectres de différents polypeptides comme le polyglutamate de benzyle, la poly L-alanine, le Poly L leucine, la poly - L - proline, la myoglobine (de baleine) et de divers acides aminés.

Théorie :

La technique de base repose sur la théorie de l'interférométrie. Il nous a semblé intéressant de décrire mathématiquement les fonctions spectrales.

Interféromètre de MICHELSON.



Un faisceau parallèle émis par une source monochromatique de nombre d'onde  $\nu$  est divisé par une séparatrice non absorbante et très mince en deux faisceaux qui vont se réfléchir respectivement sur les miroirs  $M_1$  et  $M_2$ . De retour sur la séparatrice, chaque vibration sinusoïdale a pour équation :

$$Y_1 = a \cos 2 \pi \nu (ct - d_1)$$

$$Y_2 = a \cos 2 \pi \nu (ct - d_2)$$

La vibration résultant de l'interférence des deux faisceaux pourra s'écrire :

$$Y = Y_1 + Y_2 = 2 a \cos \pi \nu (d_2 - d_1) \cos 2 \pi \nu \left[ ct - \frac{d_2 + d_1}{2} \right]$$

et son amplitude indépendante du temps  $A = 2 a \cos \pi \nu x$  (avec  $x = d_2 - d_1$  différence de marche entre les deux faisceaux).

Le flux de la radiation reçue par le détecteur est mesuré par le carré de l'amplitude

$$F(x) = 4 a^2 \cos^2 \pi \bar{\nu} x \quad \text{avec } 4 a^2 \text{ est la brillance } B(\bar{\nu}) \text{ de la source } F(x) = B(\bar{\nu}) \cos^2 \pi \bar{\nu} x$$

Source polychromatique

Un élément spectral d'onde moyen  $\bar{\nu}$  de largeur  $d\bar{\nu}$  donnera une contribution au flux

$$dF(x) = B(\bar{\nu}) \cos^2 \pi \bar{\nu} x d\bar{\nu}$$

l'interférogramme complet d'une source polychromatique s'obtiendra en intégrant sur tous les nombres d'onde :

$$F(x) = \int_0^{\infty} B(\bar{\nu}) \cos^2 \pi \bar{\nu} x d\bar{\nu}$$
$$F(x) = \frac{1}{2} \int_0^{\infty} B(\bar{\nu}) d\bar{\nu} + \frac{1}{2} \int_0^{\infty} B(\bar{\nu}) \cos 2 \pi \bar{\nu} x d\bar{\nu}$$

Le premier terme est indépendant de  $x$  et est la valeur moyenne de l'interférogramme

$$F(0) = \int_0^{\infty} B(\bar{\nu}) d\bar{\nu}$$

Le 2ème terme est égal à  $2 |F(x) - \frac{1}{2} F(0)|$

ceci montre qu'à  $F(0)$  près l'interférogramme mesuré  $F(x)$  est la transformée de FOURIER du spectre.

En effet les fonctions  $B(\bar{\nu})$  et  $F(x)$  sont des fonctions paires et la formule intégrale de FOURIER

$$\phi(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{2 \pi i t x} dt$$

devient

$$\phi(x) = 2 \int_0^{\infty} f(t) \cos 2 \pi t x dt$$

la formule de réciprocité donne :

$$f(t) = 2 \int_0^{\infty} \phi(x) \cos 2 \pi t x \, dx$$

le spectre peut être alors calculé d'après l'équation

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{\infty} \left[ F(x) - \frac{1}{2} F(0) \right] \cos 2 \pi \bar{\nu} x \, dx$$

Pour des raisons inhérentes à l'appareil, x différence de marche ne peut avoir un domaine de variation infini mais limité à la région (- L, + L)

On aura donc une valeur approchée du spectre B(\bar{\nu})

B'(\bar{\nu}) est la transformée de FOURIER des 2 fonctions F(x) et D(x) avec :

$$B'(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(x) D(x) \cos 2 \pi \bar{\nu} x \, dx$$

$$D(x) = 1 \quad -L < x < +L$$

$$D(x) = 0 \quad x > +L$$

et

$$x < -L$$

D(x) est donc une fonction de DIRAC

$$B'(\bar{\nu}) = \text{TF} |F(x)| \star \text{TF} |D(x)|$$

et le produit de convolution de deux fonctions est h(x) = f(x) \star g(x)

$$h(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(y) g(x-y) \, dy$$

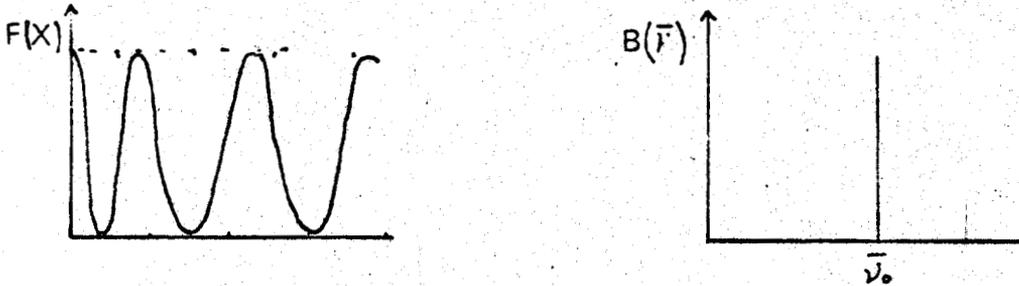
La transformée de FOURIER de F(x) est le spectre réel B(\bar{\nu}) et en calculant la TF de D(x)

$$B'(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} B(\bar{\nu}') f(\bar{\nu} - \bar{\nu}') \, d\bar{\nu}'$$

calculer  $B'(\bar{\nu})$  revient à intégrer une fonction nulle en tout point sauf pour  $\nu = \nu_0$ .

d'où  $B'(\bar{\nu}) = B(\bar{\nu}_0) \cdot f(\bar{\nu} - \bar{\nu}_0)$

on obtient ainsi une courbe ayant un maximum centré à  $\bar{\nu} = \bar{\nu}_0$ .



Si le spectre comprend beaucoup de raies, les oscillations situées de part et d'autre de chaque fréquence peuvent gêner l'interprétation du spectre. On les atténue par "l'apodisation" (on multiplie l'interférogramme par  $A(x)$  fonction d'apodisation

$$B''(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(x) A(x) \cos 2 \pi \bar{\nu} x dx$$

parmi les apodisations on a la fonction triangle :

$$A(x) = \frac{L - |x|}{L}; -L < x < +L$$

$$A(x) = 0 \quad \begin{array}{l} x > L \\ x < -L \end{array}$$

Le pouvoir de résolution est alors  $R = 2 L\bar{\nu}$

b - Mode opératoire.

Les échantillons de poly L-aspartique et d'acide poly L-glutamique solides (acide et sels de Na) ont été mélangés à 5 % à du polyéthylène très pur et comprimés pour former des pastilles.

Les spectres ont été enregistrés sur un "FOURIER Spectro 2000 CODERG" muni d'un calculateur digital à T.F., à deux températures 25°C et - 100°C. Le spectre a été déduit du polyéthylène (fig. 6).

c - Résultats et interprétation

Le tableau X indique les fréquences observées pour l'acide poly - L - aspartique (25°C et à - 100°C) et pour l'acide Poly L-glutamique

P-L-Asp H <sup>+</sup> 25°C	P-L-Asp Na 25°C	P-L-A p H <sup>+</sup> -100°C	P-L-Asp Na -100°C	PLGA H <sup>+</sup> -100°C	PLGA Na -100°C
195 Très large (h 3 <sub>1</sub> )	163 (F-large) (h 3 <sub>1</sub> )	163 TF (h 3 <sub>1</sub> )	163 M h 3 <sub>1</sub>	180 TF (αh)	145 F (R.C.)
230 f β //	195 (F-large) (h 3 <sub>1</sub> )	180-300 Forte ABS	263 TF (β //)	261 F (β //)	180 f (h)
Très forte ABS vers 300 cm <sup>-1</sup>	220 M β //				271 TF (β //)
	251 M β //				

F : intensité Forte, f faible, M moyenne.

h 3<sub>1</sub> : hélice 3<sub>1</sub> ; (αh) hélice α; (β //) chaîne β antiparallèle

Le tableau suivant XI donne les valeurs trouvées pour la Poly-L-alanine par SCHOTTS et SIEVERS (14) ainsi que pour la PG II (15)

polypeptide	hélice	forme β	hélice 3 <sub>1</sub>
P-L-Alanine	90		
	120	250	
	370	440	
PG II			104 (A <sub>2</sub> )
			158 (E)
			200 (E)
			365 (C-N)

TABLEAU XI

Fréquences (cm<sup>-1</sup>) et attributions en infra rouge lointain pour quelques polypeptides (voir aussi le tableau VI.)



Nous nous sommes surtout servi de l'acide poly L-glutamique (fig. 8) pour attribuer nos pics. Sous sa forme salifiée solide, KEITH, PADDE et G. GIANNONI (16) ont montré par rayons X que l'acide Poly glutamique contenait une forte proportion de forme  $\beta$  antiparallèles formant un système monoclinique. La bande à  $271 \text{ cm}^{-1}$  semble correspondre à cette forme. Sous forme sel de sodium deux bandes apparaissent aussi, une d'intensité moyenne à  $145 \text{ cm}^{-1}$  (attribuée à la Random Coil) et une faible à  $180 \text{ cm}^{-1}$  (attribuée à une "hélice  $\alpha$ ") (17) (tableau IV  $185 \text{ cm}^{-1}$ ). Cette dernière augmente considérablement en intensité lorsqu'on passe au solide sous sa forme protonée ( $\alpha$  hélice) alors que la bande à  $145 \text{ cm}^{-1}$  a complètement disparu. La bande à  $271 \text{ cm}^{-1}$  s'est déplacée à  $261 \text{ cm}^{-1}$  (forme  $\beta$ ) compatible avec les observations en rayons X de ITOH, FOXMAN et FASMAN (9) (tableau VI et réf 17).

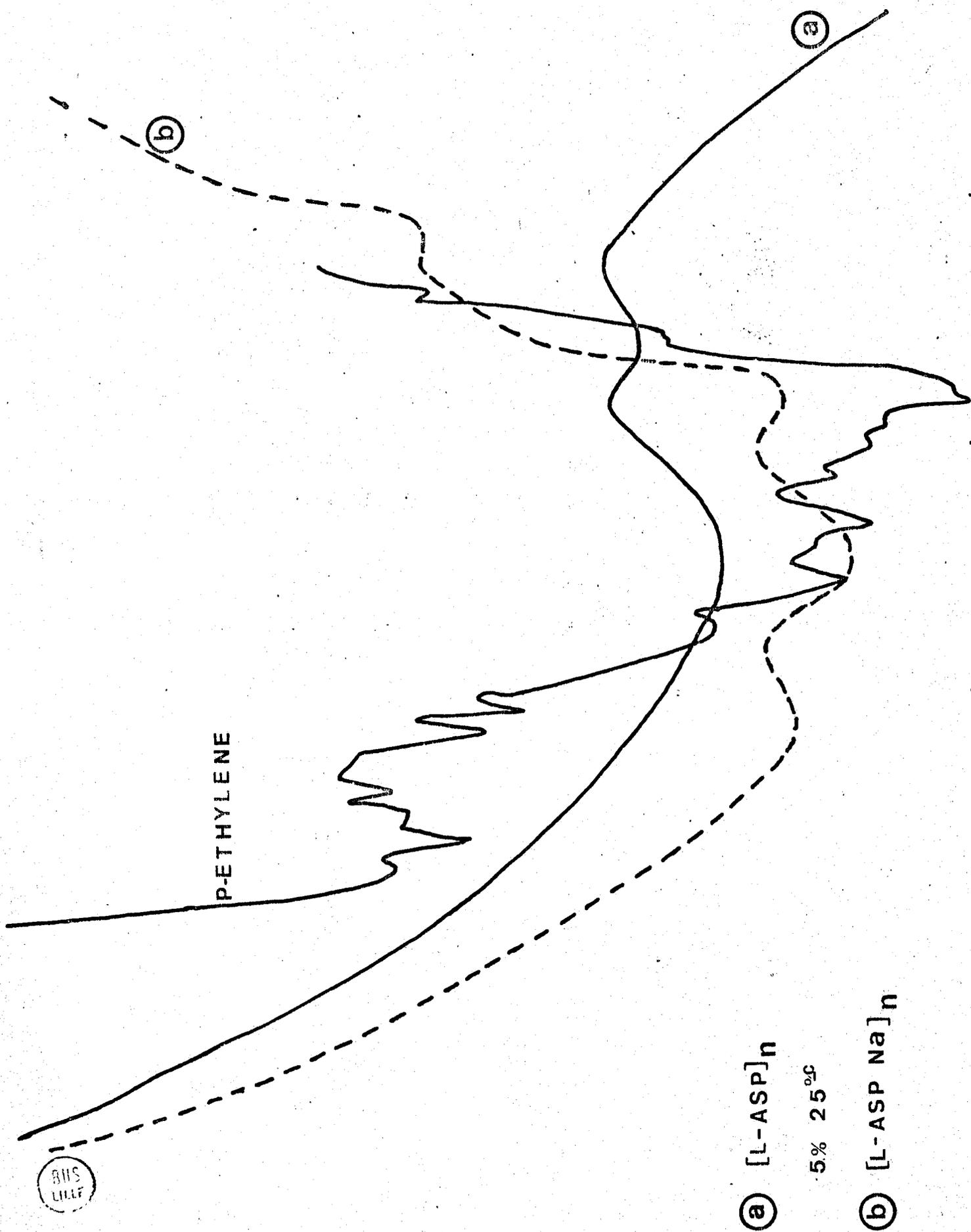
A  $25^\circ\text{C}$  (fig. 6), le Poly-L-aspartate de sodium montre 2 bandes de forte intensité à  $163 \text{ cm}^{-1}$  et  $195 \text{ cm}^{-1}$  caractéristiques d'une structure proche d'une hélice  $3_1$ , comme celle rapportée pour la polyglycine II par MIYAZAWA (15).

La bande à  $163 \text{ cm}^{-1}$  (mode E) reste intense à  $-100^\circ\text{C}$  (fig 7) et celle à  $195 \text{ cm}^{-1}$  disparaît à cette température.

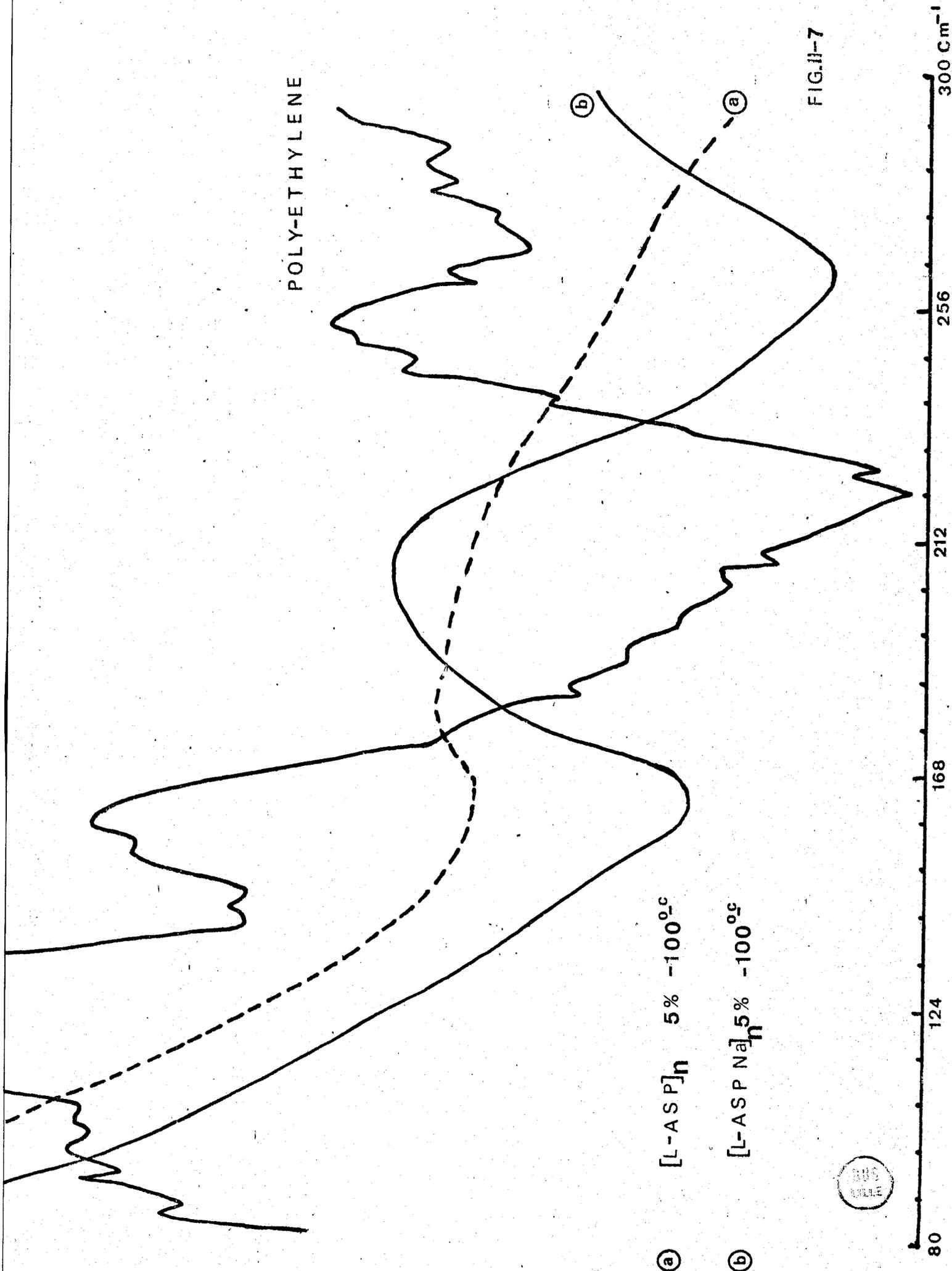
Les bandes observées entre  $200$  et  $250 \text{ cm}^{-1}$  ont été attribuées à des formes  $\beta$ , les deux bandes à  $220 \text{ cm}^{-1}$  (forte) et  $230 \text{ cm}^{-1}$  (faible) pouvant être des formes  $\beta$  parallèles alors que la bande à  $251 \text{ cm}^{-1}$  est une bande due à la forme  $\beta$  antiparallèle (observée par rayons X et Raman).

Pour le poly aspartate de sodium à  $-100^\circ\text{C}$  la bande due à la forme  $\beta$  antiparallèle a été déplacée à  $263 \text{ cm}^{-1}$  ( $251 \text{ cm}^{-1}$  à  $25^\circ\text{C}$ ) montrant une dépendance très nette du mode de vibration avec la température. De plus la structure trouvée proche d'une hélice étendue  $3_1$  semble être stabilisée en augmentant la température. La structure désordonnée reste cependant invisible à  $145 \text{ cm}^{-1}$  pour l'acide poly- $\alpha$ -L-aspartique, cependant les fortes absorptions des bandes voisines peuvent cacher cette structure.

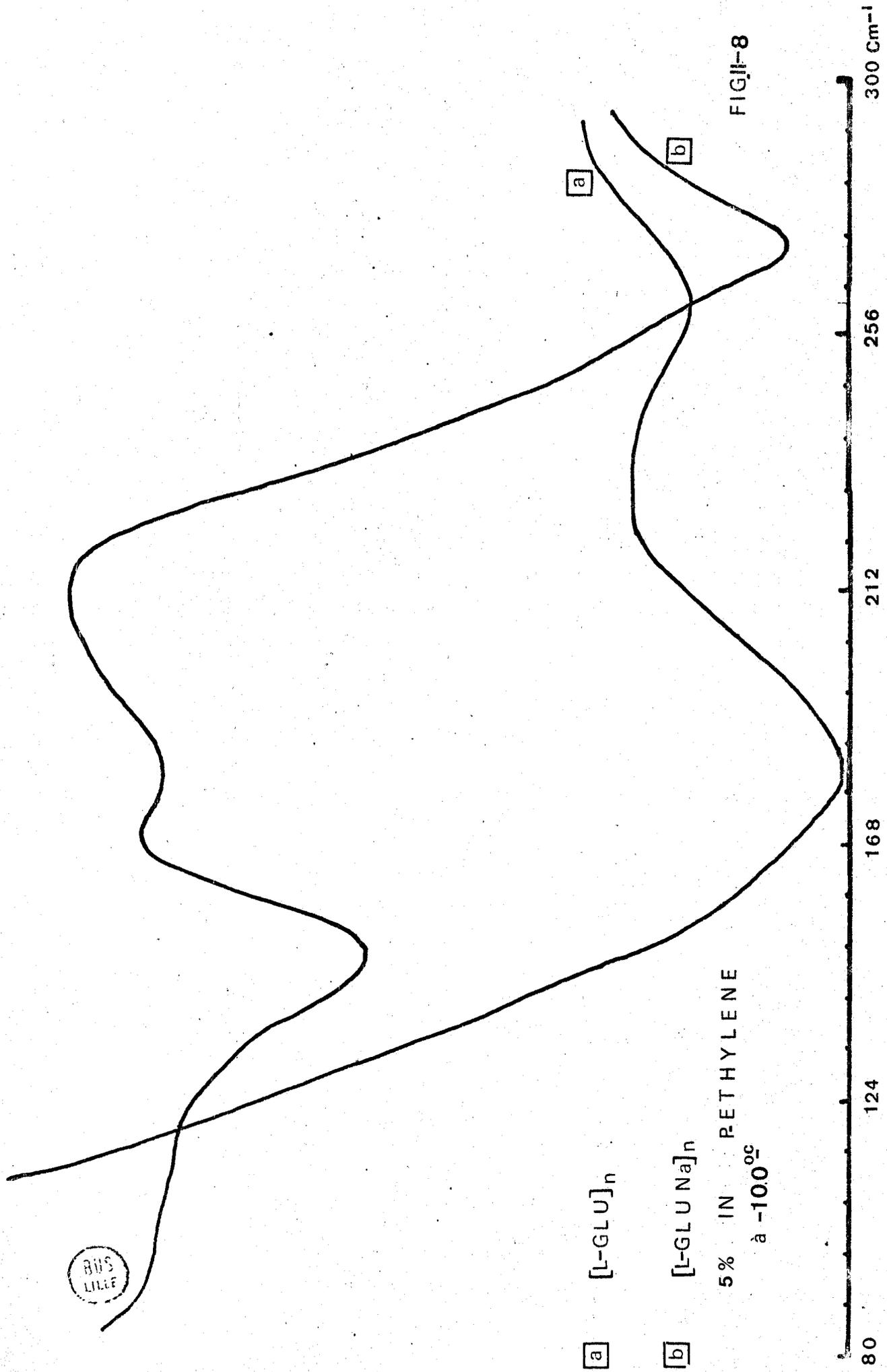
FIG II-6



POLY-ETHYLENE



BUS  
LILLE



**a** [L-GLU]<sub>n</sub>

**b** [L-GLU Na]<sub>n</sub>

5% IN PETHYLENE  
à -100°C

FIGII-8

80 124 168 212 256 300 Cm<sup>-1</sup>

c - Conclusion de l'étude infra-rouge.

L'infra-rouge fondamental et lointain nous ont permis de révéler une structure relativement complexe de l'acide poly L Aspartique à savoir : en milieu basique, présence de formes antiparallèles, de chaîne non ordonnée et d'hélice étendue proche d'une hélice  $3_1$ . En pH acide, les formes  $\beta$  conservent leur réseau cristallin mais leurs paramètres varient (Etude RX), la chaîne statistique quant à elle se transforme en hélice  $\alpha$  ( $1655 \text{ cm}^{-1}$ ) ; le fait qu'une des deux bandes à  $163 \text{ cm}^{-1}$  disparaisse en abaissant le pH de la solution semble montrer que l'on a une transformation en hélice  $\alpha$  de l'hélice étendue. Nous montrerons effectivement en Résonance magnétique nucléaire et en dichroïsme circulaire que l'hélice  $\alpha$  provient de ces deux formes.

CHAPITRE III

ETUDES EN SPECTROSCOPIE RAMAN

## CHAPITRE III

### ETUDE DE L'ACIDE POLY $\alpha$ L ASPARTIQUE EN SPECTROSCOPIE RAMAN.

#### A - Introduction

- a - Introduction
- b - Mode opératoire

#### B - Résultats

- a - Spectres Raman sur l'état solide
- b - Spectres Raman en solution aqueuse
  - dans H<sub>2</sub>O
  - dans l'eau lourde

#### C - Conclusions

- D - Calculs des fréquences par la méthode des perturbations.

## A - INTRODUCTION - MODE OPERATOIRE

Nous avons tenté de suivre les transitions conformationnelles dans l'eau, l'oxyde de deutérium et à l'état solide de l'acide poly  $\alpha$ -L-Aspartique. La spectrométrie Raman se prête fort bien à l'analyse des différentes structures conformationnelles des polypeptides. L'étude des bandes amide I ( $H_2O$ ) et I' ( $D_2O$ ) ainsi que celle des bandes amide III et III' (1) a été effectuée par de nombreux chercheurs en particulier KOENIG et FRUSHOUR (2) (6) sur les polypeptides.

De plus le Raman est une technique d'étude aussi bien adaptée en milieu solide qu'en solution alors que peu de techniques (R.X. ou D.C.) permettent une étude aussi complète.

Des traitements théoriques des interactions de résonance de la vibration amide I ont été effectués par une approximation dipole - dipole sur la base de la théorie des perturbations (14), (15), (16), nous y reviendrons en fin de chapitre.

### Mode opératoire

Nous avons employé un spectromètre Raman CODERG 800 et comme source lumineuse un laser à Argon à une longueur d'onde de  $5145 \text{ \AA}$  ; la puissance utilisée a été de 400 - 600 mW à  $25^\circ\text{C}$ .

Les échantillons employés proviennent de l'acide poly-L-Aspartique de  $\bar{M}_n$  7000 obtenus par la méthode des N-carboxy anhydrides. Chaque échantillon a été laissé en solution basique une semaine en présence de charbon actif, ou d'abord lavés par Soxhlet à l'éther et à l'acétone puis laissés sur charbon actif afin de diminuer en grande partie la fluorescence.

Les échantillons ont été lyophilisés dans  $H_2O$  ou  $D_2O$  avant de servir en solution dans ces solvants.

Les formes solides ont été lyophilisés dans l'eau.

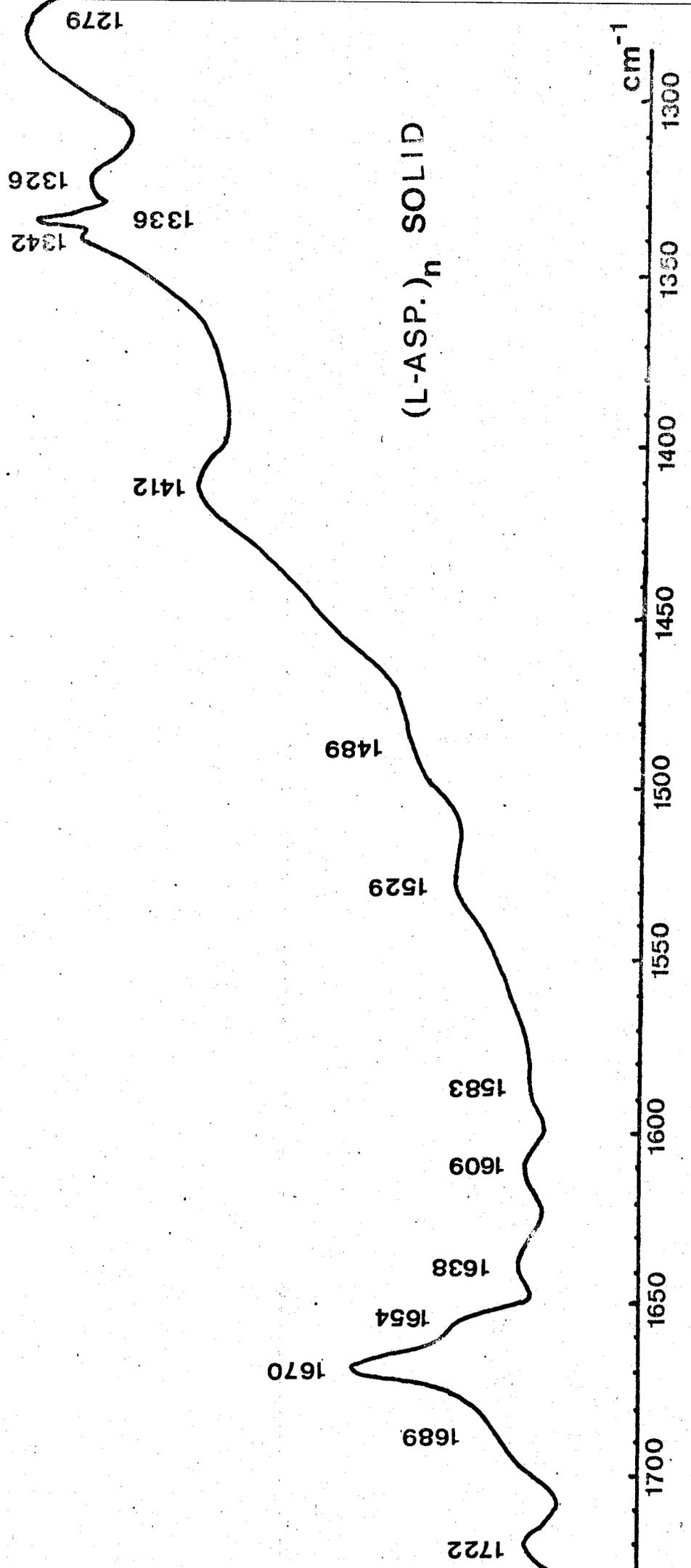


FIG III-1



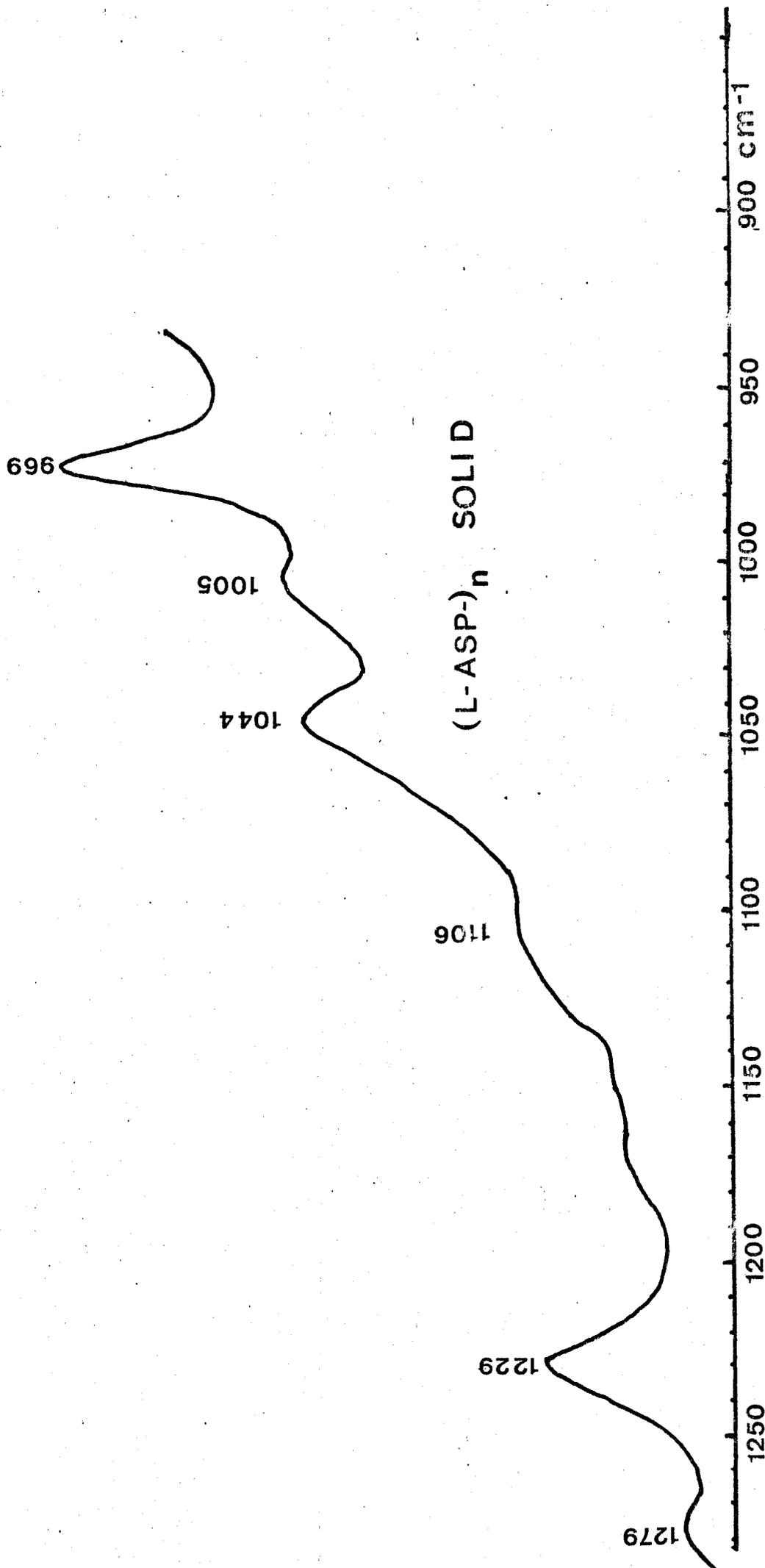


FIG III- 1



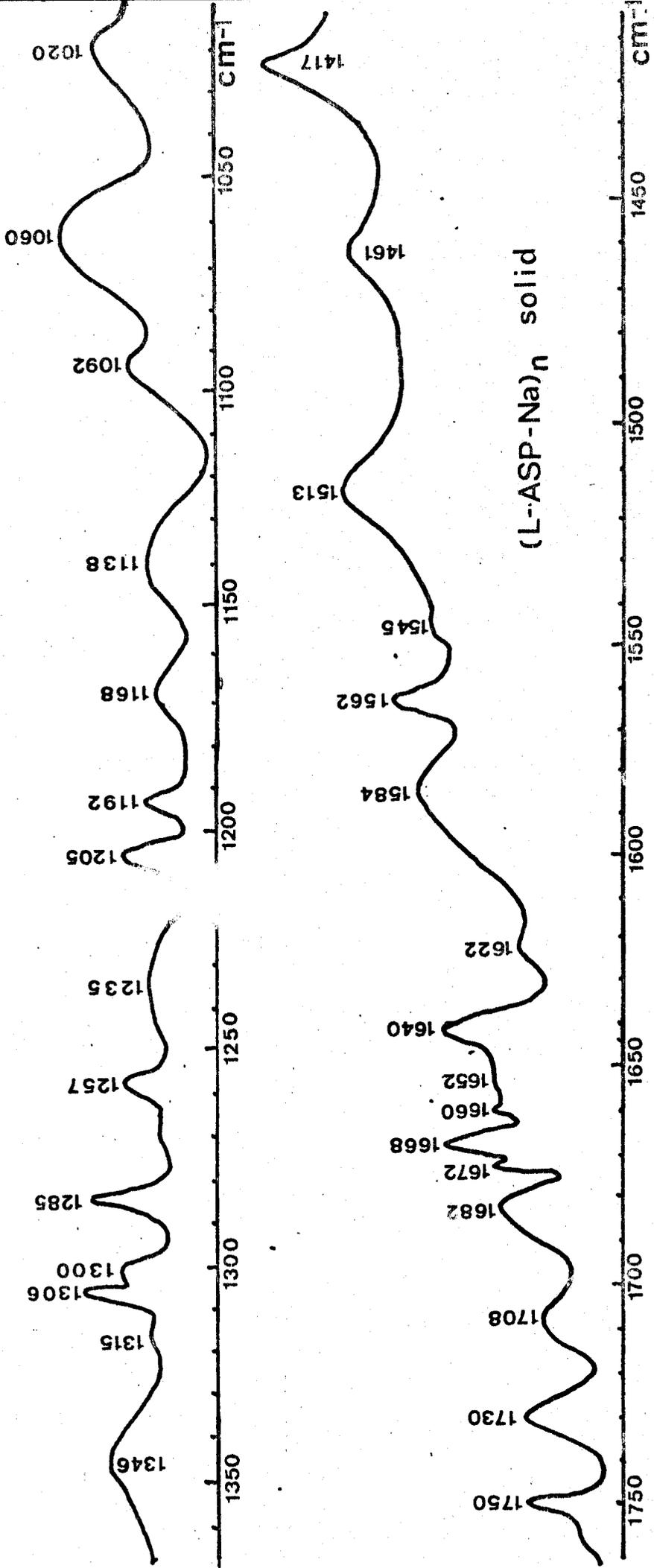


FIG III-2



## B - RESULTATS.

Dans le tableau I, les bandes Raman en solutions aqueuses ( $H_2O$ ) et ( $D_2O$ ) sont rapportées.

### a - Spectres Raman à l'état solide.

Sous sa forme acide solide (fig. 1), le P-L-Aspartique montre une bande amide plutôt compliquée avec des bandes plus ou moins larges à 1670, 1654 et 1638  $cm^{-1}$ . La première de ces bandes (1670  $cm^{-1}$ ) a été attribuée à une structure  $\beta$  antiparallèle ( $\beta //$ ) ainsi que l'on peut le voir également dans les spectres de la poly-L-Lysine (2), (4). La seconde bande à 1654  $cm^{-1}$  est caractéristique d'une chaîne non ordonnée (R.C.) et la troisième a été attribuée à la forme en hélice  $\alpha$  (1650  $cm^{-1}$  en I.R. sous la forme solide).

La bande à 1689  $cm^{-1}$  (1682  $cm^{-1}$  pour le sel de sodium) indique la présence d'un groupement C = O non hydraté et celle à 1722  $cm^{-1}$  est due à la vibration (C=O)st du groupement COOH. Une petite quantité de groupements carboxyliques ionisés ( $COO^-$ ) demeure comme l'indique la bande à 1587  $cm^{-1}$ . De plus la bande très faible à 1609  $cm^{-1}$  (et 1005-1002  $cm^{-1}$ ) peut être attribuée à des cycles benzéniques restants (< 0,5 % : détermination par U.V. à 260  $m\mu$ ).

La bande amide III est identifiée à 1229  $cm^{-1}$  avec une forte intensité et un profil effilé (1410  $cm^{-1}$  en I.R.).

Ces bandes sont toutefois déplacées dans la forme ionisée solide (fig. 2). Les bandes à 1672 - 1668  $cm^{-1}$  (1690 - 1672  $cm^{-1}$  en I.R.) proviennent des formes  $\beta$  antiparallèles et une forte bande survient à 1640  $cm^{-1}$ .

Cependant la bande amide III vers 1235  $cm^{-1}$  ( $\beta //$ ) (1) devient très large et une autre bande apparaît à 1257  $cm^{-1}$  que l'on assimile à la partie inordonnée (R. Coil) (1) du polymère.

Une autre bande fine est détectable à 1285  $cm^{-1}$  (à 1279  $cm^{-1}$  et faible pour la forme acide ; 1283  $cm^{-1}$  pour une



Fréquences (cm<sup>-1</sup>) et attributions des bandes Raman pour l'acide poly α-L-Aspartique

T.F. (très forte), F (forte), M (moyenne), f (faible), t.f. (très faible), S (fine), br (étalée)  
 E (épaulement), L (large), δ (mode de déformation), γ<sub>t</sub> (vibration de torsion), γ<sub>w</sub> (vibration de balancement), γ<sub>r</sub> (rotation dans le plan), ν (vibration de valence), ν<sub>a</sub> (antisymétrique), ν<sub>s</sub> (symétrique), P (bande polarisée).

(L-Asp Na) <sub>n</sub> H <sub>2</sub> O 10 % pH 10	(L-Asp) <sub>n</sub> H <sub>2</sub> O 10 % pH 4,7	(L-Asp) <sub>n</sub> solide	(L-Asp Na) <sub>n</sub> solide	(L-Asp Na) <sub>n</sub> D <sub>2</sub> O 20 % pH 11	(L-Asp Na) <sub>n</sub> D <sub>2</sub> O 20 % pH 7,4	(L-Asp) <sub>n</sub> D <sub>2</sub> O pH 4,3	Attributions
					2979 F 2959 f 2938 M,S		ν (C-H) <sub>a</sub>
	1722 f 1701 TF,P 1689 E	1722 F 1689 M	1755 M 1730 M 1710 M 1708 f			1710 M	ν (C=O)
1680 M 1666 M 1660 M 1644 M(H <sub>2</sub> O) 1621 f	1677 F 1670 F 1655 M 1635 F,P 1613	1670 F,S 1654 br 1638 f,br	1682 M 1672 f 1668 1652 M 1640 F	1672 M   1653 M 1640 F	1672 M   1653 M 1638 M 1621 f	1670 F   1658 F 1645 M	Am I + δ (H <sub>2</sub> O)
1592 f	1553 f	1587 f	1584 F 1562 f 1545 f	1569 f	1569 f	1589 f	ν (COO <sup>-</sup> ) <sub>a</sub>
1524 f	1529 f	1513 M 1489 f					Am II
				1479 f	1471 tf	1471 TF	NH + ND
1449 f			1461 M	1447 br		1454 F	δ (CH <sub>2</sub> ) bending
1419 F,E 1404 TF	1427 F,P	1412 F	1417 F 1405 f	1421 F 1403 T.F	1421 M 1403 TF	1421 M 1407 M	δ (CH) ν (COO <sup>-</sup> ) <sub>s</sub>
1338 f	1363 F	1342 f 1336 f	1346 f	1346 f		1358 f 1346	γ <sub>w</sub> (CH <sub>2</sub> )
1321 M		1326 f	1315 f	1321 M	1321 M	1324 M	γ <sub>t</sub> (CH <sub>2</sub> )
1276 f	1276 f	1279 f	1306 f 1300 f 1285 M 1257	1259 f		1254 M	

TABEAU I.

(L-Asp Na) <sup>n</sup> H <sub>2</sub> O 10 % pH 10	(L-Asp) <sup>n</sup> H <sub>2</sub> O 10 % pH 4,7	(L-Asp) <sup>n</sup> solide	(L-Asp Na) <sup>n</sup> solide	(L-Asp Na) <sup>n</sup> D <sub>2</sub> O 20 % pH 11	(L-Asp Na) <sup>n</sup> D <sub>2</sub> O 20 % pH 7,4	(L-Asp) <sup>n</sup> D <sub>2</sub> O pH 4,3	Attributions
1250 M 1242 M,br	1250 M 1242 F,P	1229 F	1235 M,br				Am III
1205 M	1189 f	1169 f 1150 f	1205 M 1192 f 1168 br	1209 M 1201 M	1202 f	1209 F,br	
1085 1076 S	1102 f 1076 FSP		1138 f 1092 M	1136 tf 1086 tf	1133 f 1124 f	1088 f	$\nu$ (C-N) term.
1068 S	1033	1044 F	1060 M,br	1067 f	1067 f		$\nu$ (C-C)
1021 M			1020 M	1013 M	1021 M 1010 f		Am III
981 F,br	1002 L 981 f	1004 f 969 F,S	1005 f	1003 f	1001 tf	1002 f	$\nu$ (C-C) aromatique
935 F	941 M,P			970 M,Br	983 f	965 T.F	$\nu$ (C-C) + $\nu$ (C-C-N)
898 M 836 f	879 F,S 822 E			937 T.F	938 F	938 F,E	$\nu$ (C-C)
				889 f 819 f	897 f	889 f	$\gamma_r$ (CH <sub>2</sub> )

TABLEAU II (mêmes notations que le tableau I)



structure hélicoïdale  $3_1$  de type PG II). Dans les deux formes (acide ou sel de sodium) la région Amide pour la chaîne non ordonnée ( $1654 \text{ cm}^{-1}$  forme acide,  $1652 \text{ cm}^{-1}$  forme basique) est compatible avec celle trouvée pour le poly L glutamique ( $1656 \text{ cm}^{-1}$ ) et poly L-glutamate de sodium ( $1649 \text{ cm}^{-1}$ ) d'après KOENIG et FRUSHOUR (2).

Un autre point d'intérêt est la présence dans (P-L-Asp Na) de plusieurs bandes entre  $1755 \text{ cm}^{-1}$  et  $1708 \text{ cm}^{-1}$  (région  $\nu(\text{C}=\text{O})_{\text{st}}$ ). Les échantillons ayant été plusieurs fois dialysés, il apparaît peu probable que des oligomères aient été la cause de l'apparition de ces pics. La présence de la bande à  $1640 \text{ cm}^{-1}$  dans la forme sel de sodium a été attribuée à la vibration  $\beta_2(\pi, 0)$  de la bande amide I ( $\beta//$ ) comme nous le verrons dans le calcul des fréquences par la méthode des perturbations.

#### b - Spectres Raman en solutions aqueuses.

Avec les solutions aqueuses (10 % en poids de P-L-Aspartique dans  $\text{H}_2\text{O}$ ) peu de changements interviennent dans la nature des bandes amide I (fig. 3), ces dernières étant toutefois obscurcies par l'eau ( $1644 \text{ cm}^{-1}$ ). En solution basique (pH 10 (fig. 4)), les bandes à  $1680 \text{ cm}^{-1}$  -  $1666 \text{ cm}^{-1}$  se déplacent à  $1677$  et  $1670 \text{ cm}^{-1}$  lorsqu'on abaisse le pH à 4,7 (fig. 4) montrant la présence de formes  $\beta$  antiparallèles (à pH basique et acide). (Pour des formes  $\beta$  parallèles comme la polyglycine I (9) les bandes amide I' se situent à  $1665$  et  $1674 \text{ cm}^{-1}$  et pour la  $\beta$  L Valine à  $1666 \text{ cm}^{-1}$ ).

La partie chaîne non ordonnée se déplace de  $1660 \text{ cm}^{-1}$  à  $1655 \text{ cm}^{-1}$  lorsqu'on passe de pH 10 à pH 4,7 ( $1656 \text{ cm}^{-1}$  pour PGA Na (2),  $1660 \text{ cm}^{-1}$  pour la poly L Lysine, HCl (3) et  $1658 \text{ cm}^{-1}$  pour la kératine de la plume (7)). En pH acide, une nouvelle bande apparaît à  $1635 \text{ cm}^{-1}$  (fortement polarisée). Nous avons attribué cette bande à l'hélice  $\alpha$ .

La faible bande à  $1613 \text{ cm}^{-1}$  (pH acide) peut être due à des cycles benzéniques résiduels ainsi que la bande à  $1621 \text{ cm}^{-1}$

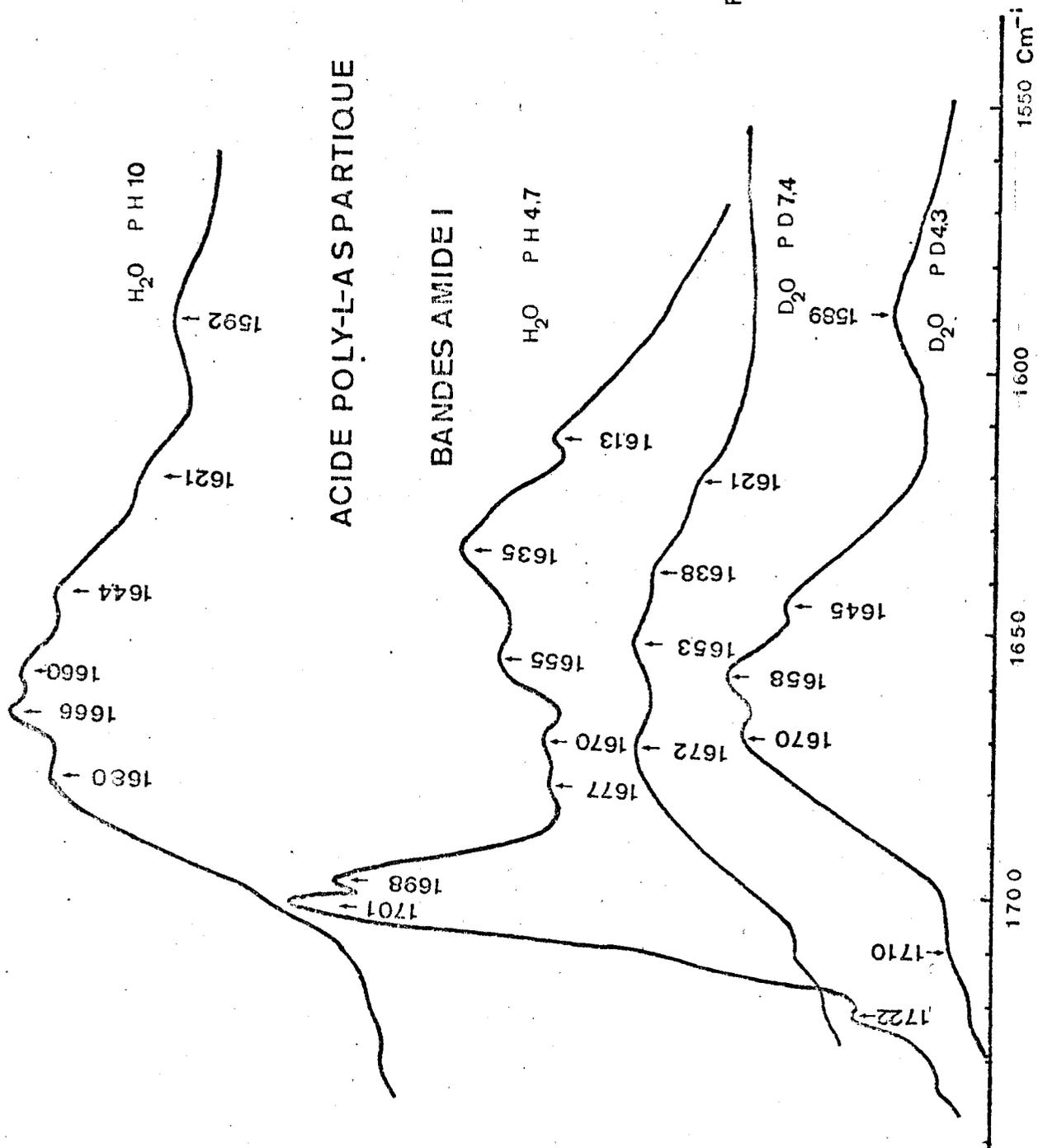


FIGURE 3



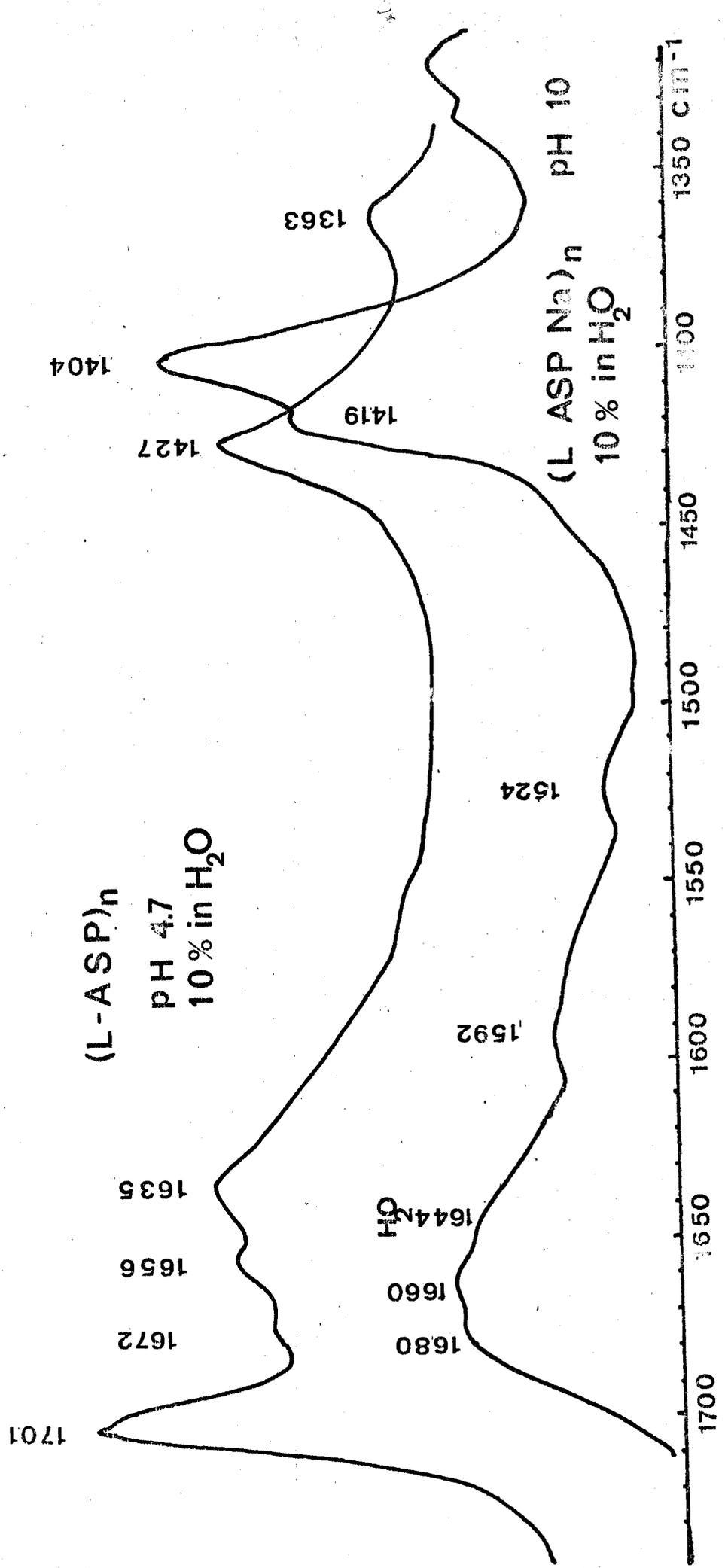


FIG III-4

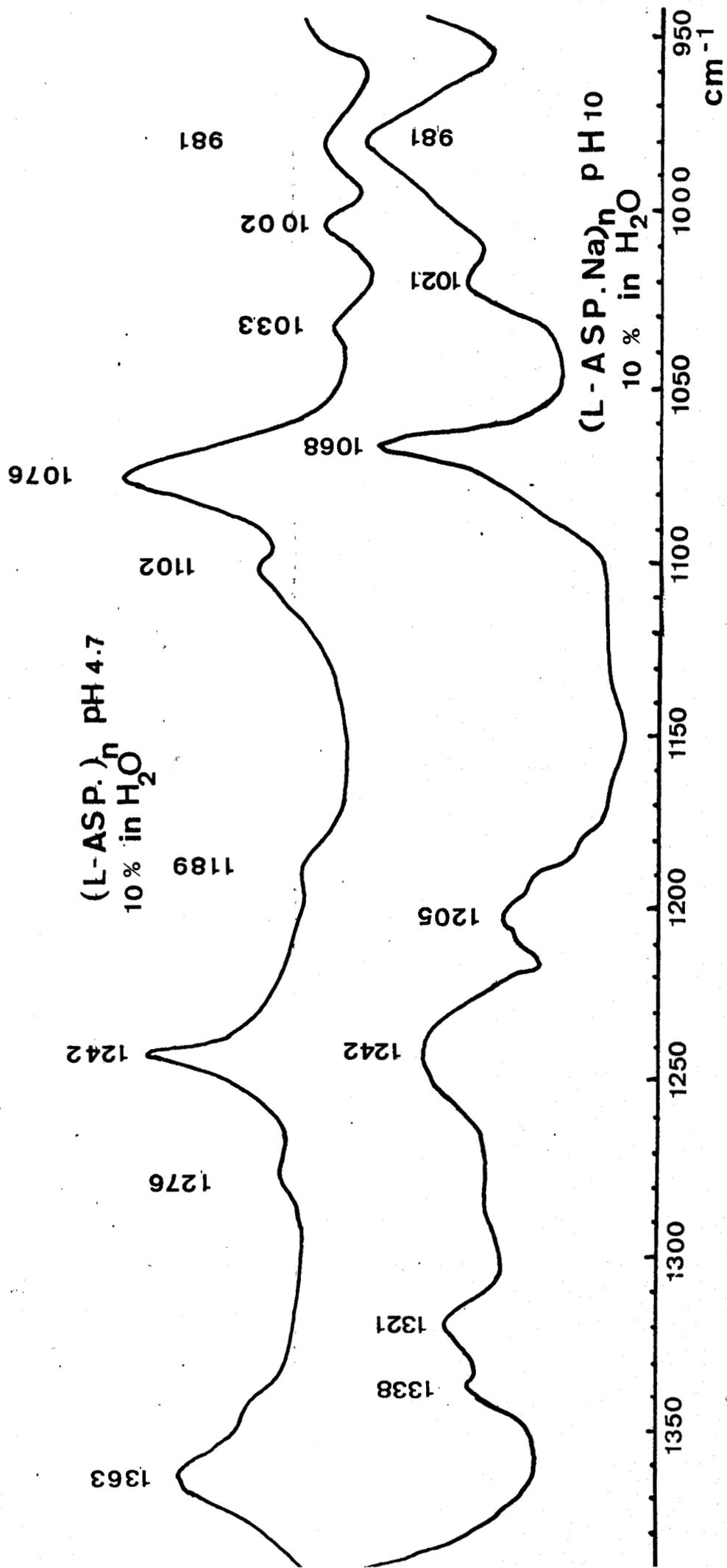


FIG III-4

à pH 10. Cependant les calculs des coefficients d'interaction montreront que ces bandes peuvent être dues à la vibration A(0,0) de la forme  $\beta_2$  antiparallèle.

Durant la transition Random Coil - hélice  $\alpha$ , les bandes amide III ne se déplacent pas mais un grand effet hypochromique survient à  $1250 \text{ cm}^{-1}$  (chaîne non ordonnée) ( $1249 \text{ cm}^{-1}$  pour PLGA (8) ). Cependant la bande à  $1242 \text{ cm}^{-1}$  reste constante en intensité à tout pH et est compatible avec une forme  $\beta$  ( $1240 \text{ cm}^{-1}$  pour la Poly L Lysine (3) ). Une autre bande observée à  $1276 \text{ cm}^{-1}$  ne se déplace pas en abaissant le pH ( $1285 \text{ cm}^{-1}$  (forte dans le PLANA solide) et peut être attribuée à la bande amide III d'une structure proche d'une hélice  $3_1$  (PG II) (9) ). Ces bandes sont déplacées à  $1013$  et  $1010 \text{ cm}^{-1}$  par N-deutération.

Un autre pôle d'intérêt est l'étude de la bande de forte intensité à  $935 \text{ cm}^{-1}$  à pH 11 qui est remplacée par une bande à  $941 \text{ cm}^{-1}$  à pH acide. Cette bande correspond au mode stretching  $\nu(\text{C-C})_S$  du squelette (C-C-N) ( $938 \text{ cm}^{-1}$  pour PLGA Na solide et  $949 \text{ cm}^{-1}$  pour PLGA Na en solution aqueuse (2) ). La bande à  $941 \text{ cm}^{-1}$  a été attribuée à la vibration du squelette peptidique ayant l'hélice  $\alpha$  pour structure secondaire.

### Spectres Raman dans l'oxyde de Deutérium ( $\text{D}_2\text{O}$ )

L'eau lourde est un excellent solvant pour l'étude des bandes Amide I. Par la nature même de la vibration amide I (fig. 3) cette dernière est peu déplacée en fréquence par N-deutération alors que la bande Amide III subit un fort déplacement par deutération. Les spectres ont été enregistrés avec une concentration de 20 % en poids.

Dans  $\text{D}_2\text{O}$  à pH 7,4 (fig. 6) les bandes (C-H)st possèdent une forte intensité à  $2979 \text{ cm}^{-1}$  (épaulement) et  $2938 \text{ cm}^{-1}$  (très forte) ainsi qu'une faible bande à  $2959 \text{ cm}^{-1}$ . Ces bandes sont typiques d'une structure PG II N deutéré.

La bande amide I' à pH basique (fig. 5) montre trois bandes distinctes à  $1672$ ,  $1653$  et  $1638 \text{ cm}^{-1}$ . La première bande

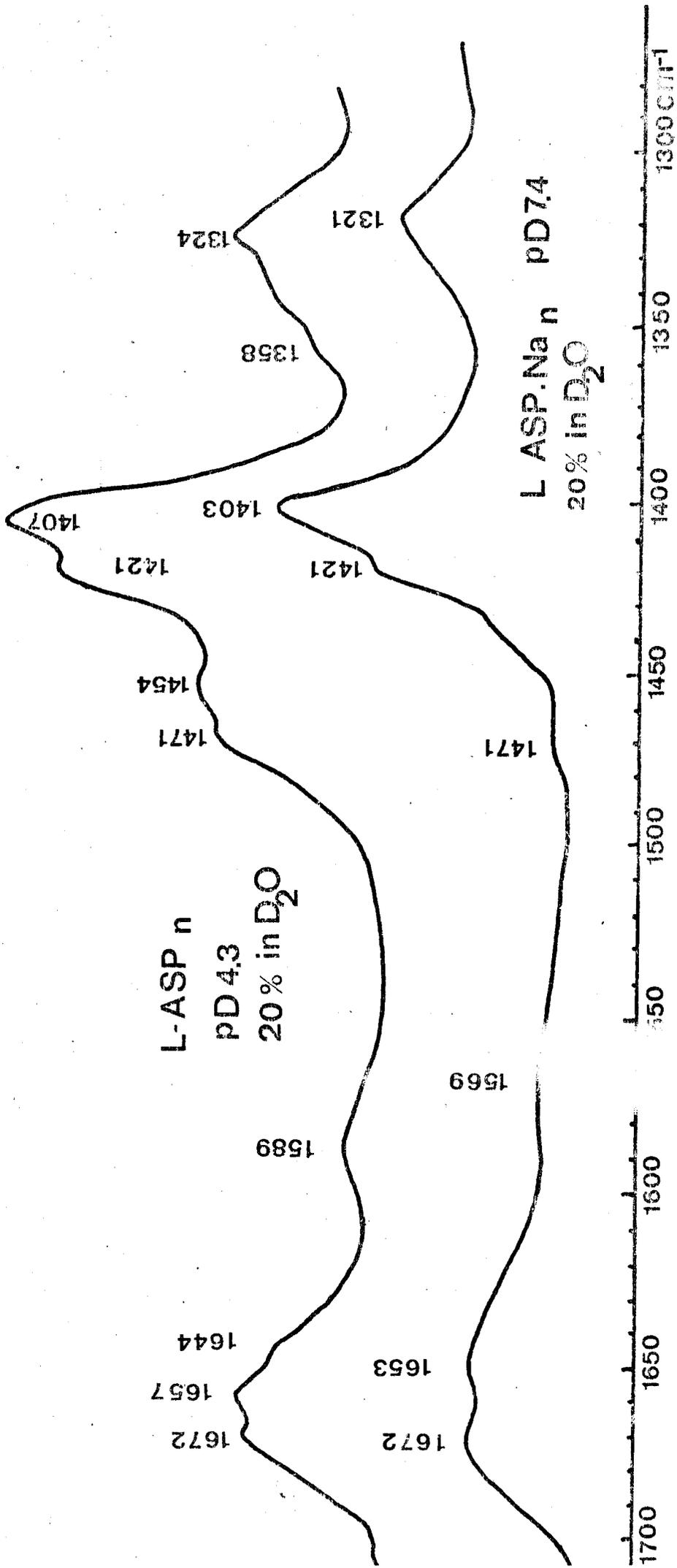


FIG III-5

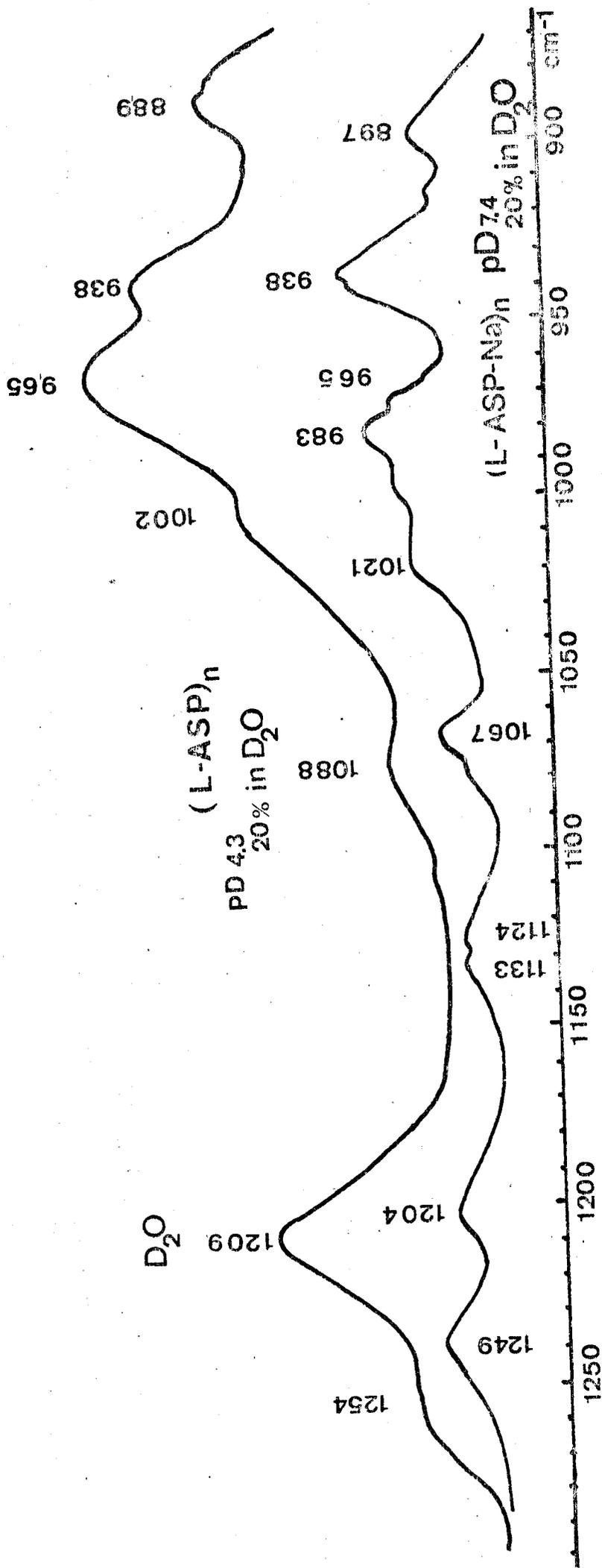
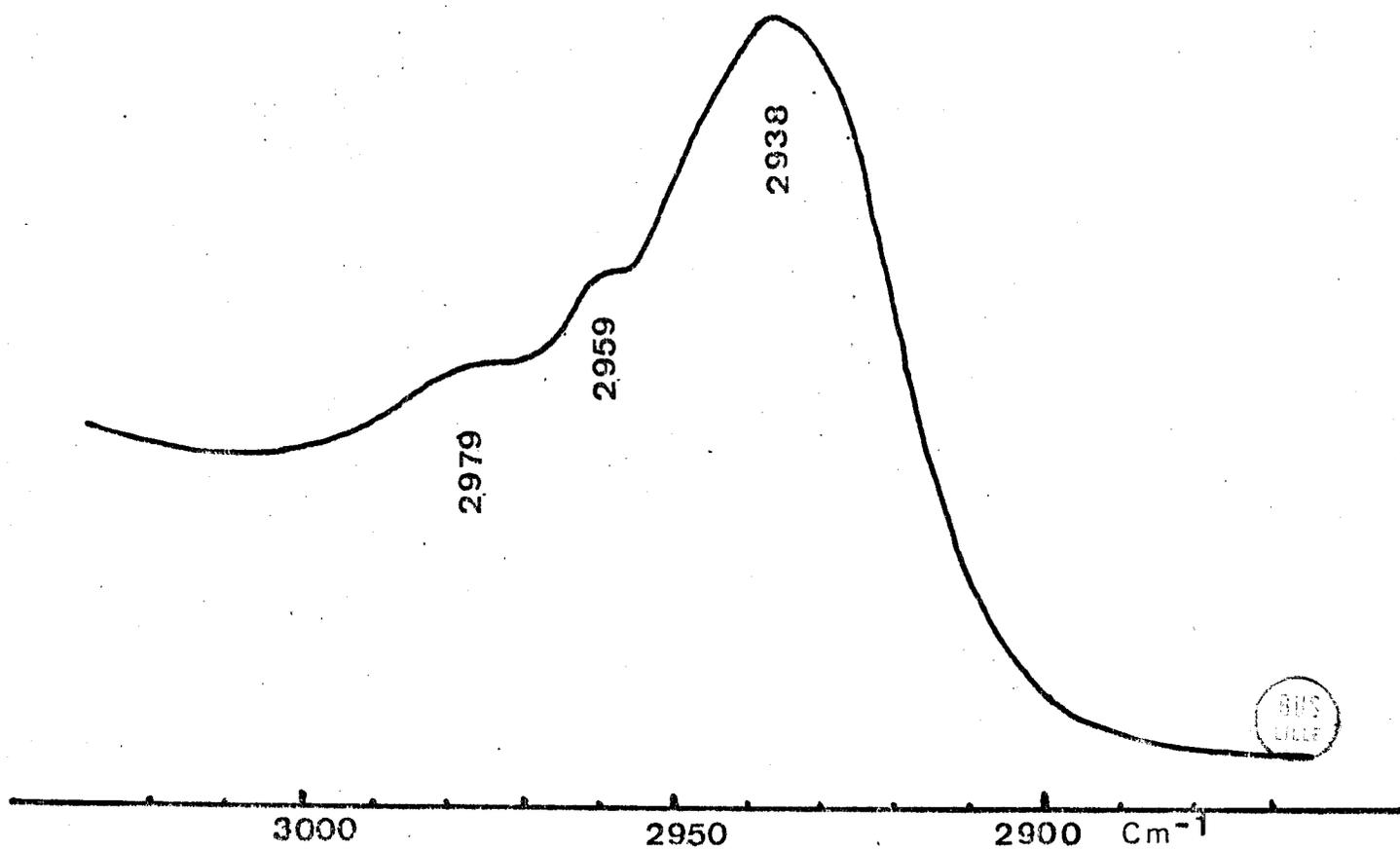


FIG III-5

(L-ASP-Na)<sub>n</sub>  
20 % in D<sub>2</sub>O

pD 7.4



FIGIII - 6

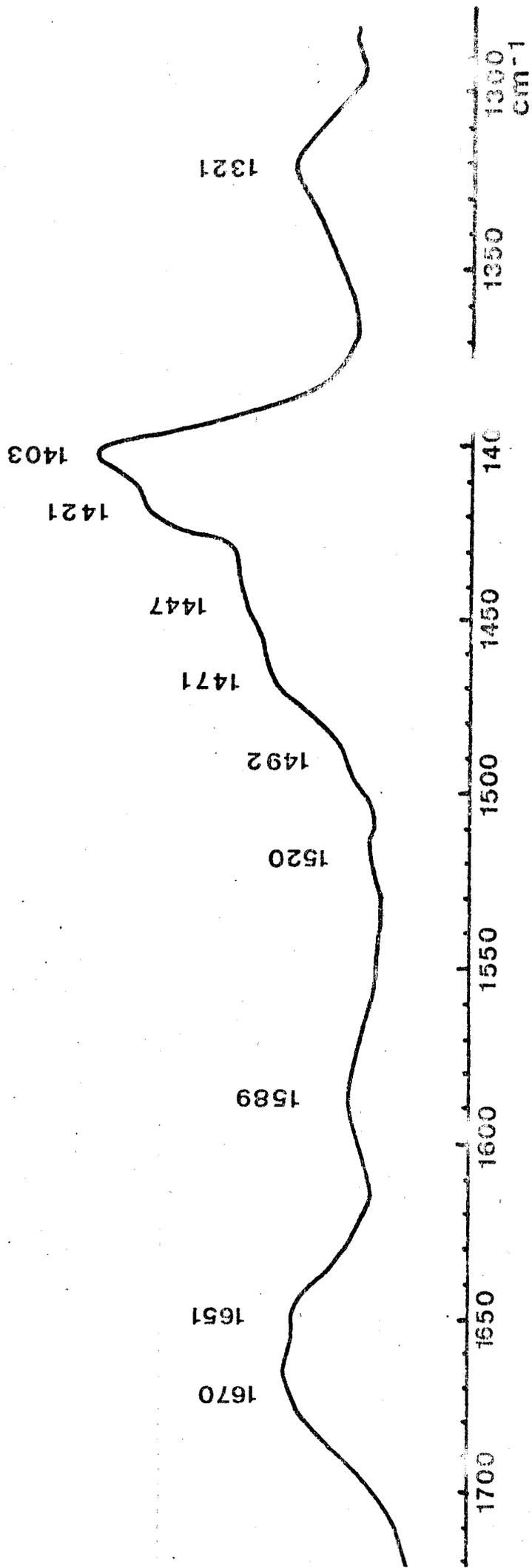
est surprenante, en effet les feuilletts plissés antiparallèles ( $\beta$  ~~//~~) devant être déplacés vers  $1658 \text{ cm}^{-1}$ , par N-deutération ( $1658 \text{ cm}^{-1}$  pour la P-L-Lysine (3) ) restent et sont déplacés à  $1670 \text{ cm}^{-1}$  en abaissant le pH.

L'étude en rayons X suggère (à l'état solide sous forme sodium) qu'une structure très compacte intervient comme pour le PLGA (forme  $\beta_2$  antiparallèle obtenue par précipitation (12) ) où les chaînes  $\beta$ -antiparallèles forment une structure monoclinique. Aucune solvatation n'apparaît dans cette structure comme on le verra lors de l'étude en Infra-Rouge proche.

En pH acide (fig. 5) cette structure  $\beta_2$  antiparallèle ( $\beta_2$  ~~//~~) se transforme en une structure  $\beta_1$  antiparallèle ( $\beta_1$  ~~//~~) dont les plans  $d_{001}$  s'écartent et permettent la solvatation des groupements carboxyliques. En fait la bande à  $1658 \text{ cm}^{-1}$  à pH 4,3 peut être due au groupe amide solvaté de la forme  $\beta_1$  ~~//~~ à pH 7,4.

La bande à  $1655 \text{ cm}^{-1}$  est attribuée à une conformation Random Coil tandis que la bande à  $1638 \text{ cm}^{-1}$  est comparable à la bande amide I' d'une structure PG II N deutérée (9) ( $1640 \text{ cm}^{-1}$ ). Cette bande disparaît par protonation (pH 4,3) et une bande à  $1645 \text{ cm}^{-1}$  apparaît et que nous avons attribuée à une hélice  $\alpha$ .

Si l'on compare ces résultats avec les spectres Infra-Rouge (ch. II) on voit que dans  $D_2O$  à pH 6,5 l'on obtient plusieurs bandes à  $1730 \text{ cm}^{-1}$  ( $\nu(C=O)$  et chaîne latérale), à 1680, 1645, 1635 et  $1595 \text{ cm}^{-1}$ . Les bandes à  $1730 - 1720$  et  $1595 \text{ cm}^{-1}$  peuvent être attribuées à la structure  $\beta_2$  ~~//~~ qui disparaît complètement à pH 2,1 alors que les bandes à  $1650 - 1620 \text{ cm}^{-1}$  ( $\beta_1$  ~~//~~) grandissent en intensité. La bande à  $1645 \text{ cm}^{-1}$  (chaîne non ordonnée) disparaît et se transforme en hélice  $\alpha$  ( $1655 \text{ cm}^{-1}$ ). En lointain Infra-Rouge une bande à  $420 \text{ cm}^{-1}$  se déplace à  $405 \text{ cm}^{-1}$  ( $\alpha$  hélice) à pH acide. ( $413 \text{ cm}^{-1}$  pour  $\alpha$  PLGA). Nous avons vu que les bandes à 375, 195 et  $163 \text{ cm}^{-1}$  étaient caractéristiques d'une structure proche d'une hélice  $3_1$ . Les bandes à 695, 650 et  $595 \text{ cm}^{-1}$  ont été attribuées aux formes  $\beta$  ~~//~~, chaîne non ordonnée et hélice  $\alpha$  respectivement. En Raman, nous n'avons pu descendre en dessous de  $750 \text{ cm}^{-1}$  à cause de la forte fluorescence.

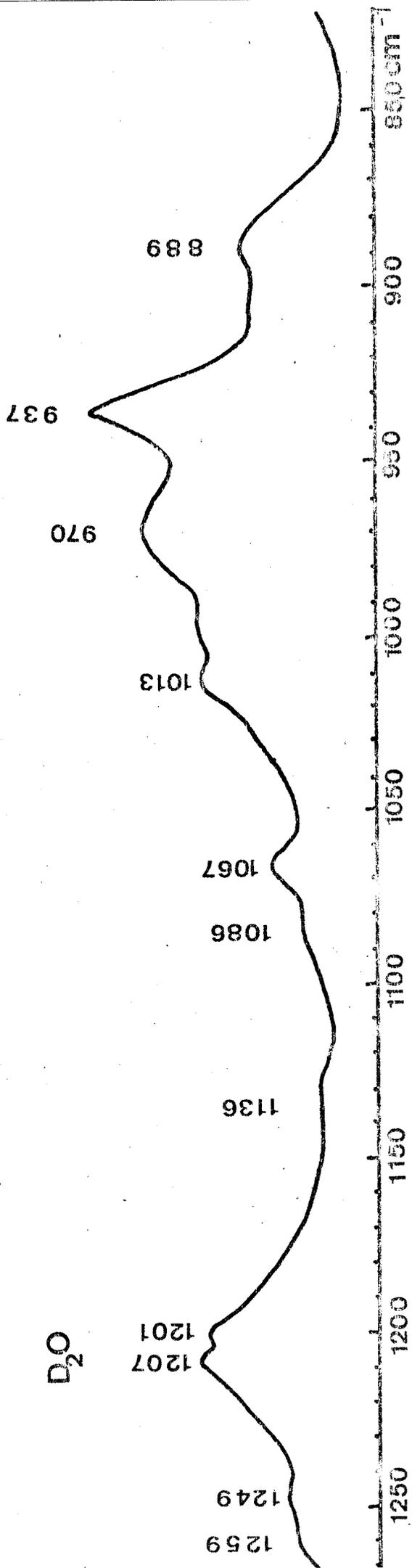


(L-ASP.Na)<sub>u</sub>

FIG III - 7

PD 11

20% in D<sub>2</sub>O



pD11 (L-ASP-Na)<sub>n</sub>  
20% in D<sub>2</sub>O

FIG III-7

Les bandes amide III' sont très faibles et visibles seulement en Raman à pH basique ( $1013 \text{ cm}^{-1}$  intensité moyenne à pH 11?  $1010 \text{ cm}^{-1}$  faible à pH 4,3). Dans la région des vibrations  $\text{CH}_2$  bending ( $1470 - 1450 \text{ cm}^{-1}$ ) les bandes présentent un fort hyperchromisme lorsqu'on passe du milieu basique au milieu acide en accord avec un plus grand degré de liberté (de mobilité).

La bande à  $935 \text{ cm}^{-1}$  en solution basique ne se déplace pas en abaissant le pH et indique les mouvements du squelette peptidique ( $\nu(\text{C-C-N})_S$ ). A pH acide apparaît une bande à  $965 \text{ cm}^{-1}$  dans  $\text{D}_2\text{O}$  ( $969 \text{ cm}^{-1}$  dans  $\text{H}_2\text{O}$ ) qui peut être attribuée à une structure en hélice  $\alpha$ .

### C - CONCLUSION

Nous avons vu que l'acide Poly  $\alpha$ -L-Aspartique possède différentes conformations qui sont conservées de l'état solide à la solution aqueuse ; ces conformations sont toutefois dépendantes du pH. Une structure proche d'une hélice  $3_1$  comme la Poly-Glycine II ou la Poly L Proline II existe en solution basique.

Cependant la concentration employée dans les solutions, fait qu'il apparaît des liaisons intermoléculaires (forte bande à  $1535 \text{ cm}^{-1}$  en I.R. disparaissant dans les solutions diluées).

Le spectre dichroïque de l'acide Poly  $\alpha$ -L-Aspartique se rapproche fortement de celui de la poly-L-Lysine, HCl dans 4 M  $\text{CaCl}_2$  dans laquelle DEARBORN et WETLAUFER (5) pensent avoir trouvé une partie hélicoïdale dans la conformation inordonnée.

En résumé, en milieu basique, le poly-L-aspartate de sodium présente un mélange de structures secondaires telles la chaîne non ordonnée, des chaînes  $\beta$  antiparallèles, et une structure secondaire comparable à l'hélice  $3_1$  de la polyglycine II. En pH acide, l'hélice  $3_1$  disparaît. De l'hélice  $\alpha$  se forme, cependant il demeure de la chaîne non ordonnée. La structure  $\beta$  ~~ne~~ subsiste en pH acide. Il n'est pas possible même avec la recombinaison des spectres dichroïques (ch. VI) d'affirmer avec

certitude si l'hélice  $3_1$  disparaît seule pour donner l'hélice  $\alpha$ , ou si elle se transforme en Random Coil pour subir la transition chaîne non ordonnée  $\rightarrow$  hélice  $\alpha$ .

D - RESONANCE D'INTERACTIONS DES VIBRATIONS AMIDE I. TRAITEMENT PAR LA THEORIE DES PERTURBATIONS.

De nombreux auteurs ont effectué des calculs théoriques des vibrations amide I et II et ont montré que leurs fréquences caractéristiques pouvaient être comprises en termes d'interactions entre groupes peptidiques adjacents à travers des liaisons hydrogènes aussi bien inter, qu'intramoléculaires.

Le premier d'entre eux, T. MIYAZAWA (14) montrait par un traitement de perturbation l'influence des liaisons hydrogènes sur les bandes amide I et II de l'hélice  $\alpha$  et des configurations étendues (formes  $\beta$ ), à partir de la méthode matricielle de WILSON.

D'autres auteurs, MOORE et KRIMM (15) ont amélioré cette méthode en faisant intervenir de nouvelles constantes d'interaction dans l'équation de MIYAZAWA ; pour un mode amide I, celle-ci est de la forme :

$$v(\delta, \delta') = v_0 + \sum_{s,t} D_{st} \cos(s\delta) \cos(t\delta')$$

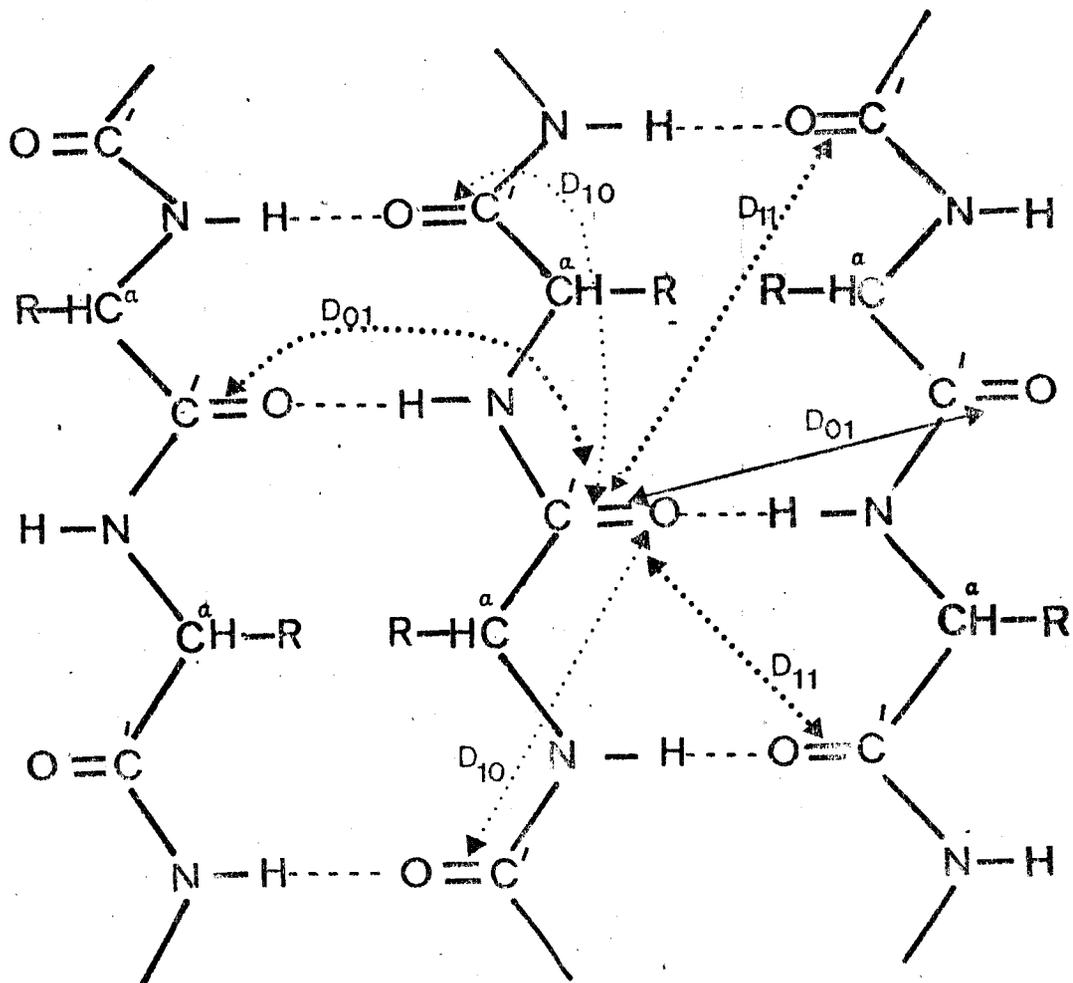
et où  $v_0$  est la fréquence du groupe peptidique non perturbé  
 $D_{st}$  constante d'interaction entre les groupes peptidiques séparés par  $t$  chaînes et  $s$  groupes le long de la première chaîne

$\delta, \delta'$  angles de phases entre les vibrations des différents groupes

$\delta'$  angle de phase entre groupes adjacents à travers une liaison hydrogène interchaîne.

$\delta$  angle de phase entre groupes adjacents appartenant à la même chaîne.

La figure (7) montre pour des feuilletts  $\beta$  antiparallèles les différentes constantes d'interactions.



constantes d'interaction du mode Amide I

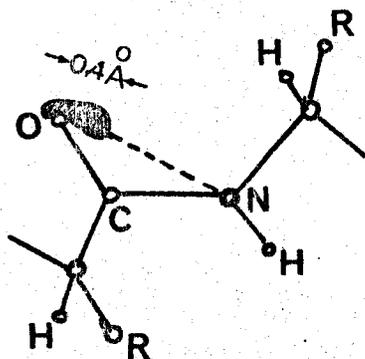
pour les feuilletts  $\beta$ -antiparalleles (couplages dipole-dipole)

FIG III-7'



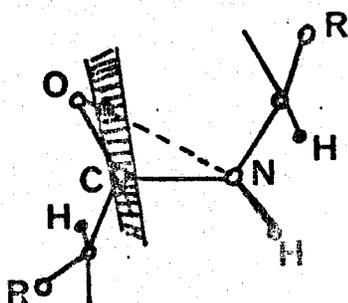
Plus récemment (16) CHIRGADZE, NEVSKAYA améliorèrent encore la description des interactions entre groupes peptidiques en effectuant un traitement théorique de la résonance d'interaction par une approximation dipôle-dipôle sur la base de la théorie des perturbations.

La figure (8) montre le centre des dipôles de transition du mode Amide I pour différentes structures peptidiques (CHIRGADZE, NEVSKAYA).



Feuillet plissé  $\beta$  antiparallèle

FIG III-8



$\alpha$  hélice

Pour les régions hachurées dans le plan du groupe peptidique, les fréquences calculées coïncident avec les fréquences observées. La figure (9) montre l'aspect général d'une forme  $\beta$  antiparallèle  $\beta(L-Ala)_n$ . Les numéros dans les cercles sont ceux des groupes peptidiques dans les cellules unités. Les numéros dans les carrés permettent d'identifier les cellules unités voisines de la cellule unité.

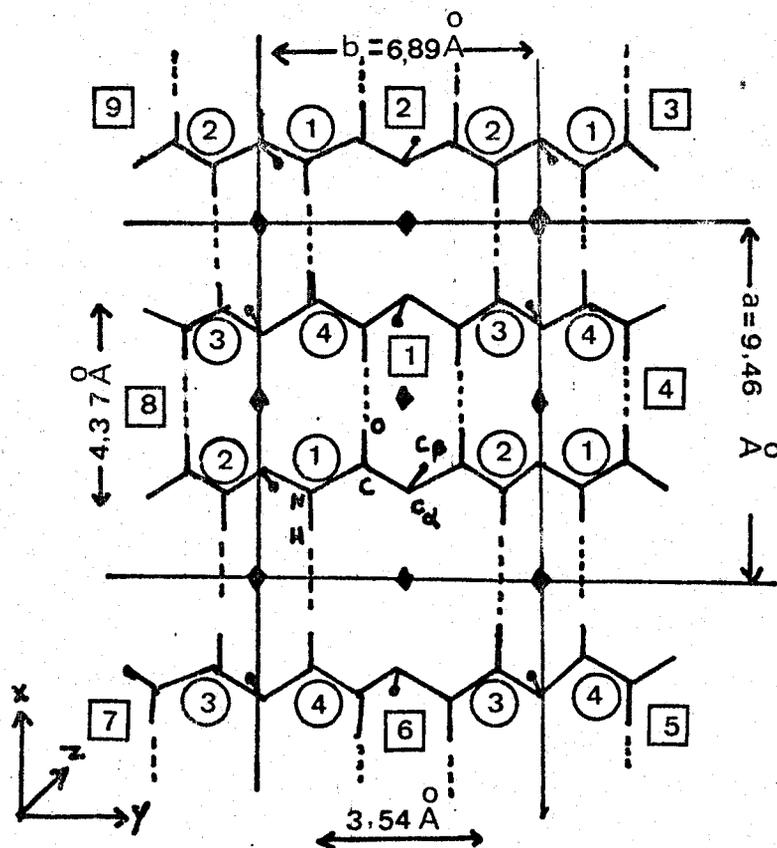


FIG III-9

Rappels théoriques (Méthode de CHIRGADZE-NEVSKAYA)

Dans la théorie de la perturbation du premier ordre, l'énergie d'excitation dans un cristal est :

$$\Delta E^f = \Delta E_0 + \Delta E_1 + E_{res}^f$$

avec :

$\Delta E_0$  : énergie de transition dans une molécule isolée

$\Delta E_1$  : changement dans l'énergie d'interaction d'une molécule donnée dû à son environnement.

$E_{res}^f$  : énergie de la résonance d'interaction de la vibration avec celle de symétrie f.

la fréquence de transition est alors :

$$\nu^f = \nu_0 + \left(\frac{1}{h}\right) E_{res}^f$$

avec  $\nu_0 = \frac{1}{h} (\Delta E_0 + \Delta E_1)$  fréquence de l'oscillateur non perturbé.

Dans un cristal ayant  $\sigma$  groupes identiques dans la cellule unité, l'énergie d'excitation est dégénérée en  $\sigma$  bandes d'excitation ayant différents déplacements de résonance  $E_{res}^f$ .

La distribution de phase des vibrations d'un groupe pour un exciton donné est décrite par les coefficients de symétrie  $C_{f_1}$ . Les valeurs du déplacement dû à l'énergie de résonance et les coefficients de symétrie sont respectivement les valeurs propres et les vecteurs propres de la matrice résonance d'interaction  $L$ .

Pour des vibrations optiquement actives, les éléments de la matrice  $L$  sont :

$$L_{ij} = \sum_n^M V_{mj,ni}$$

où :

$i, j$  : 1, 2, ...  $\sigma$  nombre de groupes dans la cellule unité

$n, m$  : 1, 2, ...  $M$  nombre de cellules unités.

$V_{mj,ni}$  : élément de matrice due au transfert de l'excitation du groupe  $ni$  au groupe  $mj$ .

' : Somme sur tous les termes sauf pour  $i = j$  et  $n = m$  simultanément.

Les fréquences de résonance sont obtenues alors par :

$$\nu^f = \nu_0 + \frac{1}{h} \sum_{ij}^{\sigma} C_{if} L_{ij} C_{fj} = \nu_0 + \frac{1}{h} \sum_{i,j}^{\sigma} \sum_n^M C_{if} V_{mj,ni} C_{fj}$$

ou

$$\nu^f = \nu_0 + \Delta\nu_{rés}^f = \nu_0 + \Delta\nu_{rés}^C + \Delta\nu_{rés}^f$$

$$\Delta\nu_{rés}^C = \frac{1}{h} \sum_i^{\sigma} C_{if} L_{ii} C_{fi} \quad (\text{terme de déplacement de fréquence :}$$

indépendant de la symétrie, il provient de l'interaction des groupes identiquement localisés dans les cellules unités). Il représente le déplacement de résonance par rapport à  $\nu_0$  (constant pour toutes les bandes excitoniques).

Le deuxième terme  $\Delta v_{res}^f$  dépend de la symétrie. Il détermine le déplacement de fréquence de résonance tel que :

$$v_1^f - v_2^f = \Delta v_{res}^f - \Delta v_{res}^f$$

Ce terme est déterminé par les éléments non diagonaux de la matrice de résonance d'interaction et provient des interactions des groupes localisés dans différentes positions dans la même ou dans une autre cellule unité.

Si une excitation est fortement localisée dans un groupe et si les distances entre groupes sont assez grandes, les éléments  $V_{mj,ni}$  d'interaction entre les transitions de 2 groupes peuvent être pris en compte par une approximation dipôle-dipôle.

Dans ce cas les transitions sont associées aux moments de transition des dipôles électriques et l'interaction de résonance peut être calculée par :

$$V_{mj,ni} = \frac{\Delta v_{ni} \Delta v_{mj}}{R^3} |(e_{ni} e_{mj}) - 3(n_o e_{ni})(n_o e_{mj})|$$

$\Delta v$  module du moment de transition du dipôle

$e$  vecteur unité du dipôle de transition

$n_o$  vecteur unité dirigé du centre d'un dipôle vers le centre de l'autre

$R$  distance entre les centres des dipôles

Les intensités pour des échantillons non orientés sont déterminés par :

$$I^f = \frac{1}{\sigma} \sum_{k=1}^3 \Delta M_k^2 = \frac{1}{\sigma} \sum_{k=1}^3 \left( \sum_{i=1}^3 C_{if} \Delta v_{ik} \right)^2$$

où :

- $\Delta M_k$  projection du dipôle de transition de la cellule unité sur les axes x, y ou z.
- $\Delta v_{ik}$  projection du moment de transition du i<sup>ème</sup> groupe peptidique.
- $C_{if}$  coefficients de symétrie pour les vibrations de symétrie f.

Calculs et résultats pour une chaîne  $\beta$  antiparallèle

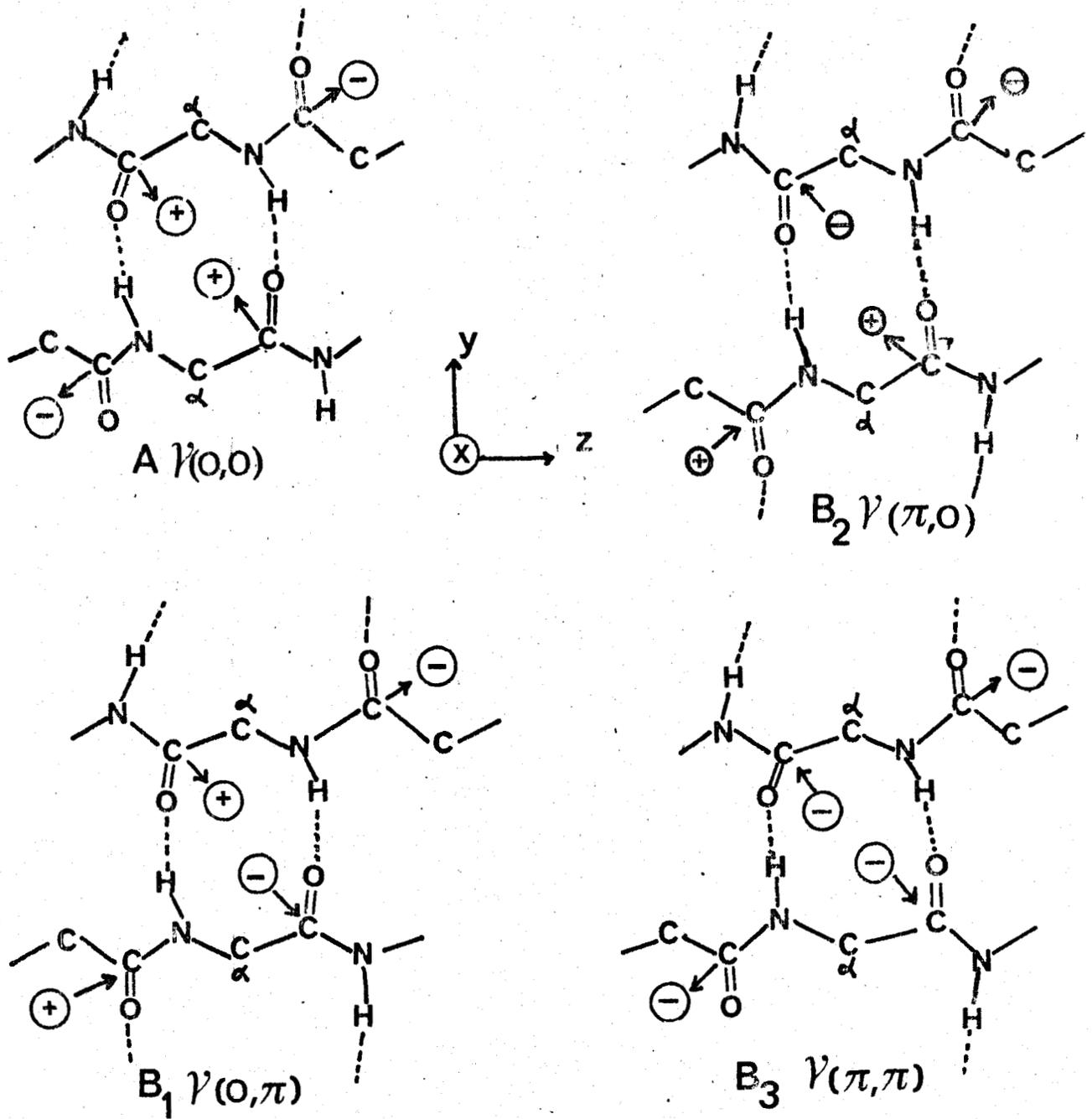
Le modèle employé à une structure de groupe  $D_2$  (système orthogonal) avec 4 groupes peptidiques par cellule unité. Pour une chaîne  $\beta$  // de longueur infinie on doit avoir 4 transitions de résonance, une du type A (Raman) et trois du type  $\beta$  ( $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ ) actives en IR et Raman et polarisées suivant les axes y, y, z respectivement (fig. III.10).

Le tableau suivant nous donne les coefficients de symétrie, les angles de différence de phase et les règles de sélection avec  $\sum_i C_{if}^2 = \sigma$

type de symétrie	coefficients de symétrie				angles de différence de phase		Activité	
	$C_{1f}$	$C_{2f}$	$C_{3f}$	$C_{4f}$	$\delta$	$\delta'$	IR	Raman
	1	$\cos \delta$	$\cos \delta \cos \delta'$	$\delta' \cos \delta'$				
A	1	1	1	1	0, 0		-	+
$B_1$	1	1	- 1	- 1	0, $\pi$		+	+
$B_2$	1	- 1	- 1	1	$\pi$ , 0		+	+
$B_3$	1	- 1	1	- 1	$\pi$ , $\pi$		+	+

La formule générale pour les fréquences de résonance est donnée par :

$$v^f(\delta, \delta') = v_0 + \frac{1}{h} |L_{11} + L_{12} \cos \delta + L_{13} \cos \delta \cos \delta' + L_{14} \cos \delta'|$$



MODES VIBRATIONNELS

DES FEUILLETS  $\beta$ -ANTIPARALLELES (SELON MIYAZAWA)

FIG III-10



Dans l'approximation du plus proche voisin on a,

$$v^f = v_0 + \left(\frac{1}{h}\right) 2 V_{11,12} \cos \delta + \left(\frac{1}{h}\right) (V_{11,13} + V_{11,83}) \cos \delta \cos \delta' + 2 \left(\frac{1}{h}\right) V_{11,14} \cos \delta'$$

et

$$v^{B_1} - v^{B_2} = -\frac{1}{h} 4 V_{11,14}$$

Si on compare aux équations générales données par MIYAZAWA :

$$v^f = v_0 + D_1 \cos \delta + D_1' \cos \delta' + (D_{13}' + D_{13,1}') \cos \delta \cos \delta'$$

On a :

$$D_1 = \left(\frac{1}{h}\right) 2 V_{11,12} \quad D_1' = \left(\frac{1}{h}\right) 2 V_{11,14}$$

coefficients d'interaction de 2 groupes dans la chaîne ( $D_1$ ) et à travers la liaisons hydrogène ( $D_1'$ ),

$$D_{13}' = \left(\frac{1}{h}\right) V_{11,13} \quad \text{et} \quad D_{13,1}' = \left(\frac{1}{h}\right) V_{11,83}$$

coefficients des interactions (diagonales) de 2 groupes dans la même  $D_{13}'$  et dans des cellules unités adjacentes ( $D_{13,1}'$ ) qui sont des éléments différents de zéro jusqu'à maintenant toujours négligés.

La grandeur du moment de transition de l'Amide I ( $\beta$  ~~+~~) est égale à 0,39 Debye (intensité :  $6,1 \cdot 10^4 \text{ l.mole}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ). Le moment de transition est situé dans le plan du groupe peptidique, près de l'atome d'oxygène et incliné de  $19^\circ$  de la liaison CO vers la liaison C-C.

Application à l'acide Poly α L Aspartique [chaîne β<sub>1</sub> antiparallèle β<sub>1</sub> ++].

Résultats :

Nous avons pris la bande la plus intense comme étant la bande B<sub>2</sub> (1645 cm<sup>-1</sup>).

En prenant les valeurs numériques des coefficients d'interaction calculés par CHIRGADZE et NEWSKAYA, on a :

$$\nu^f \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \nu_0 - 26 \cos \delta' + 9 \cos \delta \cos \delta'$$

$$\text{et } \nu_{B_1} - \nu_{B_2} = - \left(\frac{1}{h}\right) 4 V_{11,14}$$

Pour l'acide Poly L Aspartique, on trouve :

$$\nu_{B_2(\pi,0)} = 1645 \text{ cm}^{-1} \text{ (Infra-Rouge)}$$

alors  $\nu_0 = 1680 \text{ cm}^{-1}$  (1678 cm<sup>-1</sup> pour CHIRGADZE (16) ).

On a :

$$\nu_{B_2(,0)} = 1645 \text{ cm}^{-1} \text{ (vibration empêchée : théorie 1630 cm}^{-1}\text{)}$$

$$\nu_{B_1(0,)} = 1695 \text{ cm}^{-1} \text{ (1690 cm}^{-1} \text{ en IR solide pour le sel de Na)}$$

$$\nu_{A(0,0)} = 1665 \text{ cm}^{-1} \text{ (1666 cm}^{-1} \text{ pour p-L Asp Na en Raman dans H}_2\text{O)}$$

$$\text{(1670 cm}^{-1} \text{ pour p-L Asp H}^+ \text{ en Raman dans H}_2\text{O)}$$

$$\text{(1672 cm}^{-1} \text{ pour p-L Asp Na Raman solide)}$$

$$\nu^{B_3(\pi,\pi)} = 1715 \text{ cm}^{-1} \text{ (non observée en Raman ou IR sur (L-Asp Na)}_n \text{)}$$

avec  $\nu_0 = 1680 \text{ cm}^{-1}$  (observée en Raman).

La bande  $\nu^{B_2(\pi,0)}$  ne doit pas être confondue avec la bande à  $1645 \text{ cm}^{-1}$  (Random coil. IR dans  $D_2O$ ) ( $1655 \text{ cm}^{-1}$  pour p L Asp Na solide en IR).

On a :

$$\nu^{B_2} = \nu_0 - D_1 + D'_1 - (D'_{13} + D'_{13'})$$

$$\nu^{B_1} = \nu_0 + D_1 - D'_1 - (D'_{13} + D'_{13'})$$

$$\nu^{B_2} - \nu^{B_1} = -50 \text{ cm}^{-1} = 2 D'_1$$

$$D'_1 = D_{01} = -25 \text{ cm}^{-1}$$

Ce terme  $D'_1 = D_{01}$  montre que les interactions interchaînes sont très fortes et stabilisent fortement le système (signe  $<0$ ).

$$\text{On a aussi } \nu^{B_1} + \nu^A = 2 \nu_0 + 2 D_1 = 3260 \text{ cm}^{-1} = 2 \nu_0$$

$$\nu_0 = 1680 \text{ cm}^{-1}$$

d'où

$$D_1 = D_{10} = 0$$

Les interactions intrachaine entre groupements peptidiques sont très faibles. On retrouve un résultat préconisé par MOORE et KRIMM (15) pour la Polyglycine (forme  $\beta$ ) ( $D_{10} = 0$ ).

De même on trouverait :

$$D'_{13} + D'_{13'} = 10 \text{ cm}^{-1}$$

Bien que faibles, ces interactions devaient effectivement être prises en compte.

CHIRGADZE et NEVSKAYA (16) ont pris comme groupe de symétrie le groupe  $D_2$  (réseau orthogonal) ; cependant nos études par rayons X (cliché Debye-Scherrer) ont montré que nous avons un réseau monoclinique (groupe  $C_2$ ). La symétrie cristalline décroît de ce fait et nous ne devrions voir que deux vibrations de symétrie A et B

Groupe $D_2$ système orthogonal	Groupe $C_2$ système monoclinique
A	A
$B_1$	
$B_2$	B
$B_3$	

Calcul des perturbations pour un système  $\beta_2$  antiparallèle

Ce système est monoclinique encore mais les feuilletts sont beaucoup plus rapprochés.

En attribuant la forte bande à  $1595 \text{ cm}^{-1}$  (IR) à la bande  $\nu_{B_2}(\pi, 0)$  la plus intense) on trouve :

$$1595 = \nu_0 - 35 \quad \nu_0 = 1630 \text{ cm}^{-1}$$

et

$$\begin{aligned} \nu_{A(0,0)} &= 1615 \text{ cm}^{-1} && (1613 \text{ cm}^{-1} \text{ en Raman sel de Na} \\ &&& \text{dans H}_2\text{O}) \\ &&& (1609 \text{ cm}^{-1} \text{ en Raman H}^+ \text{ solide}) \\ \nu_{B_1(0,\pi)} &= 1645 \text{ cm}^{-1} \\ \nu_{B_2(\pi,0)} &= 1595 \text{ cm}^{-1} \\ \nu_{B_3(\pi,\pi)} &= 1665 \text{ cm}^{-1} \end{aligned}$$

On retrouve :

$$D_1 = 0 = D_{01}$$

$$D'_1 = - 25 \text{ cm}^{-1} = D_{10}$$

et aussi

$$D'_{13} + D'_{13'} = 10 \text{ cm}^{-1}$$

Les coefficients d'interaction apparaissent alors indépendants des dimensions du réseau cristallin. Cependant la fréquence de l'oscillateur non perturbé varie considérablement lorsqu'on passe d'un système  $\beta_1 \nrightarrow$  à  $\beta_2 \nrightarrow$ . Ce déplacement est négatif et indique une forte stabilisation du système par une plus grande inter-pénétration. C'est en quelque sorte une mesure du caractère hydrophobe des chaînes latérales.

Les bandes A, B, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> doivent donc être effectivement observées (système D<sub>2</sub> ou C<sub>2</sub>).

Ceci amène à se poser la question de la mise en évidence de la structure non ordonnée. On voit que les bandes à 1645 cm<sup>-1</sup> et 1665 cm<sup>-1</sup> (IR) prises en tant que Random Coil peuvent très bien être dues à la structure  $\beta_2 \nrightarrow$  (disparaissant d'ailleurs en abaissant le pH). Pourtant, les spectres dichroïques semblent indiquer la présence d'une structure random coil comme nous le verrons dans la tentative de reconstitution des spectres dichroïques.

Par contre un point positif a été marqué : ce que nous avons pris en Raman pour des cycles benzéniques résiduels (1613 cm<sup>-1</sup>) doit être dû à la bande  $\nu^{A(0,0)}$  (à 1613 cm<sup>-1</sup>) de la forme  $\beta_2 \nrightarrow$ .

#### Calcul pour une hélice $\alpha$ droite (Méthode de CHIRGADZE).

Pour une hélice  $\alpha$ , la cellule unité contient 18 groupes peptidiques inclus dans 5 tours. L'angle de torsion  $\frac{2 \pi \cdot 5}{18} = 100^\circ = \theta$  et la longueur de la cellule unité est 27 Å dans la direction z. Le pas est 5,4 Å. Chaque transition possède 18 modes de vibrations A symétrique (Raman), B antisymétrique (IR et Raman) et 8 modes E doublement dégénérés.

En I.R. les vibrations  $E_1$  et  $E_1'$  sont actives. Les coefficients de symétrie sont alors donnés par :

$$C_{A_i} = \sqrt{1/18} \quad C_{E_{1i}'} = \sqrt{2/18} \cos (i-1)\theta$$

$$C_{E_{1i}''} = \sqrt{2/18} \sin(i-1)\theta$$

$i = 1, 2, \dots, 18$  nombre d'unités peptidiques dans le groupe.

Les fréquences de résonance en I.R. sont données par :

$$\nu^A = \nu_0 + \frac{1}{h} \cdot \frac{1}{18} \sum_{i,j=1}^{18} L_{ij} = \nu_0 + \frac{1}{h} \sum_{i=1}^{18} L_{i1}$$

$$\nu^{E_1'} = \nu_0 + \frac{1}{h} \cdot \frac{1}{13} \sum_{i,j=1}^{18} L_{ij} \cos (i-1)\theta \cos (j-1)\theta$$

$$\nu^{E_2''} = \nu_0 + \frac{1}{h} \cdot \frac{1}{18} \sum_{i,j=1}^{18} L_{ij} \sin (i-1)\theta \sin (j-1)\theta$$

ou encore

$$\nu^A = \nu_0 + D_1 + D_2 + D_3 = \nu_0 + \frac{2}{h} (V_{11,12} + V_{11,13} + V_{11,14})$$

$$\nu^{E_1'} = \nu_0 + D_1 \cos \theta + D_2 \cos 2\theta + D_3 \cos 3\theta$$

$$= \nu_0 + \frac{2}{h} (V_{11,12} \cos \theta + V_{11,13} \cos 2\theta + V_{11,14} \cos 3\theta)$$

Le dipôle de transition pour l'amide I a un module de 0,3 D ( $4,15 \cdot 10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ).

Pour l'amide II ( $0,18 \text{ D} : 1,4 \cdot 10^4 \text{ l mole}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ).

Le calcul théorique mène à Amide I  $\nu_0 = 1663 \text{ cm}^{-1}$

Amide II  $\nu_0 = 1537 \text{ cm}^{-1}$

Pour l'acide poly  $\alpha$  L aspartique on trouve :

$$\nu^A = 1638 \text{ cm}^{-1} \text{ Raman Amide I}$$

$$\nu^{E1} = 1655 \text{ cm}^{-1} \text{ Raman}$$

En reprenant ces valeurs, on trouve si l'on fait  $D_2 = 0$  (influence dans une hélice  $\alpha$  que par les premier et troisième résidus).

$$D_1 = - 6 \text{ cm}^{-1} \quad D_3 = - 14 \text{ cm}^{-1} \quad \text{Amide I}$$

Le terme  $D_3$  montre que l'énergie de stabilisation par liaison hydrogène est près du double de l'énergie de stabilisation apportée par un résidu adjacent engagé dans une hélice droite (Amide I).

Pour l'amide II (IR solide :  $1520 \text{ cm}^{-1}$  forme  $\alpha$  hélice).

Le calcul nous donne en conservant les valeurs de  $D_1$  et  $D_3$  :

$$\nu_{\text{Am II}} = 1537 - 6 - 14 = 1517 \text{ cm}^{-1}$$

Ce résultat est en très bon accord avec la bande Amide II expérimentale.

CHAPITRE IV

ETUDES EN RAYONS X

## CHAPITRE IV

### ETUDES EN RAYONS X

- I - Rappels bibliographiques
  
- II - Etude du réseau cristallin
  
- III - Relation avec l'infra-rouge. Influence des chaînes latérales pour les structures  $\beta_1$  et  $\beta_2$  antiparallèles
  
- IV - Recherche de la structure correspondante aux raies non attribuées
  
- V - Travaux de BIRSHTEN et PTITSYN. Possible explication de l'existence de chaînes  $\beta$  antiparallèles pour l'acide poly  $\alpha$  L aspartique
  
- VI - Conclusions

## I - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

### Introduction

Depuis quelques années, de nombreux travaux d'analyse des peptides par Rayons X, se sont développés, principalement par l'étude des diagrammes de fibre (Poly  $\alpha$  méthyl-L-glutamate, poly L-alanine, Poly L-Proline I et II (1) ) ou encore sur des protéines fibreuses telles que la chrysope FLAVA (2).

Cependant ces méthodes d'analyse demandaient la préparation de fibres de polymère assez grandes (plusieurs microns) que nous ne pouvions préparer à cause des très faibles masses de l'acide poly  $\alpha$  L aspartique ( $\overline{M}_n$  7000).

Cependant une étude de Rayons X sur le polymère sous forme de poudre (clichés Debye-Scherer) devait nous apporter des renseignements quant à la structure cristalline des formes antiparallèles et à la conformation des chaînes latérales.

Il y a quelques années, KEITH, PADDEN et GIANNONI (3) établissaient les structures cristallines de l'acide Poly L glutamique et de ses sels alcalino-terreux (sels de calcium, strontium et de barium).

Les chaînes  $\beta$  antiparallèles ont toutes une cellule unité monoclinique (groupe d'espace  $P_{21}$  ) dont les paramètres varient suivant la nature du sel. Sous la forme sel alcalino-terreux les plans des ions carboxylates s'étendent parallèlement à l'axe de la chaîne, chaque cation étant en contact avec 4 anions carboxylates. En convertissant ces sels (en restant à l'état solide sous la forme  $\beta$ ) en acide Poly L glutamique les groupes carboxyliques maintiennent l'orientation des ions carboxylates mais les feuilletts se rapprochent de 13 Å à 8,8 Å ( $d_{001}$ ). D'un autre côté, l'acide poly L glutamique préparé directement par précipitation à partir de solutions aqueuses à bas pH, voit le plan de ses groupes carboxyliques s'étendre perpendiculairement à l'axe des chaînes  $\beta$  (axe b), les chaînes s'interpénétrant plus profondément ramenant l'espace interfeuillet à 7,8 Å (forme  $\beta_2$  //).

D'autre part, beaucoup plus récemment ITOH, FOXMAN et FASMAN (4) ont étudié les transitions hélice  $\alpha \rightarrow$  chaîne  $\beta$  de l'acide poly-L-glutamique en fonction de la température. Se basant sur les études de KEITH (3) ils obtinrent deux formes  $\beta$  antiparallèles ( $\beta \neq$ ) à partir de la structure en hélice  $\alpha$  par chauffage. Ces deux formes possèdent toutes deux une structure monoclinique dont les paramètres sont indiqués dans le tableau I.

Forme	paramètres cristallins (cellule monoclinique)	Mode d'obtention et caractéristiques en IR dans $D_2O$
$\beta_1 \neq$	$a = 9,79 \text{ \AA}$ $b = 6,82 \text{ \AA}$ $c = 9,35 \text{ \AA}$ $\beta = 105^\circ$	Le gel à bas pH contenant des hélices $\alpha$ ( $1639 \text{ cm}^{-1}$ en IR : Am I) a été chauffé à $40^\circ\text{C}$ . $\beta_1 \neq$ ( $1681$ et $1615 \text{ cm}^{-1}$ en IR) $\nu(0, \pi) \quad \nu(\pi, 0)$
$\beta_2 \neq$	$a = 9,75 \text{ \AA}$ $b = 6,84 \text{ \AA}$ $c = 8,06 \text{ \AA}$ $\beta = 104^\circ$	La forme $\beta_1$ a été chauffée à $85^\circ\text{C}$ $\beta_2 \neq$ ( $1597$ et $1728 \text{ cm}^{-1}$ en I.R) Degré de cristallinité $\beta_2 > \beta_1$

TABLEAU I

Etude par R.X de  $(L\text{-Glu})_n$  Réf (4)

ITOH, FOXMAN et FASMAN (4) avaient trouvé que la transition  $\beta_1 \rightarrow \beta_2$  (en fonction de la température, suivait un processus de nucléation et de croissance à partir de la forme  $\beta_1$ , processus qui se révélait être très bien expliqué par la théorie cinétique des transitions de phase développée par AVRAMI. Ils montraient de plus que les groupes carboxyliques des chaînes latérales et que le mode de liaison hydrogène entre chaînes latérales subissaient d'appréciables changements durant la transition. Dans la forme  $\beta_2$ , les groupes carboxyliques ont leurs plans normaux à l'axe de la chaîne (meilleure interpénétration), tandis que dans

la forme  $\beta_1$  ces plans sont parallèles à l'axe de la chaîne (établissement des liaisons 4 entre groupes carboxyliques).

## II - ETUDE DU RESEAU CRISTALLIN DU POLY-L-ASPARTATE DE SODIUM.

Les études en Raman et surtout infra rouge nous avaient montré l'existence des chaînes  $\beta$  antiparallèles (ch II et III). C'est surtout l'apparition en milieu basique (concentré) des bandes I R à  $1595 \text{ cm}^{-1}$  (F) et  $1730 \text{ cm}^{-1}$  (f) disparaissant en abaissant le pH (alors que deux bandes à  $1680$  et  $1620 \text{ cm}^{-1}$  augmentent en intensité) qui nous a poussé à suivre l'analogie par rapport à l'acide poly-L-glutamique en rayons X.

Dans le chapitre III, le calcul des constantes d'interaction de résonance ont montré que seule la fréquence de l'oscillateur non perturbé ( $\nu_0$ ) subissait un fort déplacement pour la structure  $\beta \nrightarrow$  dont les bandes IR à  $1595$  et  $1730 \text{ cm}^{-1}$  représentaient la structure ( $\beta_2 \nrightarrow$ ). Ce déplacement ne pouvait provenir que de la distance interfeuillet, ainsi donc on établissait a priori une relation vibration de la bande Amide I - structure cristalline ( $d_{001}$ ).

### a - Mode opératoire.

Le diagramme de poudre a été effectué sur un échantillon du sel de sodium de l'acide poly L aspartique lyophilisé dans  $\text{H}_2\text{O}$  avant usage. Une caméra Philips Debye-Scherrer a été employée (Rayon de la chambre  $57,3 \text{ mm}$ ). L'exposition à une source de radiation (raie  $\text{Cu K}_\alpha$   $1,542 \text{ \AA}$ ) a été effectuée pendant 24 heures.

La distance linéaire sur le film (S en mm) entre une raie de diffraction (pour un angle de Bragg  $\theta^\circ$ ) et la raie  $\theta = 0^\circ$  est donnée par la relation de Bragg :

$$d_{hkl} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{(hkl)}} \quad \text{avec } S(\text{mm}) = .4 \theta$$

b - Etude du réseau

Le tableau II montre les distances (S en mm) observées sur le cliché de diffraction, l'attribution des raies aux plans diffractants (h, k, l).

S (mm) = 4 θ	sin	(h, k, l)	d <sub>h,k,l</sub> (Å)	Structure β <sub>2</sub> donnée par FOXMAN, ITOH, FASMAN (4) d(h, k, l)
40 Forte	0,174	(2 )	4,43	
44 F	0,191	(0 0 2)	4,03	β <sub>2</sub> ( 4,03)
57 F	0,246	(0 2 1)	3,13	β <sub>2</sub> ( 3,14)
69,5 M	0,299	(0 0 3)	2,58	β <sub>2</sub> ( 2,60)
73 M	0,314		2,46	
73,5 f	0,315	(3 3 1)	2,45	
78,5 tf	0,335		2,30	
81 M	0,346	(3 1 2)	2,23	
89 f	0,378	(2 3 3)	2,03	
91,5 M	0,388	(0 0 4)	1,98	β <sub>2</sub> ( 1,98)
109,5 F	0,46		1,675	

F : forte intensité, M : moyenne, f : faible, tf : très faible.

TABLEAU II

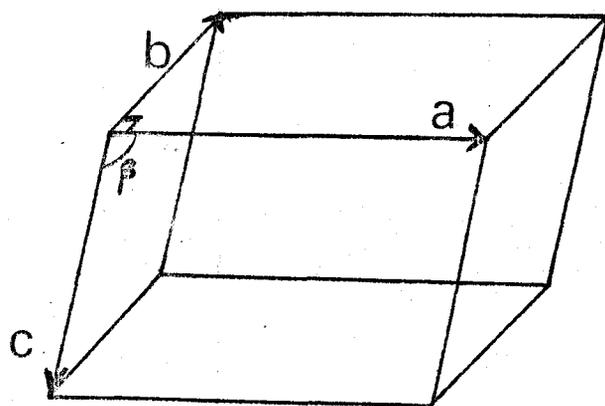
Cliché Debye-Scherrer du poly-L-Aspartate de sodium solide.

Les bandes à 4,43 ; 2,46 et 1,67 Å n'appartiennent pas à la structure β<sub>2</sub> // Les autres bandes correspondent à cette structure β<sub>2</sub> //, d<sub>hkl</sub> ayant été calculé pour un système monoclinique par la relation :

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{1}{a \cdot c \sin^2 \beta} [h^2 \frac{c}{a} + l^2 \frac{a}{c} + 2 lh \cos \beta] + \frac{k^2}{b^2}$$

avec a, b, c, paramètres de la cellule monoclinique

$$(a = 9,75 \text{ \AA}, \quad b = 6,84 \text{ \AA}, \quad c = 8,06 \text{ \AA}, \quad \beta = 104^\circ, \quad \alpha = \gamma = 90^\circ)$$



a AXE DES LIAISONS H

b AXE DE LA CHAINE

C DISTANCE INTERFEUILLETS

MAILLE MONOCLINIQUE

Figure IV-1.

ou encore :

$$\frac{1}{d_{h,k,l}^2} = \sqrt{0,01149 h^2 + 0,01294 l^2 + 0,0631 1h + k^2/48,72}$$

On a fait varier les paramètres a, b, c et  $\beta$ . Les résultats obtenus par exemple pour  $\beta = 100^\circ$  et  $110^\circ$  ne sont pas du tout en accord avec les résultats expérimentaux. Le système est donc fort bien décrit par une structure  $\beta_2$  antiparallèle incluse dans une cellule unité monoclinique.

### III - RELATION AVEC L'INFRA-ROUGE. INFLUENCE DES CHAINES LATERALES.

En infra-rouge en fonction du pH, on voit cette structure disparaître (en milieu concentré mais pas en milieu dilué).

Nous avons pris un cliché Debye-Scherrer de l'acide Poly  $\alpha$  L Aspartique solide. Les très faibles bandes observées étaient encore caractéristiques d'un système  $\beta_2$ . Ceci peut être dû au mode de préparation de l'acide solide (passage en milieu aqueux dilué, neutralisation des groupements carboxylates, dialyse puis lyophilisation).

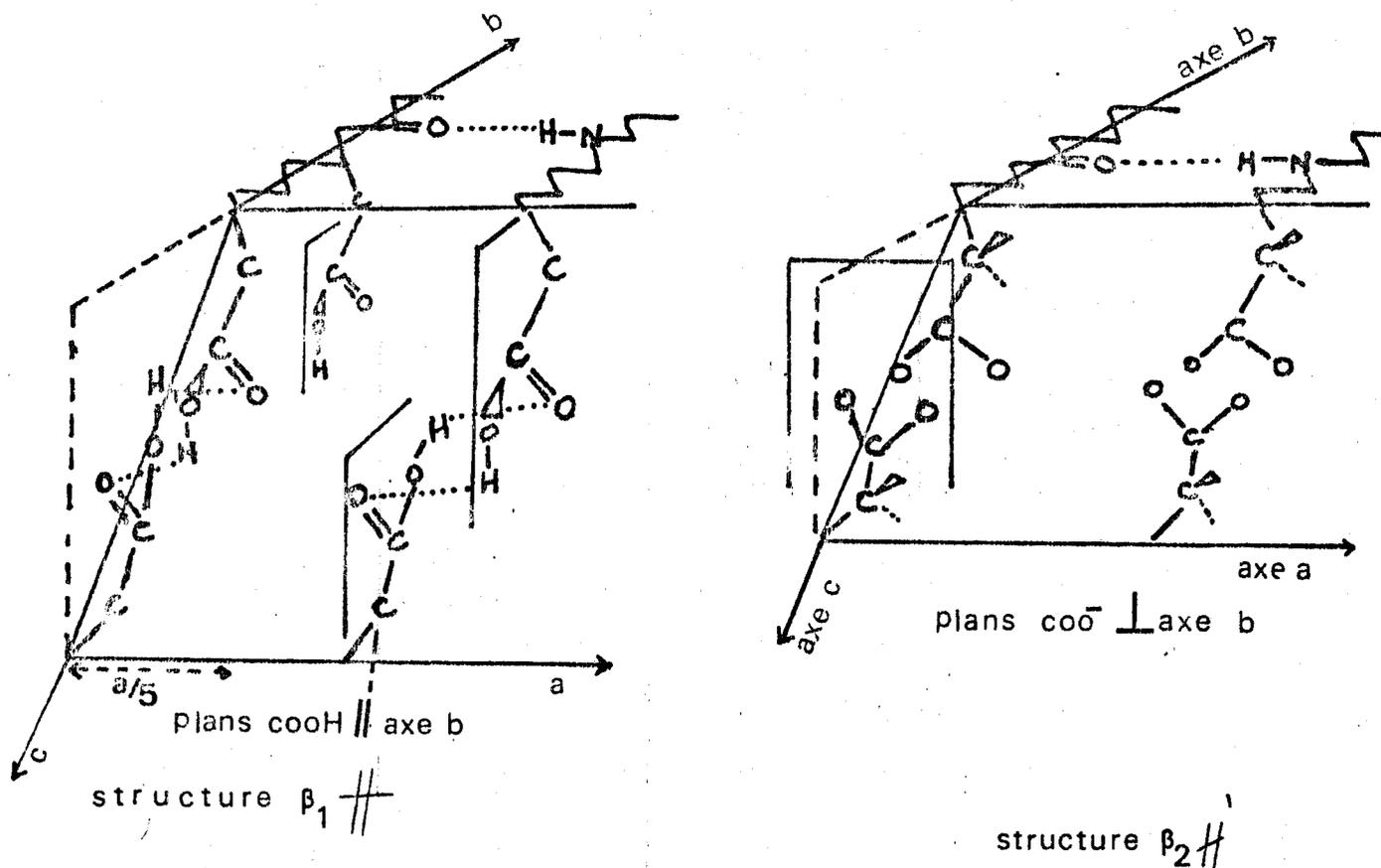
Le fait qu'en milieu concentré, la structure  $\beta_2$  disparaît (IR) pour laisser la place à 2 bandes à  $1680 - 1620 \text{ cm}^{-1}$  en abaissant le pD, alors que la structure  $\beta_2$  est conservée dans  $\text{D}_2\text{O}$  à basse concentration nous montre que le mécanisme  $\beta_2 \rightarrow \beta_1$  obtenu par abaissement du pH n'est pas un mécanisme simple.

Le plan  $d_{001}$  dans le système  $\beta_2$  // n'est pas observé où l'intensité de la diffraction est trop faible, ceci pouvant être dû aux plans contenant les ions  $\text{Na}^+$  affaiblissant la diffraction du plan  $d_{001}$ . KEITH et coll. ont observé un tel résultat dans leurs études du polyglutamate de calcium.

Les plans  $d_{00n}$  sont beaucoup plus rapprochés (distance interfeuilletts pour la structure  $\beta_2$  // que pour la structure  $\beta_1$  //). En milieu basique et concentré les plans carboxylates devant être normaux à la chaîne peptidique (axe b) tandis que l'écartement des feuilletts en milieu acide permet une rotation des groupements carboxyliques (plans parallèles à l'axe de la chaîne) pour permettre des liaisons hydrogène de s'établir entre elles.

La figure 2 schématise un tel processus. Il est à noter que dans un système monoclinique les chaînes latérales adjacentes pour deux feuilletts voisins sont décalées de  $\frac{a}{5}$  (modèle le plus compact selon KEITH).

La forme  $\beta_1$  // permet ainsi une solvatation du groupe carboxylique qui n'existe pas dans le groupement carboxylate (forte interpénétration des chaînes latérales en milieu basique (forme  $\beta_2$  //)). C'est un résultat que nous avons retrouvé lors de l'étude de la solvatation de ce polypeptide et que nous développerons dans le chapitre consacré à cette étude.



schemas de la position  
des chaines laterales dans les  
reseaux monocliniques

FIG IV-2

IV - RECHERCHE DE LA STRUCTURE CORRESPONDANT AUX RAIES NON  
ATTRIBUEES.

Dans le cliché de diffraction obtenu, les bandes correspondant à la diffraction de plans réticulaires tels que  $d = 4,43 - 2,46 - 2,30$  (très faible) et  $1,67 \text{ \AA}$  n'appartiennent ni à un système  $\beta_2 \perp$  ni à  $\beta_1 \perp$ . Or les études en Infra-Rouge fondamental, lointain et en Raman nous ont fait soupçonner l'existence d'une hélice étendue (hélice  $3_1$ ) ou une structure proche de cette hélice.

Pour la Poly-L-Proline II (ou la Poly Glycine II) tous deux formant une hélice  $3_1$ , le système cristallin est hexagonal. Le pas de l'hélice est  $9,36 \text{ \AA}$ , la translation du résidu :  $3,12 \text{ \AA}$  et les paramètres sont  $a = 6,62 \text{ \AA} = b$ ,  $c = 9,36 \text{ \AA}$   $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ . La distance du plan  $d_{hkl}$  réticulaire pour la diffraction  $(h,k,l)$  est :

$$d_{h,k,l} = \frac{1}{\sqrt{\frac{4}{3a^2} (h^2 + k^2 + hk) + \frac{l^2}{c^2}}}$$

Les réflexions les plus intenses devraient être  $d_{001} = 4,89 \text{ \AA}$ ,  $d_{002} = 2,444 \text{ \AA}$  et  $d_{003} = 1,63 \text{ \AA}$  (on trouve  $d = 4,43 \text{ \AA}$ ,  $2,46 \text{ \AA}$  et  $1,67 \text{ \AA}$ ).

On ne peut attribuer les diffractions manquantes à l'existence d'une hélice  $3_1$  pure, bien que l'on puisse soupçonner une structure avoisinante. De plus, les études faites en prenant une chaîne  $\beta$  parallèle ne donnent aucun résultat en accord avec les raies restant à déterminer.

V - TRAVAUX DE BIRSHTEIN-PTITSYN. EXPLICATION DE L'EXISTENCE DE CHAINES  $\beta$  ANTIPARALLELES POUR L'ACIDE POLY  $\alpha$  L ASPARTIQUE.

BIRSHTEIN et PTITZYN (5) ont montré par des calculs théoriques basés sur les interactions dipôle-dipôle des chaînes latérales que les polypeptides contenant des hétéro-atomes en position  $\gamma$  (rattachés au carbone  $\beta$ ) dans la chaîne latérale (Poly-L-Sérine, P-L Cystéine, P-L Thréonine) forment des structures  $\beta$  plutôt que des hélices  $\alpha$ . Les interactions des groupes  $C_\beta - M_\gamma$  avec des groupes peptidiques adjacents dépendent des angles  $\phi$  et  $\psi$  de rotation interne autour des liaisons  $N - C_\alpha$  et  $C_\alpha - C'O$  de la chaîne principale et de l'angle  $\chi$  de rotation autour de la liaison  $C_\alpha - C_\beta$  de la chaîne latérale, avec  $\phi = 38^\circ$ ,  $\psi = 225^\circ$  pour des chaînes  $\beta$ -antiparallèles et  $\phi = 122^\circ$  et  $\psi = 123^\circ$  pour une hélice  $\alpha$  droite.

Ins ont considéré trois conformations privilégiées pour les rotations autour des liaisons  $C^\alpha - C^\beta$  qui correspondent à des valeurs de  $\chi = 180^\circ$  et  $\pm 60^\circ$ .

En prenant un moment dipolaire de 0,39 D pour la liaison peptidique et une constante diélectrique  $\epsilon = 3$  et 4, ils montrent que la configuration  $\chi = 180^\circ$  est la plus avantageuse pour toutes les structures (fig. 3) car elle correspond à une répulsion dipôle-dipôle dans le cas de l'hélice  $\alpha$  et une énergie d'interaction dipôle-dipôle proche de 0 pour les structures  $\beta$ .

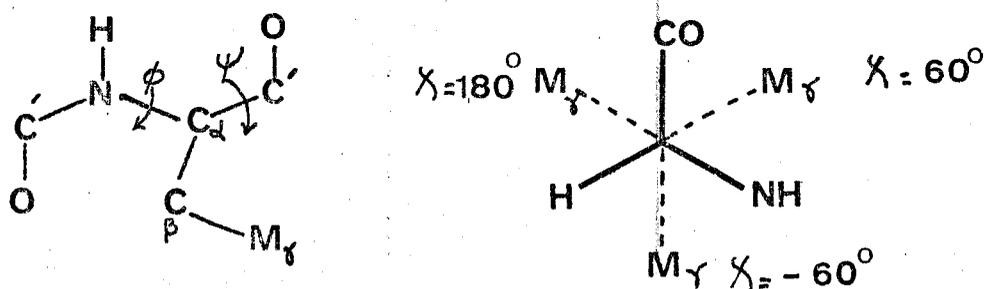


FIG IV-3

De même la structure  $\chi = 60^\circ$  est exclue (énergie dipôle-dipôle négative pour une hélice  $\alpha$ ). Le tableau III donne les valeurs de l'énergie d'interaction dipôle-dipôle. On voit que les conformations  $\chi = 60^\circ$  (rot 2) et  $\chi = -60^\circ$  (rot 3) seront des configurations privilégiées pour les chaînes  $\beta$  antiparallèles, tandis que la configuration  $\chi = -60^\circ$  sera privilégiée pour l'hélice  $\alpha$ .

Structure	V (Kcal/mole)		
	$\chi = 60^\circ$	$\chi = 180^\circ$	$\chi = -60^\circ$
$\alpha$ hélice	- 0,5	+ 0,5	+ 0,1
$\beta$ antiparallèle	0	- 0,1	+ 0,1
$\beta$ parallèle	- 0,3	0	+ 0,1

TABEAU III

Or dans l'étude que nous avons menée en R.M.N. les rotamères trouvés à l'aide des constantes de couplages (pour les formes  $\beta$  //) correspondent à  $\chi = +60^\circ$  (45 %) ( $a_2$ ) et  $\chi = -60^\circ$  (55 %) (pH basique). Nous reprendrons ces résultats dans le prochain chapitre lié à l'étude en R.M.N.

Il semblerait donc, qu'à la suite des études de BIRSHTEN et de PITTSYN qu'un groupement carboxylique joue (au moins sous forme carboxylate) le rôle d'un hétéro-atome (O, S...) quant à son énergie d'interaction avec le squelette peptidique.

#### VI - CONCLUSIONS DE L'ETUDE MENEÉE EN RAYONS X.

Les résultats des rayons X nous ont permis de retrouver la même structure ( $\beta_2$  antiparallèle) pour le Poly-L-Aspartate de sodium solide que celle qui existe pour l'acide poly-L-Glutamique (neutre) obtenue par chauffage dans  $D_2O$ .

Ceci est un résultat très étonnant. Bien que les chaînes latérales interviennent pour une part importante dans la structure du polypeptide (structures secondaire et tertiaire), il semble que cela ne soit pas le seul facteur entrant en compte quant à la structure et aux paramètres cristallins, la chaîne latérale de l'acide poly- $\alpha$ -L-glutamique contenant un groupement  $CH_2$  supplémentaire par rapport à l'acide poly  $\alpha$ -L-Aspartique.

CHAPITRE V

ETUDES EN RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

## CHAPITRE V

### ETUDES EN RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

I - Rappels bibliographiques : Etude du système théorique ABX

A - Nomenclature des angles

B - Conformation générale des polypeptides

C - Etude théorique du système de spin  $AB\alpha$

II - Applications à l'acide Poly- $\alpha$ -L-Aspartique

A - Etude en résonance du proton en fonction du pH

B - Etude des déplacements chimiques en fonction de la concentration.

III - Etudes en solvant organique (DMSO)

A - Constantes de couplage  $J_{NH-CH^{\alpha}}^3$

B - Découplage des protons

C - Mise en évidence d'un "coude" (turn § II).

IV - Discussions,

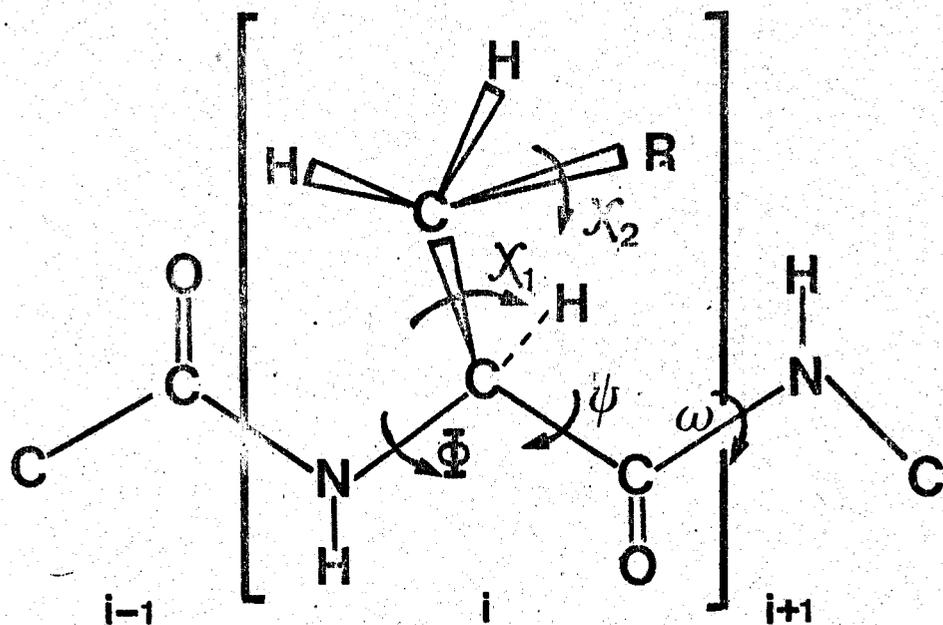


FIG V-1

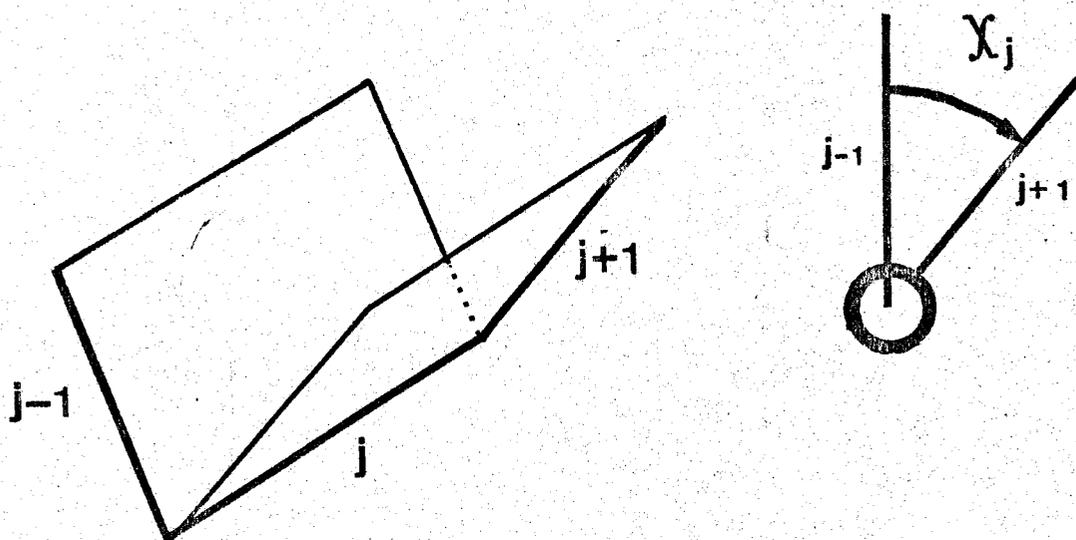


FIG V-2

I - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES. ETUDE THEORIQUE DU SYSTEME ABX  
(CH<sub>α</sub> - CH<sub>2β</sub>).

L'étude en résonance magnétique nucléaire (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) est une méthode puissante d'analyse des protéines et des polypeptides, en particulier dans l'analyse des constantes de couplage, des relations angulaires (faisant intervenir les angles φ, ψ, et χ) et des temps de relaxations caractéristiques d'un système donné.

De nombreuses études sur les polypeptides ont été menées par la RMN, et les mesures des angles φ, ψ, ω, χ<sub>j</sub> (fig. 1) grâce aux constantes de couplages ont permis de suivre des transitions chaîne statistique → hélice α ou encore d'étudier la position des chaînes latérales par rapport au squelette peptidique comme par exemple les études conformationnelles de BRADBURY, CARPENTER, ROBINSON et GOLDMAN (2) par les déplacements chimiques des différentes structures des esters de l'acide poly aspartique.

Avant d'exposer les résultats obtenus lors de l'analyse conformationnelle de l'acide poly α -L-aspartique, il est bon dans un premier temps de rappeler les caractéristiques conformationnelles des différentes structures secondaires connues, puis de faire une analyse théorique d'un spectre ABX car nous retrouverons ce type de spectre dans nos résultats expérimentaux.

A - Conventions et nomenclature.

La conformation du squelette et des chaînes latérales est bien déterminée par un certain nombre d'angles de torsion (fig. 1). L'angle de torsion τ (ABCD) des atomes A et D autour de la liaison B-C dans la molécule A-B-C-D est l'angle dièdre défini par les plans ABC et BCD (fig. 2). Il est positif lorsque regardant le long de la liaison B-C de B vers C, on fait tourner le plan ABC dans le sens des aiguilles d'une montre pour le superposer au plan BCD.

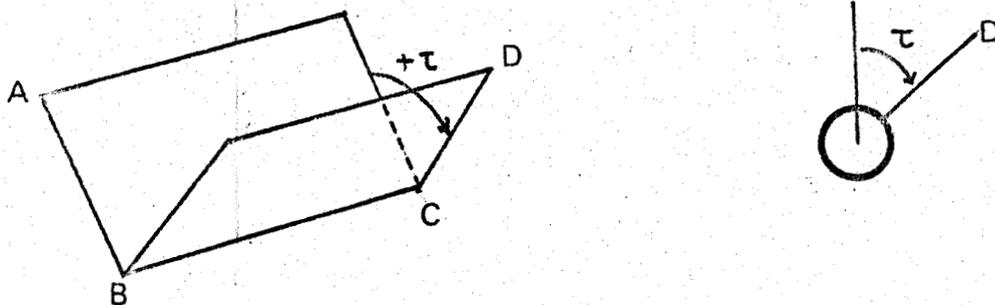
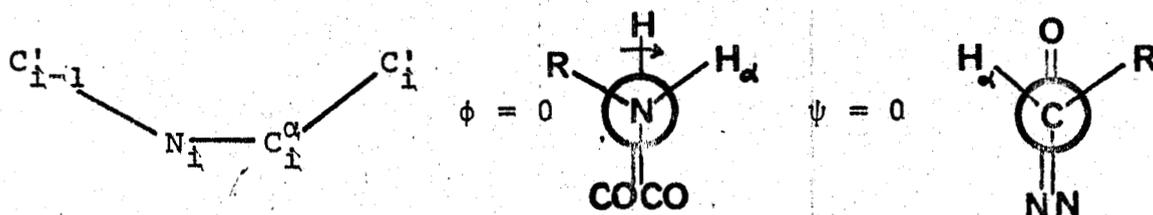


FIG V-2

Trois angles de torsion sont nécessaires pour décrire une unité peptidique (fig. 1).

$$\begin{aligned} \phi_i & (C'_{i-1} - N_i - C_i^\alpha - C'_i) \\ \psi_i & (N_i - C_i^\alpha - C'_i - N_{i+1}) \\ \omega_i & (O_i - C'_i - N_{i+1} - H_{i+1}) \end{aligned}$$

Dans la convention la plus récente (1970), les angles  $\phi_i$ ,  $\psi_i$ ,  $\omega_i$  sont égaux à  $180^\circ$  lorsque le squelette polypeptidique est plan et complètement étendu, la liaison peptidique étant sous forme trans. Ainsi dans cette nomenclature (Biochimie IUPAC-IUB 1970) un angle de torsion est nul lorsque les trois liaisons auxquelles il se rapporte sont coplanaires, la première et la troisième étant en position cis par rapport à la seconde.

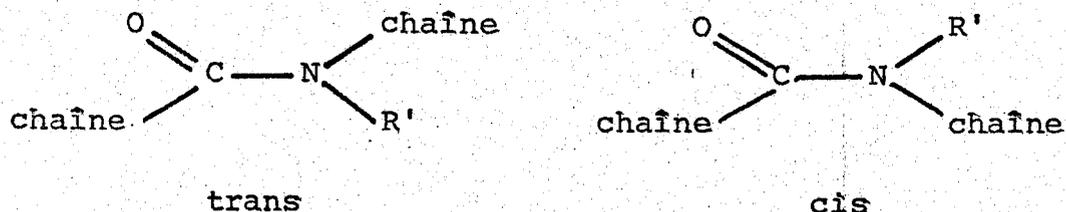


Pour les chaînes latérales (fig. 1), la désignation des atomes commence à partir du carbone  $\alpha$ . Les atomes lourds (O, C, N) sont repérés par les lettres grecques  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ .

L'angle de torsion autour de la  $j^{\text{ième}}$  liaison est appelé  $\chi_j$  et est compté positivement lorsque la  $(j-1)^{\text{e}}$  liaison tourne autour de la  $j^{\text{ième}}$  liaison dans le sens des aiguilles d'une montre pour éclipser la  $(j+1)^{\text{e}}$  liaison (fig. 2). La convention de 1970 adopte  $\chi_j = 0$  lorsque les liaisons  $j-1$ ,  $j$  et  $j+1$  sont coplanaires ( $j-1$  et  $j+1$ ) cis.

B - Conformations générales des polypeptides.

Pour les polyamino-acides, la conformation trans du groupement peptidique est largement préférée ( $R' = H$ )

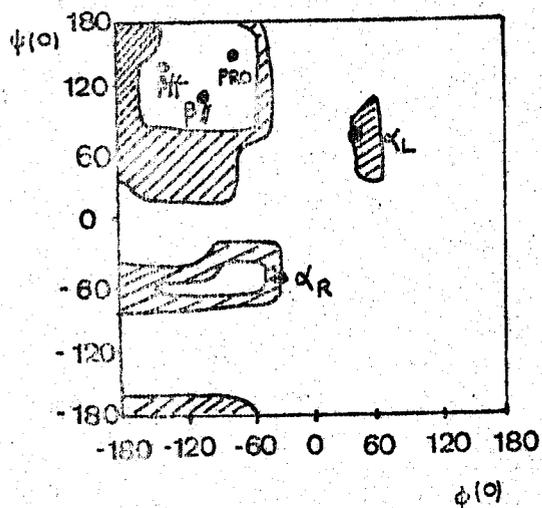


Le tableau I montre quelques systèmes de chaînes polypeptidiques suivant les angles de torsion (convention de 1970) (en degrés).

Squelette	$\phi^\circ$	Dièdre H-H $\phi''^\circ$	$\psi^\circ$	$\omega^\circ$
ZIGZAG plan	- 180	120	- 180	180
hélice droite ( $\alpha_D$ )	- 58	118	- 47	180
hélice gauche ( $\alpha_G$ )	58	0	47	180
$\beta$ antiparallèle ( $\beta_{//}$ )	- 140	160	135	180
$\beta$ parallèle ( $\beta_{\backslash\backslash}$ )	- 120	180	115	180
Poly Pro I	- 83		158	0
Poly Pro II (hélice $3_1$ )	- 78		149	180

TABLEAU I (réf 1)

Une carte conformationnelle peut être établie alors (convention 1970) (référence 3).



Les régions blanches sont les conformations totalement permises, extensibles aux régions hachées en "compressant" les atomes.

### C - Étude théorique du système de spin ABX

Un spectre ABX comme celui observé pour la chaîne latérale ( $C^{\alpha}H - CH_2^{\beta}$ ) se compose de 4 raies A, 4 raies B, 4 raies X et 2 raies de combinaison soit au total 14 raies (numérotées de 1 à 14).

Les signes relatifs des constantes de couplage affectent l'apparence d'un spectre ABX comme on peut le voir sur la figure 3, l'intensité et la position des transitions dépendant des signes relatifs de  $J_{AX}$  et  $J_{BX}$  mais étant indépendants du signe de  $J_{AB}$ .

La partie AB du spectre se compose de deux pseudo quartets qui peuvent se recouvrir partiellement ou totalement ou ne pas se recouvrir du tout. La partie X consiste en 6 raies symétriques par rapport à  $\nu_X$ .

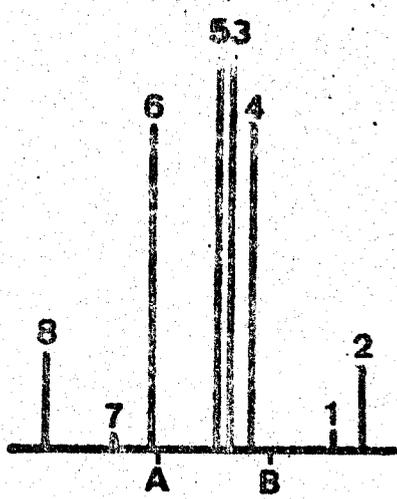
Il existe un certain nombre de relations entre les fréquences d'une part et les intensités d'autre part.

Pour la partie AB on a :

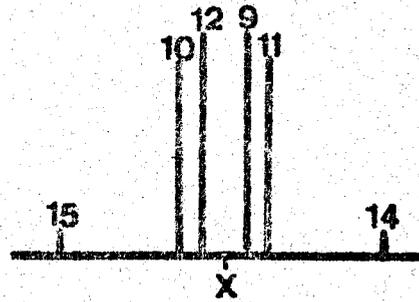
$$\nu_1 - \nu_3 = \nu_2 - \nu_4 = \nu_5 - \nu_7 = \nu_6 - \nu_8 = J_{AB}$$

$$\nu_1 - \nu_5 = \nu_3 - \nu_7 = 2 D^+$$

$$\nu_2 - \nu_6 = \nu_4 - \nu_8 = 2 D^-$$



(a)



$$\nu_A - \nu_B = 10$$

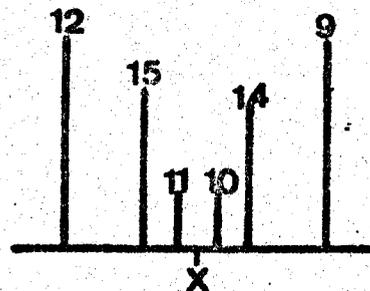
$$|J_{AB}| = 10$$

$$J_{AX} = 8$$

$$J_{BX} = -4$$



(b)

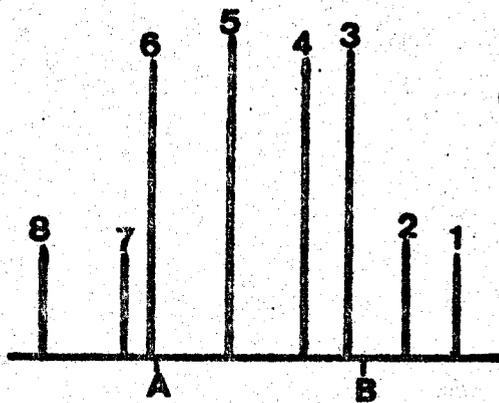


$$\nu_A - \nu_B = 2$$

$$|J_{AB}| = 2$$

$$J_{AX} = 8$$

$$J_{BX} = 16$$



(c)

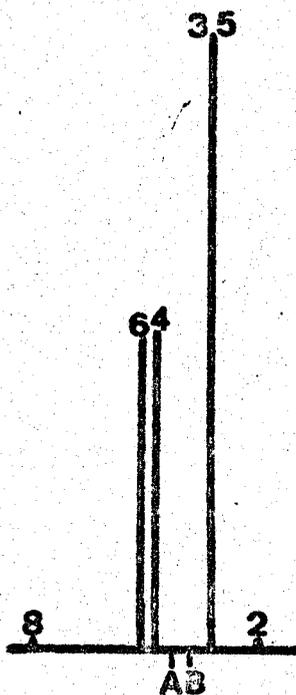


$$\nu_A - \nu_B = 20$$

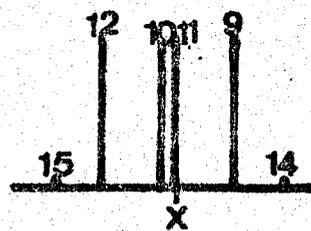
$$|J_{AB}| = 10$$

$$J_{AX} = 8$$

$$J_{BX} = 4$$



(d)



$$\nu_A - \nu_B = 2$$

$$|J_{AB}| = 10$$

$$J_{AX} = 8$$

$$J_{BX} = 4$$



figure v-3

Pour la partie X on a :

$$\nu_9 - \nu_{12} = J_{AX} + J_{BX}$$

$$\nu_{10} - \nu_{11} = 2(D+ - D-)$$

$$\nu_{13} - \nu_{14} = 2(D\ominus - D+)$$

L'intensité des raies est proportionnelle aux probabilités de transition rassemblées dans le tableau II.

De plus, on a les relations suivantes :

$$\frac{1}{2} (\nu_A - \nu_B) + \frac{1}{4} (J_{AX} - J_{BX}) = + \sqrt{D_+^2 - \frac{J_{AB}^2}{4}}$$

$$\frac{1}{2} (\nu_A - \nu_B) - \frac{1}{4} (J_{AX} - J_{BX}) = + \sqrt{D_-^2 - \frac{J_{AB}^2}{4}}$$

$$D_- \sin 2 \theta_- = \frac{J_{AB}}{2}$$

$$D_- \cos 2 \theta_- = \frac{\nu_A - \nu_B}{2} - \left( \frac{J_{AX} - J_{BX}}{4} \right)$$

$$D_+ \sin 2 \theta_+ = \frac{J_{AB}}{2}$$

$$D_+ \cos 2 \theta_+ = \frac{\nu_A - \nu_B}{2} + \left( \frac{J_{AX} - J_{BX}}{4} \right)$$

Ces relations permettant de calculer  $J_{AX}$ ,  $J_{BX}$ ,  $J_{AB}$ ,  $\nu_A - \nu_B$  etc... (Tableau II).

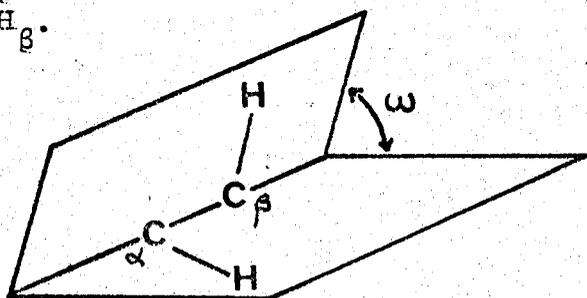


N°	F <sub>Z</sub>	Fonctions d'onde	N° raies transi- tions	Energie (en Hz) $\Sigma J = J_{AX} + J_{BX}$ $\nu = \nu_A + \nu_B$ $\nu_A = 667,3\text{Hz}$ $\nu_B = 661,3\text{Hz}$	Probabilités de transitions et intensités
1+3/2	$\alpha\alpha\alpha$		1	$\Sigma \nu / 2 + \Sigma \frac{J}{4} + \frac{J_{AB}}{2} + D_+$ 691,5	$1 - \sin 2\theta_+$ 0,47
2	$\alpha\alpha\beta$		2	$\Sigma \nu / 2 - \Sigma \frac{J}{4} + \frac{J_{AB}}{2} + D_-$ 687 Hz	$1 - \sin 2\theta_-$ 0,50
3+1/2	$\cos\theta_+ (\alpha\beta\alpha) + \sin\theta_+ (\beta\alpha\alpha) = 0,96 (\alpha\beta\alpha) + 0,28 (\beta\alpha\alpha)$		3	$\Sigma \nu / 2 \Sigma \frac{J}{4} + \frac{J_{AB}}{2} + D_+$ 675 Hz	$1 + \sin 2\theta_+$ 1,53
4	$-\sin\theta_+ (\alpha\beta\alpha) + \cos\theta_+ (\beta\alpha\alpha) = 0,28 (\alpha\beta\alpha) + 0,86 (\beta\alpha\alpha)$		4	$\Sigma \nu / 2 \Sigma \frac{J}{4} + \frac{J_{AB}}{2} + D_-$ 670 Hz	$1 - \sin 2\theta_-$ 1,5
5	$\cos\theta_- (\alpha\beta\beta) + \sin\theta_- (\beta\alpha\beta) = 0,97 (\alpha\beta\beta) + 0,26 (\beta\alpha\beta)$		5	$\Sigma \nu / 2 \Sigma \frac{J}{4} + \frac{J_{AB}}{2} - D_+$ 660 Hz	$1 + \sin 2\theta_+$ 1,53
6-1/2	$\sin\theta_- (\alpha\beta\beta) + \cos\theta_- (\beta\alpha\beta) = 0,26 (\alpha\beta\beta) + 0,97 (\beta\alpha\beta)$		6	$\Sigma \nu / 2 - \Sigma \frac{J}{4} + \frac{J_{AB}}{2} - D_-$ 653,4Hz	$1 + \sin 2\theta_-$ 1,50
7	$\beta\beta\alpha$		7	$\Sigma \nu / 2 \Sigma \frac{J}{4} - \frac{J_{AB}}{2} - D_+$ 643,1Hz	$1 - \sin 2\theta_+$ 0,47
8-3/2	$\beta\beta\beta$		8	$\Sigma \nu / 2 - \Sigma \frac{J}{4} - \frac{J_{AB}}{2} - D_-$ 636,5Hz	$1 - \sin 2\theta_-$ 0,50
9			9	$\nu_X + \Sigma \frac{J}{2}$ 1166,9Hz	1 1 1
10			10	$\nu_X + D_+ - D_-$ 1160,2Hz	$\cos^2 (\theta_+ - \theta_-)$ $\sim 1$
11			11	$\nu_X - D_+ + D_-$ 1162,2Hz	$\cos^2 (\theta_+ - \theta_-)$ $\sim 1$
12			12	$\nu_X - \Sigma \frac{J}{2}$ 1155,5Hz	1 1
13			13	$\nu_X + D_+ + D_-$ 1194,2Hz	$\sin^2 (\theta_+ - \theta_-)$ 0,14
14			14	$\nu_X - D_- - D_-$ 1128,3Hz	$\sin^2 (\theta_+ - \theta_-)$ 0,14

TABLEAU II

Constante de couplage  ${}^3J_{CH\alpha - C^\beta H_2}$

La conformation de la chaîne latérale d'un résidu est fonction de l'angle de torsion  $\chi_1$ . Il est intéressant de posséder une relation du type KARPLUS reliant la constante de couplage  ${}^3J_{\alpha\beta}$  entre le proton porté par le carbone  $\alpha$  et un proton attaché au carbone  $\beta$  de la chaîne latérale avec l'angle  $\omega$  du dièdre d'arête  $C_\alpha - C_\beta$  dont les faces s'appuient sur les liaisons  $C_\alpha - H_\alpha$  et  $C_\beta H_\beta$ .



KOPPLE, WILEY, TAUKE (4) ont proposé la relation suivante :

$$J_{\alpha\beta} = 11 \cos^2 \omega - 1,4 \cos \omega + 1,6 \sin^2 \omega$$

et  $\omega$  est relié à  $\chi_1$  par :

pour le proton  $H_{\beta_1}$   $\omega_1 = 360^\circ - \chi_1$

proton  $H_{\beta_2}$   $\omega_2 = 240^\circ - \chi_1$

En fait il existe trois valeurs privilégiées de l'angle  $\chi_1$  (rotamères 1 à 3) et  $J_{\alpha\beta}^3$  mesurée est une moyenne pondérée des constantes de couplages. On a ainsi un mélange dynamique de rotamères donnant plusieurs valeurs possibles de  $\chi_1$  comme nous allons le voir dans l'étude de l'acide poly L-Aspartique.

## II - RESULTATS, APPLICATIONS A L'ACIDE POLY $\alpha$ -L-ASPARTIQUE.

### A - Etude en résonance du proton en solution aqueuse en fonction du pH.

L'étude en R.M.N. en fonction du pH a été effectuée sur un appareil CAMECA (250 MHz à transformée de Fourier) dans  $D_2O$  à 1,5 % avec le D.S.S. comme référence.

La figure 4 montre le spectre enregistré. A haut champ vers 2,7 ppm on observe un massif contenant huit raies correspondant à la partie AB (protons  $CH_2\beta$ ) du système ABX ( $CH_\alpha - CH_2\beta$ ). Le pic  $\alpha$  CH quant à lui est sous la forme d'un triplet d'intensités (1:2:1). Le petit pic résonnant du plus bas champ est un pic de rotation de l'eau et non pas une raie attribuable au pic X ( $CH_\alpha$ ). Nous avons montré ce dernier point en corrigeant les phases et en employant diverses vitesses de rotation de l'échantillon. Les temps de conversion d'une structure secondaire en une autre sont de l'ordre de  $10^{-7}$  sec. Ils sont trop rapides pour que l'on puisse séparer le quadruplet  $\alpha$  CH d'intensité (1:3:3:1) en deux triplets d'intensité (1:2:1) représentant deux structures secondaires qui auraient un temps de vie beaucoup plus long que  $10^{-7}$  sec. C'est une question qui avait été soulevée par BRADBURY pour le Poly L-Aspartate de  $\beta$  benzyle (2) mais qui a été résolue par TAM et KLOTZ (9) en mélange solvant organique - solution aqueuse.

Le proton A est le proton de  $CH_2\beta$  qui résonne au plus bas champ (fig. 4) (constante de couplage  $J_{AX} < J_{BX}$ ). Le tableau III résume les valeurs des constantes de couplage (fig. 5 et fig. 6) et des déplacements chimiques en fonction du pH.

A titre de comparaison, la figure 5' montre les déplacements chimiques enregistrés pour l'acide poly L-glutamique dans  $D_2O$  (8). On voit qu'en pH basique (chaîne non ordonnée) le proton  $CH_\alpha$  résonne à plus faible champ qu'en milieu acide (hélice  $\alpha$ ), à l'inverse de l'acide poly  $\alpha$  L aspartique qui résonne

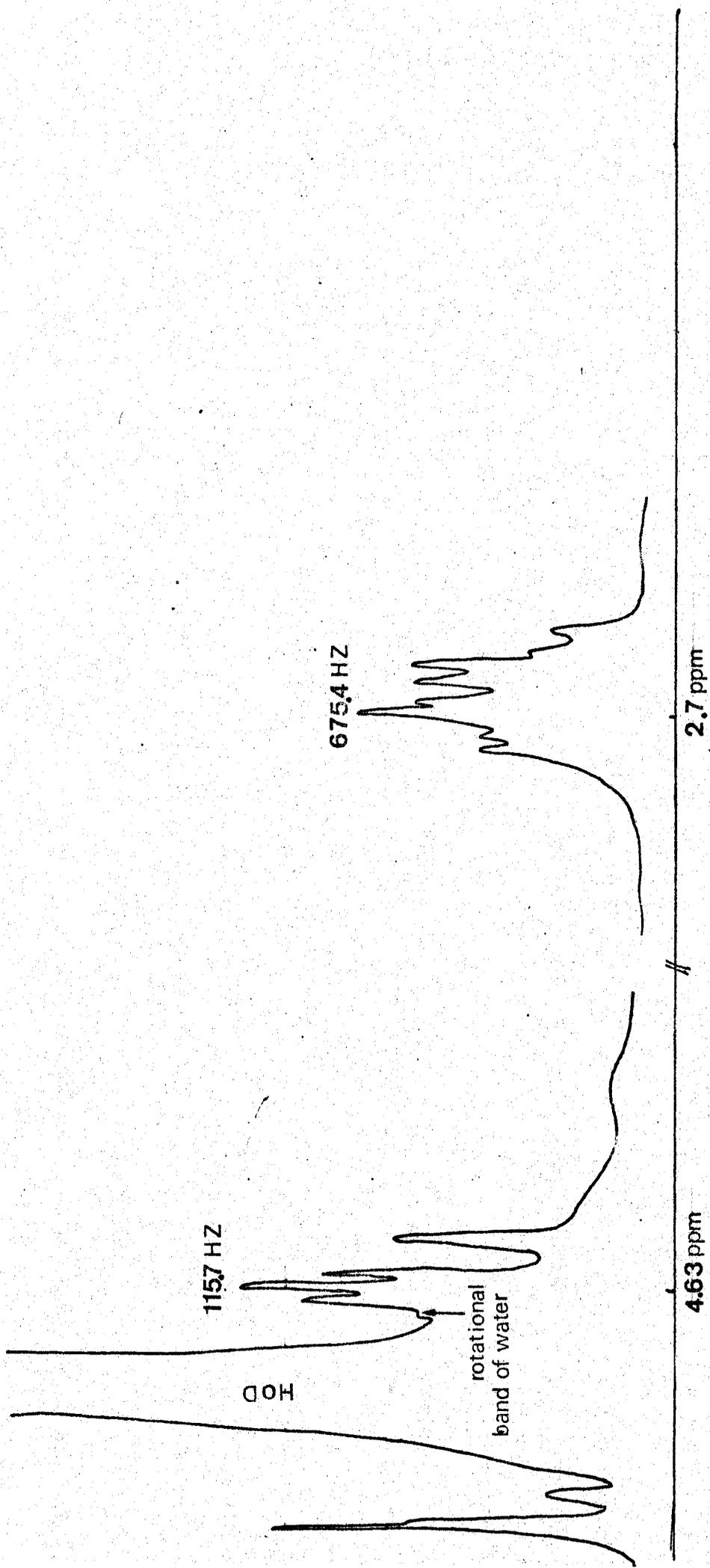


FIG V-4 [L-ASP Na]<sub>n</sub>

PD 12



BUS  
LILLIE

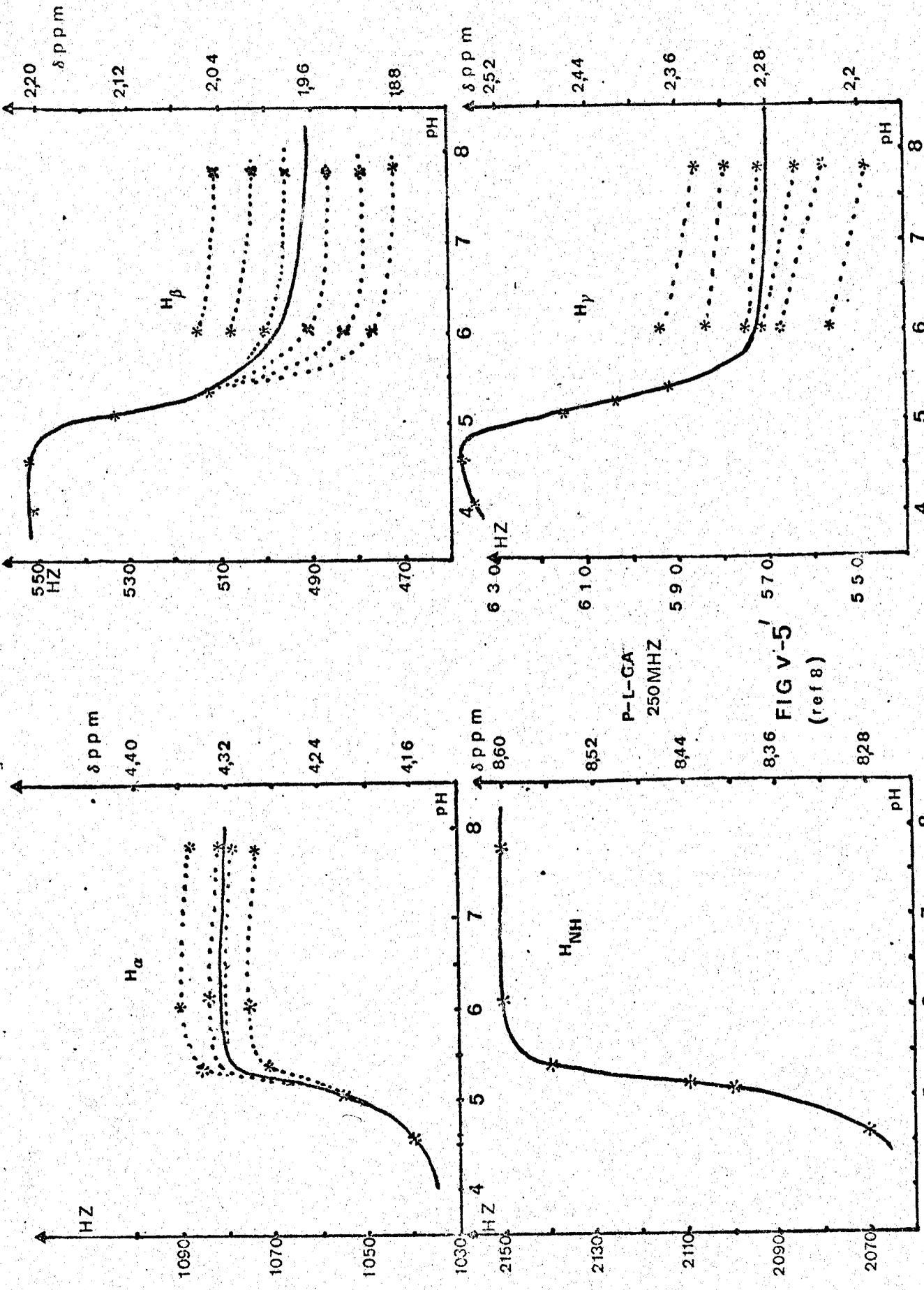


FIG V-5  
(ref 8)

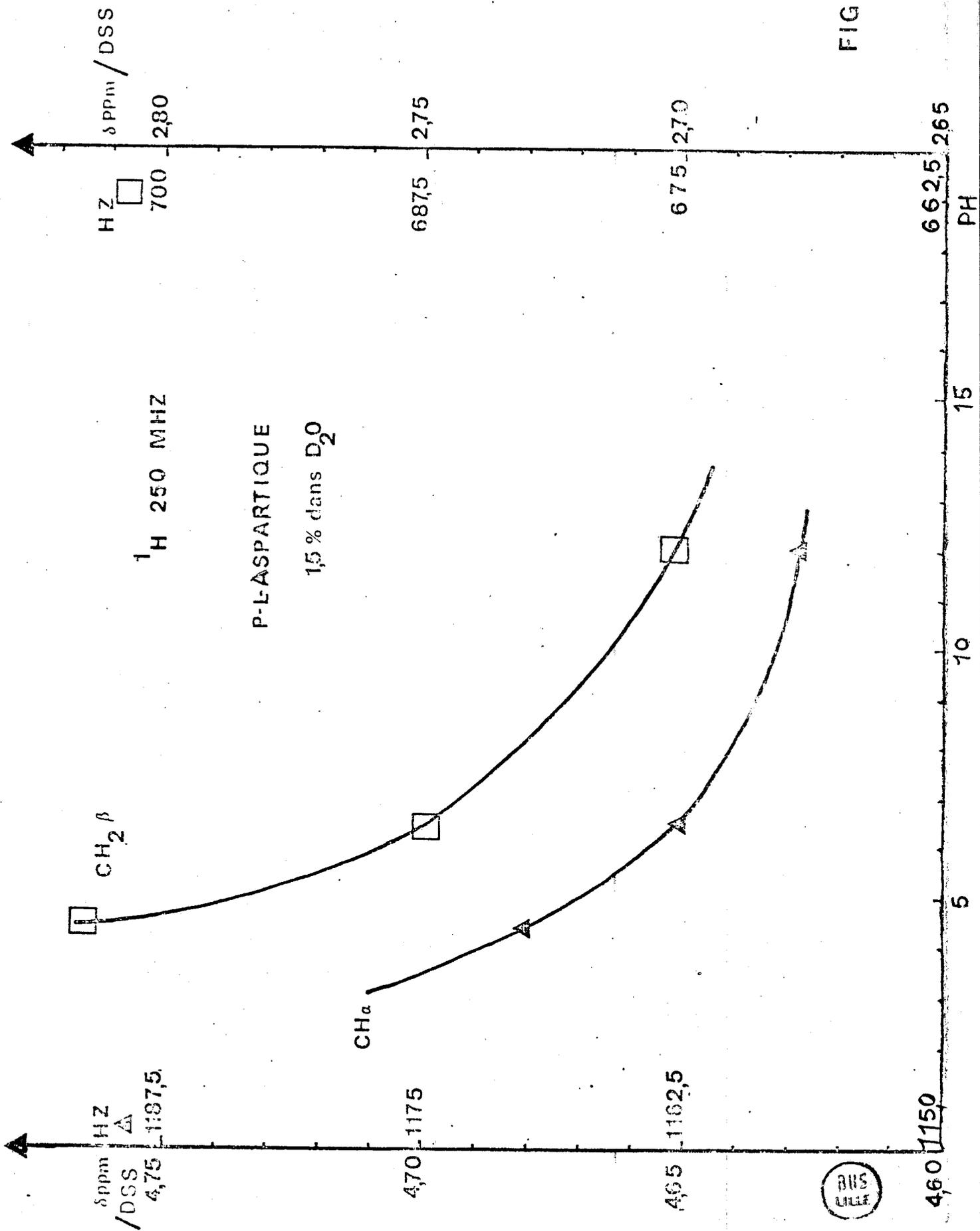


FIG V-5

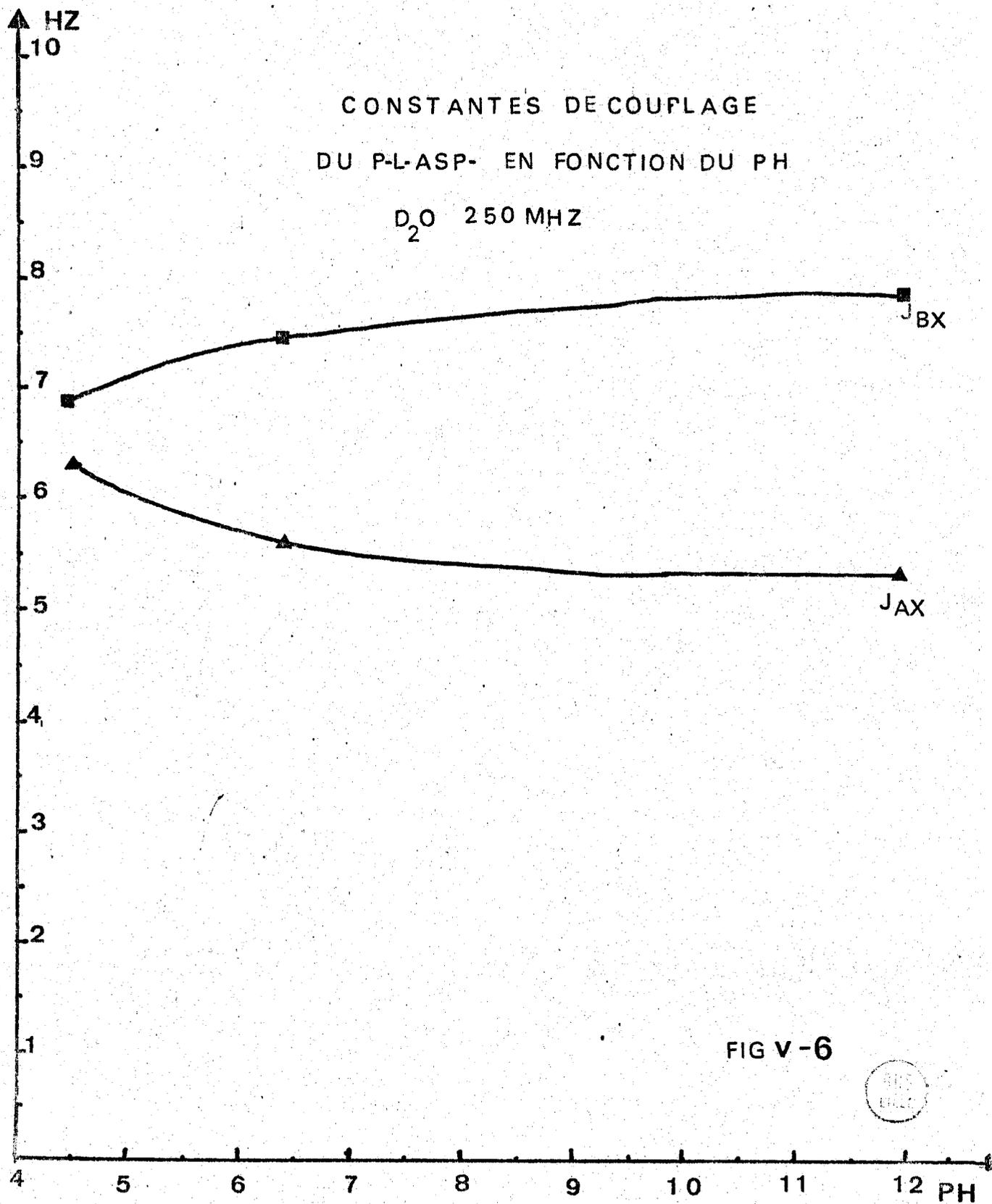


FIG V-6



à plus bas champ en milieu acide (distances interfeuillet plus grandes pour les formes  $\beta$  antiparallèles en milieu acide).

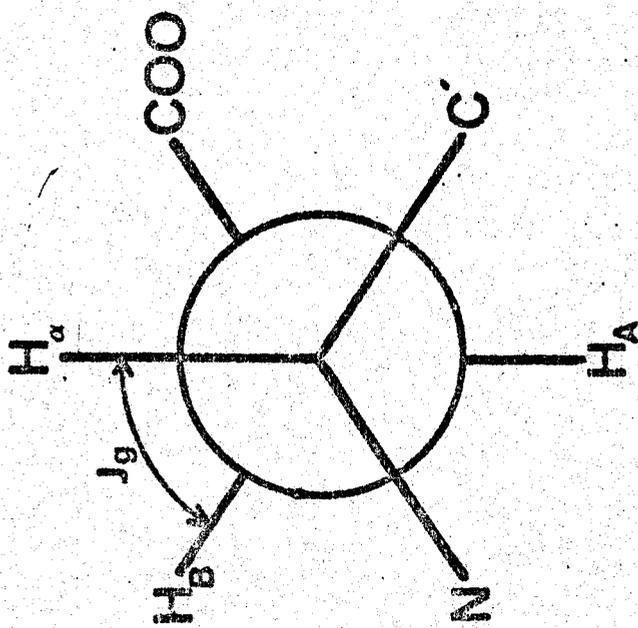
pD	12	6,4	4,6
$J_{AX}$ (Hz)	5,3	5,67	6,3
$J_{BX}$ (Hz)	7,86	7,45	6,9
$J_{AB}$ (Hz)	16,3	15,25	13,80
$\delta$ $CH_{\alpha}$ (ppm)	4,63	4,65	4,68
$\delta$ $CH_2 \beta$ (ppm)	2,7	2,75	2,82

TABLEAU III

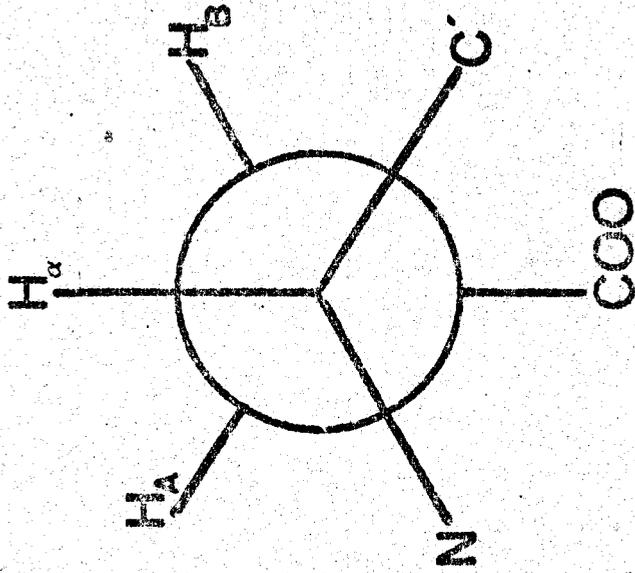
On remarque que les déplacements des protons  $CH_2 \beta$  sont plus grands que celui du carbone en  $\alpha$  (fig. 5). Le spectre enregistré est compatible avec le système étudié (formes  $\beta$  antiparallèles). En effet le proton  $\alpha$  conserve son environnement tandis que les protons  $CH_2 \beta$  changent leur orientation en fonction du pH. Cependant nous avons plusieurs formes en présence, c'est par l'analyse des chaînes latérales et la proportion des rotamères en présence que nous pourrions examiner les structures existantes.

B - Etude de la conformation des chaînes latérales.

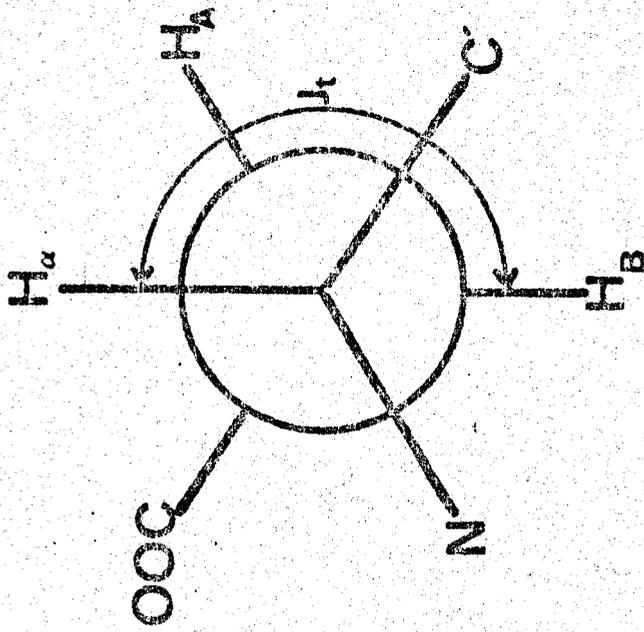
Il est intéressant d'utiliser les constantes de couplage vicinales  $J_{\alpha-\beta}^3$  pour obtenir des informations sur les configurations permises autour de la liaison  $CH_{\alpha} - CH_2 \beta$ . On peut représenter simplement les conformations en termes de trois rotamères (fig. 7), dont les proportions (ou temps de vie dans une configuration précise) sont  $a_1$ ,  $a_2$  et  $a_3$ .



Rotamère 1



Rotamère 2



Rotamère 3

figure 7



Les valeurs prises par BRADBURY et collaborateurs (2) de  $J_t$  et  $J_g$  pour le groupement moléculaire  $C - CH_2 - CH - (NH_2) - CO_2^-$  (résidu aspartique) sont  $J_t = 13,6$  Hz et  $J_g = 2,6$  Hz (PASCHLER (5) ).

D'une façon générale pour une constante de couplage  $J_{H_\alpha H_\beta}$  on a :

$$J_{H_\alpha H_\beta} \text{ observé} = a_1 J_1 + a_2 J_2 + a_3 J_3$$

$$\text{avec } a_1 + a_2 + a_3 = 1$$

$J_1, J_2, J_3$  sont les constantes de couplage associées au proton H respectivement dans les rotamères 1, 2 et 3.

Pour connaître le poids statistique des différents rotamères il faut connaître les constantes de couplage  $J_g$  et  $J_t$  (on suppose que  $J_g$  et  $J_t$  ont la même valeur quel que soit le rotamère considéré), alors :

$$a_1 = \frac{J_{H_\alpha H_{\beta 1}} - J_g}{J_t - J_g} \qquad a_2 = \frac{J_{H_\alpha H_{\beta 2}} - J_g}{J_t - J_g}$$

Lors de l'analyse du Poly L-aspartate de benzyle, BRADBURY (2) a montré que  $a_2 = 0$  lorsque le polymère est sous forme hélice  $\alpha$  gauche. Alors,

$$J_{H_\alpha H_{\beta 1}} + J_{H_\alpha H_{\beta 2}} = J_g + J_t \quad (a_2 = 0)$$

ce qui n'a pas été vérifié. Il conclut que les chaînes latérales du PLAB sont en rotation rapide entre les rotamères 1 et 3 (le rotamère 3 a été mis en évidence en dichroïsme infra rouge par la vibration du  $CH_2$  bending à  $1416 \text{ cm}^{-1}$ )

Résultats pour l'acide poly  $\alpha$  L aspartique

Avec les constantes de couplages  $J_t = 13,6$  Hz et  $J_g = 2,6$  Hz, la relation  $J_{AX} + J_{BX} = J_t + J_g$  en faisant  $a_2 = 0$

ne se vérifiait qu'en pH basique. Or cette solution était tout à fait à l'encontre des observations faites en rayons X pour lesquelles, dans la forme  $\beta$  antiparallèle compacte ( $\beta_2 \neq$ ), les groupements carboxylates étaient perpendiculaires à l'axe de la chaîne (rotamère 2). Nous avons repris les travaux de KAÏNOSHO et AJISAKA (6). Ces chercheurs ont effectué une analyse conformationnelle d'acides-amino et de peptides en utilisant des substitutions isotopiques spécifiques afin d'attribuer des constantes de couplages non ambiguës aux protons  $\text{CH}_2 \beta$ . A partir de leur analyse des populations pour l'acide L-aspartique dans différents états ioniques, nous avons trouvé les valeurs suivantes :

$$J_t = 13,52 \text{ Hz} \qquad J_t = 13,6 \text{ Hz pour BRADBURY (2)}$$

$$J_g = 5,19 \text{ Hz} \qquad \text{et } J_g = 2,6 \text{ Hz} \quad " \quad "$$

à partir des relations  $J_{H_\alpha H_\beta} = \sum_{i=1}^3 a_i J_i^\beta$  et des constantes de couplages trouvés par eux (6)

(4 Hz et 9,85 Hz en milieu basique  
4,2 Hz et 6,4 Hz en milieu acide).

Le tableau IV suivant résume les poids statistiques des rotamères obtenus à partir de ces nouvelles valeurs de  $J_t$  et  $J_g$  en utilisant nos résultats expérimentaux.

PD rotamères	4,6	6,4	12	conformation suivant BIRSHTEIN (voir ch IV)
$a_1$	0,13	0,06	< 0,01	$\chi$ 180
$a_2$	0,20	0,26	0,43	$\chi$ 60
$a_3$	0,66	0,66	0,56	$\chi$ - 60

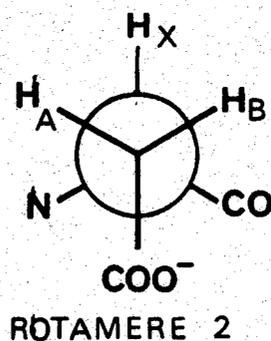
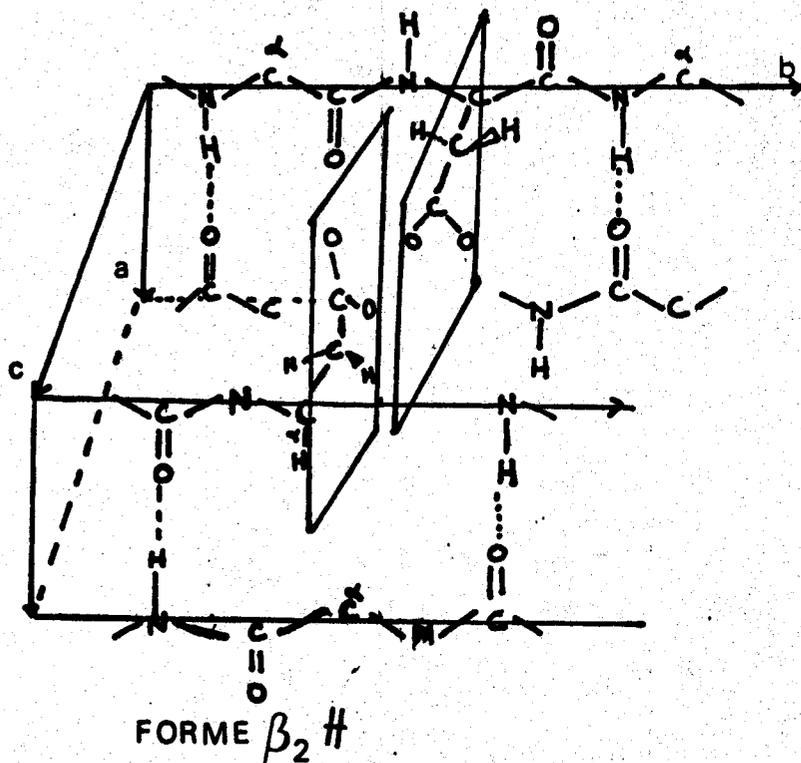
TABLEAU IV

Poids statistique des rotamères  
Comparaison de nos valeurs avec les valeurs de  $\chi$  selon BIRSHTEIN

(à noter qu'à pH 4,6 dans  $D_2O$ , tous les groupements carboxylates ne sont pas neutralisés ( $a_2 = 0,2$ )).

On voit qu'en milieu basique on se trouve en présence de deux structures, montrées par les rotamères 2 et 3. Le rotamère 2 est compatible avec la structure  $\beta_2 \#$  (groupements carboxylates) perpendiculaires à l'axe b de la chaîne, les protons  $CH_2 \beta$  s'étendant de chaque côté de ce plan (fig. 8).

fig v-8

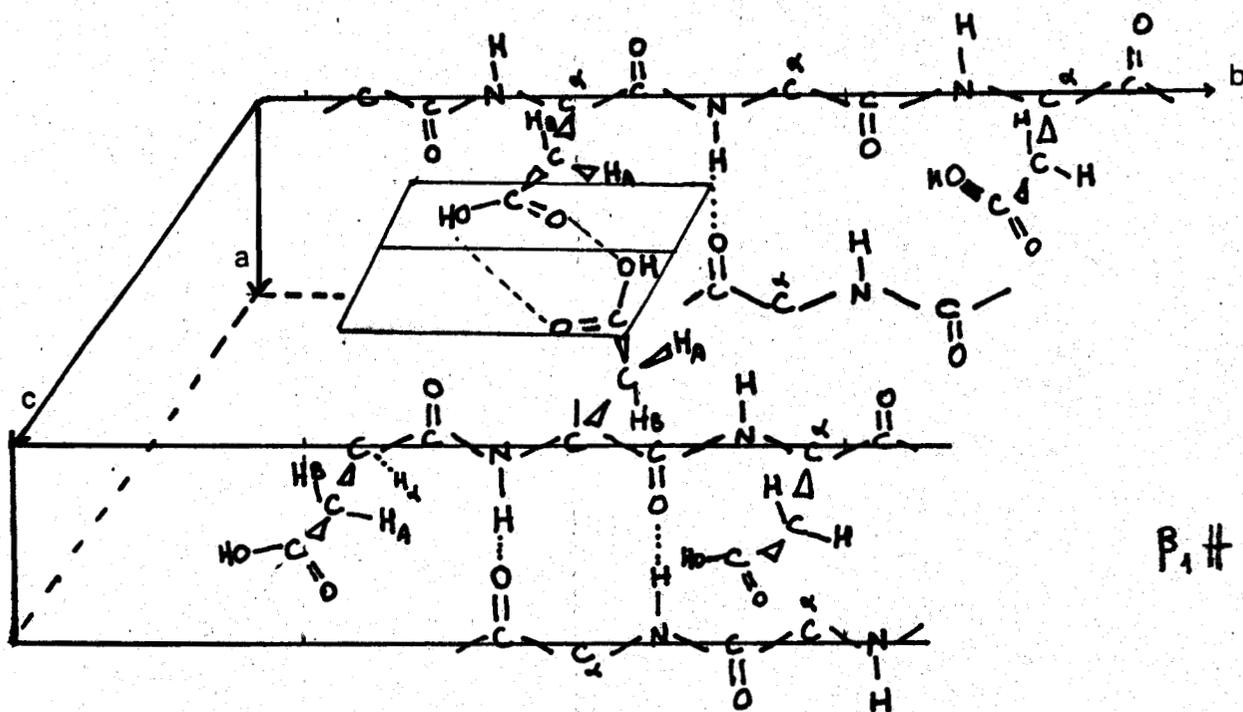


En milieu basique le rotamère 1 est totalement absent, le rotamère 3 est dû aux structures conformationnelles autres que les chaînes antiparallèles (Par dichroïsme circulaire et RMN on

montre que la forme  $\beta_2$  // représente 45 % environ des résidus du polymère, or  $a_2 = 0,43$ ).

$a_1$  passe d'une valeur nulle en milieu basique à 0,13 en PD acide. Ce rotamère correspond à la conformation  $\chi_{180}^\circ$  de BIRSHTEIN, c'est-à-dire une conformation peu stable à cause des interactions dipôle-dipôle entre chaînes latérales.

Par contre le poids du rotamère 3 augmente en pH acide. En considérant un modèle moléculaire, on voit que le plan des groupements carboxyliques neutre peut s'étendre dans le plan c du réseau monoclinique parallèlement à l'axe b de la chaîne et être stabilisé par formation de liaisons hydrogènes (fig. 9).



$\beta_1$  //

ROTAMERE 3

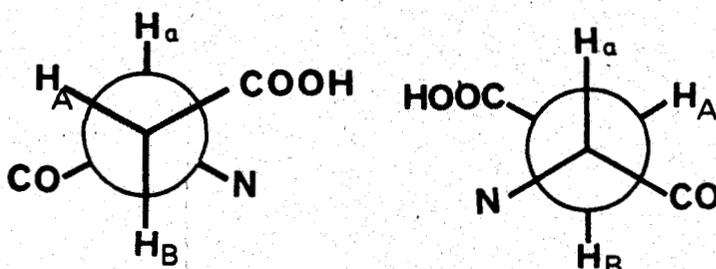


fig v-9

BRADBURY et coll. (2) n'ont pu décider complètement de la prépondérance d'un des deux rotamères en équilibre rapide 1 ou 3. Leur analyse en dichroïsme infra-rouge ne leur avait révélé que la présence du rotamère 3 (1416  $\text{cm}^{-1}$  bande // forte due au  $\text{CH}_2$  bending). Dans nos spectres infra-rouge (milieu dilué), en milieu basique comme en milieu acide on a une bande à 1420  $\text{cm}^{-1}$  de forte intensité compatible avec le mode  $\text{CH}_2$  bending d'un rotamère 3. Le rotamère 3 a ses groupements carboxyliques parallèles à l'axe b de la chaîne peptidique, ceux-ci étant coplanaires permettant des liaisons hydrogènes interfeuillet (forme  $\beta_1$  ~~4~~)

En conclusion, nous retrouvons une conformation des chaînes latérales attendue grâce aux résultats des rayons X et compatible avec les formes  $\beta$ -antiparallèles en milieu basique et acide.

Le rotamère 3 permet des liaisons H entre l'hydroxyde du groupe carboxylique et le proton amide pour former des cycles en  $\text{C}_7$ .

### C - Etude en fonction de la concentration

Il nous a paru intéressant d'étudier les effets d'agrégation par RMN afin de mettre en évidence les interactions inter ou intramoléculaires selon que l'on se trouve en milieu concentré ou dilué.

Pour cela, nous nous sommes basés sur une idée de SCHWARTZ et FASMAN (7). Ces derniers ont étudié un copolymère  $(\text{DLLys})_{10}-(\text{VAL})_{20}-(\text{DLLys})_{10}$  ; à l'aide de mesures de temps de relaxation spin réseau et des rapports  $R_{\text{NH}}$  et  $R_{\text{CH}}$  avec :

$$R_{\text{NH}} = \frac{\text{Surface du pic } \text{NH}_3^+ \text{ Lysine}}{S(\text{NH groupe amide})}$$

et

$$R_{\text{CH}} = \frac{S(\text{CH}_3 \text{ VAL})}{S(\text{CH}_2 \text{ Lys})}$$

ils ont pu donner un modèle correspondant à des associations

intramoléculaires en milieu dilué (les blocs DL Lysine interagissant avec la structure  $\beta$  L-Valine).

La figure 10 nous montre les déplacements chimiques observés pour le  $\alpha$  CH et le  $\beta$  CH<sub>2</sub> en fonction de la concentration en milieu basique. Les spectres ont été effectués sur un appareil 90 MHz H-PERKIN-ELMER R 32.

En mesurant le rapport relatif des pics  $\alpha$  CH et  $\beta$  CH<sub>2</sub> correspondant à la structure  $\beta$  antiparallèle, en fonction de la concentration, on voit que ce rapport tend vers 0,25 en milieu dilué alors qu'il tend vers 0,4 en milieu concentré (valeur théorique : 0,5). Ce rapport est une mesure de l'effet chaîne latérale - squelette peptidique. Il doit tendre vers sa valeur théorique lorsque la chaîne est libre. Il correspond au coefficient  $R_{NH}$  de SCHWARTZ et FASMAN.

Ainsi, il apparaît qu'en milieu concentré (à partir de 3 % environ et au-dessus) les interactions sont de nature intermoléculaire tandis qu'en milieu dilué (à partir de 1,5 - 1 % et en dessous) les interactions sont de nature intramoléculaire. La figure 11 illustre ce système.

Les études en infra-rouge ont montré qu'en milieu concentré, il pouvait exister des chaînes  $\beta$  parallèles ( $\beta //$ ) incluses dans la structure  $\beta \nparallel$  (I.R. Am I' à 1635 cm<sup>-1</sup>).

De plus les mesures de constantes de sédimentation n'ont donné de résultat que pour une concentration élevée (10 mg/l) avec  $S = 1,1$  Svedberg, et il n'a pas été possible d'avoir la constante de sédimentation pour de faibles concentrations de l'ordre de 0,08 % (0,8 mg/l) pour la comparer à la valeur obtenue à concentration élevée et en tirer des renseignements sur l'existence de liaisons intermoléculaires.

Ce qui paraît intéressant, c'est la possibilité qu'a la chaîne  $\beta \nparallel$  en milieu dilué de se recourber. Les études RMN étant faites en milieu dilué (3 % et moins), on peut s'attendre à voir apparaître en milieu organique (DMSO) (lorsque les protons NH ne sont plus échangés avec D<sub>2</sub>O, les pics NH apparaissant) des pics

BUS  
LILLE

$\frac{SCH_{\alpha}}{SCH_{2\beta}}$

$\delta CH_{\alpha}$  ppm  
 $\delta CH_{2\beta}$  ppm

4,8  
4,7  
4,6  
4,5  
4,4  
4,3  
4,2  
4,1  
4,0

0,4

0,3

0,2

mg/ml

$\delta CH_{\alpha}$

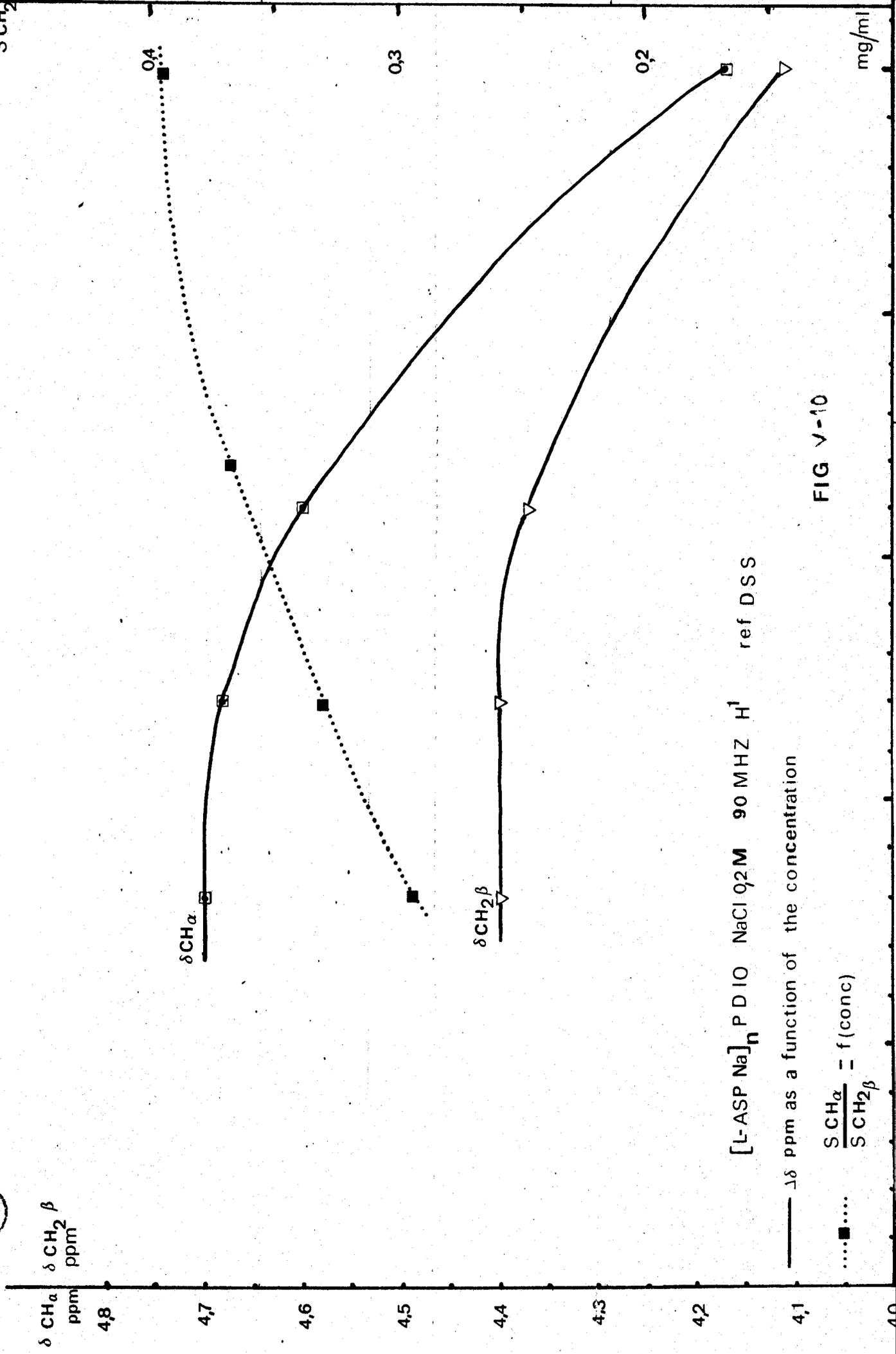
$\delta CH_{2\beta}$

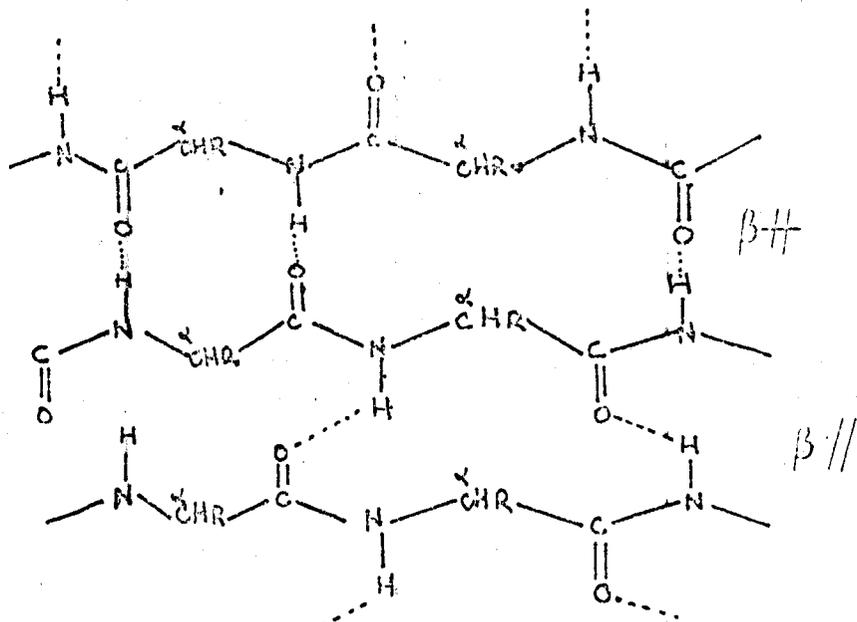
[L-ASP Na]<sub>n</sub> P D I O NaCl 0,2 M 90 MHz H<sup>1</sup> ref DSS

—  $\Delta\delta$  ppm as a function of the concentration

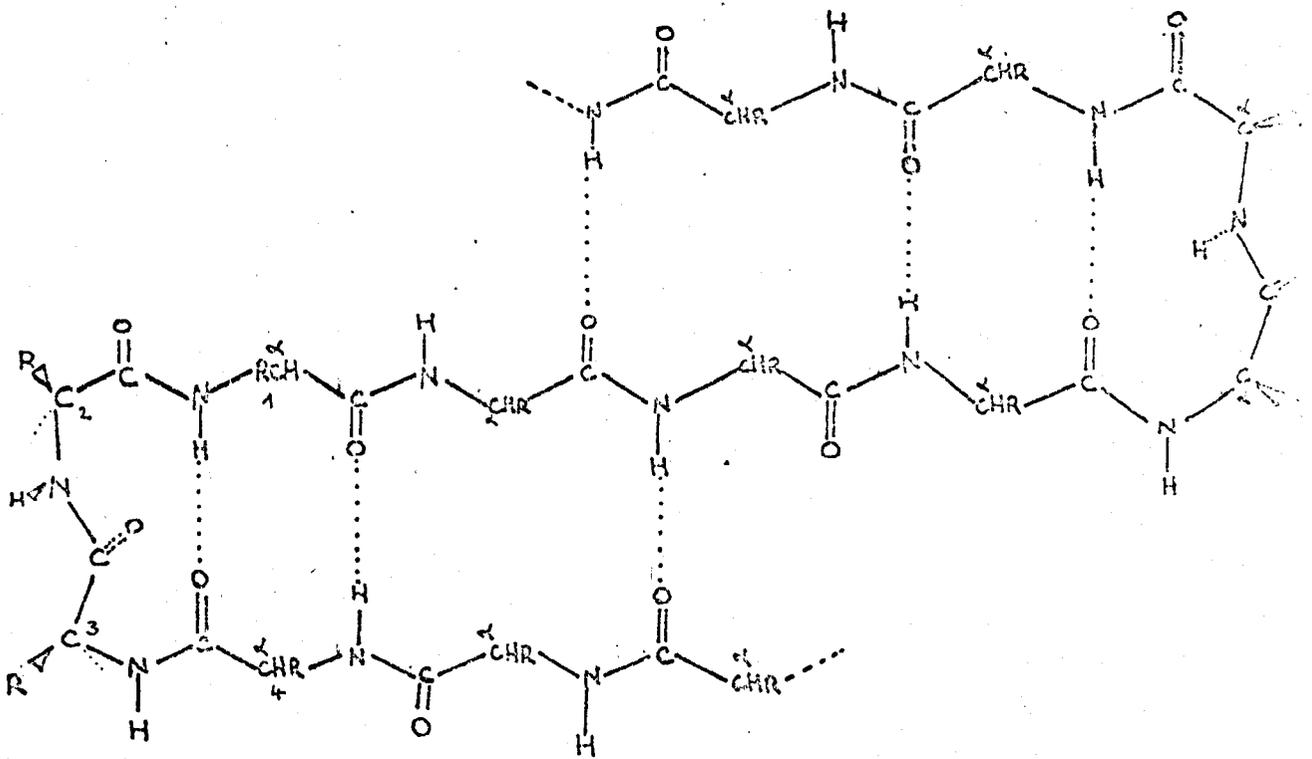
.....  $\frac{SCH_{\alpha}}{SCH_{2\beta}} = f(\text{conc})$

FIG V-10





CHAINES  $\beta$  A LIAISONS HYDROGENE INTERMOLECULAIRES



CHAINE  $\beta$  A LIAISONS HYDROGENE INTRAMOLECULAIRES  
SE REPLIANT SUR ELLE-MEME PAR  $\beta$  TURNS (TYPE  $\beta_{II}$ )

caractéristiques de ces "turns". C'est l'étude que nous allons entreprendre maintenant avec l'évaluation des constantes de couplage  $J_{\alpha\text{CH-NH}}$ .

### III - ETUDE EN SOLVANT ORGANIQUE

#### A - Constante de couplage ${}^3J_{\text{NH-CH}^\alpha}$

Les premiers travaux théoriques visant à relier une constante de couplage  ${}^3J$  avec la géométrie de la molécule ont été faits par KARPLUS sur les dérivés de substitution de l'éthane (10) et (11). Ils se traduisent par une relation trigonométrique faisant intervenir l'angle  $\theta$  du dièdre formé par les plans H - C - C' et C - C' - H' de la molécule

$$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{H}' \\ | & & | \\ \text{C} & - & \text{C}' \\ | & & | \\ \text{H} & & \text{H}' \end{array}$$

et la valeur expérimentale de la constante de couplage  ${}^3J_{\text{CH-C}'\text{H}'}$

$${}^3J_{\text{CH-C}'\text{H}'} = A + B \cos \theta + C \cos 2 \theta$$

Il est apparu intéressant à de nombreux chercheurs d'établir une relation analogue pour la constante de couplage  ${}^3J_{\text{NH-}\alpha\text{CH}}$  entre le proton de la liaison amide et l'hydrogène en  $\alpha$ .

BYSTROV et ses collaborateurs expriment  $J_{\text{NH-CH}_\alpha}$  en fonction de  $\theta$  ( $\theta$  angle du dièdre d'arête N - C (fig. 12) par une relation du type :

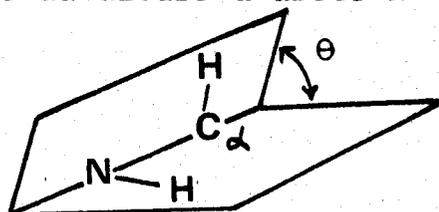


FIG V-12

$$J_{\text{NH-}\alpha\text{CH}} = A \cos^2 \theta - B \cos \theta + C \sin^2 \theta$$

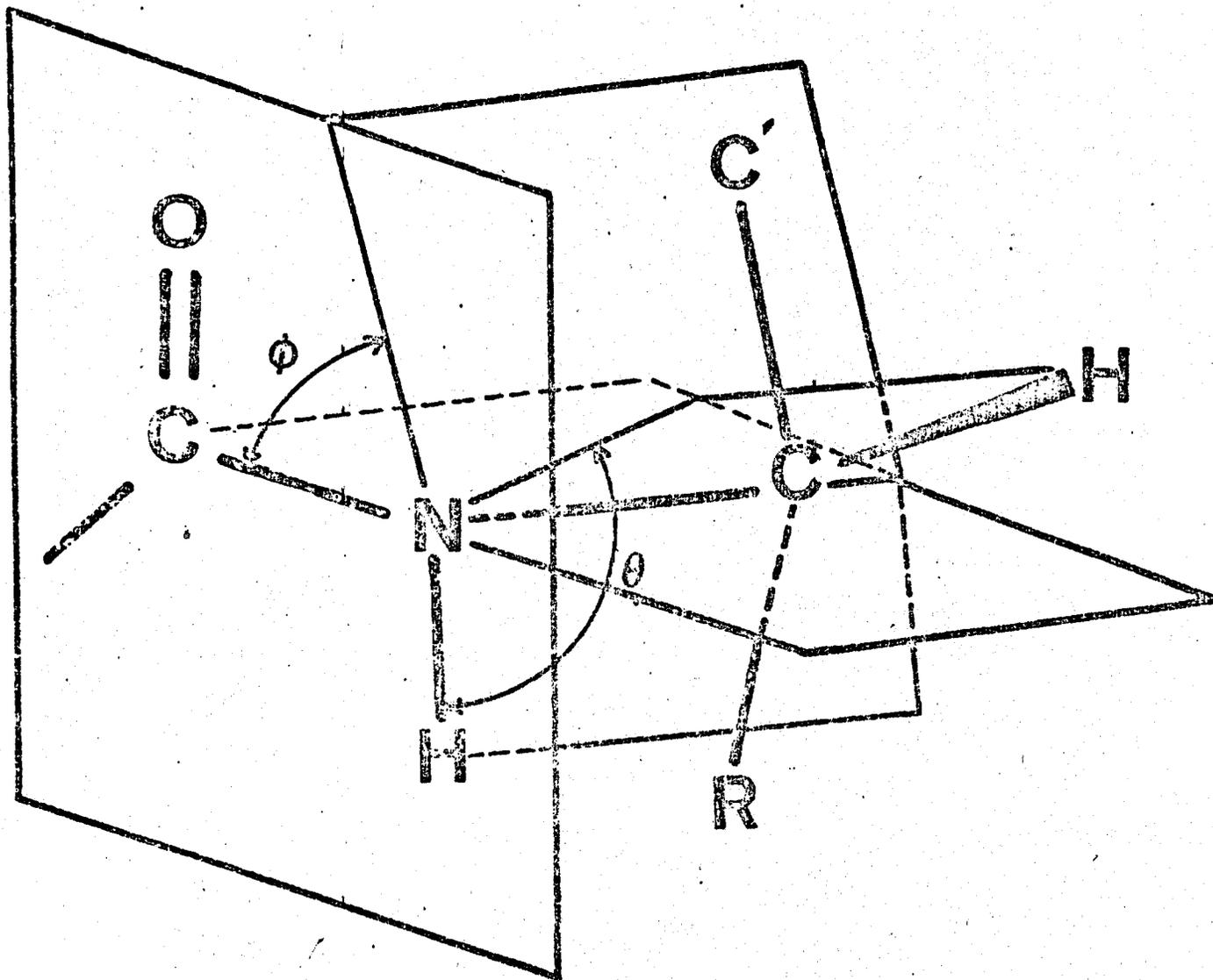


FIGURE V-13



entre l'angle  $\theta$  et l'angle de torsion  $\phi$  on a

$$\theta = |\phi - \phi| \quad \text{avec } 0 < \theta < 180^\circ \quad (\text{fig. 13})$$

CUNG, MARRAUD, NEEL (12), en se basant sur l'étude d'amides modèles (cycliques et rigides) reconsidèrent le problème et proposent :

$$J_{\text{corr}}(\theta) = (4,55 \pm 0,25) \cos 2\theta - (3,55 \pm 0,35) \cos \theta + (4,8 \pm 0,1)$$

soit :

$$J_{\text{corr}}(\theta) = (0,1 \pm 0,5) \cos^2 \theta - (3,55 \pm 0,35 \cos \theta) + (0,25 \pm 0,35)$$

avec

$$J_{\text{corrigée}} = J_{\text{exp}} \left(1 - a \sum_i \Delta E_i\right)^{-1}$$

$J_{\text{exp}}$  : valeur expérimentale de la constante de couplage  ${}^3J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}}$

$E_i$  : différence d'électronégativité entre le substituant  $i$  et l'hydrogène.

$a$  : coefficient proche de 0,1

BALASHOVA, OVCHINNIKOV (13) ont proposé

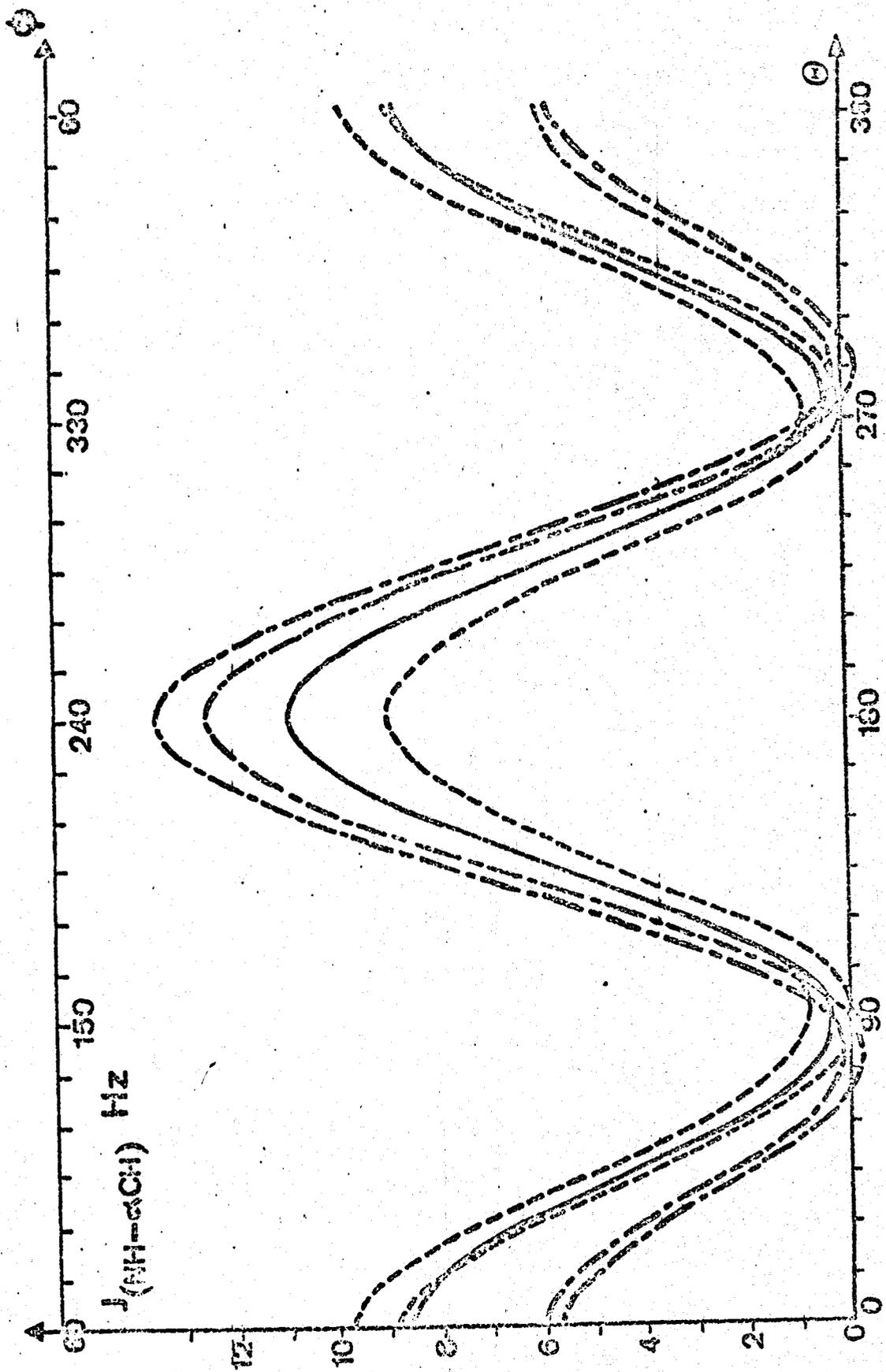
$$J_{\text{corr}} = 9,4 \cos^2 \theta - 1,1 \cos \theta + 0,4$$

avec

$$J_{\text{corr}} = 1,09 J_{\text{exp}} \quad (\text{figure 14}).$$

Selon BOVEY (1) la relation précédente est valable sans correction pour des valeurs  $J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}}$  comprises entre 0,5 et 11 Hz.

On a représenté fig. 14 les fonctions  $J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}} = f(\theta)$



--- selon CUNG · MARRAUD · NEEL

--- selon BYSTROV et ses collaborateurs

— selon BALASHOVA et OVICHINNIKOV

FIGURE V.14



D'autres auteurs comme RAMACHANDRAN et R. CHANDRASEKARAN (14) se basant sur des modèles tels les N-acetylamino acides N méthylamides ont trouvé une relation de la forme :

$$J(\theta) = 7,9 \cos^2 \theta - 1,55 B \cos \theta + 1,35 \sin^2 \theta$$

et l'ont appliquée aux couplages  $J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}}$  pour la gramicidine S.A. A partir de ces résultats, NEMETHY et PRINTZ (15) en ont tiré des constantes de couplages théoriques de "turns"  $\beta$  et  $\gamma$  présents dans les protéines.

Il est à remarquer cependant que dans un mélange dynamique de rotamères, la constante de couplage mesurée est en fait une moyenne pondérée des constantes de couplage correspondant à différents rotamères.

$$J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}}^{\text{observé}} = \langle J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}} \rangle = \frac{\int e^{-\frac{V(\phi, \psi, \chi_1, \dots, \chi_n)}{kT}} d\phi d\psi d\chi_1 \dots d\chi_n}{\int e^{-\frac{V(\phi, \psi, \chi_1, \dots, \chi_n)}{kT}} d\phi d\psi d\chi_1 \dots d\chi_n}$$

avec  $V(\phi, \psi, \chi_1, \dots, \chi_n)$  énergie potentielle de la conformation décrite par les angles  $\phi, \psi, \chi_1, \dots, \chi_n$ .

$\int$  est l'intégration sur l'espace des degrés de liberté.

La valeur de  $V(\phi, \psi, \chi_1, \dots, \chi_n)$  est donnée par l'analyse conformationnelle, et  $J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}}$  conduit à deux ou quatre valeurs de  $\phi$ .

Des calculs théoriques (16) (17) suggèrent que la présence d'un doublet électronique libre sur l'atome d'azote et que l'existence d'une liaison hydrogène dans laquelle le proton de la liaison peptidique est engagé modifient la valeur des paramètres A, B et C de la relation de KARPLUS. Cependant on obtient en général des résultats cohérents avec de telles expressions de  $J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}}^3$ .

Constantes de couplage  $J^3_{(NH-\alpha CH)}$ , pour le Poly L-Aspartate de sodium.

Les spectres ont été effectués dans le seul solvant organique que nous connaissions où l'acide poly L-aspartique se dissout (après léger chauffage) : nous avons employé le Diméthylsulfoxyde deutéré (bon accepteur de protons) comme solvant. Nous avons ajouté 12 % d'acide trifluoroacétique pour permettre de voir les pics apparaître (à la concentration de 4 % en polypeptide). Nous retrouvons les mêmes déplacements chimiques pour le  $\alpha CH$  et le  $CH_2 \beta$  dans le DMSO que dans l'eau. Ces pics se déplacent lorsqu'on ajoute plus de 16 à 18 % de TFA). La figure (15) nous permet d'attribuer les pics  $\beta CH_2$  vers 2,8 ppm (près des  $CH_3$  de la référence TMS), du pic  $\alpha CH$  vers 4,6 - 4,7 ppm et des pics NH entre 8 et 8,5 Hz.

Le pic de très forte intensité vers 6,1 ppm est dû au proton acide du TFA. Il se déplace en fonction de la concentration en TFA (liaisons hydrogènes avec les groupements carbonyles de la liaison peptidique) vers les bas champs.

On voit que les pics  $\alpha CH$  et N - H sont de nature complexe. De plus on voit vers 3,3 ppm apparaître un pic large de faible intensité. Nous avons attribué ce pic à des  $CH_2 \beta$  couplés avec le proton du groupement amide.

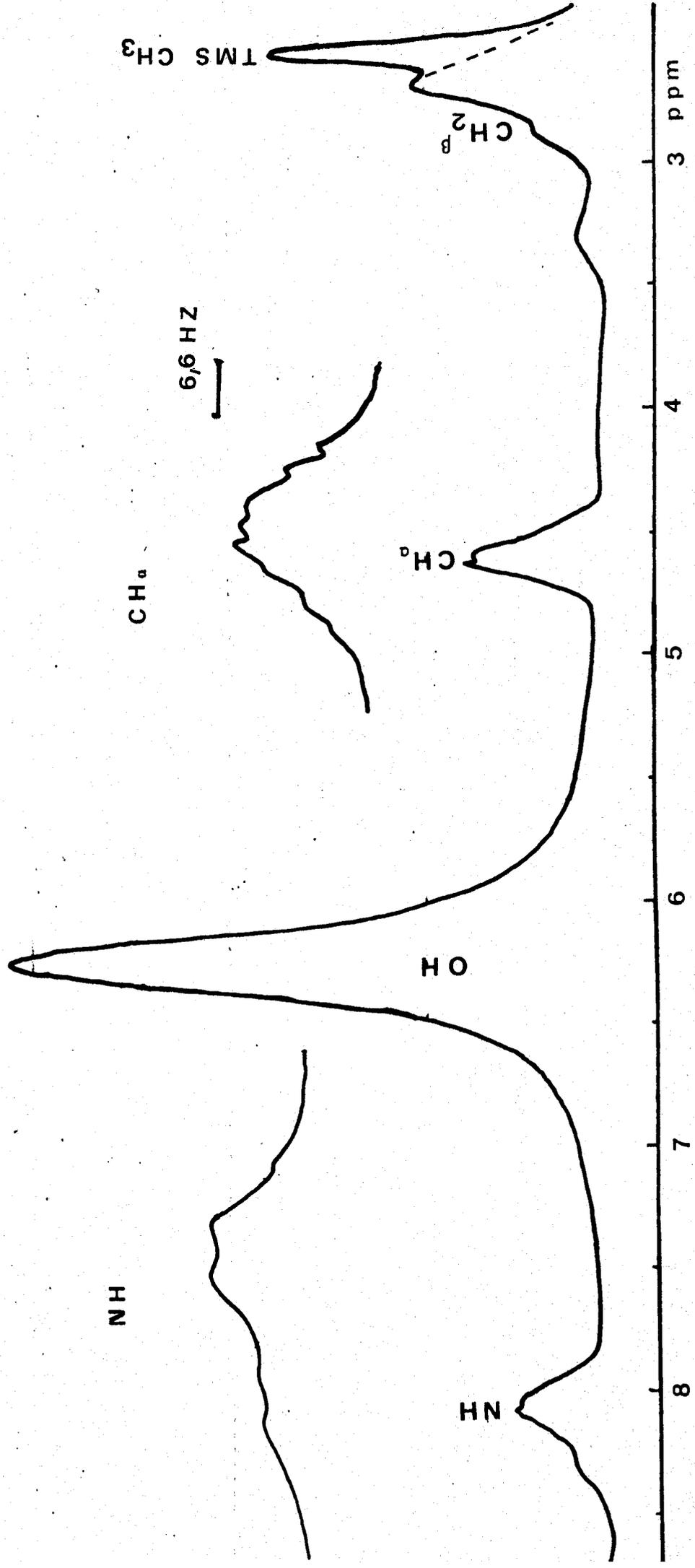
Le pic NH se compose en fait de plusieurs signaux. Nous avons tenté d'attribuer les différents couplages NH -  $C^{\alpha}H$  au moyen de découplages sélectifs en ondes continues.

B - Découplage des protons par irradiations sélectives.

Nous avons tenté de voir quels sont les protons  $\alpha CH$  qui sont couplés avec le proton NH et à quelle structure ces protons peuvent appartenir. Ceci a été fait en irradiant par exemple le proton NH se situant à 8,1 ppm avec un champ  $H_2$ . L'addition de ce champ fait que l'on sature les niveaux énergétiques (populations égales) relatifs à ce proton et à empêcher ainsi les transitions. Ainsi le  $\alpha CH$  couplé avec le NH irradié va-t-il voir son

BUS  
LILLF

$^1\text{H}$  90 MHz  
[L-ASP]<sub>n</sub> 4% DMSO  
TFA 12% REF. TMS

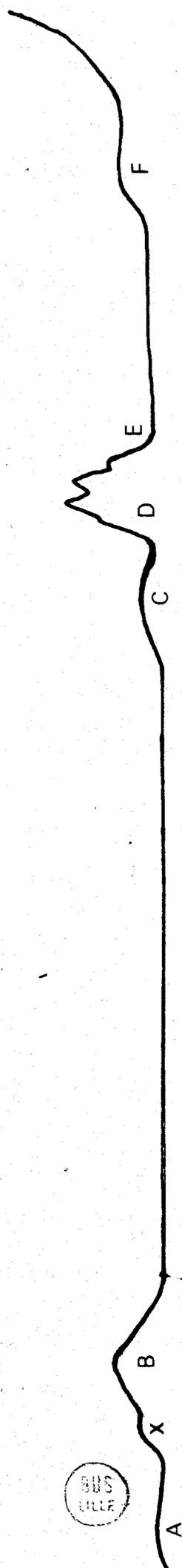
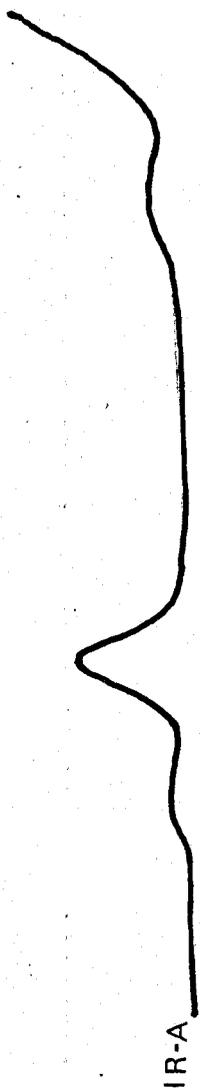


FIGV-16

DECOUPLAGES SELECTIFS

PAR IRRADIATION DES PROTONS

CH<sub>α</sub> ET NH à 90MHZ



signal de résonance disparaître (fig. 16). Le pic  $\alpha$  CH se compose en fait de 2 massifs séparés C et D.

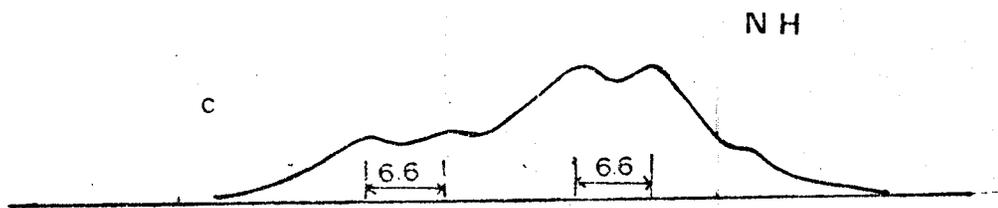
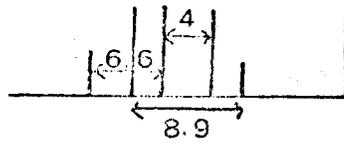
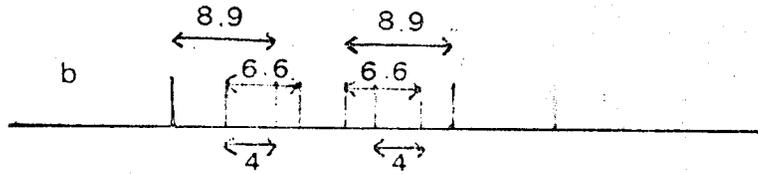
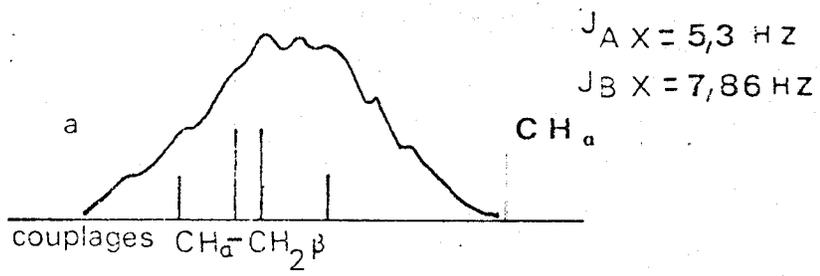
On voit que l'irradiation de A laisse inchangée la partie  $\alpha$  CH, tandis que l'irradiation du pic B fait disparaître les pics C et F. Le pic B se compose en fait de deux parties trop proches pour être irradiées séparément (B et X). L'irradiation de C et F nous montre que la partie X disparaît. La partie X représente un tiers environ de la surface du pic B total. Par contre, l'irradiation du pic D ne fait disparaître qu'une partie du pic B tandis que le pic X est conservé.

Il est difficile de prédire plus pour l'attribution des différents couplages  $J_{\text{NH-CH}\alpha}$ . L'expérience mérite d'être refaite à plus haut champ (250 MHz). Le pic D est donc complexe. Le seul résultat positif de l'irradiation a été d'attribuer la partie X du NH (8,4 ppm) au  $\alpha$  CH (à 5,05 ppm) et au  $\text{CH}_2$   $\beta$  à 3,4 ppm. Cependant l'étude du pic CH, bien qu'elle soit difficile va nous permettre de connaître les constantes de couplage  $J_{\text{NH-CH}\alpha}$ .

### C - Analyse du pic $\alpha$ CH

La partie C du pic  $\alpha$  CH a été attribuée à la présence de chaîne non ordonnée dans le système. Sur les figures 15 et 17 on voit la forme compliquée du pic  $\alpha$  CH principal (pic D).

Afin d'en déduire et d'y trouver différentes constantes de couplages  $J_{\text{NH-CH}\alpha}$  nous avons pris en considération en premier lieu des constantes  $J_{\text{CH}\alpha-\text{CH}_2\beta}$  (figure 17). Nous avons déduit du pic  $\alpha$  CH ces raies (attribution univoque : une seule possibilité a été trouvée pour faire correspondre les raies), et nous avons cherché dans les raies restantes en nous aidant des intensités, des constantes de couplage, en formant plusieurs systèmes possibles. La seule base de constantes de couplages logique nous a été donnée par un système de raies (partie B). Les raies restantes forment encore le même système. On a ainsi trois systèmes de constantes de couplage telles que on ait 8,9 - 6,6 et 4 Hz. En



constantes de couplage "résiduelles"

des doublets  $J_{C_aH-NH}$



FIGV-17

recherchant dans la littérature, on retrouve ces constantes de couplages pour un coude (turn)  $\beta$  II qu'ont décrit NEMETHY et PRINTZ (15). Etant en milieu dilué, où l'on a des interactions intramoléculaires dans les chaînes  $\beta$  //, ce résultat ne peut surprendre. Cependant il aurait besoin lui aussi d'être affiné à plus haut champ.

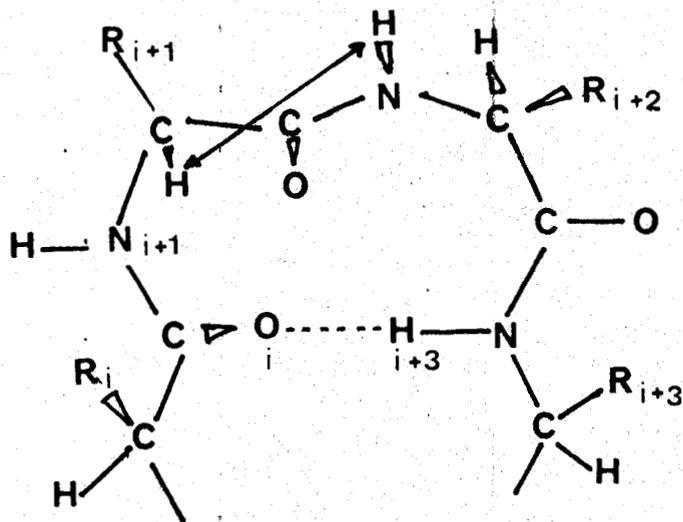
Le tableau V nous montre les résultats trouvés par NEMETHY et PRINTZ par des calculs semi-empiriques.

Turn	Constantes de couplage (Hz)	Angles diédraux			
		$\phi_2'$	$2'$	$\phi_3'$	3
$\beta_I (i \rightarrow i+4)$	(8,8 - 7,9 - 8,7 - 8,9)	- 60°	- 30°	- 90°	0°
$\beta_{II} (i \rightarrow i+4)$	(8,9 - 4 - 6,6 - 8,9)	- 60°	-120°	80°	0°
$\gamma (i \rightarrow i+3)$	(2,3 - 7,9 - 9,7)	$\phi_1 = 172^\circ$	$\phi_2 = -170^\circ$	$\phi_3 = -61^\circ$	$\phi_4 = -131^\circ$
		$\psi_1 = 128^\circ$	$\psi_2 = 68^\circ$	$\psi_3 = 172^\circ$	$\psi_4 = 162^\circ$

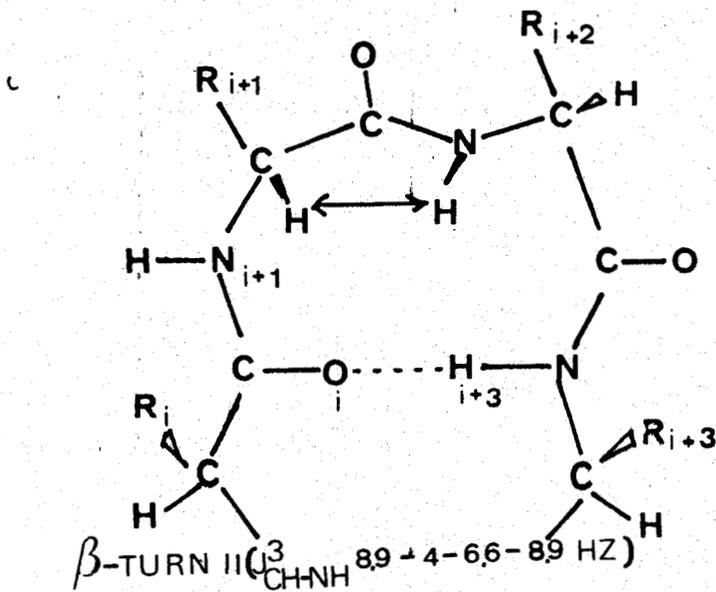
TABLEAU V

Les figures 18 et 19 nous montrent les différents coudes  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$  et  $\gamma$ . Les turns  $\beta_I$  et  $\beta_{II}$  ont été mis en évidence par les calculs théoriques de VENKATACHALAM (18). De nombreuses études ont été effectuées tant sur des oligopeptides (19), (20), (21) et (22) par effet Overhauser et en rayons X, que sur des protéines globulaires ((23), (24)).

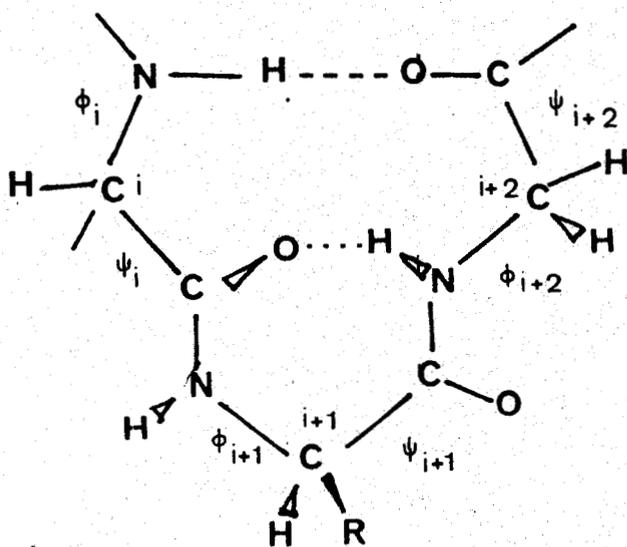
L'introduction d'une forme  $\beta$  turn II a permis la reconstitution complète des spectres dichroïques alors qu'en son absence nous n'étions jamais arrivé à un résultat satisfaisant (chapitre VI Dichroïsme circulaire). Ce résultat tend à suggérer que l'on a bien un turn  $\beta$  II.



$\beta$ -TURN I ( $J_{\text{CHNH}}^3$  8,8 - 7,9 - 8,7 - 8,9 HZ)



$\beta$ -TURN II ( $J_{\text{CHNH}}^3$  8,9 + 4 - 6,6 - 8,9 HZ)



$\gamma$ -TURN ( $J_{\text{CHNH}}^3$  2,3 - 7,9 - 9,7 HZ)



Le développement du modèle statistique de CHOU et FASMAN (25), (26) nous donne les fréquences d'apparitions  $f_j$  des résidus L aspartyl suivant leurs places respectives en  $i$ ,  $i+1$ ,  $i+2$ ,  $i+3$  et leur paramètre conformationnel (tableau VI) Pt.

Résidu	$f_i$	$f_{i+1}$	$f_{i+2}$	$f_{i+3}$	$f_{i+4}$
Aspartique	0,137	0,088	0,069	0,059	1,26

TABLEAU VI

La probabilité pour qu'un "tétrapeptides" forme un turn uniquement avec des résidus L aspartiques est :

$$P = f_i \cdot f_{i+1} + f_{i+2} \cdot f_{i+3} = 0,491 \cdot 10^{-4}$$

Or selon CHOU et FASMAN, la valeur  $P = 0,5 \cdot 10^{-4}$  semble être une valeur limite correcte pour la prévision de l'existence turn. Ceci est fait sans prendre en compte les structures particulières dans lesquelles le  $\beta$ -turn prend place.

Nous sommes juste à la limite de la probabilité d'un  $\beta$ -turn, cependant on doit prendre en considération l'effet coopératif des chaînes  $\beta$  antiparallèles intramoléculaires.

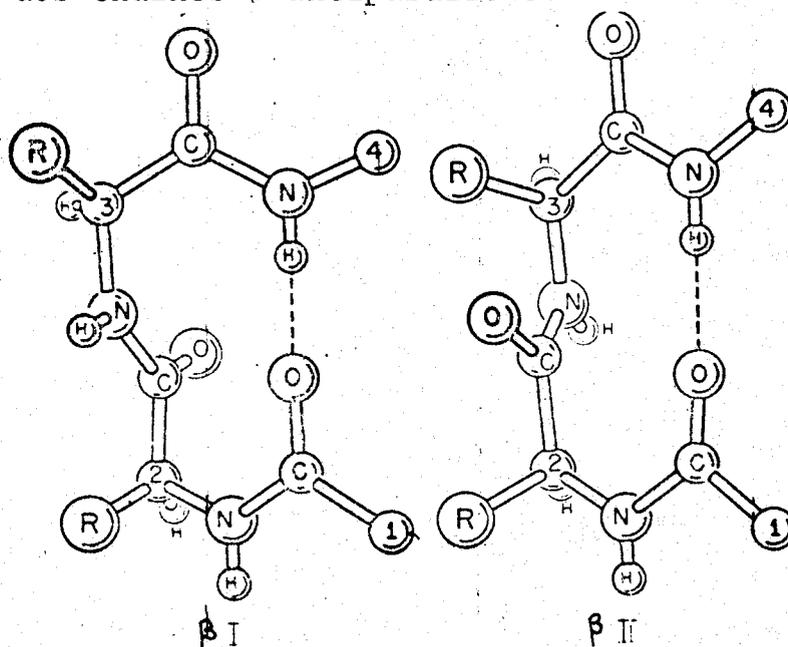


FIG V-19

C H A P I T R E    V I

ETUDES EN DICHROISME CIRCULAIRE ELECTRIQUE

## CHAPITRE VI

### ETUDES EN DICHROISME CIRCULAIRE ELECTRIQUE.

#### A - Rappels bibliographiques

##### I - Rappels théoriques

##### II - Description du chromophore amide

#### B - Résultats. Spectres de l'acide Poly $\alpha$ -L-Aspartique. Reconstitution des spectres dichroïques.

#### C - Paramètres influençant l'allure des spectres dichroïques.

##### I - Influence de la masse moléculaire

##### II - Influence de la température

##### III - Influence de la nature des contre-ions et influence de la taille des contre-ions.

#### D - Conclusions

A - RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I - Rappels théoriques.

Lorsqu'une onde électromagnétique linéairement polarisée traverse un milieu possédant un groupement chromophore optiquement actif, ses composantes circulairement polarisées gauche et droite ne sont pas absorbées de la même manière  $\epsilon_D \neq \epsilon_G$ . Il y a alors apparition du dichroïsme circulaire. Ce dichroïsme peut résulter de la présence d'un carbone asymétrique (comme le  $\alpha$  CH des polypeptides).

L'extrémité du vecteur champ électrique  $\vec{E}$  décrit à la sortie une ellipse (fig. 1).

L'angle  $\psi$  appelé ellipticité est relié aux indices d'absorption  $K_G$  et  $K_D$  des lumières circulairement polarisées gauche et droite par la relation du type FRESNEL.

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

$\psi$  : ellipticité (en radians)

$\lambda$  : longueur d'onde de l'onde électromagnétique

L : épaisseur du milieu.

Deux grandeurs macroscopiques ont été introduites pour exprimer l'ellipticité d'un soluté d'une manière commode.

- l'ellipticité spécifique  $|\psi| = \frac{\psi}{L \cdot C}$

$\psi$  : ellipticité (en degré)

L : épaisseur du milieu (en dm)

C : concentration du soluté ( $\text{g ml}^{-1}$ )

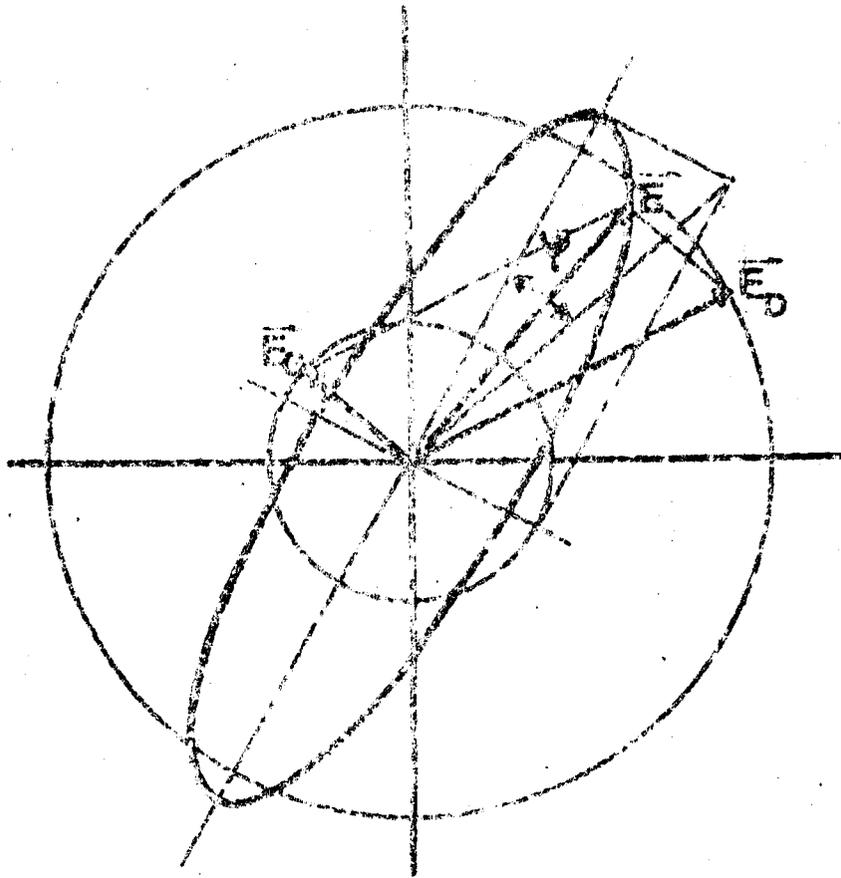


Figure VI-1

- l'ellipticité molaire  $[\theta] = [\psi] \frac{M_0}{100}$

Sachant que l'indice d'absorption K est relié au coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  par la relation :

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

**C** : concentration molaire du soluté (mole  $l^{-1}$ ).

On montre que :

$$|\theta| = 3300 (\epsilon_G - \epsilon_D)$$

$\Delta\epsilon = \epsilon_G - \epsilon_D$  est l'absorption différentielle dichroïque.

l'ellipticité molaire  $|\theta|$  s'exprime en degré  $cm^2$  décimole $^{-1}$ )

Le dichrographe fournit directement la différence de densité optique ( $A_G - A_D$ ) à la sortie de l'échantillon pour les composantes circulairement polarisées gauche et droite.

$$\Delta\epsilon = \frac{M}{C \cdot L} (A_G - A_D) \cdot S$$

**M** : masse moléculaire du soluté (résidu peptidique)  
(en g)

**C** : concentration du soluté ( $g l^{-1}$ )

**L** : épaisseur de la cuve (cm)

la différence  $A_G - A_D$  est mesurée sur le spectre en mm. Elle est retranchée de la ligne de base (solvant).

**S** : sensibilité (en  $mm^{-1}$ )

Théories quantiques de l'activité optique.

L'origine de l'activité optique d'un milieu peut avoir deux origines :

- une transition électronique peut impliquer le déplacement linéaire des charges électroniques et créer par là même un moment électrique appelé moment de transition électrique.

- ou entraîner la rotation des charges électriques au tour d'un axe, donnant naissance à un moment magnétique appelé moment de transition magnétique.

D'une façon générale les transitions électroniques peuvent être électriquement ou magnétiquement permises mais les transitions électriquement permises sont dix mille fois plus intenses que les transitions magnétiques.

En 1928 ROSENFELD (1) donne une première théorie quantique de l'activité optique, avec l'expression de la force rationnelle  $R_a$  de la transition électronique  $0 \rightarrow a$

$$R_a = I_m \langle 0 | \mu | a \rangle \cdot \langle a | m | 0 \rangle$$

$I_m$  partie imaginaire

$\mu$  opérateur moment dipolaire électrique

$m$  opérateur moment dipolaire magnétique

$0$  fonction d'onde de l'état fondamental

$a$  fonction d'onde de l'état excité.

Puis en 1937 KIRKWOOD (2) propose la théorie de l'oscillateur couplé tandis que la même année CONDON, ALTAR et EYRING (3) proposent une théorie à un électron, puis MOFFIT reprend en 1956 (4) la théorie de l'oscillateur qui fait lever la dégénérescence des états excités.

D'autres auteurs comme TINOCO (5) développent pour les polymères une théorie quantique faisant intervenir la théorie des perturbations. Sur le même modèle, SCHELLMAN et ORIEL (6) développent les calculs relatifs aux structures hélicoïdales des polypeptides. Enfin SCHELLMAN (7) fait intervenir le mécanisme  $\mu - m$  qui met en jeu d'interaction d'une transition électriquement permise d'un chromophore avec une transition magnétiquement permise d'un autre chromophore, interaction qui fut jusqu'alors complètement négligée.

## II - Description du chromophore amide.

La figure 2 montre le diagramme énergétique du chromophore amide ( $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}-$ )

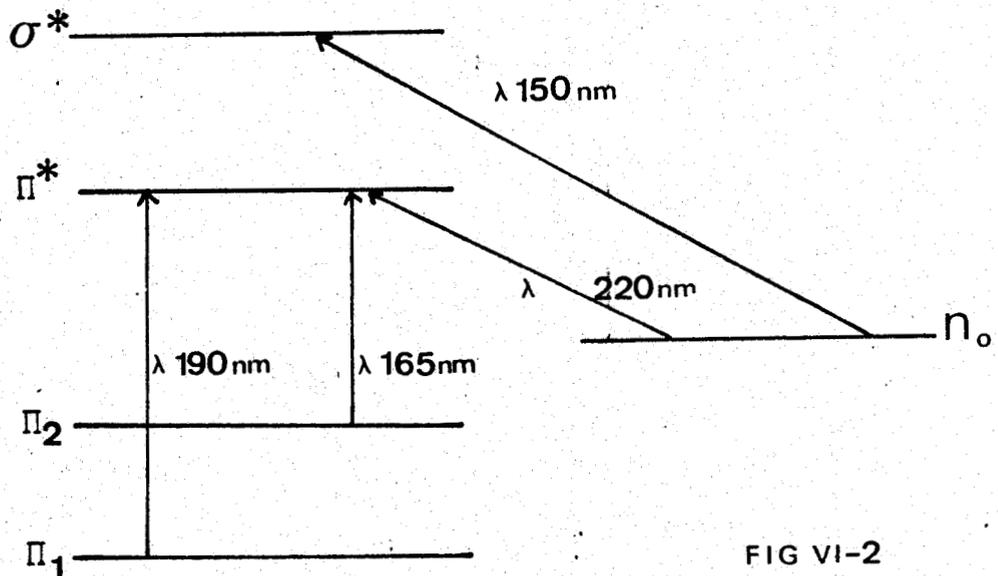
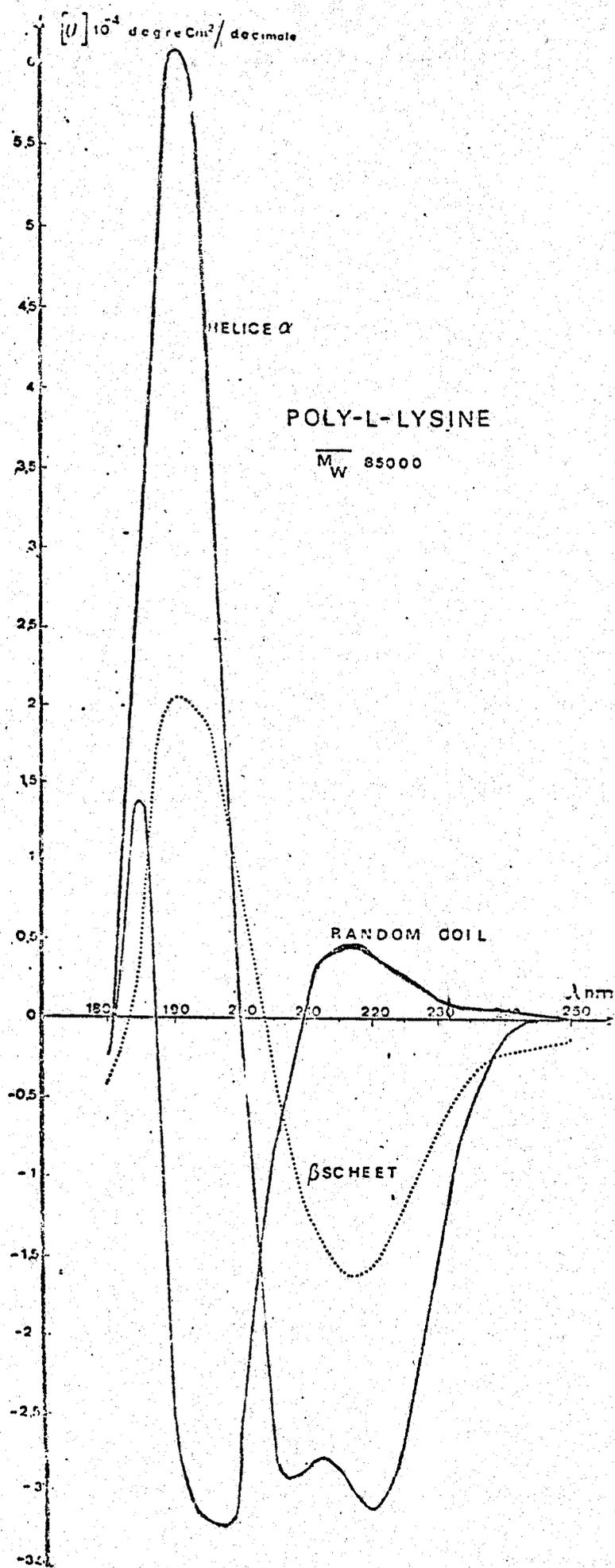


FIG VI-2

Pour les polypeptides hélicoïdaux il existe trois bandes caractéristiques pour une hélice  $\alpha$  droite ( Poly L-Lysine (fig. 2) ) :

- une bande négative à 222 nm (transition  $n \rightarrow \pi^*$  correspondant à la transition d'un électron appartenant à une orbitale non liante de l'atome d'oxygène de la liaison amide vers



BUS  
LILLF

FIG VI-2

l'orbitale antiliante  $\pi^*$   $\lambda_{\max} \sim 222 \text{ nm}$

$$[\theta] \sim -36\,000 \pm 5\,000 \text{ degré cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$$

- une bande négative à 209 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice).

- une bande positive à 190 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$  polarisée perpendiculairement à l'axe de l'hélice) (+ 70 000 d  $\text{cm}^2 \text{ dm}^{-1}$ ).

Pour les chaînes  $\beta$

- une bande négative vers 215 - 217 nm ( $n \rightarrow \pi^*$   
- 18 000  $\text{deg cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$ )

- une bande positive vers 190 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ )  
+ 25 000  $\text{deg cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$

Pour les chaînes non ordonnées

- une bande négative à 198 nm (- 42 000  $\pm 5\,000 \text{ deg cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$ )

- une bande positive à 217 nm (+ 5000  $\text{deg.cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$ )

Pour les chaînes non ordonnées le problème est plus délicat car certains auteurs préconisent l'existence d'une autre structure existant seule ou existant avec la chaîne non ordonnée. Selon TIFFANY et KRIMM (8), (9) on aurait pour l'acide poly L-glutamique présence d'une hélice étendue (2,8 à 3 résidus par tour) occupant de petites portions cependant assez grandes pour engendrer un signal dichroïque.

Pour l'hélice étendue (selon TIFFANY et KRIMM) on a

- une bande positive à 215 nm  $|\theta| = + 5\,000 \text{ deg cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$

- une bande négative à 195 nm  $|\theta| = - 33\,000 \text{ deg cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$

Nous reviendrons sur l'existence d'une telle hélice dans l'acide poly  $\alpha$  - L - Aspartique sous sa forme ionisée.

B - RESULTATS : SPECTRES DICHROIQUES DE L'ACIDE POLY  $\alpha$ -L-  
ASPARTIQUE

Les figures 3 et 4 nous montrent l'allure des spectres dichroïques de l'acide poly  $\alpha$  L-Aspartique (NaF 0,2 M et 2,5 M dans l'eau) en fonction du pH en présence de sél de forces ioniques différentes. Les ellipticités molaires apparaissent indépendantes de la force ionique en pH basique comme en milieu acide. En pH basique l'ellipticité molaire atteint  $|\theta| = 10^{-4}$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$  pour la bande négative à 198 nm. A la transition "chaîne non ordonnée - hélice" vers pH 4,5, une bande négative apparaît vers 220 nm ( $|\theta| = -4 \cdot 10^{-3}$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$ ). La bande vers 220 nm semble bien correspondre à la bande caractéristique d'une structure en hélice  $\alpha$  (fig. 2). Cependant la bande vers 207 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) n'apparaît pas. Les spectres infra-rouge et Raman nous ayant révélé la présence de formes  $\beta$  antiparallèles, on s'attend à avoir une bande négative vers 217 nm, ce qui donne une bande très large avec la transition ( $n \rightarrow \pi^*$ ) de l'hélice  $\alpha$ . Pour les formes  $\beta$  antiparallèles on n'observe cependant pas de bande positive vers 190 nm, de même, une structure non ordonnée devrait produire une bande positive vers 217 nm de faible ellipticité molaire (fig. 2).

Depuis quelques années, quelques auteurs se sont opposés sur l'interprétation à donner à la bande positive vers 217 nm pour la structure "non ordonnée" pour un polyacide comme l'acide poly L-glutamique ou pour une polybase comme la poly L-lysine. Notamment TIFFANY et KRIMM (9), (10) ont étudié la conformation "non ordonnée" des polypeptides dans l'urée et le chlorhydrate de guanidine. Selon eux la structure "non ordonnée" est en fait une hélice étendue locale proche d'une structure en hélice  $3_1$  (selon eux, cette hélice aurait 2,6 à 2,8 résidus par tour). D'autres auteurs tels DEARBORN, WETLAUFER (11) contestent cette interprétation en attribuant l'absence de la bande positive à 217 nm à une structure locale proche d'une hélice  $\alpha$ . D'autres auteurs tels ZUBKOV et collaborateurs (12) développent une méthode de

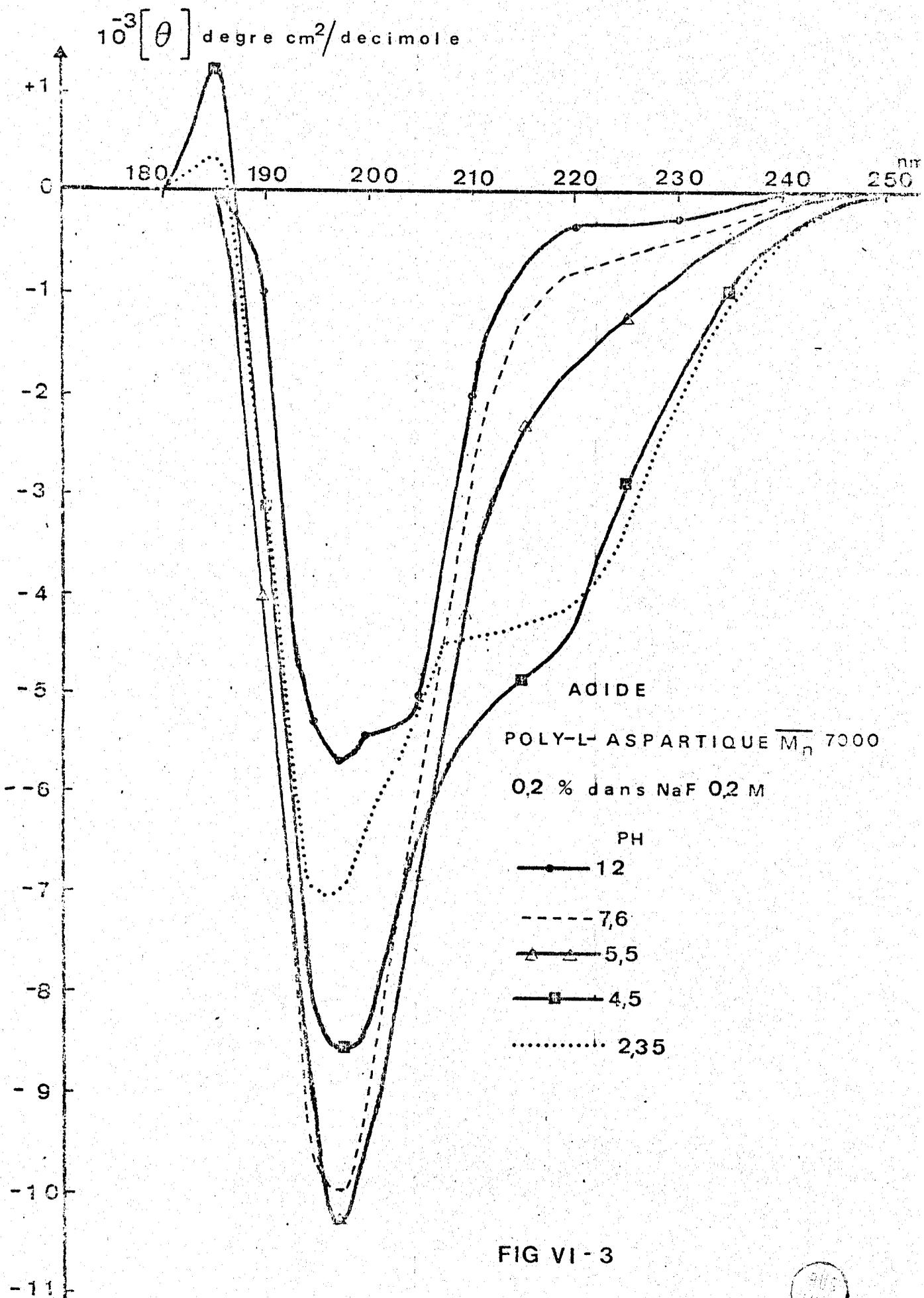


FIG VI - 3



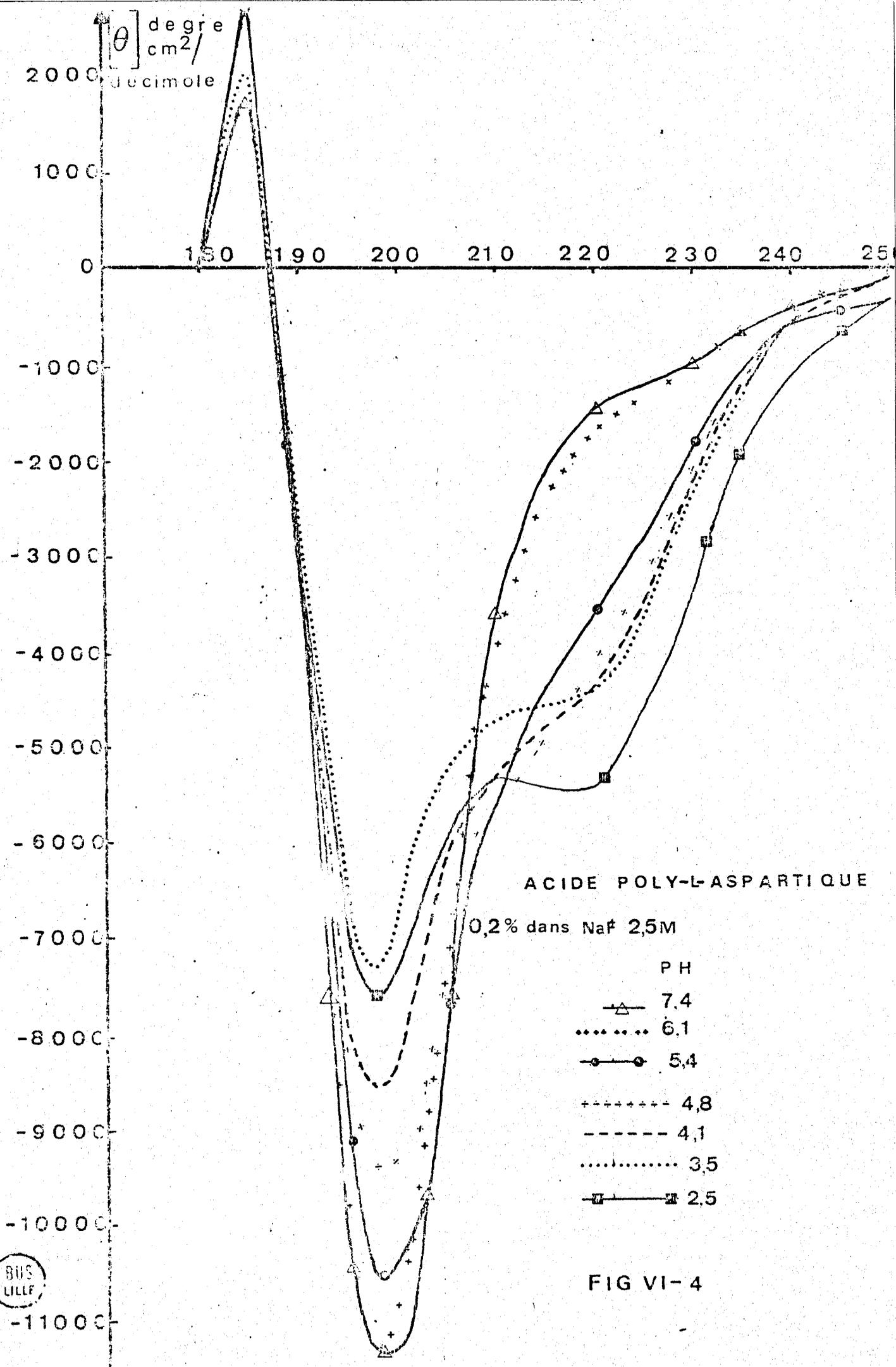
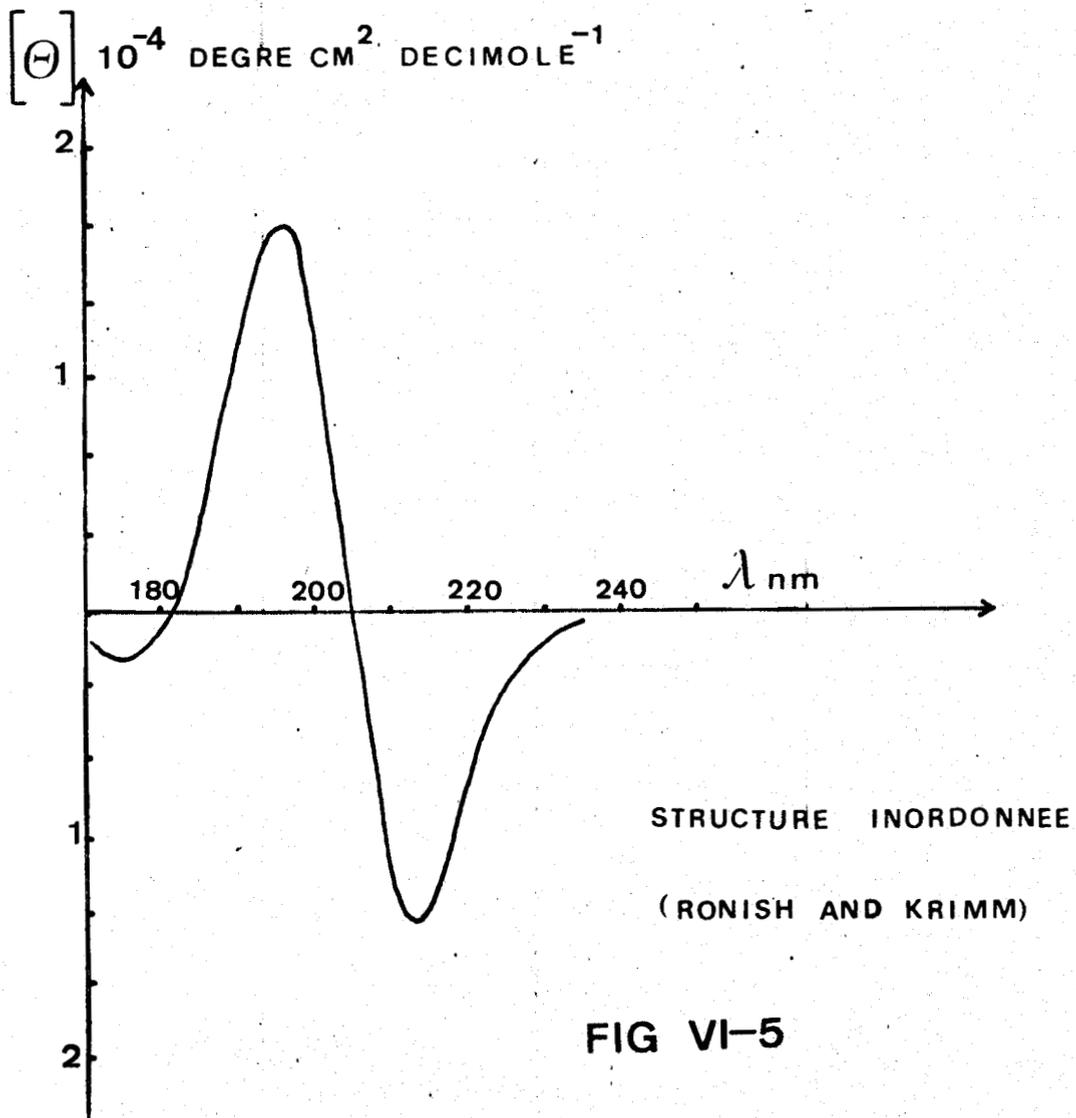


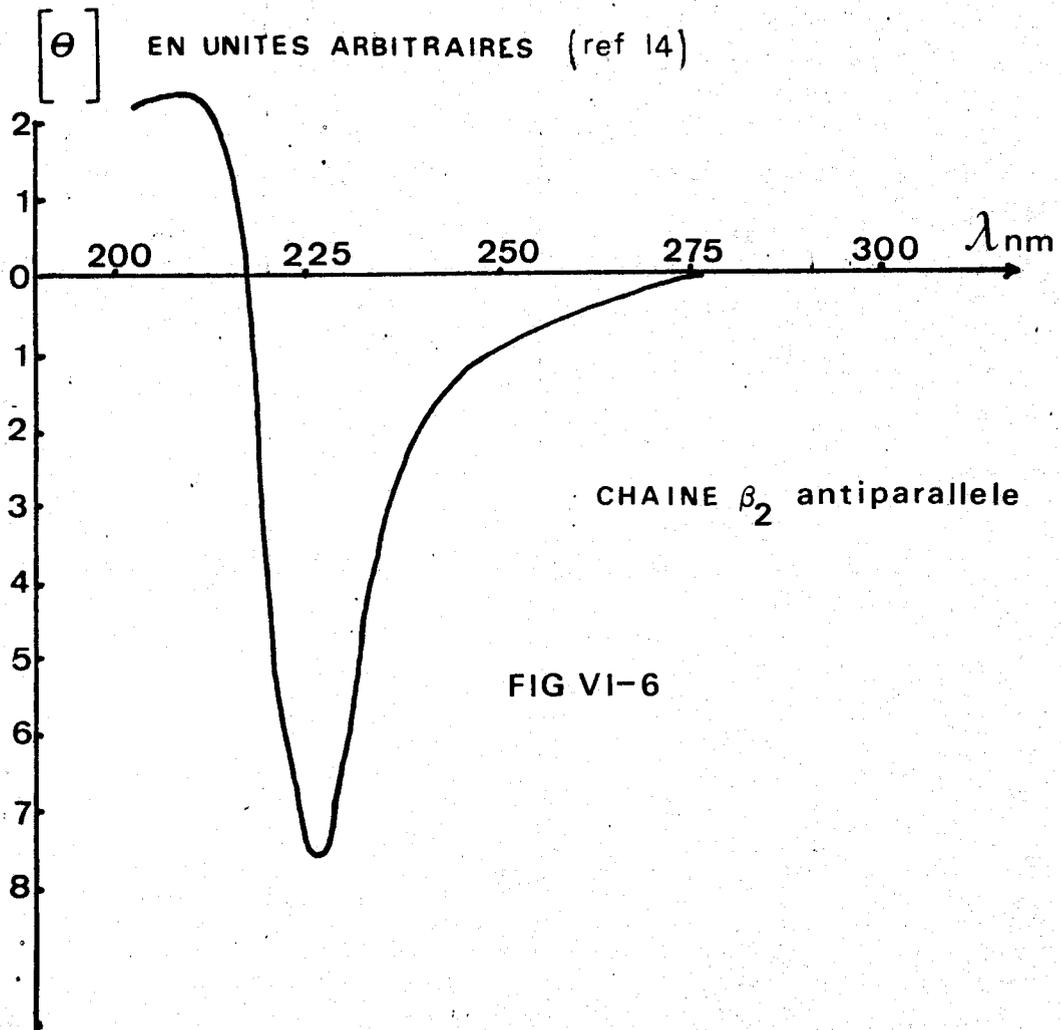
FIG VI-4



calculs statistiques pour recalculer le spectre dichroïque d'une structure "non ordonnée" selon les angles diédraux. D'autres auteurs reprennent ces calculs (13) et donnent un spectre dichroïque totalement différent des formes ionisées du PLGA et de la poly L Lysine soupçonnées être une hélice étendue. La figure 5 montre ce spectre obtenu par RONISH et KRIMM (13).



Cependant avant la reconstitution du spectre dichroïque, nous allons discuter un peu des spectres dichroïques des différentes structures,  $\beta$  antiparallèles trouvées par certains auteurs. ITOH, FOXMAN et FASMAN (14) dans leurs analyses des deux formes  $\beta$  de l'acide poly L-glutamique rapportent le spectre dichroïque suivant (fig. 6) pour la forme  $\beta_2$   $\neq$  (existant dans l'acide poly  $\alpha$  L aspartique) (la forme  $\beta_1$  étant comparable à une structure  $\beta$  pour la poly L-lysine fig. 2).



D'autres auteurs, tels MADISON, SCHELLMAN (15) recalculent les spectres dichroïques pour des formes  $\beta$  antiparallèles en fonction du nombre de chaînes et du nombre de résidus inclus dans ces chaînes. Le tableau (I) résume les valeurs des ellipticités molaires et des longueurs d'onde  $\lambda_{\max}$  et  $\lambda_{\min}$ .

nombre de chaînes peptidiques	2	4	6	8	8 (mécanisme $\mu$ -m non inclus)
nombre d'unités par chaîne	10	5	4	3	3
$[M_{\theta}]_{\min}$	-11300	-10500	-10400	- 9600	900
$[M_{\theta}]_{\max}$	12600	12400	12200	11100	3600

$[M_{\theta}]$  en degrés  $\text{cm}^2 \text{decimole}^{-1}$

TABLEAU I

(réf 15)  $\lambda_{\max} = 196 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\min} = 218 \text{ nm}$

De plus ces auteurs étudient en fonction du nombre de résidus inclus dans chaque structure, des polypeptides tels que les Poly-Proline I et II, le collagène, et les hélices  $\alpha$  de protéines (Lysozyme, Ribonucléase S,  $\alpha$  chymotrypsine, Myoglobine).

Le tableau II donne les valeurs trouvées par MADISON et SCHELLMAN pour des hélices idéales incluses dans des protéines globulaires. Les ellipticités molaires sont très éloignées de celles trouvées pour l'acide poly L-glutamique.

nombre d'unités peptidiques	$\lambda_{nm} = 222$	207 nm	194 nm
7	- 6400	8150	34600
8	- 6750	6100	40000
9	- 7100	1730	49200
10	- 7400	- 1670	55000
12	- 7850	- 6600	66700
16	- 8800	-14500	83200
20	- 8900	-19600	93200
26	- 9300	-24000	103000

TABLEAU II

$[\theta]$  degré  $cm^2$  décimole<sup>-1</sup>

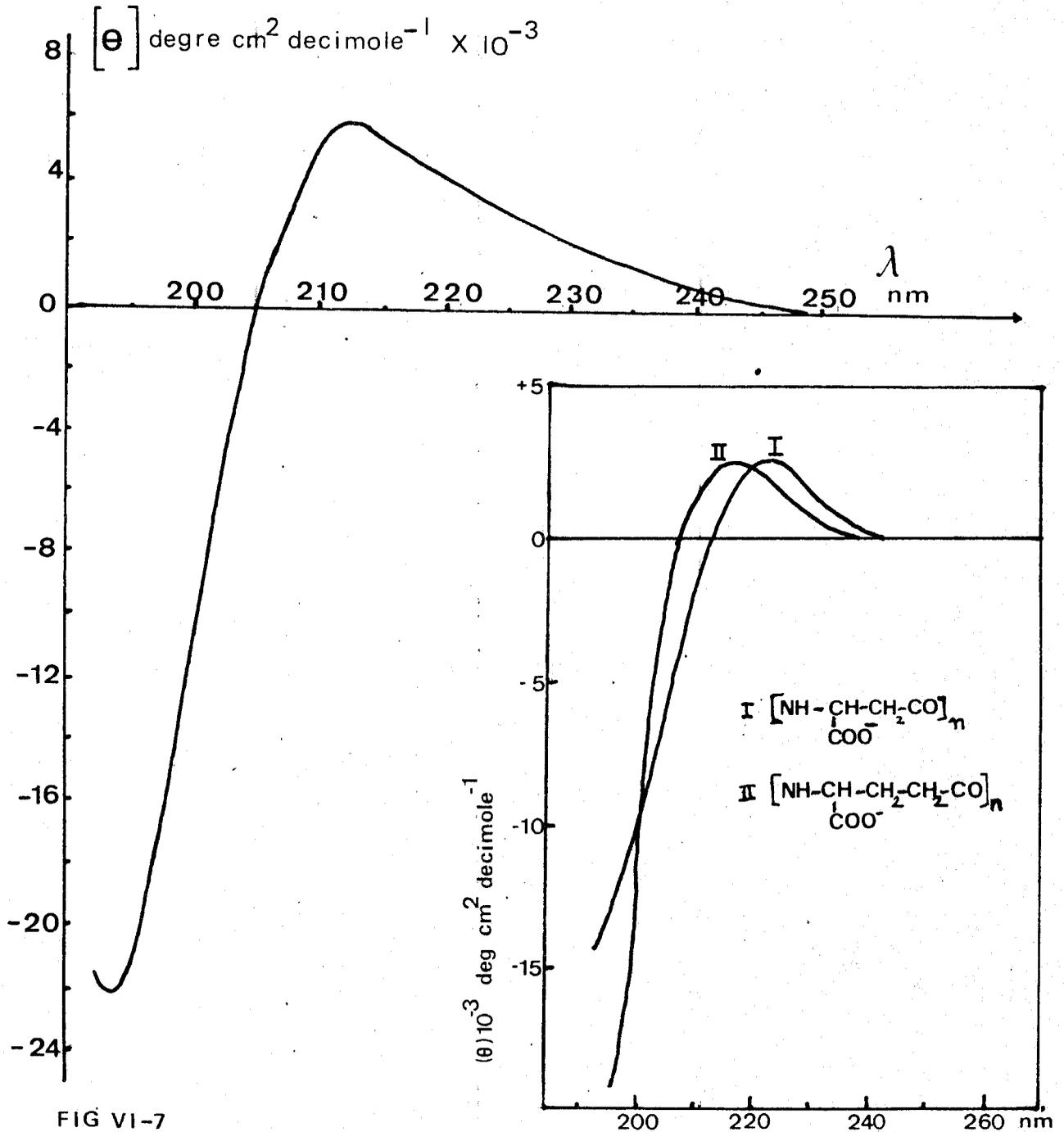
L'étude en IR lointain entre 0 et 80  $cm^{-1}$  aurait pu nous donner le nombre de résidus inclus dans les hélices (vibrations en accordéon) (16). Cependant cette étude n'a pas été faite. Elle aurait pu nous donner une ellipticité de référence dans la reconstitution des spectres dichroïques comme nous l'avons fait (partie B) pour les chaînes  $\beta$  antiparallèles.

Pour l'hélice  $3_1$  (hélice gauche) nous nous sommes servi du spectre dichroïque du poly (L Ala - Gly - Gly) donné par RIPPON et WALTON (17) (figure 7). La bande négative à 198 nm observé par ces auteurs à - 112°C suggère la présence de forme inordonnée à côté de la structure en hélice  $3_1$ . C'est ce que nous observons pour l'acide poly L Aspartique à 25°C. Un maximum positif est observé à 213 nm ( $[\theta] \sim 6000$  degré  $cm^2$ /décimole) et une forte bande négative est observée à 195 nm ( $|\theta| \sim 22000$  degré  $cm^2$ /décimole).

Par comparaison, l'étude menée par BALASUBRAMANIAN sur le poly  $\beta$ -L-Aspartique (24) et sur le poly  $\gamma$ -L-Glutamique montre

que le poly  $\beta$ -L-Aspartate de sodium  $(-\text{NH}-\underset{\text{CO}_2-\text{Na}^+}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CO}-)_n$  semble

adopter une conformation en hélice  $3_1$  (concentration 0,2 à 2 g/l) avec une bande positive vers 225 nm  $|\theta| = + 3000$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$  et une bande négative à 198 nm  $|\theta| = -15000$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$  (fig. 6').



Une dernière série de spectres dichroïques est à prendre en considération ; c'est-à-dire les spectres des  $\beta$ -turns calculés par VENKATACHALAM (18) (fig. 8) et dont les spectres dichroïques sont donnés par WOODY (25). Nous allons nous servir du spectre du turn  $\beta$  II pour recalculer les spectres dichroïques. Cependant il ne faut pas oublier que la forme des spectres dichroïques est tributaire des légères variations pouvant intervenir dans les angles diédraux.

### Calcul des spectres dichroïques

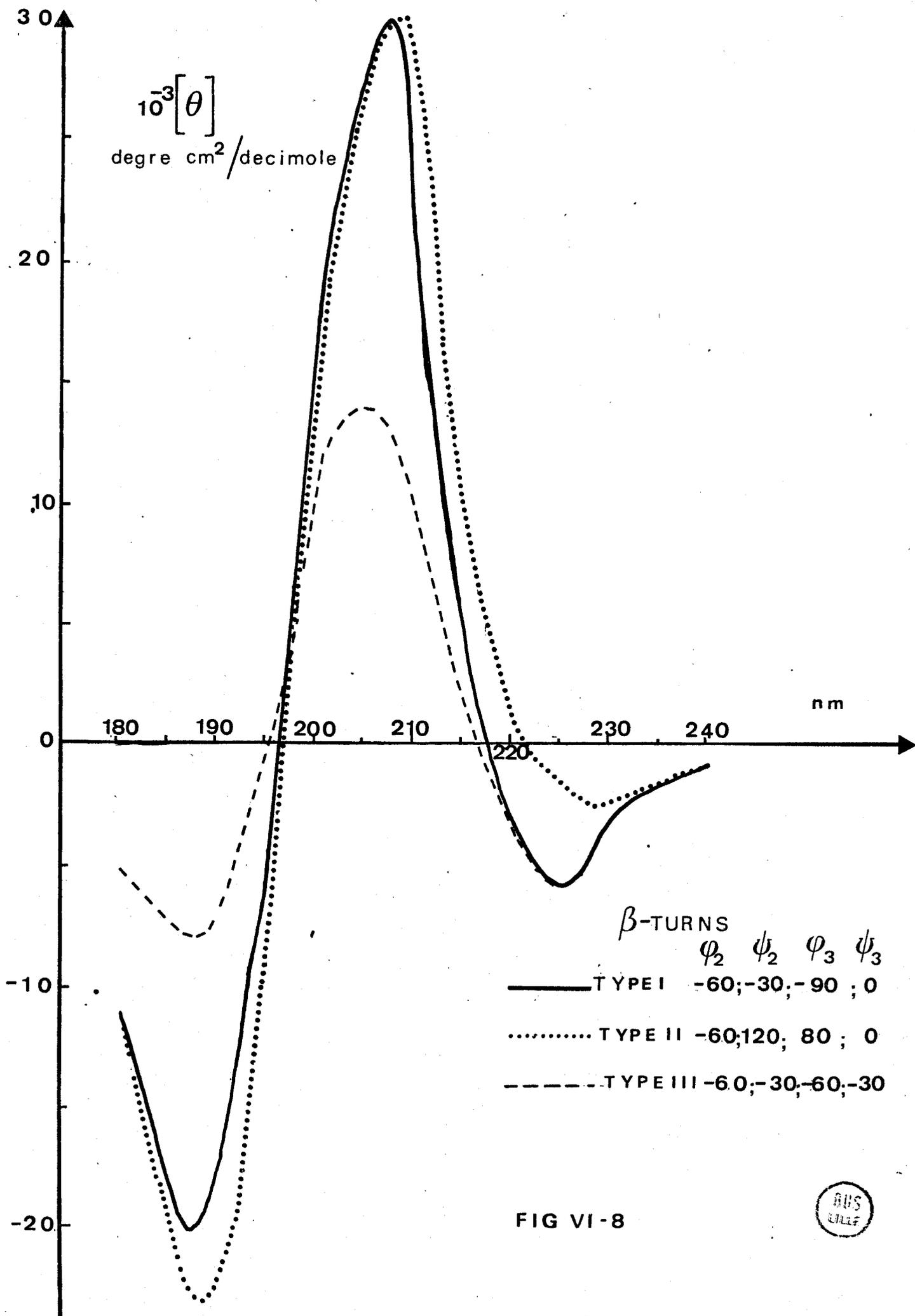
Dans un premier temps nous avons tenté de recalculer nos spectres avec les valeurs données pour l'hélice  $\alpha$ , la random coil, la forme  $\beta$  par GREENFIELD et FASMAN (19) et l'hélice  $3_1$  de la L-Ala-gly-gly) $_n$ . Cependant nous ne sommes pas arrivés à reconstituer les spectres avec toutes ces valeurs, aussi avons-nous pris les modèles de MADISON pour les formes  $\beta$  antiparallèles, celles-ci étant intramoléculaires à la concentration utilisée en dichroïsme.

C'est le modèle compris entre 4 et 6 chaînes peptidiques (ayant 5 et 4 résidus par chaîne respectivement) qui nous a donné la meilleure satisfaction. Les fig. 3 et 4 nous montrent les spectres dichroïques en fonction du pH dans NaCl 0,2 M et NaCl 2,5 M pour l'acide poly L Aspartique.

Les calculs ont été faits suivant un système d'équation à trois inconnues (en fait quatre mais la somme des quatre faisant 1) en faisant :

- x (fraction des résidus adoptant la forme  $\beta$  antiparallèle)
- y (fraction des résidus adoptant la chaîne non ordonnée)
- z (fraction des résidus adoptant l'hélice  $3_1$ )
- w (fraction des résidus adoptant la forme turn  $\beta$  II).

En milieu légèrement basique (pH 7,6), on retrouve pour toutes les longueurs d'onde le spectre dichroïque expérimental à  $[\theta] = \pm 1000 \text{ degré cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$  (pour un DPn = 56).



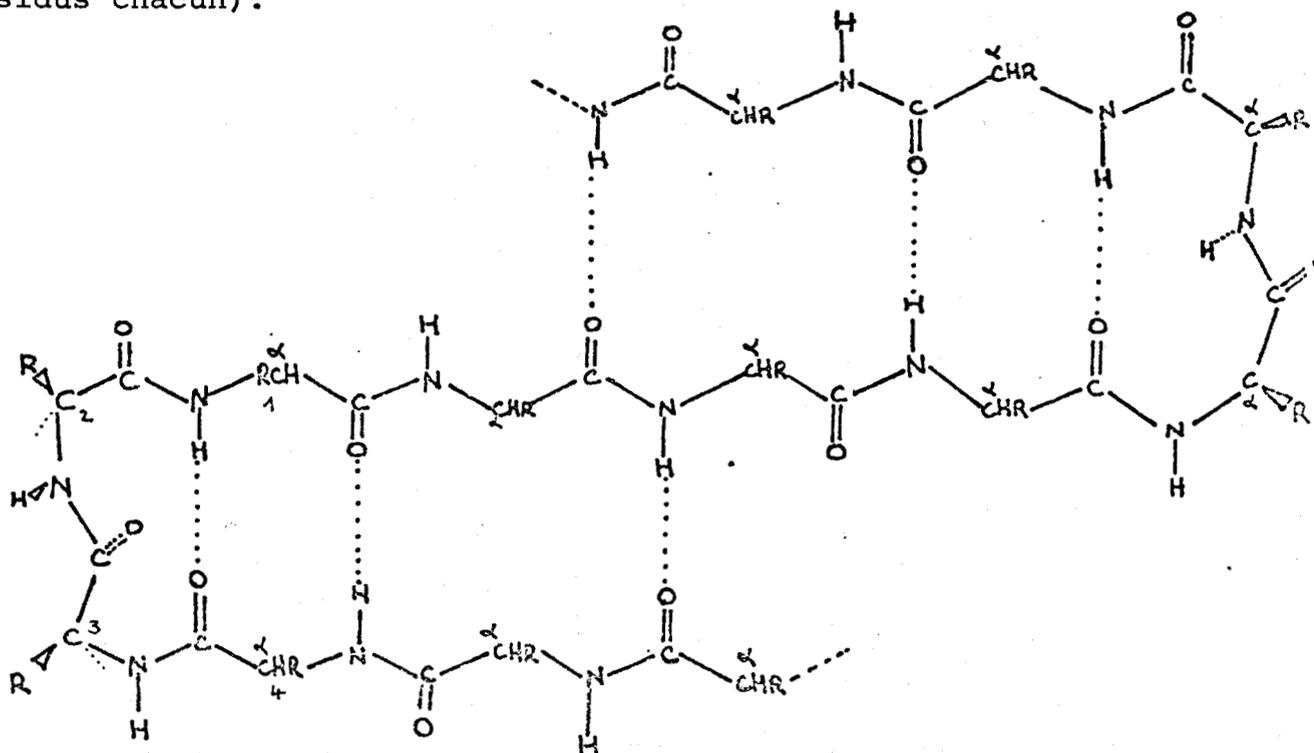
hélice (gauche) $3_1$	: 10 %	
chaîne non ordonnée	: 25 %	Ph 7,6
$\beta$ antiparallèle	: 45 %	
$\beta$ turn II	: 20 %	

En RMN la partie X du proton Amide NH et la partie C du  $\alpha$  CH semblent bien dues à celle du mélange ("hélice  $3_1$ " + chaîne non ordonnée), la surface du pic X correspondant au tiers des protons Amide.

Nous avons repris les calculs en éliminant la structure correspondant à la chaîne non ordonnée.

Le spectre calculé ne correspond plus du tout au spectre expérimental. En milieu basique on a alors (en solution) un mélange de Random Coil et d'hélice  $3_1$ . Ceci est compatible avec le fait qu'en ajoutant l'urée 8 M en milieu basique on ait un ( $b_0$ ) qui passe de - 50 à 0.

Pour un degré moyen de polymérisation en nombre (DPn = 56) on a 5 résidus sous forme hélice  $3_1$ , 14 résidus R.C., 25 résidus  $\beta$  // il reste 12 résidus inclus dans les  $\beta$  turns II (liaison  $i \rightarrow i+3$ ) soient trois turns. Le modèle proposé est alors celui que l'on peut voir sur la figure 9 (4 chaînes  $\beta$  // de six résidus chacun).



FIGV -9 CHAÎNE  $\beta$  A LIAISONS HYDROGENE INTRAMOLECULAIRES SE REPLIANT SUR ELLE-MEME PAR  $\beta$  TURNS (TYPE  $\beta_{II}$ )

En milieu acide (pH 4,5) on trouve avec une précision de  $\pm 1000$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$  pour toutes les longueurs d'onde

Hélice $3_1$	: 0 %	
Hélice $\alpha$	: 20 %	
Chaîne non ordonnée	: 15 %	PH 4,5
$\beta$ //	: 45 %	
$\beta$ II turn	: 20 %	

La forme hélice  $3_1$  a complètement disparu.

En milieu plus acide (pH 2,35) les valeurs trouvées ne donnent plus le spectre. On peut penser qu'il y a un phénomène d'agrégation à ce moment-là.

Le pourcentage d'hélicité obtenu est compatible avec les valeurs de ( $b_0$ ) obtenues par D.O.R.), mais on voit qu'il reste cependant de la structure non ordonnée. L'hélice doit être peu stabilisée par les liaisons hydrogènes pour l'acide Poly  $\alpha$ -L-Aspartique, une partie de la structure non ordonnée (10 % environ) s'étant transformée en hélice  $\alpha$ .

## C - PARAMETRES INFLUENCANT L'ALLURE DES SPECTRES DICHROIQUES.

### I - Influence de la masse moléculaire

La figure 10 montre l'aspect du spectre dichroïque obtenu pour une masse moléculaire en poids  $\bar{M}_w = 14000$  (échantillon obtenu chez SIGMA).

En milieu basique, le spectre dichroïque ressemble à celui obtenu pour une masse moléculaire plus petite ( $\bar{M}_n = 7000$ ) (fig. 3). On obtient la même ellipticité pour la bande à 198 nm ( $[\theta] = 13 \cdot 10^3$  pour  $M_w 14 \cdot 10^3$  et  $[\theta] = -10^4$  pour un  $\bar{M}_n = 7 \cdot 10^3$ ).

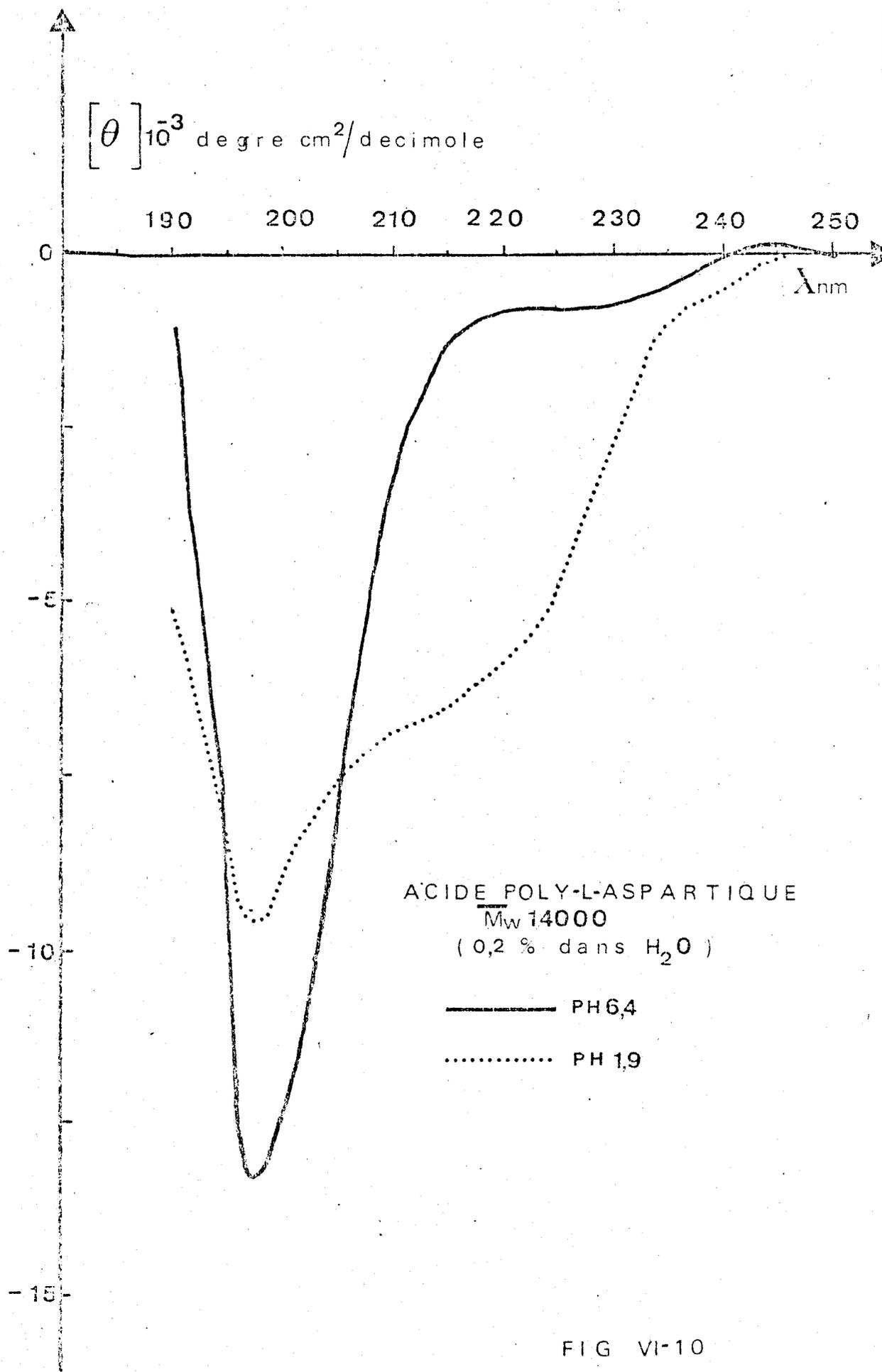


FIG VI-10

En milieu acide, cependant la bande vers 220 nm voit son ellipticité passer de  $[\theta] = - 4500$  pour  $\overline{M}_n = - 7000$  à  $[\theta] = 7 \cdot 10^3$  pour  $\overline{M}_w = 14000$ . La bande à 198 nm donne un  $[\theta] = - 10^4$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$  pour la plus forte masse tandis que pour un  $\overline{M}_n = 7000$ , on a  $[\theta] = - 7 \cdot 10^3$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$ .

On ne note pas grande différence entre les deux spectres, cependant une  $\overline{M}_w = 14000$  reste une masse relativement faible.

## II - Influence de la température.

La figure 11 donne les spectres dichroïques du poly L aspartate en fonction de la température. Le fait de chauffer à 60°C a deux effets ; d'abord d'augmenter l'ellipticité de la bande à 198 nm ( $[\theta]_{198}$  passe de  $- 11 \cdot 10^3$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$  à 25°C à  $- 15 \cdot 10^3$  degré  $\text{cm}^2$  décimole $^{-1}$  à 60°C), et l'ellipticité vers 215 nm diminue, ce qui aurait tendance à montrer qu'en chauffant en pH basique on ait une transition  $\beta \rightleftharpoons$  random coil. On trouve en recalculant le spectre dichroïque, la composition approximative suivante à 60°C avec :

$$\Delta|\theta| = \pm 1000 \text{ degré } \text{cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$$

(tableau III)

T°C	Random Coil	$\beta \rightleftharpoons$	$\beta$ turn II	hélice $3_1$
25°C	25 %	45 %	20 %	10 %
60°C	45 %	33 %	14 %	8 %

TABLEAU III

Pourcentage des diverses structures en fonction de la température.

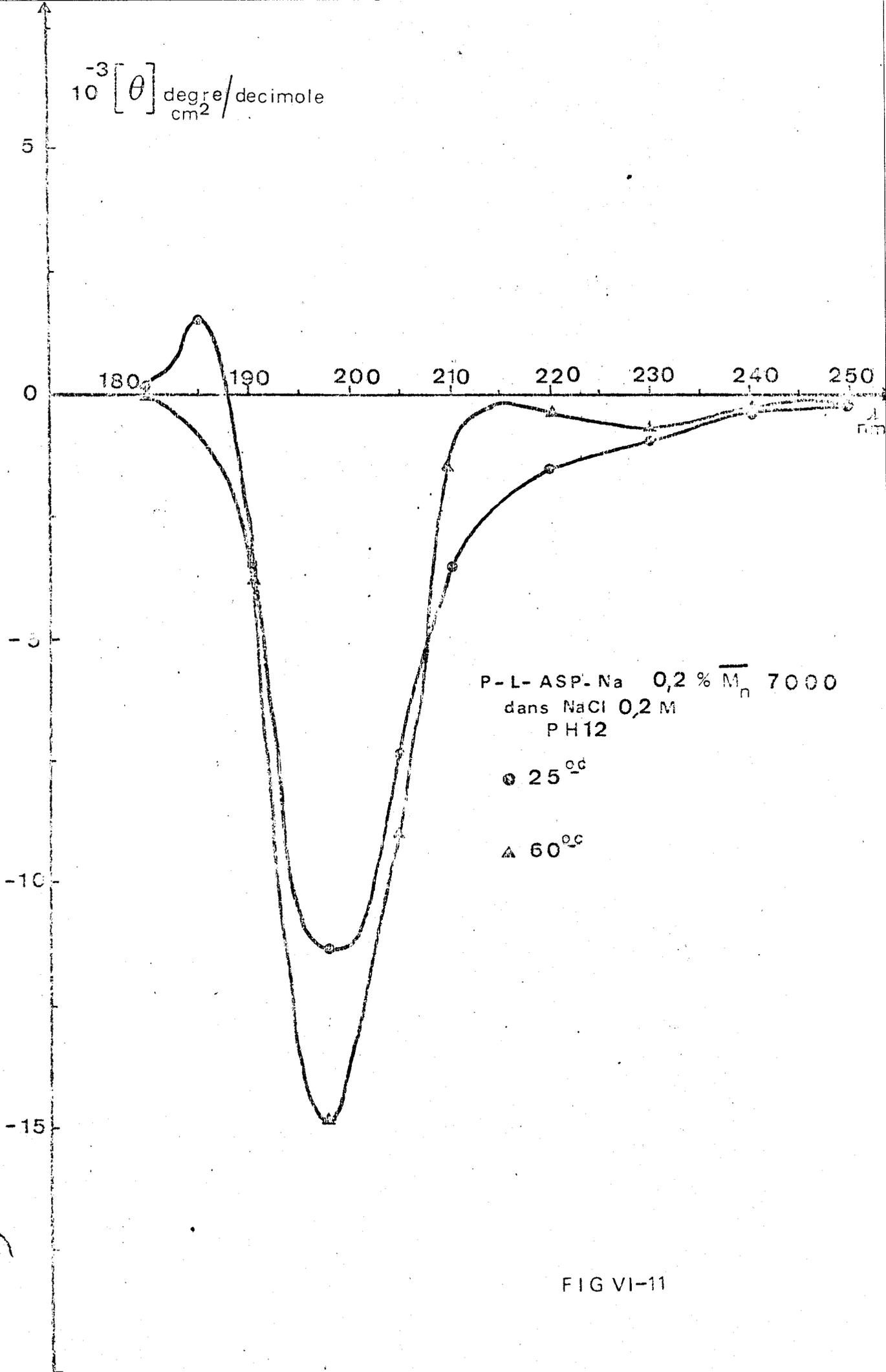


FIG VI-11

### III - Influence de la nature des contre-ions.

Divers auteurs ont étudié l'influence des contre-ions sur des polypeptides. Il convient cependant de distinguer deux modes d'interaction des contre-ions sur le polypeptide :

1) Pour des chaînes latérales ionisables comme l'acide poly-L-glutamique ou la poly-L-Lysine les contre-ions peuvent jouer un rôle stabilisateur de l'hélice  $\alpha$  comme dans l'acide poly-L-glutamique en présence de chlorures de tétraalkylammonium (20). C'est alors le rayon ionique du contre-ion qui intervient (à côté de l'interaction électrostatique) pour modifier la structure du solvant environnant.

2) Il existe aussi une interaction des ions métalliques avec le groupe peptidique, particulièrement avec les sels des groupes I A ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) et II A ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) (21) .

Nous allons d'abord développer le premier point.

#### Effet du rayon ionique du contre-ion.

Nous basant sur les travaux de KANEHIRO (20) et collaborateurs, il nous a semblé intéressant d'essayer d'avoir une proportion plus grande d'hélice  $\alpha$  que nous n'en trouvons dans NaCl 0,2 M et NaCl 2,5 M (où la force ionique ne semble avoir que peu d'effets (fig. 3 et fig. 4).

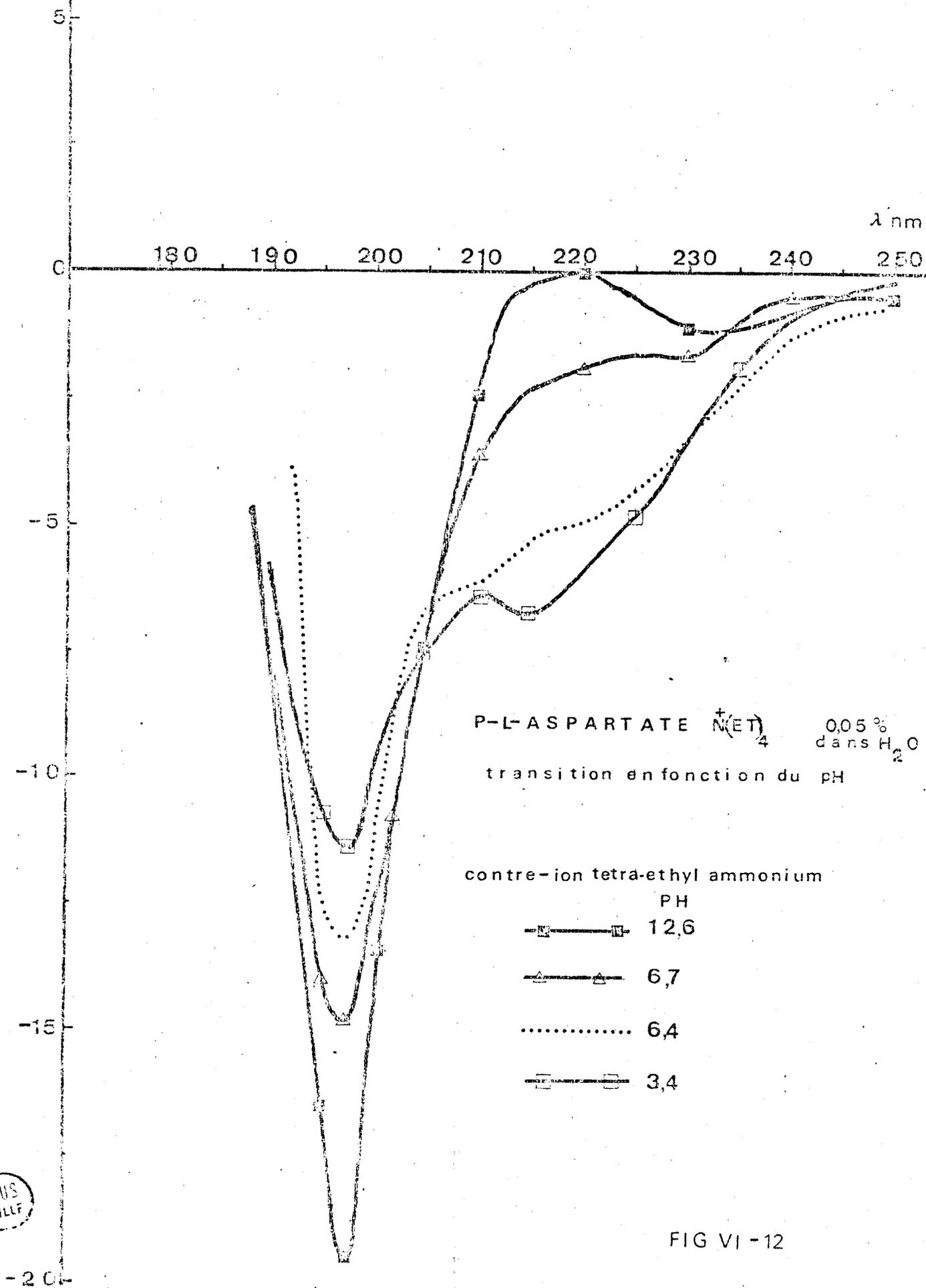
Nous avons regardé l'effet que produisait l'introduction d'un contre-ion plus gros tel le contre-ion tétraéthylammonium. Le polypeptide a été dissout par le tétraéthylammonium hydroxyde ( $\text{Et}_4\text{NOH}$ ) et on a effectué une transition en fonction du pH (fig. 12). En comparant cette transition avec celle obtenue dans NaCl 0,2 M (fig. 3), on peut remarquer plusieurs effets.

A pH basique, il semble y avoir plus de chaîne non ordonnée dans  $(\text{L-Asp NEt}_4)_n$  (pH 6,7) que dans  $(\text{L-AspNa})_n$  (pH 7,6)

$$([\theta]_{198 \text{ nm}}^{\text{Et}_4\text{N}^+} = - 15.000 \text{ d.cm}^2 \text{ décimole}^{-1} \text{ et}$$

$$[\theta]_{198 \text{ nm}}^{\text{Na}} = - 10.000 \text{ d.cm}^2 \text{ décimole}^{-1}.$$

$-10^3 [\theta]$  degre  $\text{cm}^2/\text{decimole}$



BUS  
LILLF

FIG VI -12

Lorsqu'on abaisse le pH (neutralisation partielle), l'hélice  $\alpha$  apparaît à plus haut pH (6,4) pour le contre-ion tétraéthylammonium que pour le contre-ion sodium (pH 4,5) ; ceci est mis en évidence par l'apparition pour (L-Asp  $\text{NEt}_4$ )<sub>n</sub> des deux bandes à 209 et 222 nm ( $[\theta]_{222 \text{ nm}}^{\text{Net}_4} = - 5000 \text{ dcm}^2 / \text{dm}$  et  $[\theta]_{222 \text{ nm}}^{\text{Na}} = - 5000 \text{ d.cm}^2 \text{ d mole}^{-1}$ ). La bande à 198 nm reste plus importante pour le contre-ion  $\text{N}^+\text{Et}_4$  ( $[\theta]_{198 \text{ nm}}^{\text{Net}_4} = - 13000 \text{ d.cm}^2 \text{ d mole}^{-1}$  (pH 6,4) que pour le contre-ion  $\text{Na}^+$  ( $[\theta]_{198 \text{ nm}}^{\text{Na}} = - 9000 \text{ d.cm}^2 \text{ d mole}^{-1}$ ) (pH 4,5). A plus bas pH les deux bandes à 209 et 222 nm disparaissent pour (L-Asp  $\text{NEt}_4$ )<sub>n</sub> (pH 3,4) et une bande à 216 nm apparaît (structure :  $\beta$  ( $[\theta]_{216 \text{ nm}} = - 7000 \text{ degré cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$ )).

Pour le sel de sodium, l'ellipticité de la bande à 222 nm ne change plus lorsqu'on abaisse le pH (pH 2,4).

La bande à 198 nm (chaîne non ordonnée) reste plus intense à bas pH pour le contre-ion tétraéthylammonium que pour le contre-ion Na ( $[\theta]_{198 \text{ nm}}^{\text{NEt}_4} = - 12000 \text{ degré cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$  à pH 3,4 et  $[\theta]_{198 \text{ nm}}^{\text{Na}} = - 7000 \text{ degré cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$ ).

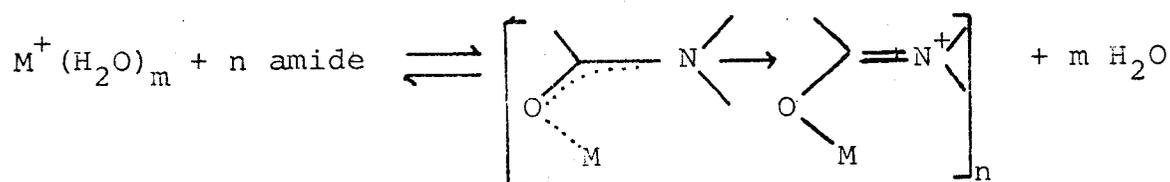
En conclusion, l'introduction d'un contre-ion de forte taille semble augmenter la quantité de la chaîne non ordonnée, mais aussi de promouvoir la transition chaîne non ordonnée  $\rightarrow$  hélice  $\alpha$  à plus haut pH.

De plus, à bas pH on voit apparaître une transition hélice  $\alpha \rightarrow \beta$  qui semble être due à un phénomène d'agrégation (pH 3,4). A pH très basique (pH 12 fig. 12) la bande à 216 nm semble avoir disparue et la bande à 198 nm (chaîne non ordonnée) a une ellipticité forte ( $[\theta]_{198 \text{ nm}}^{\text{Et}_4\text{N}} = - 20000 \text{ degré.cm}^2 \text{ décimole}^{-1}$ ). Le rôle du contre-ion  $\text{N}^+\text{Et}_4$  serait de "s'infiltrer" dans le réseau monoclinique des formes  $\beta$  ~~et~~ et de les détruire, stabilisant ainsi les groupements carboxylates de la chaîne non ordonnée. On aurait alors une transition  $\beta$  ~~et~~  $\rightarrow$  chaîne non ordonnée à haut pH, due à la taille du contre-ion.

Effet de la nature du contre-ion

BALASUBRAMANIAN et MISRA (21) ont montré que les cations des groupes I A et II A interagissent avec le groupe peptidique par un mécanisme d'interaction ion-dipôle. Ils ont montré que l'interaction du groupe peptidique avec le cation varie dans l'ordre  $H^+ > Li^+ > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^+ > K^+$ . Le cation se lie à l'oxygène du carbonyle, amenant une augmentation de l'ordre de la liaison CN et une diminution dans l'ordre de la liaison C=O, ce qui change de façon significative les propriétés optiques du chromophore amide.

En général l'addition de ces ions induit des déplacements hypochromiques (réduction dans l'intensité de la bande) et hypsochromiques (déplacement vers les plus faibles longueurs d'onde) dans les spectres du chromophore amide. La présence de points isobestiques dans le spectre obtenu par addition de ces cations montre l'existence d'un équilibre :



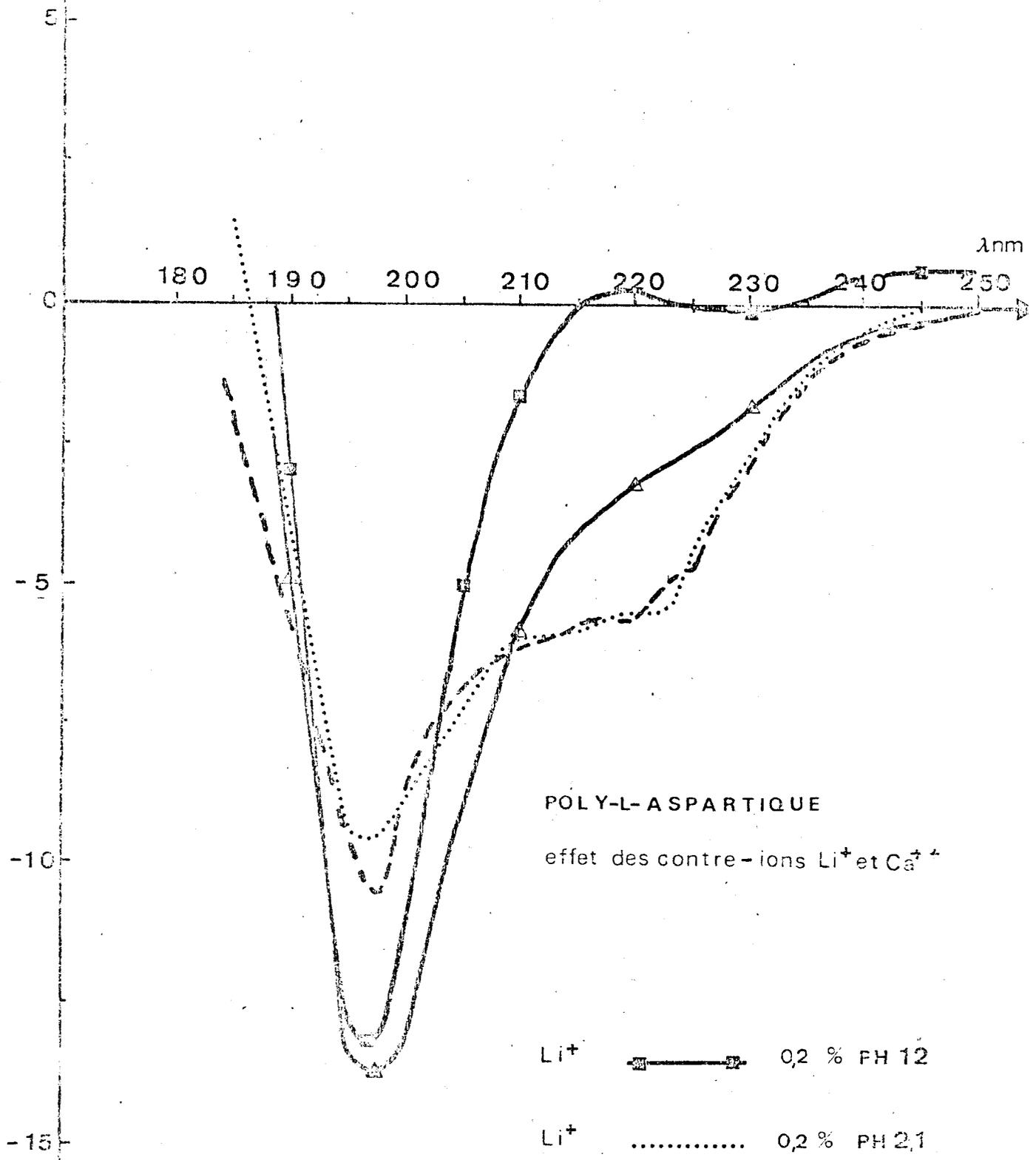
Nous reviendrons sur ce problème de solvatation (structure de l'eau au voisinage du groupe amide) dans le chapitre suivant.

La figure 13 nous montre les spectres dichroïques obtenus lorsqu'on prend des cations complexants comme  $Li^+$  ou  $Ca^{2+}$ .

En pH acide on voit immédiatement que les spectres dichroïques des sels de  $Li^+$  et  $Ca^{2+}$  ressemblent tout à fait au spectre dichroïque du polypeptide neutralisé.

En milieu basique, l'addition d'ions  $Ca^{2+}$  augmente l'ellipticité de la bande à 215 - 220 nm ( $[0] = -4 \cdot 10^3$  degré  $cm^2$  décimole $^{-1}$ ) par rapport à l'addition de  $Na^+$  (NaF 0,2 M et 2,5 M fig. 3 et 4), alors que l'addition d'ions  $Li^+$  donne une ellipticité légèrement positive à 217 nm (bande correspondant à la

$[\theta] 10^{-3}$  degre  $\text{cm}^2/\text{decimole}$



POLY-L-ASPARTIQUE  
effet des contre-ions  $\text{Li}^+$  et  $\text{Ca}^{++}$

- $\text{Li}^+$         0,2 % PH 12
- $\text{Li}^+$     .....    0,2 % PH 2,1
- $\text{Ca}^{++}$         0,1 % PH 10,4
- $\text{Ca}^{++}$         0,1 % PH 2,2

FIG VI-13



structure  $\beta$   $\#$ ) (pour le glutamate de sodium l'addition de  $\text{Li}^+$  fait disparaître cette bande (23) ). Il semblerait donc que  $\text{Li}^+$  qui se fixe (avec  $\text{H}^+$ ) plus fortement sur l'oxygène carbonyle du groupe amide que  $\text{Na}^+$ , empêche la formation de formes  $\beta$   $\#$  en détruisant les liaisons hydrogènes des formes  $\beta$   $\#$  (liaison  $\text{C} = \text{O}$  plus courte et oxygène complexé). Cependant les ions  $\text{Ca}^{2+}$  devraient eux aussi être des destructeurs des liaisons hydrogènes engagées dans les formes  $\beta$   $\#$ , mais nous avons deux effets compétitifs : complexation du groupe amide et fixation sur le groupe carboxylaté. C'est ce dernier point qui semble l'emporter pour  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, ces ions sont solvatés par l'eau et pour  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $n \text{H}_2\text{O}$  c'est la grosseur du cation hydraté qui semble empêcher celui-ci de parvenir au groupe amide engagé dans des formes  $\beta$   $\#$ .

#### C - CONCLUSIONS

Nous avons vu que la nature des spectres dichroïques n'est pas simple et qu'il a fallu recourir à des méthodes d'analyse telles l'infra-rouge et le Raman pour identifier les structures en présence et pouvoir ensuite reconstituer approximativement les spectres dichroïques. Nous avons vu quels principaux paramètres (masse, température, nature du contre-ion) il fallait faire intervenir. Nous avons vu aussi apparaître des transitions dues à la température ( $\beta$   $\#$   $\rightarrow$  Random Coil) ou révélées par la présence de contre-ions (Random Coil  $\rightarrow$  hélice  $\alpha$   $\rightarrow$   $\beta$   $\#$ ).

On s'aperçoit par l'influence des contre-ions que la nature du champ électrostatique au voisinage du polymère joue sur la structure du polypeptide. Il serait intéressant d'étudier le changement de solvation (et donc de constante diélectrique) au cours d'une transition en fonction du pH.

- 1 - V.L. ROSENFELD,  
Z. phys., 1928 52 161-174.
- 2 - J.G. KIRKWOOD,  
J. Chem. Phys., 1937 5 479-491.
- 3 - E.V. CONDON, W. ALTAR, H. EYRING,  
J. Chem. Phys., 1937 5 753-775.
- 4 - W. MOFFIT,  
J. Chem. Phys., 1956 25 467-478.
- 5 - I. TINOCO Jr.,  
Adv. Chem. Phys., 1962 vol IV 113-160.
- 6 - J.A. SCHELLMAN, P. ORIEL,  
J. Chem. Phys., 1962 37 2114-2124.
- 7 - J.A. SCHELLMAN,  
Chem. Reviews, 1975 75 (3) 323-331.
- 8 - M.L. TIFFANY, S. KRIMM,  
Biopolymers, 1968 6 1770.
- 9 - M.L. TIFFANY, S. KRIMM,  
Biopolymers, 1972 11 2309-2316.
- 10 - M.L. TIFFANY, S. KRIMM,  
Biopolymers, 1973 12 575-587.
- 11 - D.G. DEARBORN, D.B. WETLAUFER,  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970 39 314.
- 12 - V.A. ZUBKOV, J.M. BIRSHTAIN, J.S. MILEVSKAYA,  
Biopolymers, 1971 10 2051-2061.
- 13 - E.W. RONISH, S. KRIMM,  
Biopolymers, 1972 11 1919-1928.
- 14 - K. ITOH, B.M. FOXMAN, G.D. FASMAN,  
Biopolymers, 1976 15 419-455.
- 15 - V. MADISON, J. SCHELLMAN,  
Biopolymers, 1972 14 1011-1076.
- 16 - T. SHIMANOUCI, Y. KOYAMA, K. ITOH,  
Prog. Polym. Sc. Japan, 1974 7 273-368.

C H A P I T R E   V I I

SOLVATATION DE L'ACIDE POLY  $\alpha$  -L ASPARTIQUE

## CHAPITRE VII

### SOLVATATION DE L'ACIDE POLY $\alpha$ -L ASPARTIQUE

A - Bibliographie. Les différents modes d'étude de la solvatisation des polypeptides.

I - Calculs quantiques

II - Mesure de relaxation en spectroscopie mécanique dynamique.

III - Dispersion diélectrique

IV - Temps de relaxation par RMN

V - Infra-Rouge proche.

B - Etudes en Infra-Rouge proche de l'acide poly  $\alpha$ -L-Aspartique

A - DIFFERENTES METHODES D'ETUDE DE LA SOLVATATION DES POLY-  
PEPTIDES ET DES PROTEINES.

L'hydratation des polypeptides est l'un des plus importants phénomènes intervenant dans l'existence des structures secondaires, principalement au niveau moléculaire où l'eau se trouve associée par liaisons hydrogènes au squelette peptidique ainsi que sur les groupes polaires portés par les chaînes latérales.

Il existe différentes manières de considérer le problème. On peut regarder la variation des propriétés du polymère par solvatisation par des techniques telles que la relaxation mécanique dynamique, la relaxation diélectrique, ou encore en mesurant les variations de certaines propriétés du solvant lui-même au voisinage du polymère (temps de relaxation des deutérons par RMN, Infra-Rouge proche).

Il nous a paru intéressant, avant d'entamer l'étude par infra-rouge proche de résumer quelques techniques de mesure de la solvatisation des polypeptides.

I - Les calculs semi-empiriques

De nombreux calculs quantiques et semi-empiriques ont été effectués sur les polypeptides visant à donner une évaluation de l'énergie libre de solvatisation minimale pour le système polypeptide - eau de solvatisation considéré. HÖPFINGER (1) a réalisé un tel calcul sur les acides Poly-L-Glutamique et poly-L-Aspartique suivant leur structure secondaire. Il a trouvé qu'un modèle à 2 molécules d'eau par groupement peptidique offrait l'énergie libre minimale d'interaction polymère-solvant (ici l'eau). Il montrait que les interactions groupe polaire - solvant aqueux étaient plus stabilisantes. Il montrait de plus que de toutes les structures secondaires, c'était l'hélice  $\alpha$  droite qui avait l'énergie libre d'interaction polymère-solvant la moins favorable.

## II - Mesure de relaxation en spectroscopie mécanique dynamique.

Par des mesures de perte mécanique dynamique en fonction de la solvataion sur le sel de sodium de l'acide poly L-glutamique, SHIRAIISHI (2) et collaborateurs mettaient en évidence deux modes différents de relaxation des chaînes latérales, correspondant à la présence de deux structures secondaires dont les pourcentages variaient avec l'hydratation.

Par ces mesures sur des films différemment hydratés et en s'aidant d'autres techniques comme l'infra-rouge fondamental et la D.S.C. (Differential Scanning Calorimeter : Analyse thermique différentielle) ils ont pu identifier les deux structures secondaires et l'hydratation correspondante. Ainsi à 46 % d'humidité on peut voir des formes  $\beta$  tandis qu'à 86 % en humidité apparaît la forme hélice  $\alpha$  tandis que disparaît la forme  $\beta$ . Entre ces deux taux d'humidité on a un mélange des deux formes.

Ils en concluent la solvataion suivante pour les deux formes : 4 molécules d'eau par résidu pour les chaînes  $\beta$  (0,5 g eau/g de PGANa) et 7,5 molécules d'eau de solvataion par résidu pour les hélices  $\alpha$  (0,9 g eau/g de PGANa), l'eau extérieure (eau de remplissage) ne changeant pas les propriétés.

Ainsi pour l'hélice  $\alpha$  (humidité > 86 %) il existe des répulsions électrostatiques entre chaînes latérales, tandis qu'à un taux d'humidité < 46 %, il y a compétition entre forces électrostatiques interchaîne et liaisons hydrogène qui stabilisent la forme  $\beta$ .

## III - Mesure de dispersion diélectrique.

Les mesures de dispersion diélectrique et l'étude de la relaxation diélectrique du squelette peptidique, surtout des chaînes latérales, peut amener des renseignements sur la solvataion des polypeptides et la détermination de la quantité d'eau associée (mesures à basse fréquence) à l'aide de la perte diélectrique (3).

Cependant, les mesures de dispersion diélectrique dans l'eau sont gênées par la forte conductance du milieu. Nous n'avons pu mener cette étude à bien pour ces raisons techniques. TAKASHIMA (4) a mené cette étude pour l'acide poly L-glutamique dans l'eau et étudié la perte diélectrique lors de la transition chaîne non ordonnée  $\rightarrow$  hélice  $\alpha$  en mettant en évidence la possibilité d'avoir une structure intermédiaire lors de cette transition.

IV - Mesures des temps de relaxation spin réseau ( $T_1$ ) de  $D_2O$  par RMN.

GLASEL (5) a mené l'étude des  $T_1$  en fonction du pH des molécules de  $D_2O$  (temps de réorientation des deutérons libres  $T_1 \sim 0,5$  sec) qui solvatent l'acide poly-L-glutamique et la poly-L-Lysine. Il en déduisait un seul temps de corrélation ( $T = 1,6 \cdot 10^{-8}$  sec) et plusieurs règles phénoménologiques, à savoir :

a) les groupements  $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{C} = \text{O} \\ \diagdown \end{array}$ ,  $\begin{array}{l} \diagup \\ \text{N} - \text{H} \\ \diagdown \end{array}$ ,  $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}^- \text{M}^+$ ,  $\text{C} - \text{NH}_3^+ \text{X}^-$  n'ont pas de fortes interactions avec l'eau.

b)  $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$ ,  $\text{C} - \text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{H} \\ \diagdown \text{H} \end{array}$  ont de fortes interactions avec l'eau.

c) Les fortes interactions de l'eau avec des polymères ayant une charge formelle se produisent lorsque cette charge est partiellement ou totalement neutralisée.

Quand les fluctuations intramoléculaires ont une durée de vie égale à  $10^{-3}$  seconde, les interactions polymères-solvants sont détruites.

Ainsi il en conclut que les ions  $\text{COO}^-$  de la chaîne latérale de l'acide polyglutamique peuvent interagir avec des groupes NH avec délocalisation de la charge et qu'il y a un processus compétitif entre les interactions polymère - eau et polymère contre-ion.

De plus il montre que les interactions de l'eau avec les groupements imides ou les fonctions carbonyles des groupes peptidiques doivent être très faibles.

### V - INFRA ROUGE PROCHE.

Cette méthode plus simple que les autres nous a cependant donné de bons résultats. Elle est basée sur les déplacements de la bande de vibration de l'eau ( $\nu_1 + \nu_3$ ) engagée dans une interaction polymère - solvant. (Domaine du proche infra-rouge 1,3 à 1,7  $\mu$  ou 8000 - 6000  $\text{cm}^{-1}$ ).

Mc CABE et FISHER (6) ont les premiers utilisé la méthode de l'absorption infra-rouge différentielle pour connaître la solvataion des sels alcalins.

La figure 1 schématise les composants spectraux et le spectre différentiel. Polymère (échantillon) - eau (référence)  
Ici :

- $V_{in}$  est le volume molaire intrinsèque du soluté
- $\phi_v$  est le volume molaire apparent du soluté
- $nV_h$  volume d'hydratation (eau fixée sur le polymère)
- $n$  nombre de molécules d'eau fixée
- $V_{exclu}$  volume molaire exclu par le soluté hydraté
- $V_{el}$  volume d'électrostriction (perte de volume de l'eau interagissant avec le polymère)

Des équations simples nous donnent

$$V_{exclu} = 10^3 \frac{F V}{C}$$

$C$  concentration molaire du soluté

$$FV = fN_{\mu} \text{ facteur de normalisation} = \frac{|\Delta A|}{H_2O}$$

$|\Delta A|$  absorption différentielle (valeur absolue) entre l'échantillon et la référence (prise à la fréquence  $\mu$ )

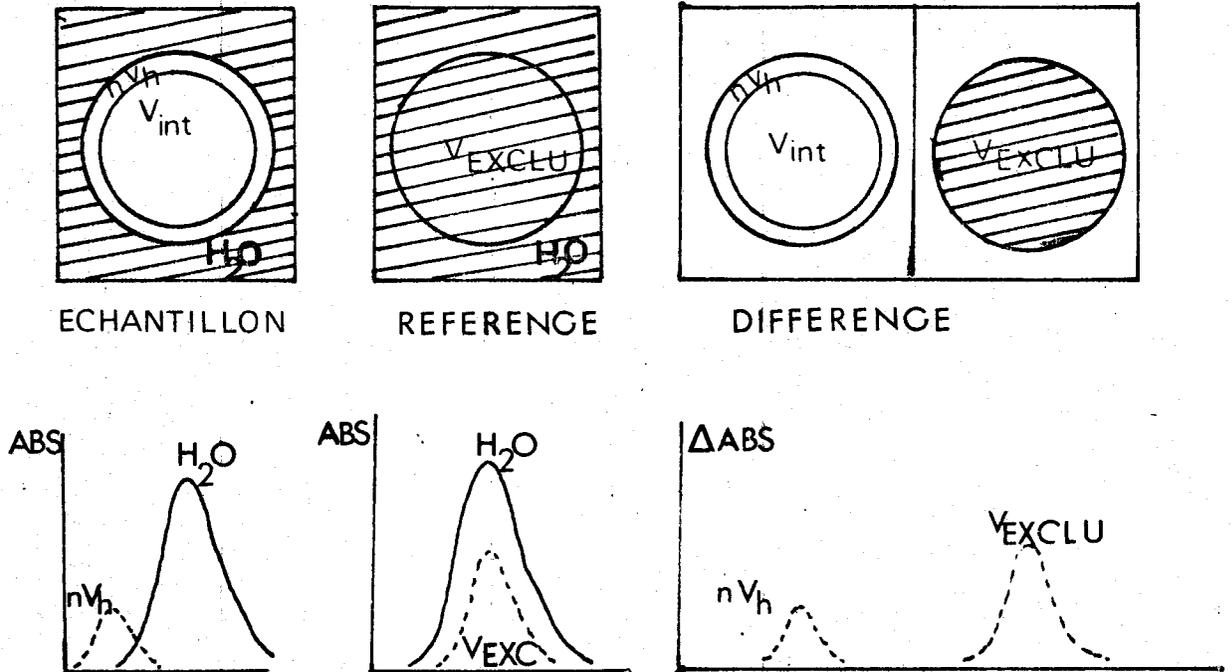


Figure VII-1

$H_2O$  Absorption par l'eau (prise à la fréquence  $\mu$ ).

le rapport  $fN_{\mu}$  est pris à la fréquence ( $\mu$ ) où l'eau a un maximum d'absorption (c'est-à-dire à  $1,44 \mu$ ) où  $\Delta ABS(H_2O)_{1,44\mu} = 1,34$ .

On a aussi :

$$\phi_v = 10^3 \frac{(d_o - d)}{c d_o} + \frac{M_2}{d_o}$$

$d$  densité du soluté

$d_o$  densité de l'eau

$M_2$  masse du résidu peptidique

$C$  concentration molaire = 0,13 M

Le produit  $f_{N_o}(H_2O)$  pour toutes les longueurs d'onde donne le spectre "normalisé" de l'eau qui représente la contribution

nette de l'absorption par l'eau dans la cellule référence (courbe B).

L'addition de cette courbe au spectre différentiel donne la contribution nette de l'absorption par l'eau dans l'échantillon (courbe C).

On a donc l'expression :

$$V_{\text{exclu}} - \phi_v = n V_0$$

avec  $V_0$  : volume molaire de l'eau libre (à 25°C)

$d_0$  : densité de l'eau à 25°C = 0,997048 g/ml

$V_0$  : 18,053 cm<sup>3</sup>/ml

$n$  : nombre de moles d'eau fixées sur le polymère par résidu.

#### B - ETUDES EN INFRA ROUGE PROCHE DE L'ACIDE POLY $\alpha$ -L-ASPARTIQUE

Ce que nous voyons dans les spectres, ce sont les bandes de l'eau associée aux polymères (plus des bandes NH et NH<sub>3</sub><sup>+</sup> qui absorbent dans ces régions).

Il est donc nécessaire d'avoir des composés modèles (acide propionique pour les chaînes latérales, la N-acétyl glycine pour le groupe peptidique) pour pouvoir attribuer les bandes de l'eau fixée ou des bandes de vibration N - H qui apparaissent aussi dans ce domaine.

Nous allons nous servir également de l'étude faite par SUBRAMANIAN et FISCHER (7) sur l'acide poly L-glutamique, sur la poly-L-Lysine et sur des modèles comme la L-Lysine, l'aniline et la N-Butyl amine.

Ces auteurs étudient la bande à 1,4  $\mu$  due à la bande de combinaison ( $\nu_1 + \nu_3$ ) de l'eau.

Ils montrent que l'eau (sous forme de monomère dans CCl<sub>4</sub>) a un  $\lambda_{\text{max}}$  d'absorption vers 1,4  $\mu$  et que ce sont les

électrons p libres de l'oxygène qui sont engagés dans des liaisons H pour l'eau interagissant avec la poly L-Lysine (groupe  $\epsilon$   $\text{NH}_2$ ).

De plus, selon eux les groupements  $-\text{NH}_3^+$  (longueur d'onde supérieure à  $1,54 \mu$ ) doivent se combiner avec  $\text{Cl}^-$  car on n'observe pas de solvatation de ce groupement (ABS résiduelle et non de solvatation). Le tableau I résume les fréquences et les attributions des raies observées par SUBRAMANIAN et FISCHER.

Longueurs d'onde (en $\mu$ )	Composé	Attribution des bandes
1,406	P-L-Lysine	Eau liée au groupe $\text{NH}_2$ (par l'oxygène)
1,408	L-Lysine	
1,402	n-BU $\text{NH}_2$	
1,46	P-L-Lysine	N - H libre (de $\epsilon\text{-NH}_2$ )
1,54	P-L-Lysine	N - H lié à $\text{H}_2\text{O}$ (de $\epsilon\text{-NH}_2$ )
1,49	P-L-Lysine	bandes $\nu_1 + \nu_3$ asymétrique et symétrique du groupe $\epsilon\text{-NH}_2$
1,527		non ionisé

TABLEAU I

Les figures 2, 3 et 4 donnent les spectres différentiels pour l'acide propionique, la N acétyl-glycine et l'acide poly  $\alpha$ -L-aspartique (échantillons) contre leur sel de sodium (référence). Ils représentent la différence de solvatation entre pH acide et basique.

Cependant pour avoir une analyse plus fine nous avons pris chaque soluté (échantillon) contre l'eau (référence). La

BUS  
LILLE

$\Delta A$

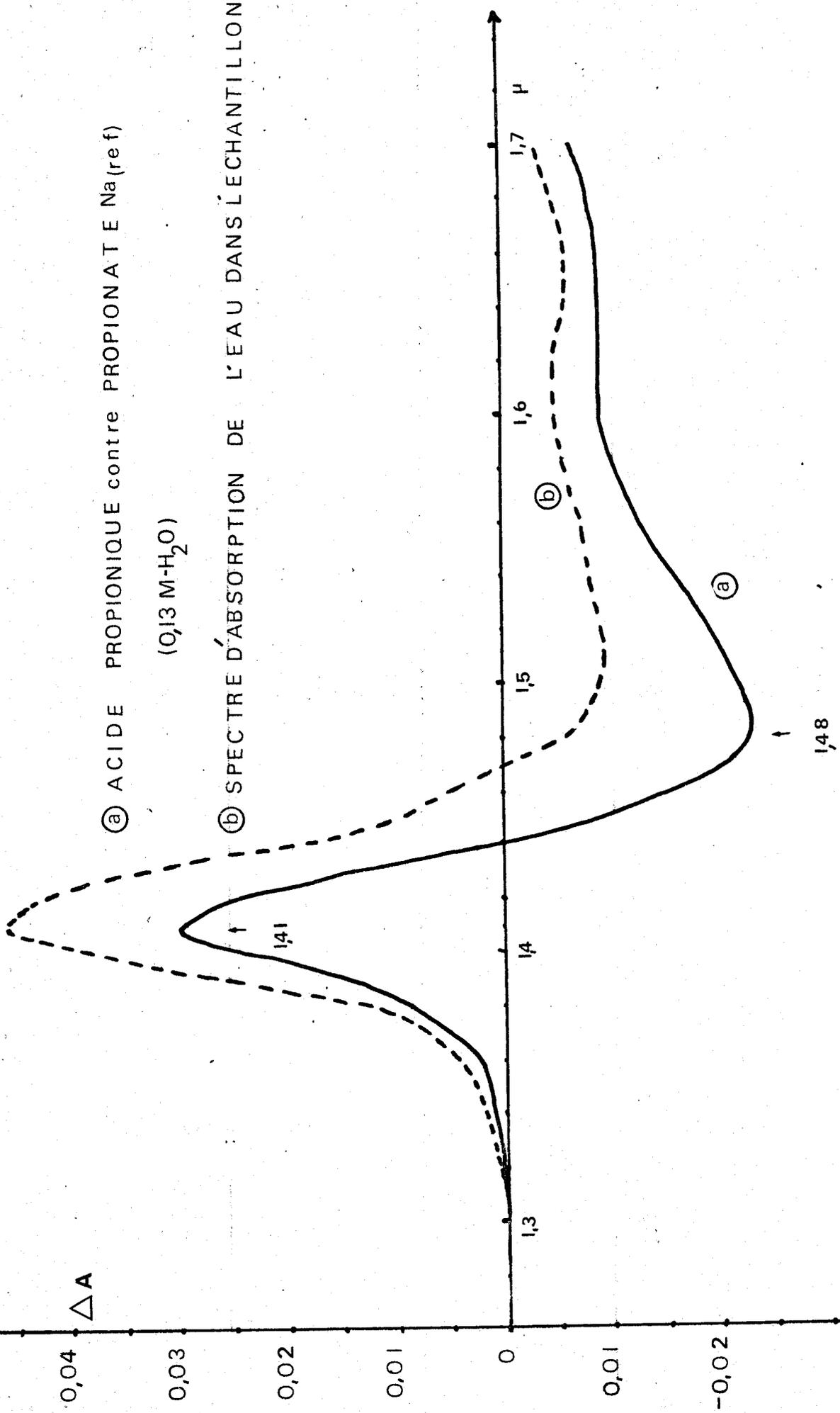


FIG VII-2

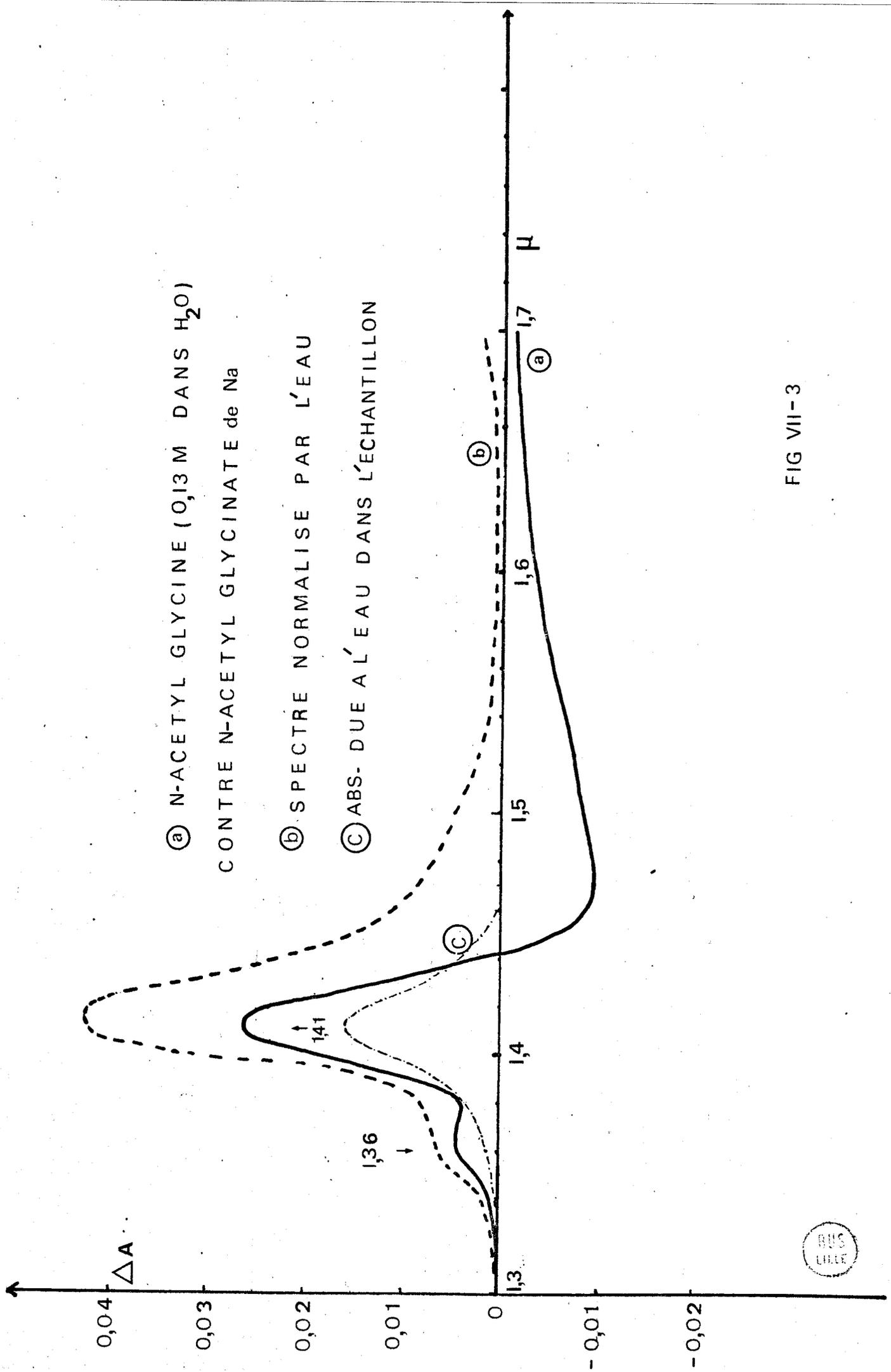


FIG VII-3





$\Delta A$

P-L-ASPARTIQUE 0,13M(H<sub>2</sub>O)

- (a) PH 4 - PH8(ref)
- (b) H<sub>2</sub>O normalisée
- (c) spectre d'hydratation du PLASP

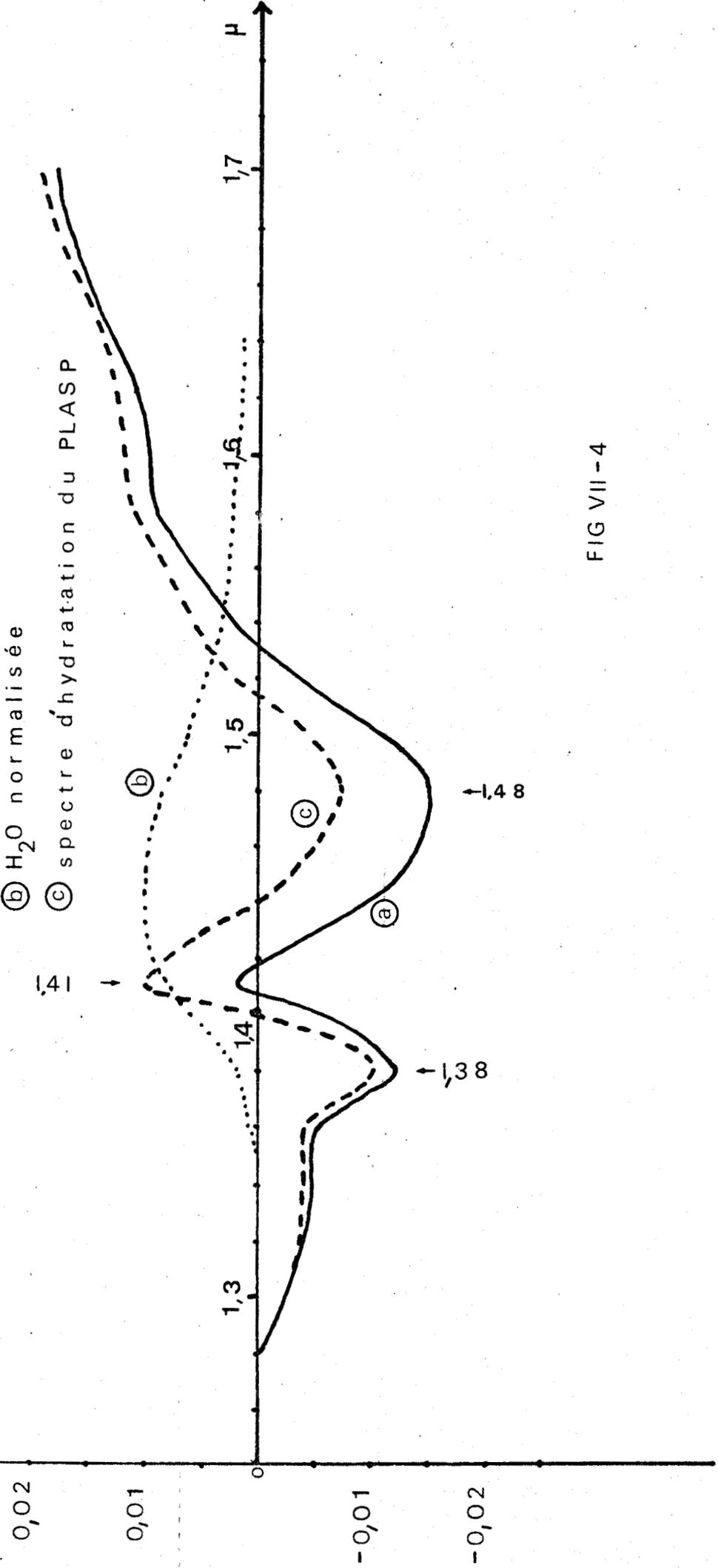


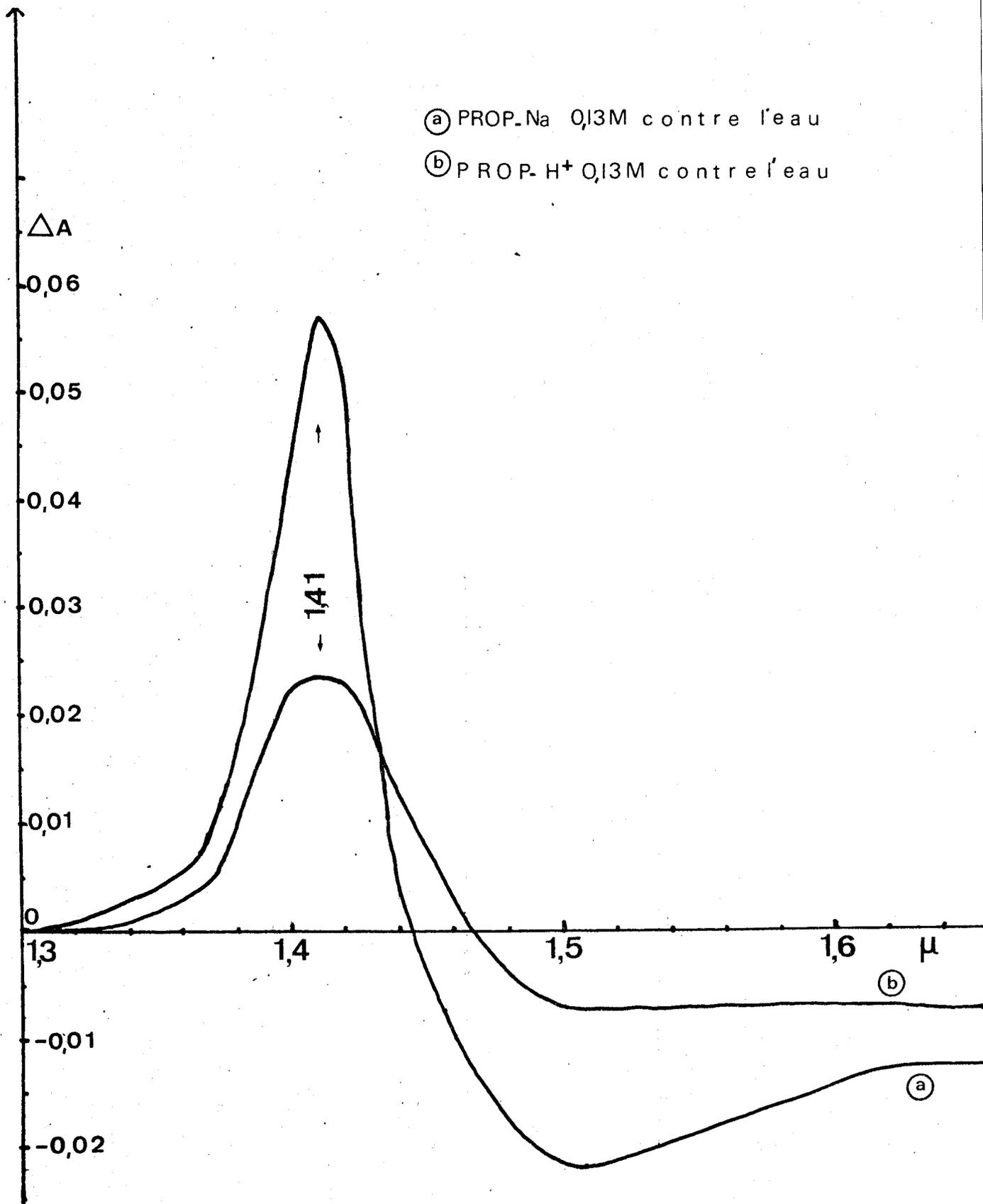
FIG VII-4

différence de solvatation entre la forme acide et basique a été retrouvée la même que pour l'absorption différentielle directe (acide (échantillon) - base (référence) ).

Les figures 5, 6 et 7 montrent ces spectres différentiels (contre l'eau). Pour les spectres de la N acétyl-glycine et de l'acide poly  $\alpha$  L aspartique contre l'eau, l'allure dissymétrique de la bande à  $1,41 \mu$  nous a conduit à chercher d'autres bandes en recomposant le spectre. Les longueurs d'onde des maxima d'absorption sont montrés dans le tableau II.

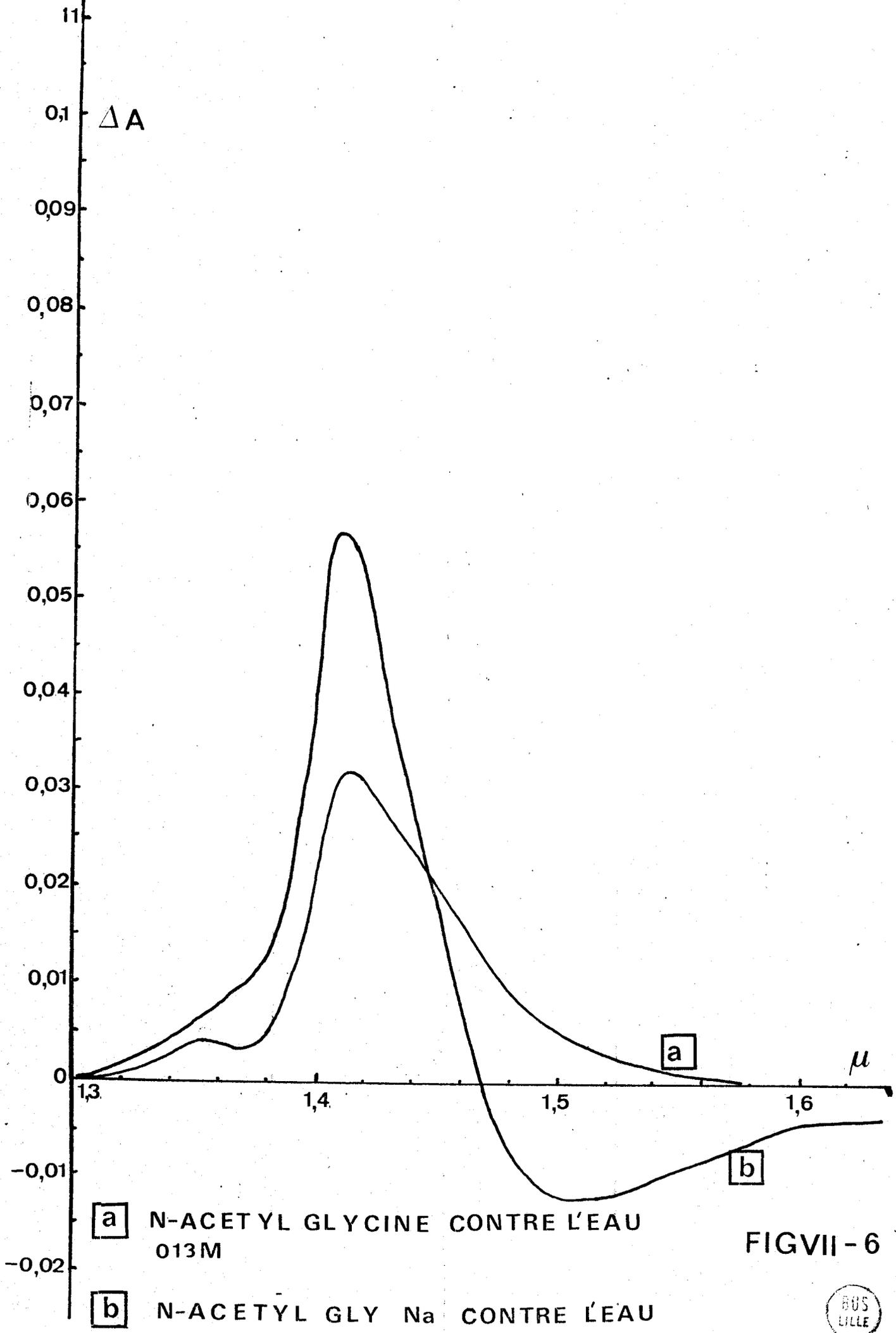
Composé	longueur d'onde	attribution
propionate de sodium	$1,41 \mu$	EAU FIXEE SUR COO <sup>-</sup>
acide propionique	$1,41 \mu$	EAU FIXEE SUR COOH
N acétyl glycinat de sodium	$1,41 \mu$	EAU FIXEE SUR COO <sup>-</sup>
N acétyl glycine	$1,36 \mu$	EAU FIXEE SUR CO CARBONYLE
	$1,41 \mu$	EAU FIXEE SUR COOH
	$1,46 \mu$	NH HYDRATÉ
P-L-Aspartate de sodium	$1,41 \mu$	EAU FIXEE SUR COO <sup>-</sup>
P-L-Aspartique Acide	$1,36 \mu$	EAU FIXEE SUR CO CARBONYLE
	$1,41 \mu$	EAU FIXEE SUR COOH
	$1,46 \mu$	NH HYDRATÉ
	$1,54 \mu$	NH LIBRE NON HYDRATÉ
	$1,6 \mu$	- NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>

TABEAU II



BHS  
 1107

FIG VII-5



**a** N-ACETYL GLYCINE CONTRE L'EAU  
013M

**b** N-ACETYL GLY Na CONTRE L'EAU

FIGVII-6



ACIDE POLY-L-ASPARTIQUE

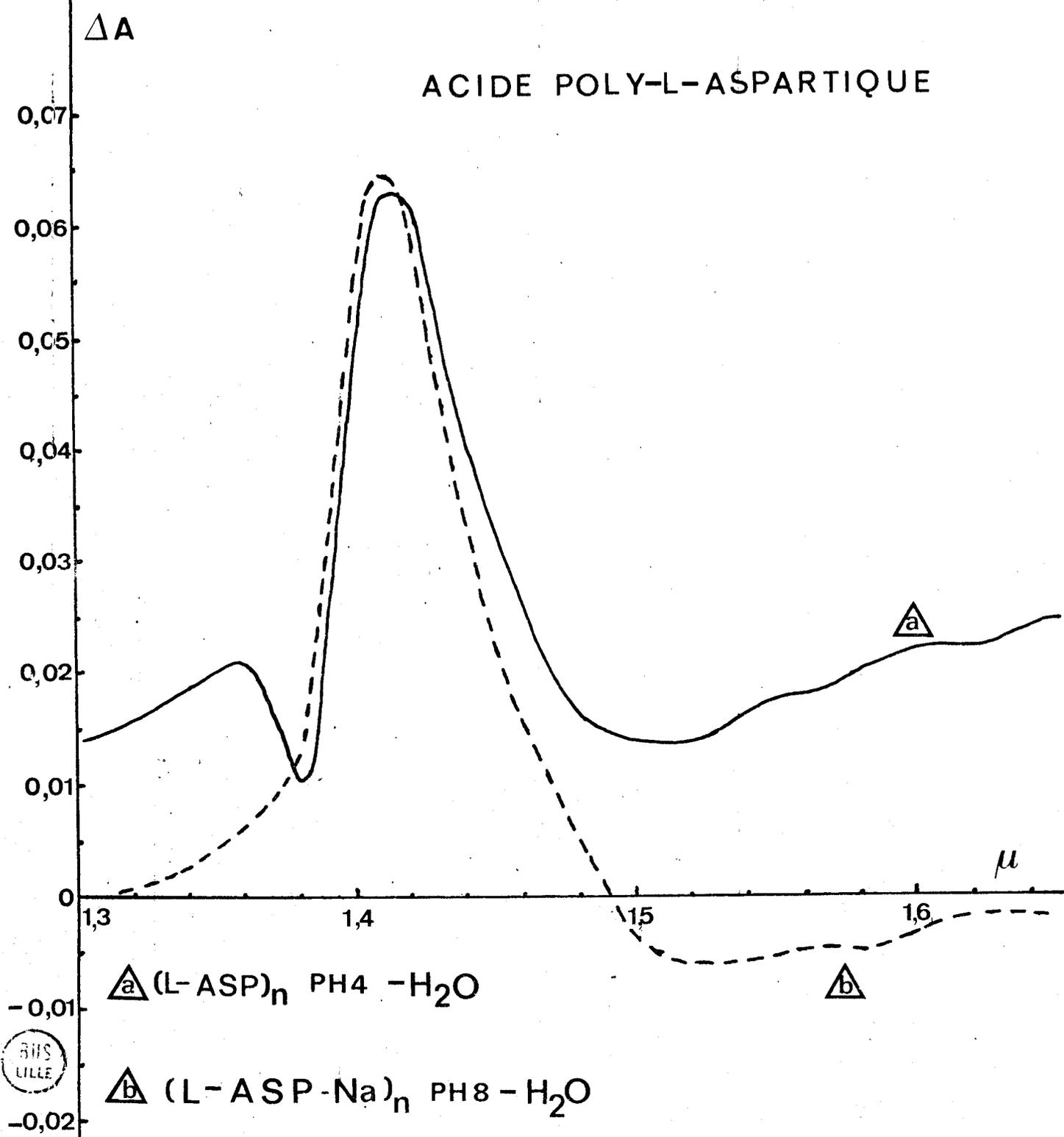


FIG VII-7

Le tableau III nous montre les résultats obtenus par les calculs des deux volumes exclus et des volumes molaires apparents.

Composé (0,13 M)	densité	$f_N$	$V_{\text{exclu}}$ cm <sup>3</sup> / mole	$\phi_V$ cm <sup>3</sup> / mole	n H <sub>2</sub> O/ résidu	$\Delta n$ calc.	$\Delta n$ exp.
propionate de sodium	1,002453	$7,62 \cdot 10^{-3}$	204	58,6	7,22	4,25	4,5
Acide pro- pionique	0,99629	$9,33 \cdot 10^{-3}$	137,7	84,08	2,97		
N acétyl glycinate de sodium	1,006012	$2,81 \cdot 10^{-2}$	215,4	71,2	7,98	3,9	4
N acétyl glycine	1,001003	$1,12 \cdot 10^{-2}$	160,8	86,8	4,1		
P-L-Aspar- tate de sodium	1,00443	$2,05 \cdot 10^{-2}$	157,8	80,45	4,28		0,6
P-L-Aspar- tique Acide	0,99843	$2,98 \cdot 10^{-2}$	172,3	104,6	3,75		

TABLEAU III

Le rapport du nombre de moles de solvation des sels de sodium du poly L-Aspartate de sodium au nombre de moles pour le sel de Na de la N-acétyl glycine est égal à 0,57. Il y aurait donc en milieu basique environ 43 % des groupements carboxylates du polypeptide qui ne seraient pas solvatés. Ceci correspond aux valeurs



trouvées par dichroïsme circulaire (45 % de forme  $\beta_2$  dont les groupements carboxylates s'interpénètrent très fortement). Le groupe amide dans la N-acétyl glycine a 1,1 mole d'eau d'hydratation (par résidu). En milieu basique comme en milieu acide le groupe peptidique est solvaté (0,7 mole d'eau en milieu basique, 1,1 mole d'eau en milieu acide).

Pour la N-acétyl glycine, la bande à 1,46  $\mu$  doit exister mais n'est pas décelable d'après le spectre en milieu basique. On la voit apparaître grâce à la déformation du pic à 1,41  $\mu$  en milieu acide. La bande à 1,36  $\mu$  n'apparaît qu'en milieu acide et son intensité est environ moitié de celle à 1,46  $\mu$ . (FIG 8)

Pour l'acide poly-L-Aspartique la bande à 1,36  $\mu$  devient très intense. (deux fois la bande à 1,46  $\mu$   $\Delta A = 0,001$ ). De plus apparaissent deux autres bandes à 1,54  $\mu$  et à 1,6  $\mu$ . (FIG 9)

La bande à 1,36  $\mu$  ne peut être due au groupement hydroxyle du groupement carboxylique car on ne la met pas en évidence pour l'acide propionique.

Nous pensons que la bande à 1,36  $\mu$  est due à la solvation du groupe amide.

De plus, SUBRAMANIAN et FISCHER (7) en prenant leurs modèles montrent que la bande à 1,46  $\mu$  est due à un N - H libre tandis que la bande à 1,54  $\mu$  est due au proton amide lié à l'eau. La bande vers 1,6  $\mu$  trouve son origine dans l'absorption résiduelle des  $\text{NH}_3^+$ . Cependant on ne voit pas de bande à 1,54  $\mu$  pour la N-acétyl glycine alors que le NH amide doit être hydraté (0,7 mole  $\text{H}_2\text{O}$ /groupe N-H). Nous pensons pouvoir attribuer les bandes pour l'acide poly  $\alpha$  L aspartique, à 1,36  $\mu$  au CO carbonyle hydraté et à 1,46  $\mu$  au proton amide hydraté. Les deux bandes ont environ la même intensité. Nous proposons le modèle suivant d'hydratation du groupement amide (1 mole  $\text{H}_2\text{O}$ /résidu).

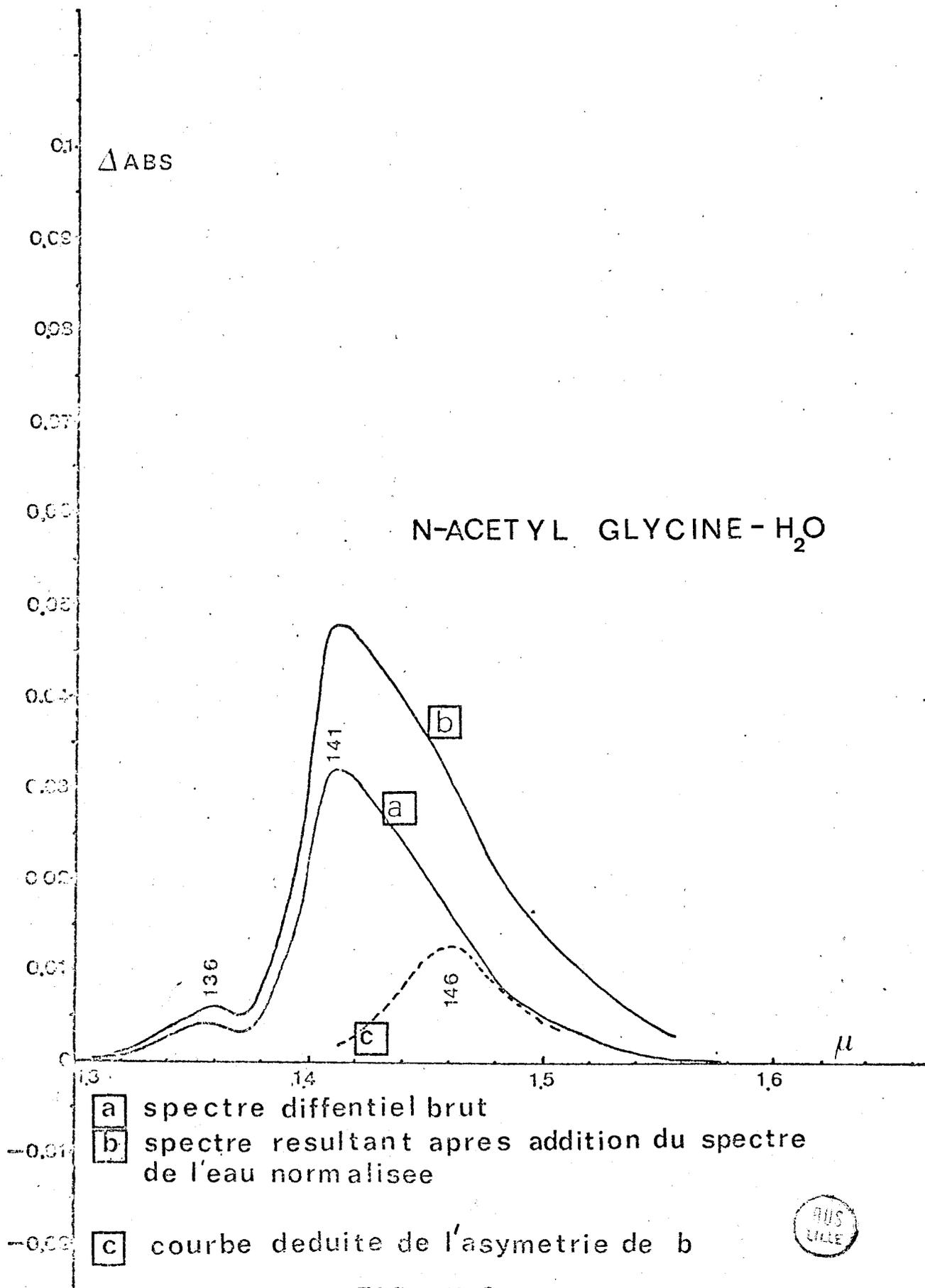
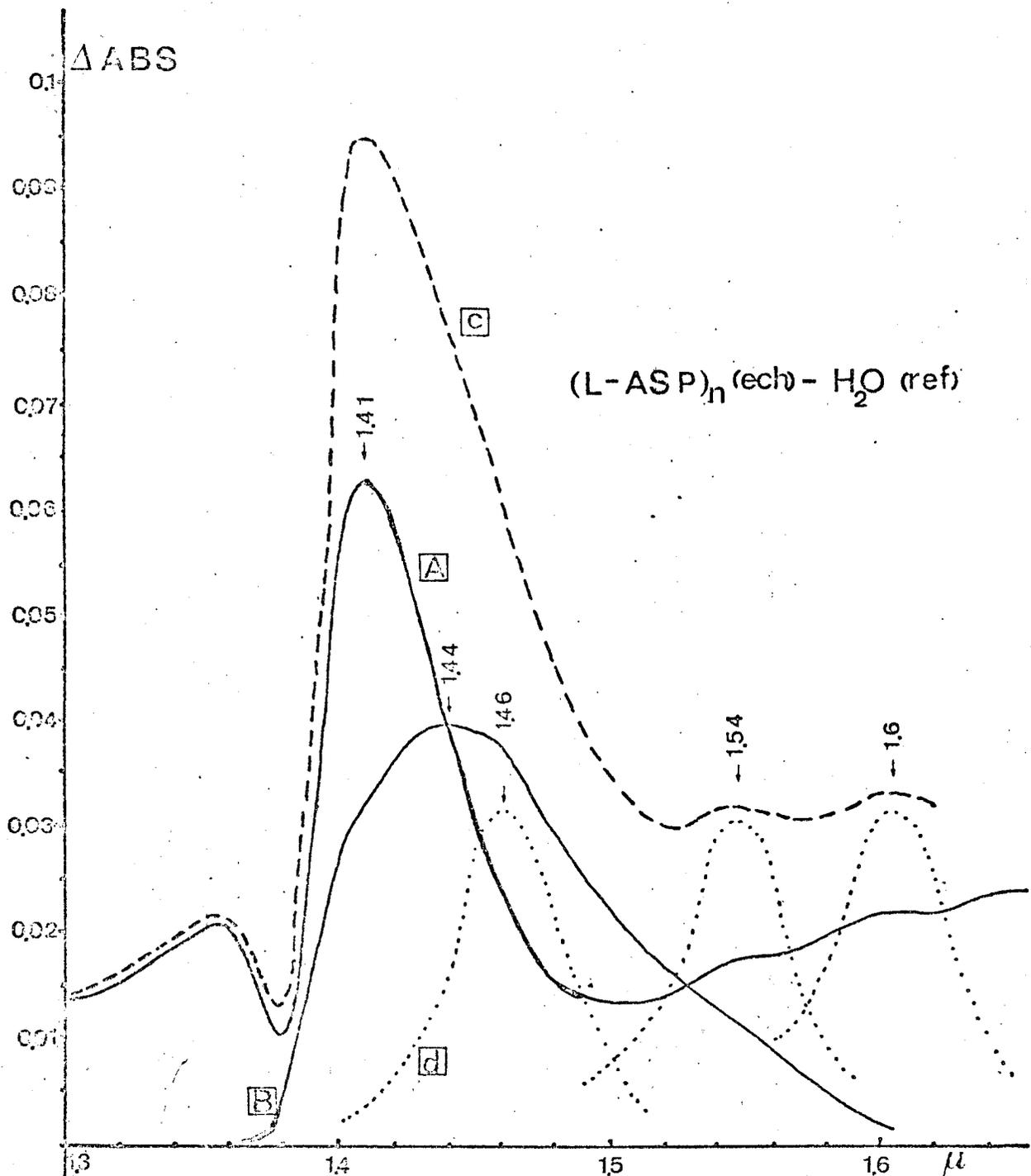


FIG VII-8





- A spectre differentiel brut
- B volume exclu
- C spectre resultant apres addition de B
- D courbe deduite de l'asymetrie de C



FIG VII-9

SUBRAMANIAN et FISCHER signalent la possibilité d'avoir plusieurs bandes dans la région 1,4 - 1,41  $\mu$  (absorption de l'eau vers les groupes carboxylate et carboxyliques).

Pour l'acide propionique, on a une bande très large et aplatie à 1,41  $\mu$ . Nous pensons qu'il y aurait là 2 bandes correspondant à l'équilibre  $\text{-COOH} \rightleftharpoons \text{-COO}^- + \text{H}^+$  où chaque espèce (carboxylique et carboxylate serait hydratée. Le caractère acide devrait alors changer avec la solvatation. Une dernière remarque s'impose. Il est étonnant qu'en milieu basique on trouve une solvatation du groupe amide et aucune pour le groupement carboxylate pour la structure  $\beta_2$  // . Les résultats obtenus sont des résultats d'ensemble. Si alors dans cette structure le groupe amide n'était pas solvaté, on aura une solvatation du groupe amide de 2 moles/ $\text{H}_2\text{O}$  par résidu pour les autres structures, résultat en accord avec les calculs de HOPFINGER (1).

#### Conclusions.

Le groupe amide est faiblement hydraté par rapport au groupement carboxylique. De plus le groupement carboxylate lui-même est beaucoup plus hydraté que le même groupement carboxylique ( $\text{COOH}$ ). Ces observations sont en accord avec les règles phénoménologiques de GLASEL, à savoir que les groupes  $\text{C} = \text{O}$  (carbonyl) et  $\text{N} - \text{H}$  ne forment pas de fortes interactions avec l'eau.

Dans la solvatation des groupes amides ou carboxylates il y a compétition entre l'eau et les contre-ions au voisinage de ces groupes.

Dans la partie  $\beta$  // du poly L-aspartate de sodium, les groupements carboxylates ne sont pas solvatés. On doit alors avoir une paire d'ions liés ( $\text{-COO}^- \text{Na}^+$ ). Au niveau des groupements carboxylates dans les formes  $\beta$  // la constante diélectrique doit être faible.

Il est possible que les chaînes latérales (dans les structures secondaires autres que la forme  $\beta$  //) se replient ou aient des interactions avec les protons du groupement amide afin de neutraliser partiellement la charge.

Enfin, la méthode d'étude de la solvation par infra-rouge proche semble être une bonne technique pour distinguer les différentes contributions des interactions polypeptide - solvant. On voit que l'hydratation est fonction et aussi la cause (hydratation du carbonyle en milieu acide (bande à  $1,36 \mu$ )) de la structure des polypeptides.

CONCLUSION

Les études en Infra-Rouge et en spectroscopie Raman nous ont permis de déduire les structures secondaires qui apparaissent dans l'acide Poly- $\alpha$ -L-Aspartique.

- En milieu basique concentré, ces études révèlent la présence de structures secondaires telles : la chaîne non ordonnée, une structure hélicoïdale étendue proche d'une hélice  $3_1$  et des chaînes  $\beta$ -antiparallèles engagées dans une structure monoclinique (structure tertiaire) avec de faibles distances interfeuillets (structure  $\beta_2$  //).

- En milieu acide concentré, la structure proche d'une hélice  $3_1$  disparaît. Les chaînes  $\beta$ -antiparallèles conservent une structure tertiaire monoclinique, mais leur distance interfeuillets augmente (structure  $\beta_1$  //).

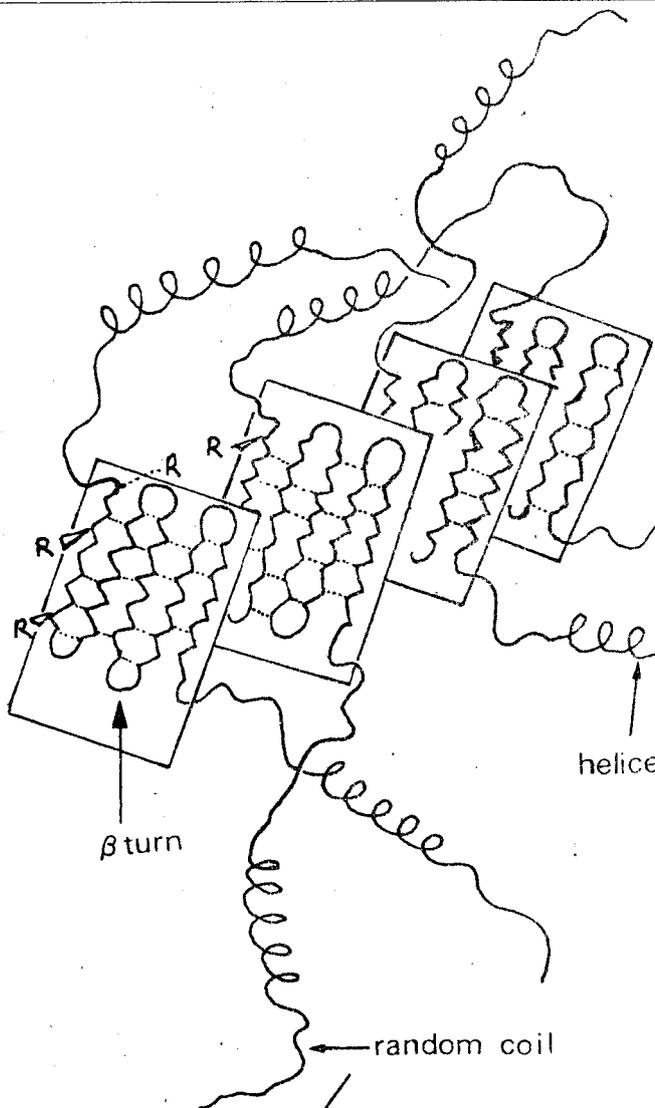
De l'hélice  $\alpha$  apparaît, et la chaîne non-ordonnée subsiste. On ne peut décider si l'hélice étendue ou la chaîne non-ordonnée ou les deux se transforment en hélice  $\alpha$ .

En milieu concentré, les chaînes  $\beta$ -antiparallèles possèdent des liaisons hydrogène intermoléculaires. La structure  $\beta$  parallèle disparaît en milieu acide.

- En milieu basique dilué, on observe les structures chaîne non-ordonnée, hélice étendue (structure secondaire proche d'une hélice  $3_1$ ) ainsi que des chaînes  $\beta$ -antiparallèles à faible distance interfeuillets (structure  $\beta_2$  //).

- En milieu acide dilué, la structure proche de l'hélice  $3_1$  disparaît. Les chaînes  $\beta$ -antiparallèles à faible distance interfeuillets subsistent (structure  $\beta_2$  //), tandis que l'hélice  $\alpha$  apparaît.

De plus en milieu dilué, les chaînes  $\beta$ -antiparallèles ont leurs liaisons hydrogènes intramoléculaires. Les études en Résonance Magnétique Nucléaire ont montré qu'il existait des coudes (turns  $\beta$  II), amenant des repliements de la chaîne  $\beta$ -antiparallèle sur elle-même.



milieu dilué

les feuillets peuvent appartenir à deux macromolécules différentes

ou

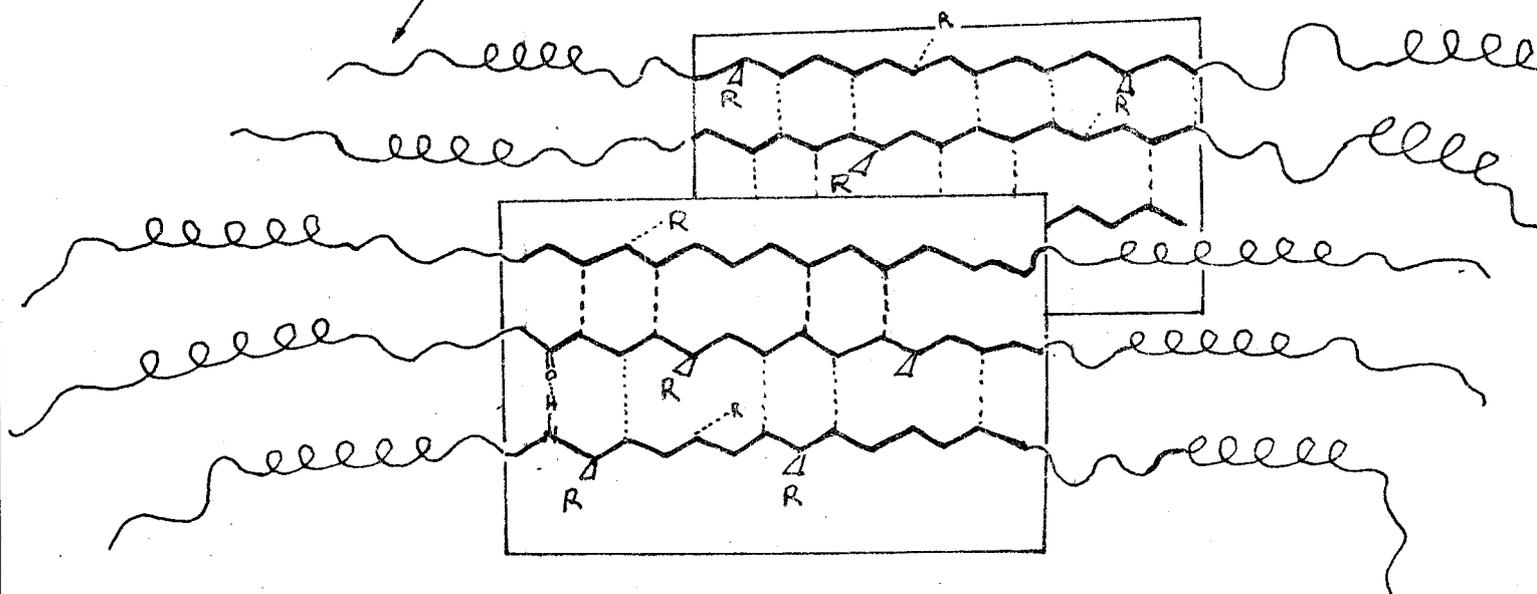
les feuillets peuvent appartenir à la même macromolécule

chaines  $\beta$  # à liaisons hydrogène intramoléculaires

helice  $\alpha$

$\beta$  turn

random coil



milieu concentré

chaines  $\beta$  # a liaisons hydrogène intermoléculaires

La structure tertiaire dans laquelle sont impliquées les chaînes  $\beta$ -antiparallèles en milieu concentré, a été déterminée par les rayons X, et l'on a vu que la solvatation du polypeptide était fonction de cette structure tertiaire.

Enfin, des études ultérieures pourraient nous donner une idée de la façon dont s'opère le passage de systèmes à interactions intermoléculaires (en milieu concentré) à des interactions intramoléculaires (en milieu dilué) telles les liaisons hydrogènes, avec comme conséquence l'apparition de coudes dans les chaînes  $\beta$ -antiparallèles.