

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

par

Claude FEYEREISEN

POLYPEPTIDES A HYDROPHOBIE VARIABLE EN SOLUTION DANS DES MELANGES

EAU/SOLVANT ORGANIQUE : SYNTHESE ET ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE

DE COPOLYMERES

N⁵ -(2-HYDROXYETHYL)-L-GLUTAMINE)-CO-(N⁵ -BENZYL-L-GLUTAMINE)



Soutenu le 8 juin 1978, devant la commission d'examen

Membres du jury :

MM. J.	LHOMME	Président
C.	LOUCHEUX	Rapporteur
C.	STRAZIELLE	Rapporteur
M.	MORCELLET	Examineur
C.	QUIVORON	Examineur

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

--0000000--

DOYENS HONORAIRES DE l'Ancienne Faculté des Sciences

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

PROFESSEURS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences
et de l'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

MM. ARNOULT, BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, DION, DOLLE, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, HOCQUETTE, HEIM DE BALZAC, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PEREZ, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, ROUBINE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

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

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. 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 Ladislas	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
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle 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 ^{lle} 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 ^{me} ZIN-JUSTIN Nicole	Algèbre

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille où Monsieur le Professeur Claude LOUCHEUX a bien voulu m'accueillir. Je tiens à le remercier très vivement pour la confiance qu'il m'a témoignée et lui exprime mes sentiments dévoués et respectueux.

Monsieur Jean LHOMME, 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 gratitude à Monsieur le Professeur Claude LOUCHEUX qui a bien voulu accepter de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

Je suis également heureux de remercier Monsieur Claude STRAZIELLE, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui a accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur.

Monsieur Claude QUIVORON, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) a bien voulu accepter de faire partie du jury de cette thèse. Qu'il soit vivement remercié ici.

C'est aussi un plaisir pour moi d'associer à mes remerciements Michel MORCELLET, Maître-Assistant à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, à la fois pour avoir bien voulu accepter de faire partie du jury de cette thèse et pour les nombreux conseils et encouragements qu'il a su me prodiguer.

Je suis reconnaissant de l'aide que m'ont apportée Madame Marie-Paule HILDEBRAND et Madame Myriam CONIEZ, qui ont bien voulu se charger de l'enregistrement des spectres dichroïques et des mesures d'ultra-centrifugation.

J'associe à mes remerciements tous mes camarades de Laboratoire qui ont su maintenir une ambiance détendue et chaleureuse.

Enfin, je ne saurais oublier Philippe LAGANT et Jacky ESTEVEZ qui ont su guider mes premiers pas dans la Recherche Scientifique.

Je remercie aussi tout particulièrement Mlle Annie OLIVIER qui a bien voulu se charger, avec soin et diligence, de la dactylographie de cette thèse et Mesdames SAINLEGER et THOMAS, qui en ont réalisé l'impression.

P L A N

INTRODUCTION

I - SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE LA POLY (N⁵-(2-HYDROXYETHYL)-L-GLUTAMINE) ET DES COPOLYMERES POLY [(N⁵-(2-HYDROXYETHYL)-L-GLUTAMINE) - CO - (N⁵-BENZYL-L-GLUTAMINE)]

I.1. Introduction

I.2. Synthèse de la PHEG et des copolymères poly (HEG-CO-BGLN)

I.3. Caractérisation de la PHEG et des copolymères poly (HEG-CO-BGLN)

I.4. Conclusion

II - ETUDE DE LA TRANSITION HELICE - CHAÎNE

II.1. Introduction

II.2. Etude conformationnelle en solution aqueuse

II.3. Etude de la transition hélice - chaîne dans les mélanges de solvant eau/solvant organique

II.4. Conclusion

ANNEXE : L'INTERACTION HYDROPHOBE

III - ETUDE DE L'ADSORPTION PRÉFÉRENTIELLE ET ABSOLUE DANS LES MÉLANGES EAU/2-CHLOROETHANOL

III.1. Introduction

III.2. Méthodes d'étude de la solvation préférentielle

- III.3. Détermination de l'adsorption préférentielle par mesure des incréments de densité
- III.4. Détermination de l'adsorption absolue
- III.5. Mode opératoire
- III.6. Résultats expérimentaux
- III.7. Interactions polypeptide - mélange de solvants et transition chaîne - hélice

IV - CONCLUSION GENERALE

G L O S S A I R E

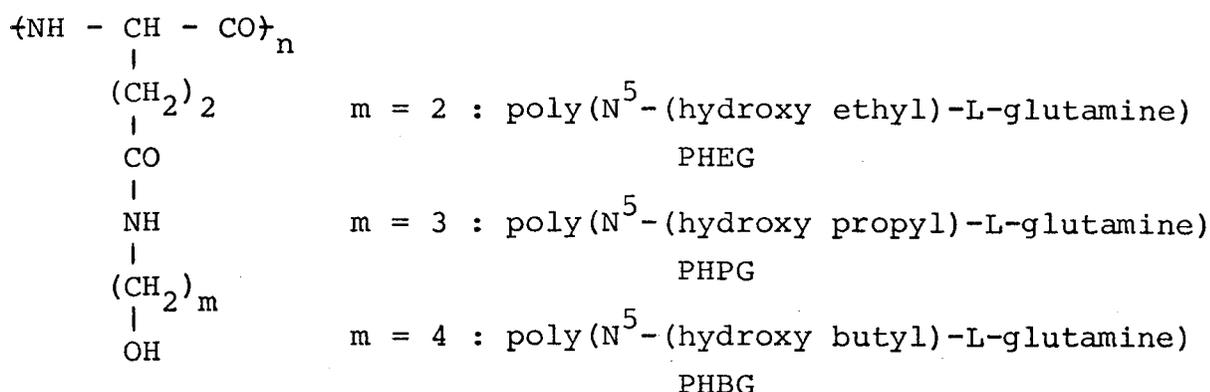
PBGln	Poly(N ⁵ -(benzyl)-L-glutamine)
PHBG	Poly(N ⁵ -(4-hydroxy butyl)-L-glutamine)
PHEG	Poly(N ⁵ -(2-hydroxy ethyl)-L-glutamine)
PHPG	Poly(N ⁵ -(3-hydroxy propyl)L-glutamine)
PLGA	Acide poly(L-glutamique)
PLGB	Poly(L-glutamate de γ-benzyle)
A ₁	Adsorption absolue par l'eau
A ₃	Adsorption absolue par le solvant organique
$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})$	Incrément de densité
$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$	Coefficient d'adsorption préférentielle
f _H	Fraction d'hélice α
[θ] ₂₂₂	Ellipticité molaire à 222 nm
\bar{v}_2	Volume spécifique partiel du polymère
\bar{v}_3	Volume spécifique partiel du solvant organique

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

Les protéines et les polypeptides synthétiques peuvent adopter des structures organisées, telles que l'hélice α de PAULING et COREY ou les structures en feuillets plissés, ou prendre simplement une conformation désordonnée. Par de nombreuses méthodes physico-chimiques on a pu mettre en évidence une transition conformationnelle entre l'hélice α et une conformation désordonnée qui peut être induite, en solution, de plusieurs façons :

- par une variation de température
- par un changement de composition du solvant
- par une variation du degré d'ionisation des chaînes latérales, dans le cas des polypeptides porteurs de chaînes latérales ionisables.

Le milieu biologique étant essentiellement aqueux, il est intéressant de pouvoir disposer de polypeptides de synthèse, modèles simplifiés des protéines, solubles en milieu aqueux. Un certain nombre de ces polypeptides sont porteurs de chaînes latérales ionisables (acide polyglutamique, acide polyaspartique, polylysine par exemple), ce qui ne permet pas de s'affranchir de l'influence du degré d'ionisation et des interactions électrostatiques entre charges électriques sur la structure secondaire, lorsque l'on veut étudier l'effet de la température ou du solvant sur la stabilité de l'une ou l'autre conformation. Un moyen de résoudre ce problème est de synthétiser un polypeptide à chaîne latérale non polaire, soluble en milieux aqueux ; ce fut résolu par la synthèse ^{1,2} des POLY(N⁵-(HYDROXYALKYL)-L-GLUTAMINE), qui répondent à la formule :

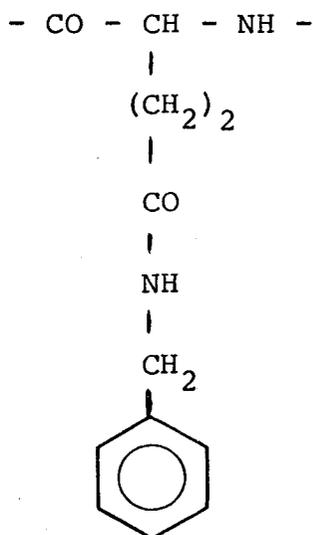


En solution aqueuse, on observe une augmentation de la fraction en hélice α f_H du polypeptide dans le sens PHEG < PHPG < PHBG. Cela a été attribué ^{3,4} à l'effet stabilisant des interactions hydrophobes, de plus en plus marqué lorsque le nombre de méthylènes croît dans la chaîne latérale. Cet effet a été observé sur d'autres séries homologues de polypeptides ⁵⁻⁸. Toutes ces observations ont contribué à confirmer le rôle stabilisant des interactions hydrophobes entre groupements non polaires ^{9,10} sur la structure hélicoïdale des chaînes polypeptidiques.

Il nous a alors paru intéressant de synthétiser des copolymères formés par l'association en proportions variables d'un résidu hydrophile et d'un résidu hydrophobe, afin d'étudier l'effet des interactions hydrophobes sur la stabilité conformationnelle des polypeptides.

La plupart des études menées à ce jour sur de tels copolymères consistent à incorporer un acide aminé hydrophobe, non soluble dans l'eau, dans une chaîne polypeptidique soluble dans l'eau ¹¹⁻²⁸, généralement ionisable. Pour éviter l'influence des chaînes latérales ionisables, des poly(N⁵-(hydroxy alkyl)-L-glutamine) ont été copolymérisés avec des acides aminés hydrophobes tels que la p'-hydroxy phenyl azo phénylalanine ²⁹, l'alanine ³⁰, la leucine ^{31,32}, la phényl-alanine ³³, la valine ³⁴ et la tyrosine ³⁵.

Dans le travail présenté ici, nous avons étudié l'effet de l'incorporation, dans une chaîne polypeptidique constituée par la PHEG, d'un résidu d'acide aminé hydrophobe dérivé de la glutamine, la N⁵-benzyl-L-glutamine (BGl_n) :



Nous avons étudié également les propriétés de ces copolymères en solution dans des mélanges eau/solvant organique. Une transition conformationnelle peut, en effet, être induite par une variation de la composition d'un mélange de deux solvants, si un des deux solvants favorise l'hélice α et l'autre la forme désordonnée. Dans le cas des poly(N⁵-(hydroxy alkyl)-L-glutamine), l'eau favorise une structure désordonnée², alors que les solvants organiques (méthanol², dioxanne³⁶, 2-chloroethanol³⁷, isopropanol³⁸, diméthylformamide³⁹) favorisent une structure hélicoïdale.

Dans de tels mélanges eau/solvant organique, on a observé une relation entre le comportement conformationnel des protéines globulaires et l'adsorption préférentielle de l'un des composants du mélange de solvants sur les chaînes protéiques. L'interprétation de ce phénomène est rendue délicate par la présence des différents acides aminés constitutifs de la protéine (qui ne se comportent pas de la même façon vis-à-vis des deux solvants) et par l'existence d'une structure globulaire comprenant une couche extérieure, en contact avec

le solvant, et une couche interne, qui n'est mise au contact des solvants que lors de la dénaturation de la structure globulaire native par le solvant organique. La couche polypeptidique mise en contact avec le mélange de solvants évolue alors, aussi bien par le nombre d'acides aminés découverts que par leur nature (la zone interne est nettement plus hydrophobe que la couche externe). Les études en mélange de solvants de polypeptides de synthèse, comme modèles simplifiés des protéines, sont peu nombreuses et limitées aux homopolypeptides ^{36,37,40-44}. En ce qui concerne les polypeptides, notre étude sera la première à tenter de relier la variation de la composition d'un copolymère à la variation de l'adsorption préférentielle dans un mélange eau/solvant organique. Nous nous sommes limités au mélange eau/2-chloroethanol, qui a été utilisé dans le cas des protéines globulaires ⁴³⁻⁴⁴ et de la PHPG ³⁷, ce qui devrait permettre d'intéressantes comparaisons, aussi bien du point de vue de l'effet de l'hydrophobie que de l'effet de la transition chaîne - hélice.

1. N. LUPU, A. YARON, M. SELA et A. BERGER
Bull. Res. Counc. Israël A 10, 47 (1961).
2. N. LUPU-LOTAN, A. YARON, A. BERGER et M. SELA
Biopolymers 3, 625 (1965).
3. N. LOTAN, A. YARON et A. BERGER
Biopolymers 4, 365 (1966).
4. N. LOTAN, A. BERGER et E. KATCHALSKI
Ann. Rev. Biochem. 41, 869 (1972).
5. G. BLAUER et Z.B. ALFASSI
Biochim. Biophys. Acta 133, 206 (1967).
6. N. MURAI et S. SUGAI
Biopolymers 13, 1161 (1974).
7. T. HAYAKAWA, M. MATSUYAMA et K. INOUE
Polymer 18, 854 (1977).
8. Y.W. TSENG et J.T. YANG
Biopolymers 16, 921 (1977).
9. W. KAUZMANN
Adv. Prot. Chem. 15, 1 (1959).
10. H.A. SCHERAGA
The proteins ch. 6 p. 477-594, H. NEURATH Ed. Ac. Press
1963.
11. W.G. MILLER et R.E. NYLUND
J. Am. Chem. Soc. 87, 3542 (1965).
12. R.L. SNIPP, W.G. MILLER et R.E. NYLUND
J. Am. Chem. Soc. 87, 3547 (1965).
13. V.E. BYCHKOVA, et al.
Biopolymers 14, 1739 (1975).
14. E.V. ANUFRIEVA et al.
F.E.B.S. Letters 55, 46 (1975).
15. A. WARASHINA et A. IKEGAMI
Biopolymers 11, 529 (1972).

16. M.J. SAGE et G. D. FASMAN
Biochemistry 5, 286 (1966).
17. S.P. RAO et W.G. MILLER
Biopolymers 12, 835 (1973).
18. H. SUGIYAMA et H. NODA
Biopolymers 9, 459 (1970).
19. H.A. ARFMANN, R. LABITZKE et K.G. WAGNER
Biopolymers 14, 1381 (1975).
20. C.R. SNELL et G.D. FASMAN
Biopolymers 11, 1723 (1972).
21. H.A. ARFMANN, R. LABITZKE et K.G. WAGNER
Biopolymers 16, 1815 (1977).
22. R. MANDEL et G.D. FASMAN
Biopolymers 14, 1633 (1975).
23. J. ESTEVEZ et M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE
Biopolymers 15, 2101 (1976).
24. J. ESTEVEZ et M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE
F.E.B.S. Letters 71, 157 (1976).
25. R.T. INGWALL, et al.
Biopolymers 6, 331 (1968).
26. H.E. AUER et P. DOTY
Biochemistry 5, 1708 (1966).
27. M.N. JONES et C.P. PATRICK
J. Coll. Interface Sci. 55, 116 (1976).
28. A.M. SCHWARTZ et G.D. FASMAN
Biopolymers 15, 1377 (1976).
29. M. GOODMAN et E. BENEDETTI
Biochemistry 7, 4226 (1968).
30. K.E.B. PLATZER, et al.
Macromolecules 5, 177 (1972).

31. J.E. ALTER, G.T. TAYLOR et H.A. SCHERAGA
Macromolecules 5, 739 (1972).
32. P.Y. CHOU, M. WELLS et G.D. FASMAN
Biochemistry 11, 3028 (1972).
33. H.E. VANWART, G.T. TAYLOR et H.A. SCHERAGA
Macromolecules 6, 266 (1973).
34. J.E. ALTER, R.H. ANDREATTA, G.T. TAYLOR et H.A. SCHERAGA
Macromolecules 6, 564 (1973).
35. R.K. SCHEULE, F. CARDINAUX, G.T. TAYLOR et H.A. SCHERAGA
Macromolecules 9, 23 (1976).
36. H. INOUE et T. IZUMI
Biopolymers 15, 797 (1976).
37. C. FEYEREISEN, M. MORCELLET et C. LOUCHEUX
Macromolecules 10, 485 (1977).
38. M. MIYAKE, et al.
Biopolymers 13, 1173 (1974).
39. A. YARON, N. LUPU, A. BERGER et M. SELA
Bull. Res. Council Israël A 11, 87 (1962).
40. C. STRAZIELLE, C. DUFOUR et E. MARCHAL
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris C 271, 720 (1970).
41. R. ALMASSY, J.S. ZVIL, L.G. LUM et J.B. IFFT
Biopolymers 12, 2713 (1973).
42. N. MURAI et S. SUGAI
Biopolymers 13, 1195 (1974).
43. M. MORCELLET et C. LOUCHEUX
Polymer 16, 401 (1975).
44. J. KOMIYAMA, T. MORI, K. YAMAMOTO et T. IJIMA
J. Chem. Soc. Farad. Trans. I. 73, 203 (1977).
45. S.N. TIMASHEFF
Accts. Chem. Res. 3, 62 (1969).
46. H. INOUE et S.N. TIMASHEFF
Biopolymers 11, 737 (1972).

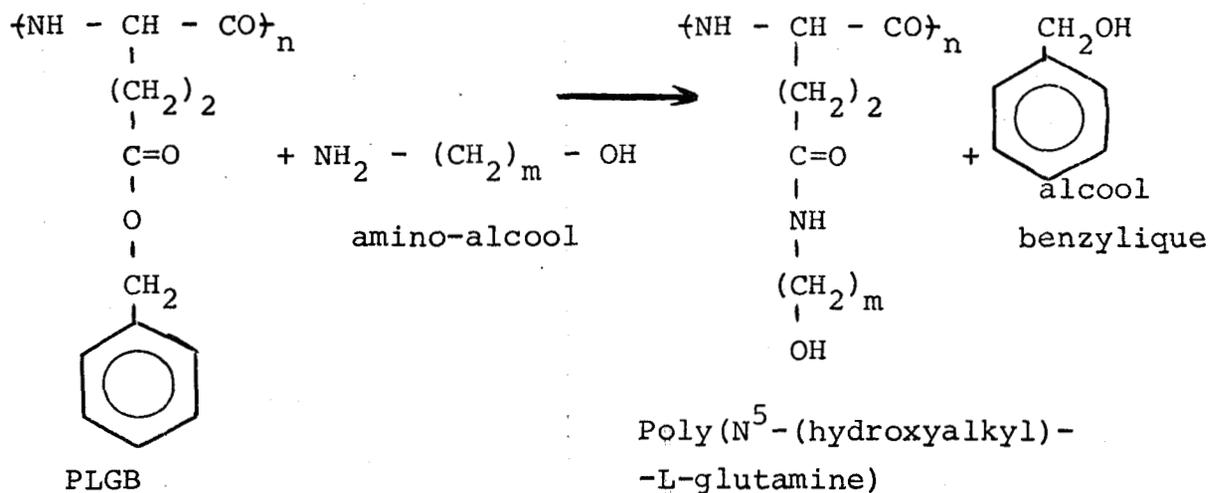
C H A P I T R E I

SYNTHESE ET CARACTERISATION

DE LA POLY(N⁵-(2-HYDROXYETHYL)-L-GLUTAMINE) ET DES COPOLYMERES
POLY [(N⁵-(2-HYDROXYETHYL)-L-GLUTAMINE)-CO-(N⁵-BENZYL-L-GLUTAMINE)]

I.1. INTRODUCTION

Les poly(N⁵-(hydroxyalkyl)-L-glutamine) sont obtenues par aminolyse ^{1,2} d'un échantillon de poly(L-glutamate de γ benzyle) (PLGB) par l'amino-alcool adéquat :



C'est ainsi qu'est synthétisée la poly(N⁵-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine) (PHEG). Nous avons tenté d'appliquer cette réaction à la synthèse de la poly(N⁵-benzyl-L-glutamine) (PBGLn), afin de réaliser des copolymères par deux aminolyses partielles successives, mais sans succès, quelle que soit la température ou le solvant utilisé (dioxanne, diméthylesulfoxyde, pyridine, diméthylformamide, N-méthylacétamide,.....).

Les résultats obtenus montraient que la désestérification n'était pas complète. Pour pallier cet inconvénient, nous avons effectué l'aminolyse du PLGB par un mélange benzylamine/éthanol-amine, afin que l'éthanolamine puisse réagir avec les groupements ester benzylique qui n'auraient pas été attaqués par la benzylamine. En travaillant dans des conditions telles que l'aminolyse du PLGB par l'éthanolamine seule soit complète, il a été possible de synthétiser les copolymères recherchés.

I.2. SYNTHÈSE DE LA PHEG ET DES COPOLYMERES (HEG-CO-BGln)

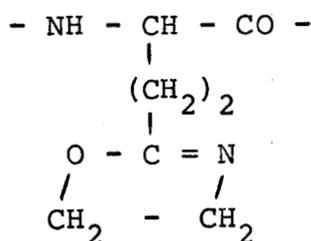
I.2.1. Synthèse du Poly(L-glutamate de γ benzyle)

Le poly(L-glutamate de γ benzyle) (PLGB) a été synthétisé par polymérisation du N-carboxy-anhydride de glutamate de benzyle, selon la méthode de BLOUT et KARLSON³. Sa masse moléculaire moyenne en poids a été évaluée par mesure de la viscosité intrinsèque à 25°C dans le diméthylformamide⁴ :

$$[\eta] = 5,20 \text{ dl/g} \quad \overline{M}_w = 320\ 000$$

I.2.2. Synthèse de la PHEG

La transformation du PLGB s'effectue dans le dioxanne à 60°C, en présence d'un excès d'éthanolamine, ce qui a pour effet de solubiliser la PHEG formée, insoluble dans le dioxanne même à cette température. Au cours de l'aminolyse des esters benzyliques par des amino-alcools de faible masse, on observe souvent une réaction de cyclisation de la chaîne latérale^{1,2,5}. Le cycle oxazoline :



ainsi formé est une base faible, de pK apparent égal à 6,5^{1,2}. Le mode opératoire que nous avons choisi² a permis de minimiser cette cyclisation.

L'aminolyse s'effectue comme suit :

- L'échantillon de PLGB est lyophilisé à partir d'une solution dans le dioxanne (1 g/100 ml). L'éthanol-amine est séchée sur oxyde de Baryum, puis distillée à pression réduite.

- L'échantillon de PLGB lyophilisé est dissous dans le dioxanne (4 ml/g de PLGB), dans un réacteur thermostaté à 60°C, surmonté d'un réfrigérant et d'un piège à chlorure de calcium. On introduit ensuite l'éthanolamine (6 ml/g de PLGB, soit vingt fois la quantité stoechiométrique) On maintient une agitation modérée du milieu réactionnel tout au long de l'aminolyse. La durée de l'aminolyse est de 72 heures. On la poursuit quelques heures si on observe une gélification du milieu réactionnel (due aux réactions de cyclisation). Le mélange est alors dilué dans un minimum d'eau, puis dialysé contre un mélange eau/méthanol (1/1). Il est ensuite dialysé exhaustivement contre de l'eau distillée et lyophilisé. Rendement en poids : 80 % .

I.2.3. Synthèse des copolymères

Afin d'obtenir une désestérification complète du PLGB, on effectue l'aminolyse dans les mêmes conditions que celles nécessaires à la synthèse de la PHEG. Le mélange réactionnel est constitué par un mélange éthanolamine/benzylamine. Un étalonnage préalable est nécessaire pour déterminer la correspondance entre la fraction molaire des résidus N⁵-benzyl-L-glutamine dans les copolymères et la fraction molaire de la benzylamine dans le mélange réactionnel.

Les rendements de l'aminolyse sont de l'ordre de 90 % en poids (voir Tableau I.1).

I.3. CARACTERISATION DE LA PHEG ET DES COPOLYMERES POLY(HEG-CO-BGln).

Au cours des réactions de transformation des polymères, on observe parfois des taux de conversion limités du fait de la nature macromoléculaire des composés et de l'intervention des groupes fonctionnels portés par la chaîne polymérique. Lorsque la nature de la réaction chimique permet un

AMINOLYSE N°	G-XI	G-X	G-XII	G-IX
% molaire des motifs BGl _n déterminés par U.V.	3,84	6,97	10,03	14,85
% molaire de motif BGl _n attribué	4	7	10	15
Désignation du copolymère	BGl _n ₄	BGl _n ₇	BGl _n ₁₀	BGl _n ₁₅
Poids moléculaire apparent : PM _{HEG} (1-x) + PM _{BGl_n} x	174	175	177	179
Rendement de l'aminolyse (en poids)	93 %	95 %	85 %	82 %

TABLEAU I.1



taux de conversion égal à l'unité, il y a lieu de se placer dans les conditions opératoires appropriées et de s'assurer ensuite de la pureté du polymère obtenu. Ainsi, la caractérisation des polypeptides synthétisés dans ce travail comporte deux axes :

1 - Il faut s'assurer que l'aminolyse du PLGB a été totale ; il faut s'assurer en outre de l'absence de groupements ionisables provenant de la cyclisation de la chaîne latérale, d'une coupure au niveau du γ -carbonyle, ou d'un branchement de l'éthanol amine par le groupement hydroxyle.

2 - Il faut déterminer la composition des polymères en résidus (N^5 -(2-hydroxyethyl)L-glutamine) et (N^5 -benzyl-L-glutamine).

I.3.1. Caractérisation par spectroscopie U.V.

I.3.1.1. Caractérisation de la PHEG

Si l'aminolyse a été complète, la PHEG doit être exempte de groupements ester benzylique, qui absorbent entre 270 et 250 nm. Le spectre U.V. de la PHEG, entre 270 et 250 nm, ne doit donc y présenter aucun épaulement. On vérifie alors, sur une solution aqueuse de PHEG ($5 < C < 10$ g/l.), que le spectre U.V. ne présente aucun épaulement dans cette région. Sachant que la glutamate de benzyle est caractérisé par un coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{270} = 200 \text{ L.mole}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, on peut détecter jusqu'à 0,1 % de motifs L-glutamate de benzyle résiduels. La précision de la spectroscopie U.V. nous permet de contrôler les échantillons de PHEG.

I.3.1.2. Caractérisation des copolymères

La benzylamine, en solution aqueuse, présente un spectre d'absorption U.V. caractérisé par une large bande centrée sur 260 nm, (figure I.1) présentant des épaulements à 270, 265 et 255 nm :

$$\begin{aligned}\epsilon_{270} &= 110 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1} \\ \epsilon_{265} &= 160 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1} \\ \epsilon_{260} &= 210 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1} \\ \epsilon_{255} &= 180 \text{ l.mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}\end{aligned}$$

N'ayant pu synthétiser la poly(N⁵-benzyl-L-glutamine), nous assimilerons les coefficients d'extinction molaire des résidus (BGln) à ceux de la benzylamine en solution aqueuse. Les copolymères, en solution aqueuse, présentent bien les bandes caractéristiques du chromophore benzylique (figure I.1). On peut alors déterminer la composition des copolymères en résidus (BGln) par mesure de l'absorbance U.V. à 270, 265, 260 et 255 nm. En effet, si ϵ_1 et ϵ_2 représentent, respectivement, les coefficients d'extinction molaire des résidus (HEG) et (BGln), on a la relation :

$$DO = \epsilon_1 C_1 l + \epsilon_2 C_2 l$$

où C_1 et C_2 représentent, respectivement, les concentrations en g/l, des résidus (HEG) et (BGln) et l la longueur du trajet optique en cm.

Si on appelle M_{app} la masse apparente d'un motif monomère, sachant que les masses moléculaires des résidus (HEG) et (BGln) sont respectivement égales à 172 et 218, on a la relation :

$$M_{app} = 172(1-x) + 218 x = 172 + 46 x$$

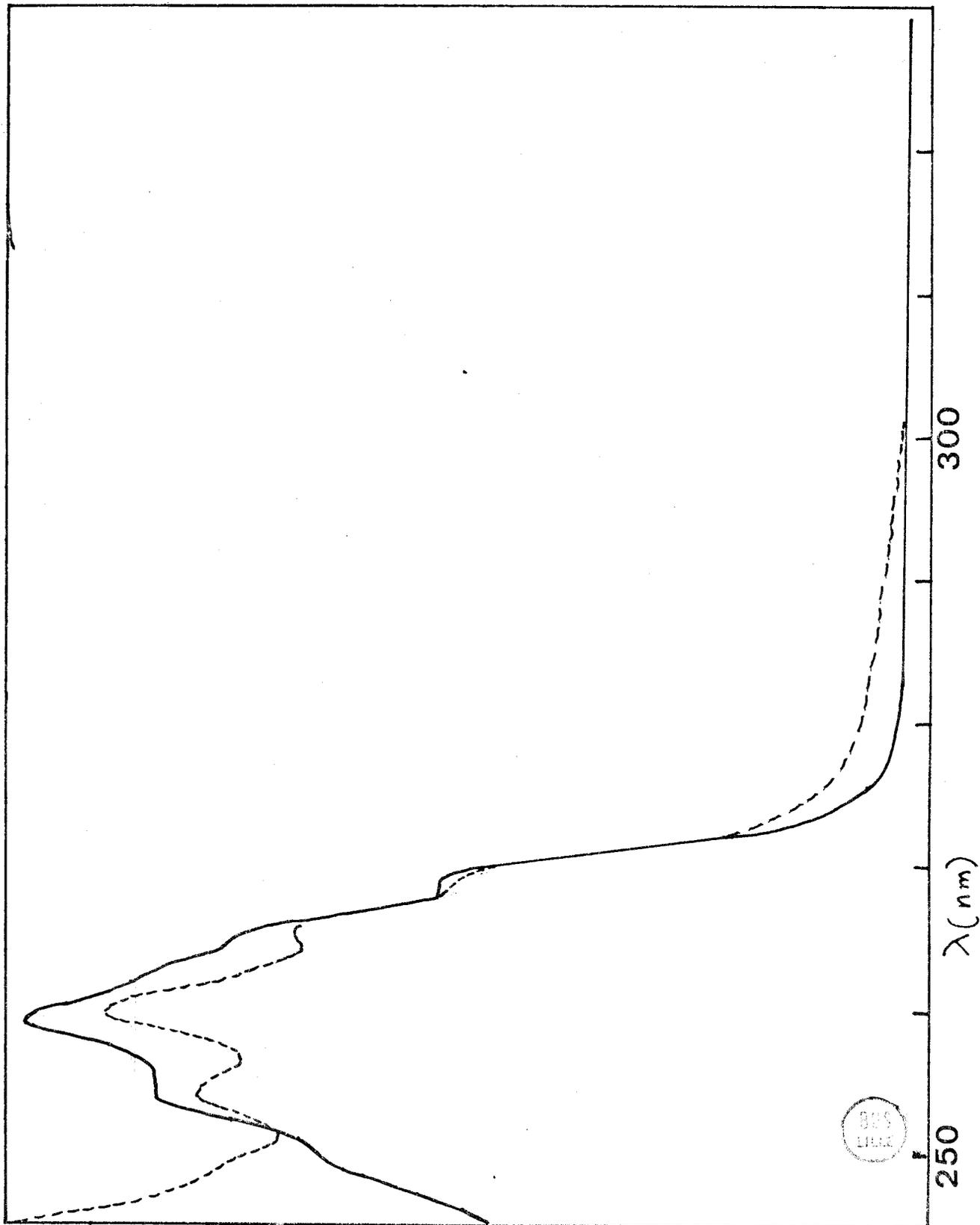
où x représente la fraction molaire en résidus (BGln) dans le copolymère.

Dans ces conditions, si C représente la concentration en g/l du copolymère, on obtient :

FIGURE I-1

SPECTRES U.V. DE LA
BENZYLAMINE (TRAIT
PLEIN) ET D'UN COPO
LYMERE (HEG-co-BGL)
(TRAIT INTERROMPU)
EN SOLUTION AQUEUSE

Les deux courbes ne
sont pas à la même
échelle en ordonnées



$$x = \frac{1 \varepsilon_1 C - 172.D0}{46.D0 + 1C(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)}$$

ε_1 est de l'ordre de 0,05 l.mole⁻¹.cm⁻¹.

Le tableau I.1 présente les valeurs de x ainsi déterminées, ainsi que la désignation des copolymères suivant leur teneur en résidus (BGln).

REMARQUES

- Nous nous sommes limités à un taux en (BGln) de 15 %. En effet, au delà, le copolymère n'est plus soluble dans l'eau. Lors des études préliminaires que nous avons effectuées, nous avons observé que l'introduction d'une faible quantité de résidus (BGln) amenait à une variation marquée de la conformation du polypeptide ; cela justifie le choix de la gamme de composition des copolymères.

- Statisticité des copolymères. Nous n'avons pas pu vérifier si les résidus (BGln) étaient distribués statistiquement sur la chaîne polypeptidique. Le fait que la benzylamine ne permette pas une aminolyse complète du PLGB indique qu'à partir d'un certain taux de substitution, la réaction n'est plus possible, peut-être pour des raisons d'encombrement stérique. On peut en conclure que la formation de longues séquences de résidus (BGln) sur la chaîne polypeptidique est défavorisée. Il se peut aussi que le caractère de plus en plus hydrophobe du polypeptide rejette à l'extérieur l'ainoalcool et défavorise la réaction. Ceci peut constituer une indication - et non une preuve - que la distribution des résidus (BGln) est à peu près statistique. Il faut mentionner à ce sujet les travaux de KONISHI et HATANO ⁶ qui ont montré que, dans des copolymères (poly(γ -méthyl-D-glutamate-CO- γ benzyl-D-glutamate), les résidus (γ -benzyl-D-glutamate) interagissaient de manière répulsive les uns avec les autres au cours de la réaction de

transestérification du poly(γ -méthyl-D-glutamate) par l'alcool benzylique. Bien que l'on ne puisse pas extrapoler ces résultats au cas de la benzylamine, ces observations fournissent une indication supplémentaire permettant d'envisager la formation de séquences (BGl_n) comme peu probable.

- Le spectre U.V. du groupe ester benzylique se superpose à celui du groupe N-benzylamide de la chaîne latérale. Il n'est pas possible alors, par spectroscopie U.V., de vérifier l'absence de résidus L-glutamate de benzyle. Néanmoins, l'aminolyse étant effectuée dans les mêmes conditions que celles aboutissant à la formation de la PHEG, les groupes ester benzylique non attaqués par la benzylamine seront substitués par l'éthanol-amine présente en quantité suffisante (vingt fois la quantité stoechiométrique) dans le milieu réactionnel. L'éthanol-amine permettant une désestérification complète du PLGB, il n'y a aucune raison que le taux en motifs L-glutamate de benzyle résiduels soit plus important dans le cas des copolymères que dans le cas de la PHEG (où il est inférieur à 0,1 %).

I.3.2. Caractérisation par analyse élémentaire

On constate un bon accord entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales * de la teneur en éléments C, H, N et O, si on tient compte, comme cela a été observé dans le cas de la poly(N⁵-(3-hydroxy propyl)-L-glutamine)^{2,7}, d'une demi-molécule d'eau de constitution (tableaux I.2 à I.6).

I.3.3. Caractérisation par dosage des groupements hydroxyle portés par la chaîne latérale.

Le dosage des fonctions hydroxyle (-CH₂OH) portées par la chaîne latérale des motifs monomères (HEG) s'effectue par acétylation par l'anhydride acétique en présence de pyridine *. Les résultats sont exprimés en pourcentage en poids :

* Je remercie M. CALME qui s'est chargé des mesures d'analyse élémentaire et de dosage des hydroxyles au Centre de Recherches sur les Macromolécules de Strasbourg.

ELEMENT	% calculé pour $(C_7H_{12}N_2O_3, \frac{1}{2} H_2O)_n$	% EXPERIMENTAL
C	46,41	47,58
H	7,18	7,23
N	15,47	15,38
O	30,09	29,79

TABLEAU I.2. Analyse élémentaire de la PHEG

ELEMENT	% calculé pour $[(C_7H_{12}N_2O_3)_{0,96}(C_{12}H_{14}N_2O_2)_{0,04} \frac{1}{2} H_2O]_n$	% EXPERIMENTAL
C	47,25	48,20
H	7,15	7,28
N	15,31	16,12
O	30,28	28,39

TABLEAU I.3. Analyse élémentaire du copolymère BGln₄



ELEMENT	% calculé pour $\left[(C_7H_{12}N_2O_3)_{0,93} (C_{12}H_{14}N_2O_2)_{0,07} \frac{1}{2} H_2O \right]_n$	% EXPERIMENTAL
C	47,87	49,23
H	7,13	7,48
N	15,19	15,23
O	29,79	28,06

TABLEAU I.4. Analyse élémentaire du copolymère BGLn₇

ELEMENT	% calculé pour $\left[(C_7H_{12}N_2O_3)_{0,9} (C_{12}H_{14}N_2O_2)_{0,1} \frac{1}{2} H_2O \right]_n$	% EXPERIMENTAL
C	48,49	49,84
H	7,11	7,19
N	15,09	15,57
O	29,31	27,39

TABLEAU I.5. Analyse élémentaire du copolymère BGLn₁₀



ELEMENT	% calculé pour $\left[(C_7H_{12}N_2O_3)_{0,85} (C_{12}H_{14}N_2O_2)_{0,15} \frac{1}{2} H_2O \right]_n$	% EXPERIMENTAL
C	49,49	51,83
H	7,08	7,31
N	14,90	14,96
O	28,52	25,89

TABLEAU I.6. Analyse élémentaire du copolymère BGln₁₅



$$\% \text{ en poids d'hydroxyle théorique} = \frac{(1-x) \cdot 17}{M_{\text{app}}} \cdot 100$$

où x représente la fraction molaire en résidus (BGl_n) des copolymères et M_{app} la masse moléculaire apparente d'un motif monomère. Les résultats expérimentaux obtenus (tableau I.7) montrent un bon accord avec les valeurs calculées, si l'on tient compte du fait que les polymères étant insolubles dans le mélange pyridine/anhydride acétique, l'acétylation des fonctions alcool primaire n'a peut-être pas été complète.

I.3.4. Caractérisation par dosage conductimétrique

On vérifie par un dosage conductimétrique que les polymères ne présentent aucun groupement ionisable tels que -COOH, -NH₂ ou le cycle oxazoline observé par LOTAN et ses coll. ^{1,2} : une solution aqueuse de PHEG ou de copolymères (HEG-CO-BGl_n) est titrée par une solution diluée d'acide chlorhydrique ou de soude. Les résultats expérimentaux obtenus montrent que le taux en groupements ionisables résiduels est inférieur à 0,5 % en moles.

I.3.5. Détermination de la pureté optique

Afin de vérifier si l'aminolyse n'a provoqué aucune racémisation des résidus d'acide aminé, nous avons hydrolysé les polymères par HCl 6 N à 105 °C pendant 24 heures et comparé le pouvoir rotatoire à 546 nm des hydrolysats à celui d'un échantillon d'acide L-glutamique soumis aux mêmes conditions. L'écart maximum observé, par rapport au témoin acide L-glutamique, correspond à 1,9 % de la valeur du pouvoir rotatoire du témoin. Le taux de racémisation n'a donc pas dépassé 1 %.

I.3.6. Mesure de la masse moléculaire moyenne

Les masses moléculaires moyennes en poids ont été déterminées par la technique de l'équilibre de sédimentation.

POLYMERE	% en poids d'hydrolyse (OH)	
	théorique	expérimental
PHEG	9,4	8,9
COPOLYMERE BGln ₄	8,9	8,1
COPOLYMERE BGln ₇	8,6	8,6
COPOLYMERE BGln ₁₀	8,2	7,7
COPOLYMERE BGln ₁₅	7,7	7,1

TABLEAU I.7. Dosage des groupements hydroxyle (OH) de la fonction alcool primaire de la chaîne latérale des résidus (HEG)



La masse moléculaire de l'échantillon est donnée par la relation :

$$\overline{Mw} = \frac{2 \log \frac{C_2}{C_1} RT}{(1-\bar{v}\rho) \omega^2 (r_1^2 - r_2^2)}$$

où : \overline{Mw} représente la masse moléculaire moyenne en poids
 ρ représente la densité de la solution
 \bar{v} représente le volume spécifique partiel du soluté
 R représente la constante des gaz parfaits
 T représente la température absolue
 ω représente la vitesse angulaire de rotation
 C_1 et C_2 représentent la concentration du soluté aux distances r_1 et r_2 de l'axe de rotation, respectivement.

Les volumes spécifiques partiels des solutés ont été déterminés à partir des mesures des incréments de densité en solution aqueuse (voir ch. III). Les résultats obtenus * sont consignés dans le tableau (I.8) et montrent que l'aminolyse a provoqué une dégradation du polymère : le degré de polymérisation moyen en poids des polymères obtenus est de l'ordre de 30 à 40 % de celui du PLGB initial (tableau I.8).

On observe une dégradation d'autant plus importante que le taux en BGLn est grand. Il apparaît donc que la benzylamine, présente en proportions croissantes dans le milieu réactionnel lors de l'aminolyse des copolymères BGLn₄ à BGLn₁₅, provoque des coupures plus importantes que l'éthanolamine sur la chaîne polypeptidique.

I.4. CONCLUSION

Nous nous étions fixé pour but de synthétiser des copolymères non-ionisables, solubles dans l'eau, dérivés de

* Je remercie Mme Myriam CONIEZ qui a bien voulu effectuer les mesures d'ultra-centrifugation au Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille.

POLYMERE	PHEG	COPOLY BGln ₄	COPOLY BGln ₇	COPOLY BGln ₁₀	COPOLY BGln ₁₅
volume spéci- fique partiel dans l'eau * en ml/g	0,722	0,727	0,727	0,729	0,739
$\overline{M}_w \times 10^{-4}$ déterminée par équilibre de sédimentation	10,3	9,5	9,2	8,3	8,2
\overline{DP}_w app **	600	546	526	470	458
$\frac{\overline{DP}_w \text{ app}^{***}}{\overline{DP}_w \text{ PLGB}} \times 100$	41 %	31 %	36 %	32 %	31 %

TABLEAU I.8. Masse moléculaire moyenne en poids déterminée par équilibre de sédimentation de la PHEG et des copolymères (HEG-CO-BGln)

* déterminé à partir de la mesure des incréments de densité (§ III.6.1.)

** $\overline{DP}_w \text{ app} = \frac{\overline{M}_w}{M_{\text{app}}}$ avec $M_{\text{app}} = (1-x)M_{\text{HEG}} + x M_{\text{BGln}}$
voir Tableau III.1

*** \overline{DP}_w du PLGB = 1460



la L-glutamine et dont on pouvait faire varier le caractère hydrophobe en contrôlant le taux en motifs monomères à chaîne latérale non-polaire. L'aminolyse couplée du PLGB par un mélange éthanolamine/benzylamine nous a permis, en nous plaçant dans les conditions adéquates, de préparer une série de copolymères dont nous avons pu tester la pureté et déterminer la composition.

1. N. LUPU, A. YARON, M. SELA et A. BERGER
Bull. Res. Counc. ISR. A 10, 47 (1961).
2. N. LOTAN, A. YARON, A. BERGER et M. SELA
Biopolymers 3, 625 (1965).
3. E.R. BLOUT et R.H. KARLSON
J. Am. Chem. Soc. 78, 941 (1956).
4. P. DOTY, J.M. BRADBURY et A.M. HOLTZER
J. Am. Chem. Soc. 78, 947 (1956).
5. H.W.GILSON et F.C. BAILEY
J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 10, 3017 (1972).
6. Y. KONISHI et M. HATANO
J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed. 14, 219, 303 et 351 (1976).
J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 14, 2339 (1976).
7. C. FEYEREISEN
Mémoire du D.E.A. Lille 1976.

C H A P I T R E I I

ETUDE DE LA TRANSITION HELICE - CHAINE

II.1. INTRODUCTION

Lorsqu'une onde électromagnétique linéairement polarisée traverse un milieu optiquement actif, dans le domaine de longueurs d'onde d'absorption de ce milieu, ses composantes circulairement polarisées gauche et droite ne sont pas absorbées de la même manière. Il y a alors apparition du phénomène de dichroïsme circulaire. C'est le cas des solutions de polypeptides, qui possèdent un carbone assymétrique sur la chaîne principale. Le dichroïsme circulaire est exprimé par l'ellipticité molaire $[\theta]_{\lambda}$ à la longueur d'onde λ par la relation :

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\pi}{\lambda} (K_G - K_D) \frac{M_0 l}{100 C}$$

où K_G et K_D désignent les indices d'absorption des lumières polarisées gauche et droite, M_0 la masse molaire d'un résidu, C la concentration en g/ml et l la longueur du trajet optique.

Expérimentalement, le dichrographe fournit directement la différence de densité optique ($A_G - A_D$) à la sortie de l'échantillon pour les composantes polarisées gauche et droite. Dans ces conditions :

$$[\theta]_{\lambda} = 3300 \frac{M_0}{C l} (A_G - A_D) S$$

où S désigne la sensibilité de détection.

si ΔA désigne la différence ($A_G - A_D$) mesurée pour la solution, diminuée de la valeur de ($A_G - A_D$) du solvant, on a alors :

$$[\theta]_{\lambda} = 3300 \frac{M_0}{C l} \Delta A S$$

$[\theta]_{\lambda}$ est exprimée en degré.cm²/décimole.

Le chromophore peptidique ($-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{NH}-$) présente deux bandes d'absorption :

- la bande $n \rightarrow \pi^*$ située à 220 nm
- la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ située à 190 nm

Dans le cas où le polypeptide adopte la conformation en hélice α , la bande $\pi \rightarrow \pi^*$ se dédouble en deux bandes situées à 190 et 209 nm.

Les bandes caractéristiques des différentes conformations prises par les polypeptides en solution ont pu être précisées et sont constituées par ¹ :

- une bande négative vers 217 nm ($[\theta] \approx -5000$)
et une bande positive vers 198 nm ($[\theta] \approx 42000$)
pour la conformation désordonnée ;
- une bande négative vers 216 nm ($[\theta] \approx -36000$)
et une bande positive vers 190 nm ($[\theta] \approx +25000$)
pour les feuilletts plissés ;
- une bande négative à 222 nm ($[\theta] \approx -36000$)
une bande négative à 209 nm, et une bande positive à 190 nm ($[\theta] \approx +70000$)
pour la conformation en hélice α droite.

A 222 nm, les ellipticités de l'hélice α et de la chaîne désordonnée sont très différentes. Si la solution étudiée ne contient que ces deux conformations, on peut calculer la fraction en hélice du polypeptide, F_H , par la relation :

$$F_H = \frac{[\theta]_{222}^{RC} - [\theta]_{222}}{[\theta]_{222}^{RC} - [\theta]_{222}^H} \quad (\text{II.1.})$$

où $[\theta]_{222}^{RC}$ et $[\theta]_{222}^H$ représentent, respectivement, les ellipticités molaires à 222 nm d'une chaîne totalement désordonnée

et d'une hélice α droite complète. Ces valeurs varient suivant la nature du solvant. En solution aqueuse, on utilise généralement les valeurs suivantes :

$$[\theta]_{222}^{RC} = 4000$$

$$[\theta]_{222}^H = -36000$$

II.2. ETUDE CONFORMATIONNELLE DE LA PHEG ET DES COPOLYMERES POLY(HEG-CO-BGln) EN SOLUTION AQUEUSE

II.2.1. Etude conformationnelle à température ambiante

Le spectre dichroïque * de la PHEG en solution aqueuse à température ambiante présente (Figure II.1) une bande négative, de faible intensité, entre 230 et 240 nm, une bande positive, de faible intensité, centrée à 216 nm et une bande négative, intense, à 199 nm. Ces caractéristiques démontrent que la PHEG se présente sous une forme désordonnée, conformément à ce qui avait été observé par d'autres auteurs²⁻⁶.

Les spectres dichroïques des copolymères (fig.II.1) montrent des caractéristiques différentes. En effet, lorsque l'on augmente la quantité de motifs (N⁵-benzyl-L-glutamine) (BGln) dans la chaîne polypeptidique, on observe :

- une diminution progressive de l'intensité de la bande située aux faibles longueurs d'onde ; son maximum se déplace vers des longueurs d'onde plus grandes (200, 202, 203 nm). Pour le copolymère BGln₁₅, elle est remplacée par une bande négative intense située à 207 nm.

- la diminution en intensité de la bande positive centrée sur 216 nm, qui devient négative.

* Mme M.P. HILDEBRAND a bien voulu se charger de l'enregistrement des spectres dichroïques à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille. Qu'elle soit vivement remerciée ici.

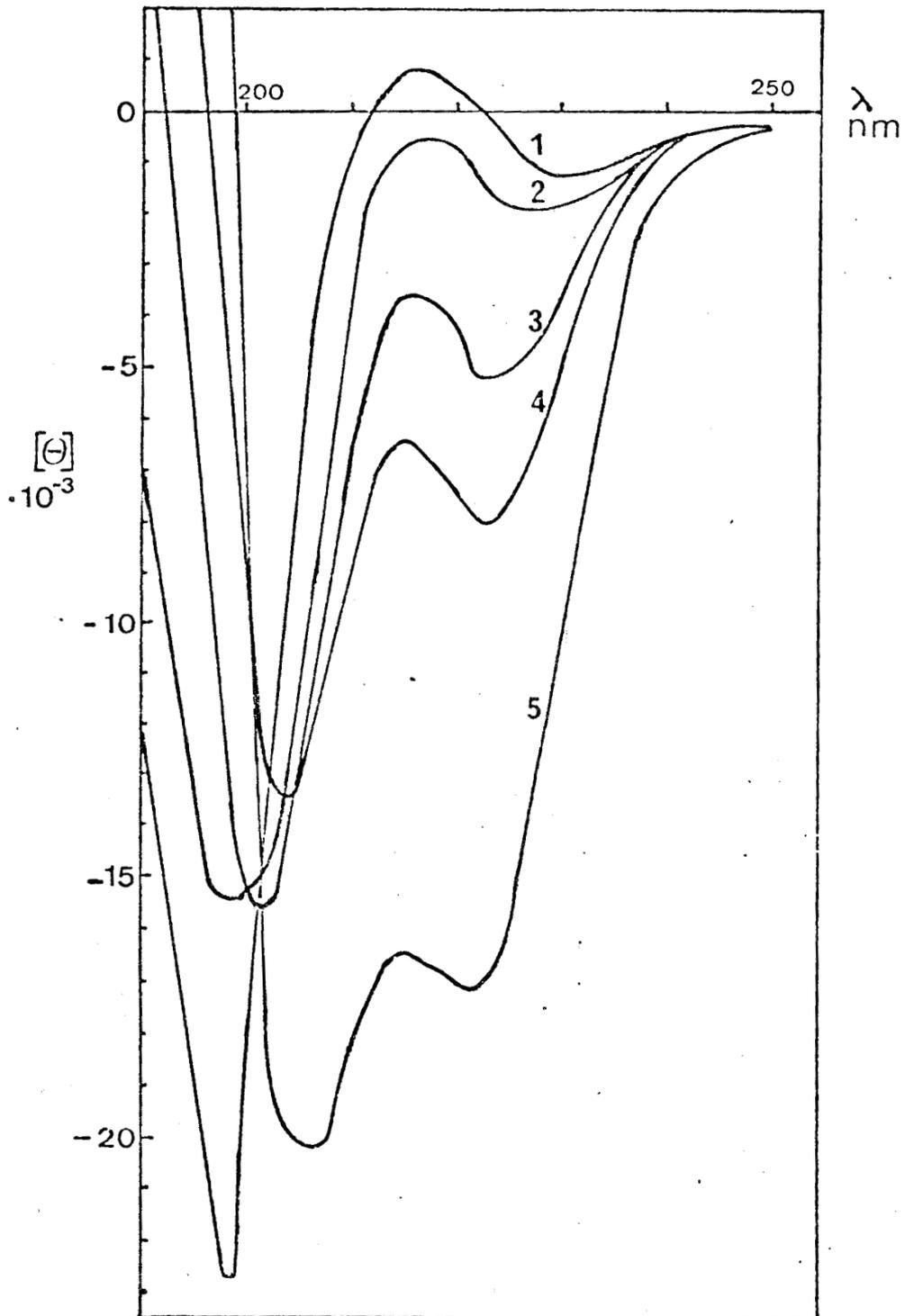


FIGURE II.1

Spectres dichroïques de la PHEG (1), des copolymères BGLn₄ (2) BGLn₇ (3), BGLn₁₀ (4) et BGLn₁₅ (5) en solution aqueuse à température ambiante.



- la bande négative centrée sur 235 nm augmente en intensité et se déplace vers des longueurs d'ondes plus courtes (225, 223, 222 et 222 nm).

Ceci démontre que l'on est en présence d'un mélange de deux conformations : la chaîne désordonnée et l'hélice α droite ; en outre lorsque les copolymères s'enrichissent en motifs BGl_n, la proportion d'hélice α augmente progressivement, comme le montre la variation de l'ellipticité molaire à 222 et 216 nm (figure II.2.).

Deux remarques peuvent être faites :

. la variation de $[\theta]_{222}$ et de $[\theta]_{216}$ en fonction du taux de BGl_n n'est pas linéaire. Cela avait déjà été observé dans le cas de copolymères optiquement actifs ⁷⁻¹², de copolymères poly(méthyl-L-aspartate-CO-nitrobenzyl-L-aspartate) ¹³ et poly(acide-L-glutamique-CO-L-glutamate de benzyle) ¹⁴. Cette variation non-linéaire a été expliquée sur la base d'effets de voisinage pris en compte en termes de triades ¹¹.

. l'enrichissement en hélice α des copolypeptides, lorsque l'on augmente la teneur en BGl_n, est rapide : $[\theta]_{222} = -17200$ pour le copolymère BGl_n₁₅. En outre, on constate que l'incorporation, même en faible proportion, de résidus BGl_n aboutit à une modification importante de la conformation du copolypeptide.

L'incorporation d'un groupement benzylique non polaire sur la chaîne latérale contribue donc à la stabilisation de la conformation hélicoïdale du polypeptide, en solution aqueuse. Cette stabilisation de l'hélice α a pour origine des interactions spécifiques entre groupements non-polaires en solution aqueuse, nommées interactions hydrophobes.

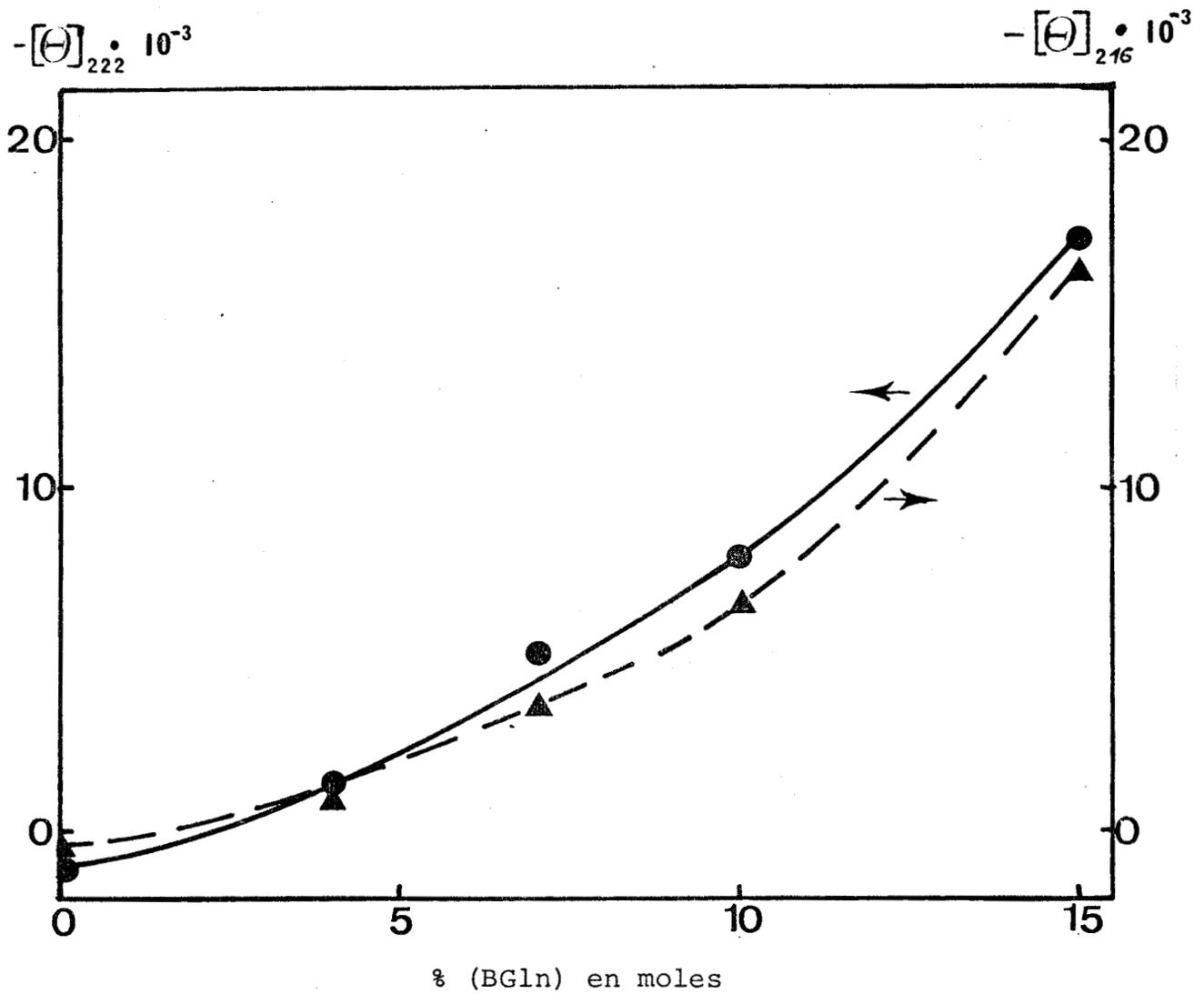


FIGURE II.2

Variation de l'ellipticité molaire à 222 et 216 nm de la PHEG et des copolymères en fonction de la composition en motifs (BGlN).
(solvant : eau ; température ambiante).

Transition hélice - chaîne et interactions hydrophobes

On trouvera en annexe de ce chapitre un résumé de la définition et des propriétés des interactions hydrophobes. Rappelons simplement que KAUFMANN¹⁵, NEMETHY et SCHERAGA^{16,17} ont défini l'effet hydrophobe comme étant une propriété particulière des groupements chimiques non polaires en solution aqueuse, caractérisée par une attraction mutuelle de ces groupements afin de former des "zones hydrophobes" desquelles l'eau est exclue. De nombreux auteurs ont montré que ces interactions hydrophobes contribuent à la stabilisation de la structure hélicoïdale en solution aqueuse^{2, 16-24}, en renforçant les liaisons hydrogène interpeptidiques caractéristiques de l'hélice α et en augmentant l'entropie de stabilisation de l'hélice α . Ainsi, par exemple, l'entropie de la transition chaîne - hélice α augmente dans l'ordre Polyglycine/Poly-L-Alanine/Poly-L-Leucine/Poly-L-Valine, reflétant un renforcement des interactions hydrophobes dû à l'allongement de la chaîne latérale non polaire²⁴. De la même façon, si l'on considère des séries homologues de polypeptides, ne différant que par le nombre de groupements méthylène dans la chaîne latérale, on observe une stabilisation de la conformation hélicoïdale en solution aqueuse, lorsque le nombre de (-CH₂-) croît dans la chaîne latérale : c'est le cas de la série de la poly-L-Lysine et de ses homologues²⁵⁻²⁸, et de la série des poly(S-alkyl-L-cystéine)²⁹. C'est également le cas de la série des poly(N⁵-(hydroxyalkyl)-L-glutamine)² : lorsque le nombre de méthylène de la chaîne latérale est augmenté de 4 à 6 (PHEG/PHPG/PHBG), la fraction d'hélice α des polypeptides en solution aqueuse est, respectivement, égale à 0, 0,16 et 0,65, à température ambiante.

L'effet stabilisant vis-à-vis de l'hélice α des interactions hydrophobes a également été montré dans le cas de copolymères contenant un acide aminé à caractère non polaire, comme l'alanine³⁰, la leucine^{31,32}, la phényl-alanine³³, le glutamate de benzyle¹⁴ et le glutamate de 2-nitrobenzyle^{34,35}.

En conclusion, l'accroissement de la teneur en hélice α des copolymères étudiés dans le présent travail, en solution aqueuse, a pour origine une stabilisation de l'hélice α , provenant des interactions de type hydrophobe entre les groupements benzyliques des résidus BGln. L'effet stabilisant des résidus hydrophobes BGln est important: $[\theta]_{222} = - 17200$ pour le copolymère BGln₁₅, ce qui indique une fraction en hélice proche de 0,5 *

II.2.2. Etude conformationnelle en fonction de la température

La stabilité de la conformation adoptée par un polypeptide en solution dépend de la température. En ce qui concerne la transition hélice - chaîne en solution aqueuse induite par une variation de la température, on distingue deux cas :

- la transition est dite "normale" lorsqu'une augmentation de la température induit une transition hélice - chaîne ;

- la transition est dite "inverse" lorsqu'une augmentation de la température stabilise la conformation hélicoïdale.

La plupart des polypeptides se rangent dans le premier cas. En effet, la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires, nécessaires à l'établissement d'une structure hélicoïdale, est défavorisée à haute température. Par contre, les interactions hydrophobes sont favorisées par une augmentation de la température (voir annexe).

La figure II.3. montre la variation de l'ellipticité molaire à 222 nm en fonction de la température des différents copolypeptides et de la PHEG.

Pour la PHEG, $[\theta]_{222}$ reste positif, ce qui indique que l'hélice α reste instable dans tout le domaine de température

* les valeurs exactes de la fraction en hélice sont calculées au § II .3

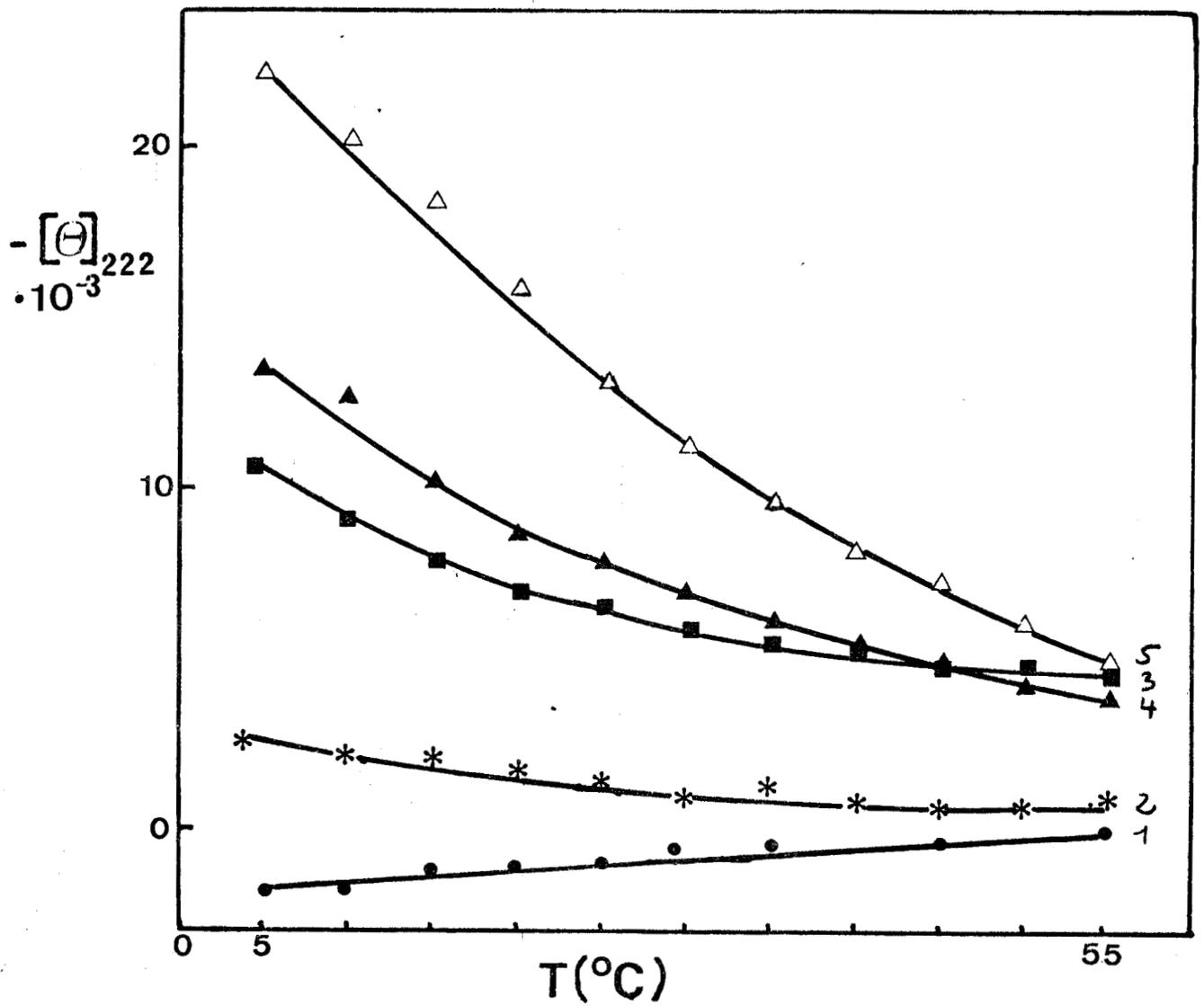


FIGURE II.3

Variation de l'ellipticité molaire à 222 nm en fonction de la température (même numérotation que pour la figure II.1).



étudié, comme l'avaient déjà noté d'autres auteurs ^{2,4,36}. Au contraire, l'hélice α des copolymères est d'autant plus stable que la température est basse. Ce qui implique que, lorsque l'on augmente la température, l'effet stabilisant des interactions hydrophobes est masqué par la rupture des liaisons hydrogène intramoléculaires ¹⁶⁻¹⁸.

A une température donnée, l'hélice est plus stable si le copolypeptide est doué d'un caractère plus hydrophobe ; cet effet tend à s'amenuiser vers les hautes températures. La température de transition, T_r , déterminée par extrapolation sur les courbes (voir Tableau II.1) augmente avec le taux en résidus hydrophobes, conformément aux prévisions ¹⁸ et à d'autres observations ^{2,30-33,35}.

II.3. ETUDE DE LA TRANSITION HELICE-CHAINE DANS LES MELANGES DE SOLVANTS EAU/SOLVANT ORGANIQUE.

Il est maintenant bien connu que l'addition d'un solvant organique non polaire ou faiblement polaire à une solution aqueuse de protéine globulaire ou de polypeptide de synthèse induit une dénaturation de la structure secondaire native de la chaîne polypeptidique ^{24,37-38}. Cette dénatura-tion peut s'accompagner d'une structuration de la chaîne poly-peptidique (en hélice ou en feuilletts plissés). Une telle transition conformationnelle induite par une modification de la composition du solvant est alors appelée dénaturation re-structurante ³⁹. De nombreux solvants organiques sont capa-bles d'induire une telle restructuration ³⁷. Deux d'entre eux nous ont paru particulièrement intéressants : le méthanol, qui est un des meilleurs agents hélicogènes des poly(N⁵- (hydroxyalkyl)-L-glutamine) ^{2,40-41} et le 2-chloroethanol, con-nu pour ses propriétés hélicogènes vis-à-vis des protéines globulaires ^{37,39,42-51}, des polypeptides de synthèse ^{25,52-55} - dont la PHPG ⁵⁶ - et dont les interactions avec les proté-ines ^{39,45,46} et la PHPG ⁵⁶ ont été étudiées.

POLYPEPTIDE							
Copolymère (HEG-CO-BGln)							
	PHBG	PHPG	PHEG	BGln ₄	BGln ₇	BGln ₁₀	BGln ₁₅
transition induite par la température en solution aqueuse : température de transition et, \overline{DP}_w du polymère	40°C $\overline{DP}_w = 500$	- 5°C $\overline{DP}_w = 750$	- $\overline{DP}_w = 600$	- $\overline{DP}_w = 546$	(-28°C)* $\overline{DP}_w = 526$	(-16°C)* $\overline{DP}_w = 470$	9°C $\overline{DP}_w = 458$
REFERENCE	(2)	(2) (40)		ce travail	ce travail	ce travail	ce travail
transition induite par un solvant organique : composition du mélange de solvant à la demi-transition à température ambiante exprimée par le % de solvant organique (en volume) dans le mélange eau/solvant organique	(2)	15 10 (40) (2)	35 33 (2)ce travail	30 ce travail	21 ce travail	19 ce travail	9 ce travail
		25	45	39	22	17	5
		(56)	ce travail	ce travail	ce travail	ce travail	ce travail
			25				
			(36)				

* valeurs extrapolées

TABLEAU II.1



Grâce à la relation (II.1), il est possible de déterminer les changements conformationnels des polypeptides, en mesurant $[\theta]_{222}$ dans les mélanges de solvants. Les différentes solutions ont été préparées en mélangeant, dans des proportions connues, deux solutions de polymère, de même concentration molaire : une solution aqueuse et une solution à 95 % en volume de solvant organique (la PHEG et les copolymères sont insolubles dans le méthanol et le 2-chloroéthanol purs), obtenue par addition du solvant organique à une solution aqueuse de polymère.

II.3.1. Etude de la transition chaîne - hélice dans les mélanges de solvants eau/méthanol et eau/2-chloroéthanol à température ambiante.

II.3.1.1. Résultats

Les figures II.4. et II.5. représentent les variations de l'ellipticité molaire à 222 nm de la PHEG et des copolymères en fonction de la composition du mélange de solvants eau/méthanol et eau/2-chloroéthanol, respectivement. Dans les deux cas, on observe une augmentation rapide de la valeur de $-\ [\theta]_{222}$, ce qui indique que les deux solvants organiques induisent une transition chaîne - hélice. La transition est atteinte d'autant plus rapidement que les copolymères possèdent un caractère hydrophobe plus marqué ; cet effet tend néanmoins à s'amenuiser lorsque la proportion de solvant organique est prédominante dans le mélange de solvants.

En ce qui concerne la PHEG, la valeur de $[\theta]_{222}$ dans le mélange eau/méthanol 95/5 ($[\theta]_{222} = - 39200$) est supérieure à celle observée par ADLER et ses coll.³. Cette différence est peut-être attribuable à l'influence de la masse moléculaire moyenne du polypeptide.

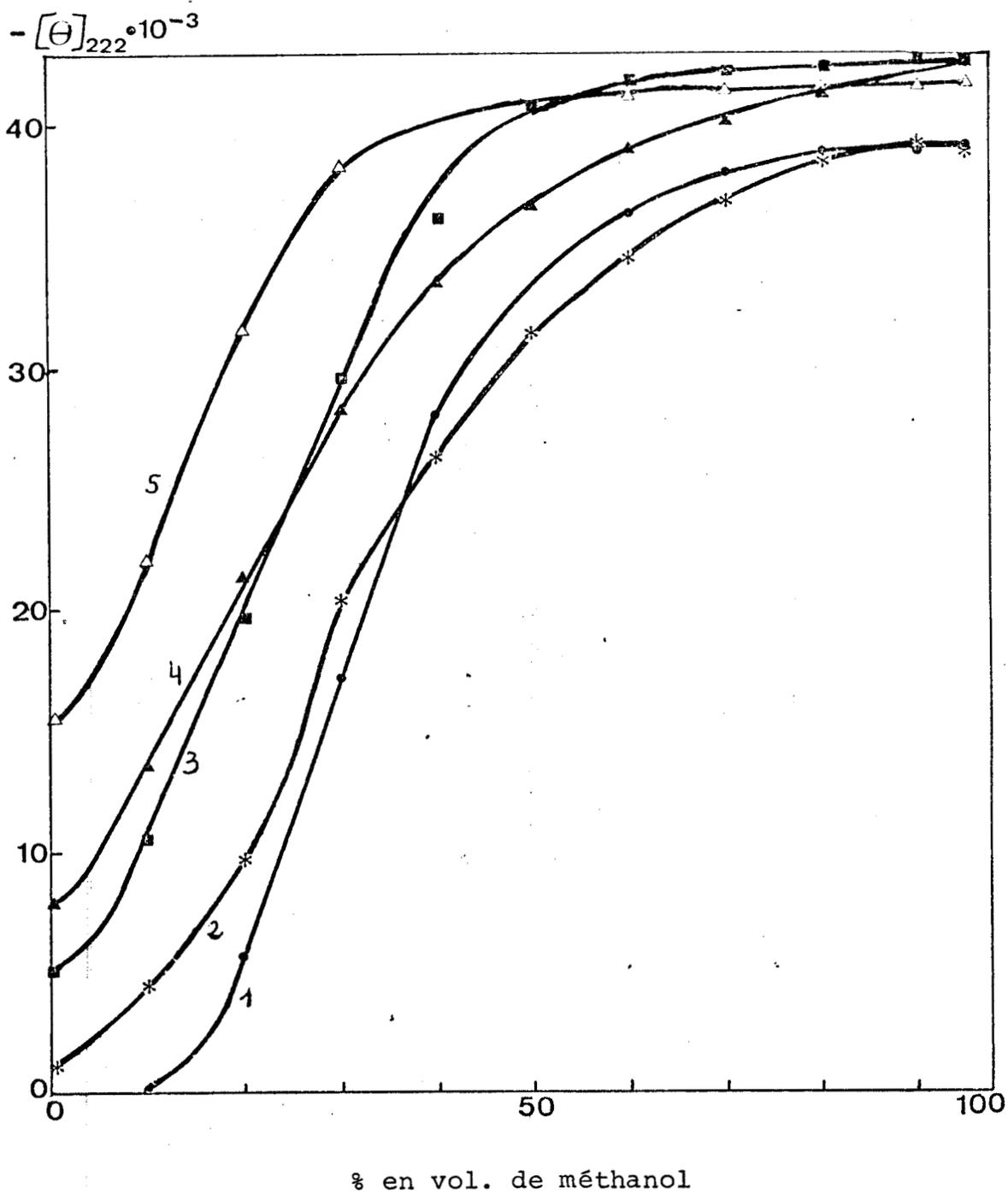


FIGURE II.4



Variation de $\left[\theta\right]_{222}$ en fonction de la composition du mélange eau/méthanol, à température ambiante (même numérotation que pour la figure II.1)

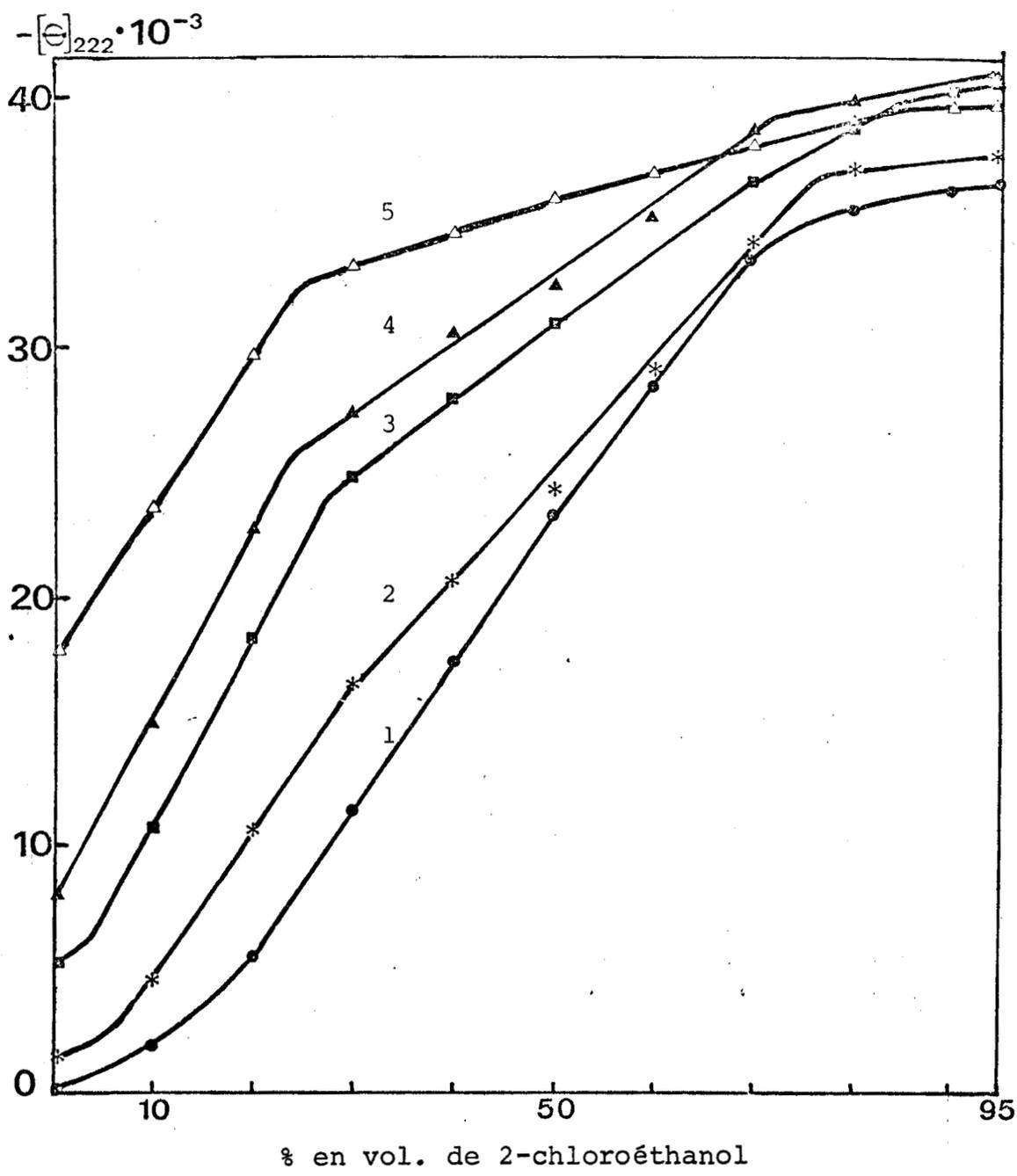


FIGURE II.5

Variation de $[\alpha]_{222}$ en fonction de la composition du mélange eau/2-chloroéthanol, à température ambiante (même numérotation que pour la figure II.1).



II.3.1.2. Détermination de la fraction d'hélice

La détermination de la fraction d'hélice, f_H , se fait grâce à la relation II.1. :

$$f_H = \frac{[\theta]_{222}^{RC} \quad [\theta]_{222}^H}{[\theta]_{222}^{RC} - [\theta]_{222}^H}$$

où $[\theta]_{222}^{RC}$ et $[\theta]_{222}^H$ désignent, respectivement, les ellipticités molaires à 222 nm d'une chaîne totalement désordonnée et d'une hélice α droite. Dans la plupart des cas, on choisit les valeurs standards :

$$[\theta]_{222}^H = - 36000$$

$$[\theta]_{222}^{RC} = 4000$$

Néanmoins, dans le cas des poly(N^5 -(hydroxy alkyl)-L-glutamine), LOTAN et ses coll. ⁴⁰ ont été amené à proposer des valeurs différentes, notamment :

$$[\theta]_{222}^H = - 53000$$

$$[\theta]_{222}^{RC} = 0$$

pour la PHPG.

Pour la PHEG, ADLER et ses coll. ³ proposent :

$$[\theta]_{222}^H = - 33600$$

$$[\theta]_{222}^{RC} \sim + 1000$$

Ces dernières valeurs nous paraissant trop faibles au regard de nos résultats expérimentaux, nous avons choisi :



- pour $[\theta]_{222}^H$, la valeur expérimentale la plus élevée observée pour $[\theta]_{222}$, arrondie par excès, à savoir :

$$[\theta]_{222}^H = - 43000 \quad (\text{voir figure II.4})$$

- pour $[\theta]_{222}^{RC}$, la valeur la plus faible observée pour $[\theta]_{222}$ dans le cas de la PHEG, arrondie par excès, à savoir :

$$[\theta]_{222}^{RC} = + 2000 \quad (\text{voir figure II.3})$$

La fraction en hélice f_H se calculera donc à partir de la relation :

$$f_H = \frac{2000 - [\theta]_{222}}{45000} \quad (\text{II.2})$$

Dans le tableau II.2, nous avons regroupé les valeurs de la fraction en hélice ainsi calculée, pour la PHEG et les copolymères, en solution aqueuse, et dans quelques mélanges de solvants particuliers. Aux fins de comparaison, nous y avons ajouté les valeurs de f_H trouvées dans la littérature pour la PHEG dans d'autres solvants, ainsi que pour ses homologues supérieurs, la PHPG et la PHBG.

II.3.2. Discussion des résultats

L'addition de méthanol ou de 2-chloroéthanol à une solution aqueuse des polypeptides étudiés provoque une augmentation rapide de la fraction d'hélice α . Dans les domaines

SOLVANT	f_H PHBG	f_H PHPG	f_H PHEG	f_H copoly BGLn ₄	f_H copoly BGLn ₇	f_H copoly BGLn ₁₀	f_H copoly BGLn ₁₅
EAU	0,65	0,20	0	0,07	0,16	0,22	0,40
Référence	(2)	(2)	(2) (3) travail	ce travail	ce travail	ce travail	ce travail
H ₂ O/méthanol * 90/10	0,70	0,40	0,05 0,04	0,14	0,28	0,35	0,54
H ₂ O/méthanol * 50/50	0,89	0,77	0,70 0,74	0,74	0,95	0,86	0,96
H ₂ O/méthanol * 5/95	0,96	0,90	0,91	0,91	0,99	0,99	0,96
Référence	(2)	(2)	(2) ce travail	ce travail	ce travail	ce travail	ce travail
H ₂ O/2-chloroéthanol* 90/10		0,26	0,08	0,14	0,28	0,37	0,57
H ₂ O/2-chloroéthanol* 50/50		0,70	0,56	0,60	0,73	0,78	0,84
H ₂ O/2-chloroéthanol* 5/95		0,78	0,86	0,88	0,95	0,96	0,93
Référence		(56)	ce travail	ce travail	ce travail	ce travail	ce travail
H ₂ O/isopropanol * 30/70			0,89				
Référence			(36)				

* en vol/vol.

TABLEAU II.2. Fraction d'hélice α , f_H , de la PHBG, PHPG, PHEG et des copolymères (HEG-CO-BGLn) dans différents solvants à température ambiante



de composition où l'eau est prépondérante, cette augmentation est d'autant plus grande que le polypeptide est riche en résidus BGl_n : l'effet stabilisant des interactions entre chaînes latérales hydrophobes sur la structure hélicoïdale se maintient. Si l'on compare la composition du mélange de solvant à la demi-transition, on constate (tableau II.1) qu'il faut ajouter d'autant moins de solvant organique que le polypeptide est plus hydrophobe. On constate également que le méthanol est plus hélicogène que le 2-chloroéthanol. Lorsque le mélange de solvants s'appauvrit en eau, l'augmentation de la fraction d'hélice devient moins importante. On atteint un palier, au-delà duquel l'addition de solvant organique ne provoque pas ou peu de changements dans la conformation du polymère. Ce palier est situé à 75 % en vol. de 2-chloroéthanol ou de méthanol. Sur la figure (II.6), nous avons reporté les variations de f_H en fonction de la teneur en (BGl_n), pour différents mélanges eau/2-chloroéthanol. Aux faibles concentrations en 2-chloroéthanol, les courbes représentatives sont concaves, ce qui indique que les interactions hydrophobes stabilisent la structure hélicoïdale d'une manière coopérative. Aux plus fortes concentrations en 2-chloroéthanol (> 15 % en vol.), les courbes représentatives sont convexes, ce qui démontre que l'augmentation de la teneur en résidus (BGl_n) ne contribue plus de façon marquée à la stabilisation de l'hélice α . Ceci peut s'expliquer par une disparition des fortes interactions hydrophobes qui existent en solution aqueuse : le solvant étant devenu moins polaire, les groupements chimiques non-polaires, rapprochés les uns des autres en milieu fortement polaire, ont tendance à se "relaxer" et leurs interactions avec le solvant peu polaire sont alors tout aussi favorables que leurs interactions mutuelles. Les interactions hydrophobes s'amenuisent alors ^{16,17} (cf. annexe).

BLANCO, GOROSTIDI et MUNTANER ⁵⁷ ont étudié la transition chaîne - hélice de copolymères de composition variable dans le mélange chloroforme / acide dichloroacétique (DCA) et ont observé une dépendance entre

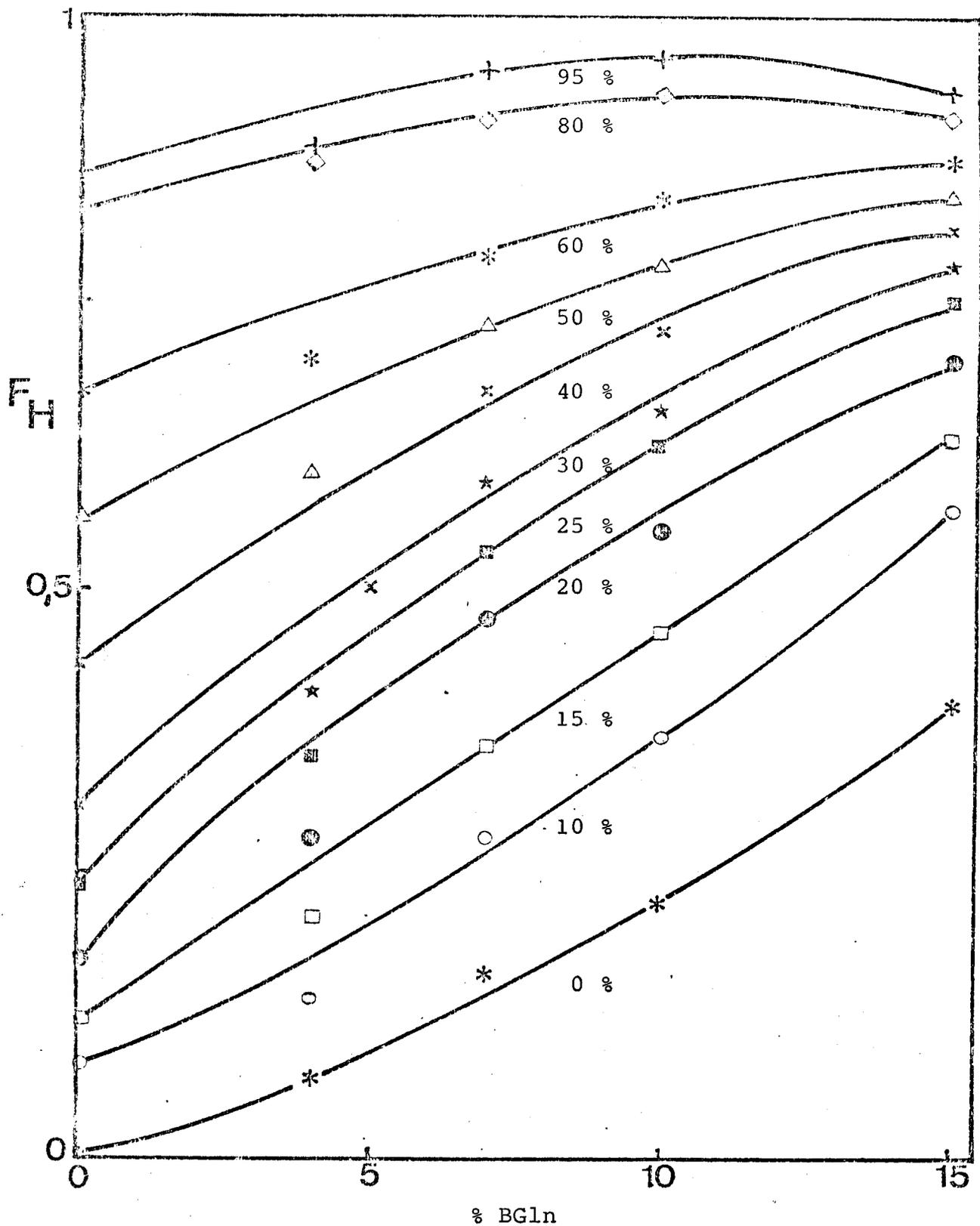


FIGURE II.6

Variation de la fraction d'hélice f_H dans les mélanges eau/2-chloroéthanol en fonction de la teneur en motifs (BGlN) (les % indiqués dans la figure se réfèrent au % en volume de 2-chloroéthanol).



la composition des copolypeptides et la composition du mélange chloroforme/DCA à la demi-transition. Ce résultat est comparable à celui de ARFMANN, LABITZKE et WAGNER⁵⁸ qui ont étudié la transition conformationnelle dans des mélanges eau/méthanol de copolymères de la L-Lysine et de divers acides aminés à chaîne latérale non polaire. Ainsi, à pH 8,5, la demi-transition est obtenue à des quantités décroissantes de méthanol, dans le mélange eau/méthanol, lorsque l'on incorpore des quantités croissantes de norleucine dans les copolymères (L-Lysine-CO-L-Norleucine).

Ces résultats sont en bon accord avec les nôtres et confirment l'effet stabilisant sur l'hélice α des interactions hydrophobes dues aux chaînes latérales non polaires : pour induire une transition chaîne hélice isotherme, il faut rajouter d'autant plus de solvant hélicogène que le polypeptide est plus hydrophile.

La structuration en hélice α d'une chaîne peptidique désordonnée s'accompagne nécessairement de la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires, essentiellement entre le carboxyle et l'amide de la chaîne principale. L'eau est connue comme étant un très bon donneur de liaisons hydrogène, notamment avec les groupements amides^{37,59-64}, contrairement aux solvants non aqueux. La transition hélice - chaîne dans les mélanges de solvants eau/solvant non polaire peut être interprétée de la manière suivante^{24,37} : la liaison hydrogène intrapeptidique est formée entre un donneur de liaison hydrogène (NH) et un accepteur (CO)^{37,65}. Dans un solvant accepteur de liaison hydrogène (la plupart des solvants peu polaires), il y aura pas ou peu de compétition entre le solvant et la liaison peptidique. Cette compétition sera d'autant moins forte que le solvant possède un caractère donneur de liaisons hydrogène plus faible⁶⁶. Au contraire, en solution aqueuse, il y aura compétition entre les molécules d'eau et le groupement (NH). Sachant que celui-ci est un faible donneur de liaisons hydrogène^{37,62,65,67}, cette compétition aboutit à une rupture de liaisons hydrogène intrapeptidiques.

En outre, les liaisons hydrogène carbonyle - eau sont plus fortes que les liaisons hydrogène eau/eau ⁵⁹ ; elles sont d'ailleurs renforcées par la proximité d'un azote substitué ^{59,61}. Le solvant organique, en abaissant l'activité de l'eau ⁶⁸ et en formant des complexes eau/solvant organique ⁶⁹⁻⁷⁴, diminue la capacité des molécules d'eau à former des liaisons hydrogène avec les groupements amides ⁷⁵.

Il apparaît donc que la dénaturation restructurante de la PHEG et des copolymères (HEG-CO-BGln) a pour origine plusieurs effets :

- * un abaissement de l'activité de l'eau, solvant bon donneur de liaisons hydrogène,
- * le remplacement d'un milieu polaire peu propice aux liaisons hydrogène intrapeptidiques par un milieu moins polaire, plus favorable.

De nombreux auteurs ont interprété la dénaturation restructurante des protéines ^{24,37,39,75} et des polypeptides de synthèse ^{24,25,26,37,56,76-82} par des mélanges de solvants de cette manière ; deux d'entre elles nous paraissent particulièrement significatives.

WEN et WOODY ⁸⁰ ont étudié la transition chaîne - hélice de la poly-L-tyrosine dans le mélange diméthylsulphoxide/ acide dichloroacétique (DMSO/DCA) : en solution dans le DMSO, la Poly-L-tyrosine se présente sous forme d'une chaîne désordonnée, et l'addition de DCA induit une structuration en hélice α . Ils ont observé, en mesurant la viscosité des mélanges DMSO/DCA, que ces deux solvants interagissent fortement entre eux. Pour ces auteurs, la transition est induite par une baisse importante de la capacité du DMSO à solvater le squelette peptidique et les chaînes latérales aromatiques, à cause de la formation de complexes DMSO/DCA. Aux fortes concentrations en DCA, celui-ci étant un mauvais solvant de la poly-L-tyrosine (elle est insoluble dans le DCA pur), les chaînes interagissent de préférence entre elles, et on observe une structuration importante.

De la même façon, LOTAN, BIXON et BERGER⁷⁶ ont mis en évidence une relation existant entre les activités des constituants d'un mélange de solvants eau/acide formique et la transition conformationnelle (voir figure II.7). Ces auteurs ont étudié trois polymères dans le mélange eau/acide formique : la PHEG, la PHPG et la PHBG. En solution aqueuse, la fraction d'hélice dépend essentiellement du caractère hydrophobe de ces polypeptides², comme nous l'avons vu précédemment ; en solution dans l'acide formique, ces trois polymères se présentent sous une forme totalement désordonnée : le caractère acide de l'acide formique pur en serait responsable, probablement à cause de la protonation des liaisons peptidiques. Dans les mélanges eau/acide formique, les trois polypeptides présentent un maximum dans la variation de la fraction en hélice, maximum situé à une fraction molaire d'acide formique égale à 0,3 (voir fig. II.6). Cela a été interprété par LOTAN et ses coll. comme étant la conséquence d'une interaction entre les deux solvants, sous la forme de complexes eau/acide formique. Ces complexes seraient inactifs vis-à-vis des polypeptides qui atteignent alors une conformation structurée maximale. Le pouvoir hélicogène du méthanol et du 2-chloroéthanol vis-à-vis de la PHEG et des copolymères (HEG-CO-BGln) peut alors se comprendre à la lumière des considérations que nous venons de développer : en réduisant l'activité de l'eau, en formant des complexes eau/méthanol⁷⁰ et eau/2-chloroéthanol⁸³, ils diminuent sa capacité à former des liaisons hydrogène avec la chaîne polypeptidique qui est alors capable de se structurer. Peu polaires, moins bons donneurs de liaison hydrogène, ces molécules doivent créer un environnement favorable à l'enroulement en hélice. Le plus grand pouvoir hélicogène du méthanol, comparé à celui du 2-chloroéthanol, doit pouvoir s'expliquer par de plus fortes interactions avec l'eau et/ou par une plus faible activité vis-à-vis des chaînes peptidiques.

fraction
d'hélice αf_H

activités de l'eau (a_1) et de
l'acide formique (a_2) dans les
mélanges eau/acide formique

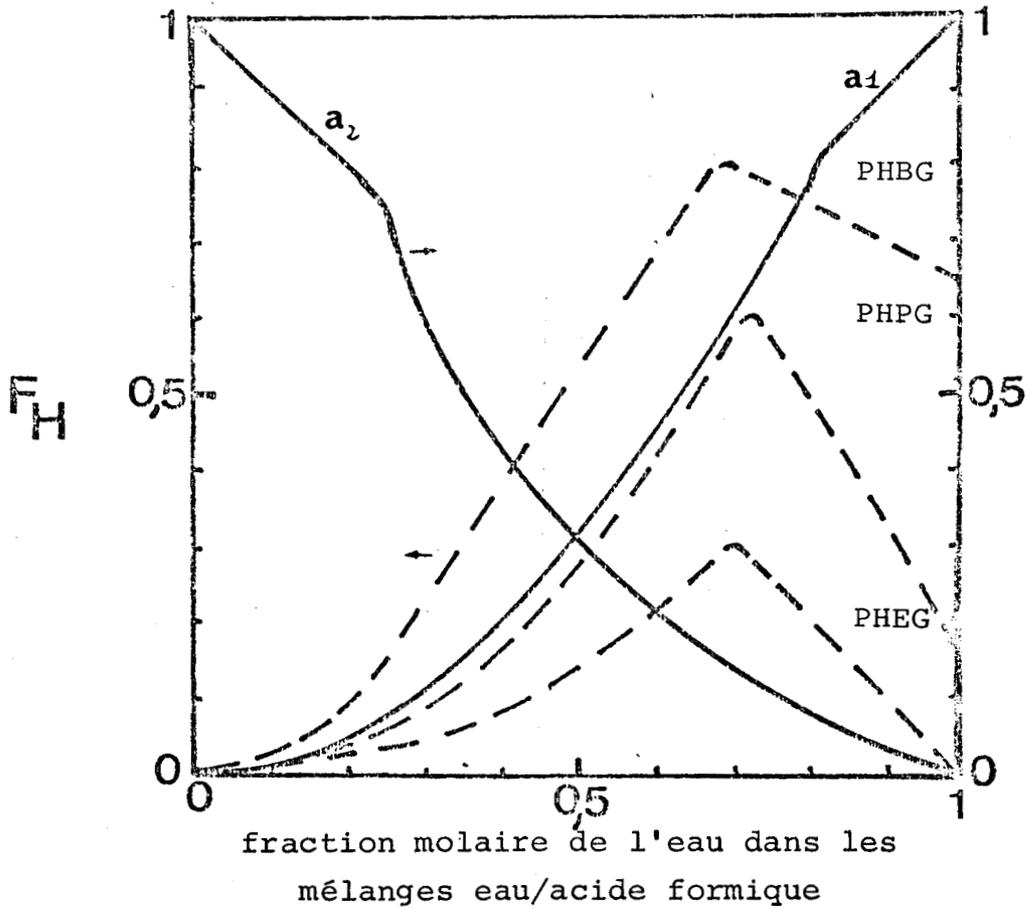


FIGURE II.7

Variation de la fraction d'hélice de la PHEG, de la PHPG et de la PHBG et de l'activité de l'eau et de l'acide formique dans les mélanges eau/acide formique (d'après LOTAN, BIXON et BERGER ⁷⁶).

I.4. CONCLUSION

L'étude de la transition chaîne - hélice de la PHEG et des copolymères (HEG-CO-BGln) en solution aqueuse et dans les mélanges eau/solvant organique, nous a permis de confirmer l'existence de deux effets stabilisant la structure ordonnée :

L'effet des interactions hydrophobes entre chaînes latérales non polaires : la PHEG, de par son caractère hydrophile se présente, en solution aqueuse à température ambiante, sous une conformation totalement désordonnée. Lorsque l'on substitue le groupement hydroxyéthyl en bout de la chaîne latérale par un groupement benzylique hydrophobe, la structuration de la chaîne polypeptidique est stabilisée de façon marquée.

L'effet des interactions solvant - polypeptide et solvant - solvant : dans un solvant "actif" ^{24,40}, les interactions solvant - polypeptide déstabilisent la structure hélicoïdale ; dans un solvant "inerte" ^{24,40}, au contraire, l'hélice α est stabilisée. Lorsque l'on mélange les deux solvants, les interactions entre le constituant "inerte" et le constituant "actif" entrent en compétition avec les interactions constituant "actif"/Polymère, et contribuent à induire une transition chaîne - hélice.

En synthétisant une série de polypeptides non ionisables, solubles dans l'eau, d'hydrophobicité variable, nous avons pu confirmer quantitativement l'effet stabilisant des interactions hydrophobes vis-à-vis de l'hélice α , aussi bien en solution aqueuse qu'en mélange eau/solvant organique. L'hypothèse, selon laquelle les différences du comportement conformationnel entre protéines globulaires, en solution aqueuse et en mélange eau/solvant organique, seraient dues, dans une large mesure, à des différences d'hydrophobie (dues à des différentes compositions en acides aminés hydrophobes)^{15,17,24,37} se trouve ainsi confirmée.

REMARQUE : INFLUENCE DE LA MASSE MOLECULAIRE MOYENNE SUR
LA TRANSITION CHAINE - HELICE.

La fraction d'hélice d'un polypeptide, dans un solvant donné et à une température donnée, dépend de sa masse moléculaire moyenne^{38,84-87} : la fraction d'hélice est plus petite pour les faibles masses. Néanmoins, l'influence de la masse moléculaire est peu marquée pour des degrés de polymérisation moyens en poids $\overline{DP}_w > 500$. Ceci a pu être vérifié dans le cas de la PHPG^{40,88} et de la PHEG^{5,36}. L'écart entre les masses moléculaires moyennes en poids de la PHEG et des copolymères étudiés dans ce travail n'est pas assez important pour pouvoir avoir un effet notable sur leurs propriétés physico-chimiques, et notamment sur la fraction d'hélice.

A N N E X E

L'INTERACTION HYDROPHOBE

A - INTRODUCTION

KAUZMANN ¹⁵ dans une mise au point concernant les facteurs responsables du maintien de la structure secondaire des protéines, était amené à définir une liaison non-covalente d'un type nouveau, la liaison hydrophobe, et à dégager son rôle primordial dans la stabilisation de la structure native des protéines en solution aqueuse. Parmi tous les modèles théoriques qui furent élaborés par la suite, nous retiendrons notre attention sur celui de SCHERAGA et NEMETHY, qui a été le plus appliqué aux protéines et aux polypeptides.

Nous utiliserons tout au long de cet exposé le terme d'"interaction hydrophobe" qui s'est substitué ^{24,89} au terme de "liaison hydrophobe".

B - THEORIE DE KAUZMANN

Comme les chaînes latérales non-polaires des protéines possèdent une faible affinité pour l'eau, les configurations que prendront les chaînes polypeptidiques qui favorisent un large contact entre ces chaînes latérales, et de là tendent à les soustraire de la phase aqueuse, seront plus stables que toutes les autres configurations - toutes choses étant égales par ailleurs. Ces chaînes latérales pourront former des "micelles" intramoléculaires analogues, à ceux formés par les savons en solution aqueuse. Cette tendance des groupes non-polaires, en phase aqueuse, à adhérer les uns aux autres constitue la liaison hydrophobe. Pour étudier les propriétés de la liaison hydrophobe, KAUZMANN ¹⁵ prend pour modèle le transfert des hydrocarbures d'un solvant non polaire dans l'eau. Ainsi, le solvant non polaire représente le milieu non-polaire formé par le regroupement des chaînes latérales non-polaires. Ce transfert s'accompagne de variations d'entropie, d'énergie libre, d'enthalpie libre et de volume molaire :

$$\Delta S_t < 0 \qquad \Delta G_t > 0$$

$$\Delta H_t < 0 \qquad \Delta V_t < 0$$

Ceci a pour conséquences que :

- tout groupe aliphatique non-polaire qui quitte un environnement aqueux pour entrer dans un environnement non polaire voit son entropie augmenter ;
- les liaisons hydrophobes sont plus stables à température ambiante qu'à 0°C, à cause du caractère endothermique du transfert milieu aqueux → milieu non polaire.

C - MODELE DE NEMETHY et SCHERAGA

NEMETHY et SCHERAGA^{16-18,20-21,90-91} ont développé un modèle statistique de l'interaction hydrophobe (qu'ils dénommaient encore liaison hydrophobe), basée sur la définition de KAUZMANN¹⁵. Ce modèle est fondé sur une théorie de la structure de l'eau^{90,91} et sur une théorie des solutions aqueuses d'hydrocarbures⁹⁰.

DEFINITIONS

Les interactions hydrophobes sont caractéristiques des groupes non - polaires des protéines en solution aqueuse.

L'interaction d'un groupe non-polaire avec l'eau est thermodynamiquement défavorisée. C'est pourquoi il existe une "tendance thermodynamique" de ces groupes non-polaires pour se regrouper et diminuer par là leurs contacts avec l'eau. Cette "tendance thermodynamique" est d'origine entropique ($\Delta S_E < 0$) et indique que le changement de structure de l'eau qui accompagne l'interaction hydrophobe est un facteur essentiel.

STRUCTURE DE L'EAU

L'étude des propriétés de l'eau indique que sa structure doit comprendre certaines particularités dues, notamment, à l'existence de nombreuses liaisons hydrogène. Des "agrégats" doivent exister. Ils seraient constitués de molécules d'eau liées entre elles par plusieurs liaisons hydrogène (4 au maximum pour une molécule d'eau). On considère alors que l'eau est constituée par un mélange fluctuant de plusieurs sortes de molécules qui diffèrent par leur nombre de liaisons hydrogène (de 0 à 4/molécule d'eau). L'énergie interne de ces agrégats est une fonction de la somme des énergies des liaisons hydrogène de ces agrégats. L'entropie est :

$$S = R \text{Ln} (j^\omega) !$$

où: j représente le nombre de molécules formant un agrégat
 ω représente un paramètre qui permet de tenir compte du fait qu'il existe plusieurs arrangements possibles des liaisons hydrogène dans un agrégat donné et que cet agrégat n'est pas forcément de symétrie sphérique.

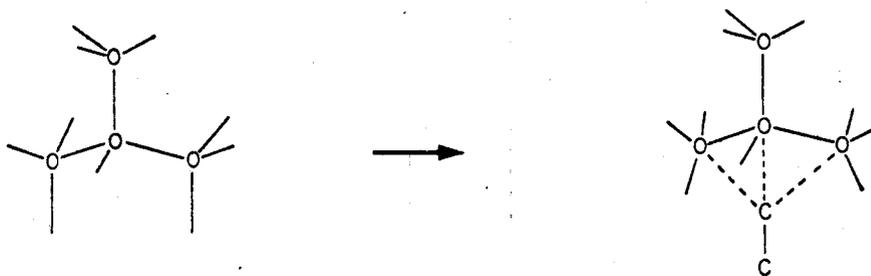
A partir de ces données, NEMETHY et SCHERAGA ont calculé toutes les variables thermodynamiques. Leur modèle s'est avéré être en bon accord avec les données expérimentales sur l'eau, pour des températures $\leq 60^\circ\text{C}$, seuil à partir duquel les différences sont très marquées. Ce seuil provient des approximations introduites dans l'élaboration du modèle :

- il n'a pas été tenu compte de la coopérativité de la liaison hydrogène de l'eau ;
- l'énergie de formation d'une liaison hydrogène dans un agrégat a été supposée indépendante de la taille de l'agrégat et de sa géométrie.

STRUCTURE DES SOLUTIONS AQUEUSES D'HYDROCARBURES SATURES

Selon NEMETHY et SCHERAGA, les solutions aqueuses d'alcanes linéaires sont caractérisées par une importante énergie libre de dissolution, correspondant à une faible solubilité et résultant d'une enthalpie de dissolution négative contrebalancée par une entropie d'excès négative (c'est, en partie, l'inverse dans le cas des protéines).

Lorsqu'une molécule de soluté est introduite dans l'eau, quelques molécules d'eau, précédemment entourées de molécules d'eau, recevront comme voisins des molécules de soluté. Dans le cas de molécules ayant 0, 1, 2, 3 ou 4 liaisons hydrogène, une molécule voit son voisin *non lié par liaison hydrogène* être remplacé par une molécule de soluté. Or, les interactions H₂O/soluté sont plus faibles que les interactions entre molécules d'eau : d'où une baisse de l'énergie interne de la molécule d'eau. Une molécule d'eau ayant eu 4 voisins liés par liaison hydrogène peut acquérir la molécule de soluté comme cinquième voisin :



Ceci est possible car les molécules d'hydrocarbures, inertes, n'interfèrent pas dans l'orientation des molécules d'eau entre elles. La formation d'une telle structure, dans laquelle le soluté occupe un espace partiellement "vide" dans la structure de l'eau pure, explique la diminution du volume partiel molaire de l'hydrocarbure en solution aqueuse.

Ceci concerne les solutions diluées, dans lesquelles chaque molécule d'eau ne peut avoir qu'une molécule de soluté au maximum comme voisin.

Le modèle théorique a pu montrer que la fraction de molécules d'eau liées entre elles par liaison hydrogène est accrue lorsque l'on ajoute le soluté non polaire :

à 25°C $f_H = 0,45$ pour l'eau pure

$f_H = 0,57$ pour une solution diluée d'hydrocarbure aliphatique

Il faut signaler que l'effet stabilisateur de l'introduction d'un groupe non-polaire dans l'eau sur la structure de l'eau avait déjà été noté (bien que sous une forme réfutée par NEMETHY et SCHERAGA) par FRANCK et EVANS⁹² et par KLOTZ⁹³. Il a été également confirmé par des calculs quantiques CNDO⁹⁴⁻⁹⁵.

FACTEURS AGISSANT SUR L'INTERACTION HYDROPHOBE

Les interactions groupes non-polaires/eau sont défavorables thermodynamiquement ; par conséquence, les groupes vont avoir tendance à se regrouper (diminuant par là leurs contacts avec l'eau) plutôt que de rester séparés et entourés d'eau.

La formation d'une interaction hydrophobe dans une protéine consiste dans le rapprochement de deux (ou de plusieurs) chaînes latérales non-polaires (à l'origine entourées d'eau) jusqu'à ce qu'elles se touchent (dans la limite des rayons de Wan der Waals) et par là diminuent le nombre de molécules d'eau avec qui elles sont en contact. L'énergie libre de formation d'une liaison hydrophobe est :

$$\Delta F_{H\emptyset}^O = \Delta F_W^O + \Delta F_S^O$$

où ΔF_W° représente la contribution du changement de structure de l'eau ; ΔF_W° est fonction du nombre de molécules d'eau exclues de la zone d'hydratation des chaînes latérales non-polaires lors de leur regroupement et de la différence d'énergie libre de ces molécules d'eau qui accompagne leur exclusion ;

où ΔF_S° représente la contribution du changement d'état de la chaîne latérale non-polaire ; ΔF_S° est fonction du nombre de contacts eau/groupe non-polaire et groupe non-polaire/groupe non-polaire, de la différence d'énergie interne qui accompagne la formation de l'interaction hydrophobe et de l'énergie libre gagnée par liaisons C - C lors du changement d'état.

NEMETHY et SCHERAGA ont calculé les valeurs de ΔF_W° et ΔF_S° pour la formation d'une liaison hydrophobe entre des acides aminés constitutifs des protéines.

$\Delta S_{H\emptyset}^{\circ}$ restant positif jusqu'à une température de l'ordre de 65°C, les interactions hydrophobes sont stabilisées lorsque la température augmente, dans la limite des 60 - 70°C. Les interactions hydrophobes sont peu spécifiques et dépendent du solvant : elles ne peuvent atteindre une grande importance qu'en milieu aqueux. En solvant non aqueux, même très polaire, il faut plutôt parler de liaisons non-polaires. En solvant non aqueux, non polaire ou faiblement polaire, les chaînes latérales non-polaires n'ont aucune raison d'interagir entre elles ; leurs interactions avec le solvant sont tout aussi favorables. En mélanges eau/solvant organique, ce dernier peut former des interactions hydrophobes avec les chaînes latérales non-polaires, facilitant ainsi le dépliement de la protéine. Les interactions hydrophobes renforcent les liaisons hydrogène. Elles ne provoquent un affaiblissement des liaisons hydrogène que si elles doivent être brisées pour permettre à la liaison hydrogène de s'effectuer.

D - LES AUTRES MODELES

Dans le modèle proposé par BEN-NAIM ⁹⁶, l'énergie libre de l'interaction hydrophobe provient du travail fourni par deux molécules non-polaires en solution aqueuse lors de leur rapprochement depuis une distance infinie. Dans le cas de mélange de solvants eau/solvant organique, BEN-NAIM a montré ⁹⁷ que l'addition d'une faible quantité de dioxanne ou d'éthanol provoque une augmentation des interactions hydrophobes. Si l'on ajoute encore du dioxanne ou de l'éthanol, les interactions hydrophobes s'amenuisent pour atteindre un minimum dans le solvant organique pur.

Le modèle de FRIEDMAN et KRISHNAN ⁹⁸ est fondé sur le calcul du potentiel d'interaction d'une paire soluté/soluté, qui contient un terme dû aux répulsions électrostatiques et un terme dû à une diminution de la sphère d'hydratation des deux molécules de soluté lors du rapprochement hydrophobe.

Dans un modèle assez différent de ceux de NEMETHY et SCHERAGA, de BEN-NAIM ou de FRIEDMAN et KRISHNAN, FRANKS ⁹⁹ propose de maintenir plusieurs couches de molécules d'eau entre les groupes non-polaires. L'interaction hydrophobe est considérée comme une interaction à longue distance et non plus comme une interaction due au regroupement de molécules aliphatiques en solution aqueuse.

De nombreux autres modèles ont été proposés ¹⁰⁰⁻¹⁰⁶, parfois critiquant et améliorant les modèles de NEMETHY et SCHERAGA et de BEN-NAIM.

Il faut noter que la notion même d'interaction hydrophobe est parfois sévèrement critiquée ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, voire réfutée ¹¹⁰.

1. W.B. GRATZER et D.A. COWBURN
Nature 222, 426 (1969).
2. N. LOTAN, A. YARON et A. BERGER
Biopolymers 4, 365 (1966).
3. A.J. ADLER, et al.
J. Am. Chem. Soc. 90, 4736 (1968).
4. W.L. MATTICE, J.T. LO et L. MANDELKERN
Macromolecules 5, 729 (1972).
5. W.L. MATTICE et J.T. LO
Macromolecules 5, 734 (1972).
6. N. LOTAN, K. CHEN et R.S. ROCHE
Isr. J. Chem. 12, 207 (1974).
7. C. CARLINI, F. CIARDELLI et P. PINO
Makromol. Chem. 119, 244 (1968).
8. H. YAMAGUCHI et Y. MINOURA
J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 8, 1467 (1970).
9. H. YUKI, K. OHTA et N. YAJIMA
Polym. J. 1, 164 (1970).
10. M. VERT
Eur. Polym. J. 8, 513 (1972).
11. C. BRAUD
Thèse Sc. Phys., Rouen, 1976, AO CNRS N° 12.757.
12. C. VILLIERS
Thèse 3ème cycle, Rouen, 1977
13. C. TONIOLO, M.L. FALXA et M. GOODMAN
Biopolymers 6, 1579 (1968).
14. S.P. RAO et W.G. MILLER
Biopolymers 12, 835 (1973).
15. W. KAUZMANN
Adv. Prot. Chem. 15, 1 (1959).
16. G. NEMETHY et H.A. SCHERAGA
J. Phys. Chem. 66, 1773 (1962).

17. H.A. SCHERAGA
in The Proteins, H.V. NEURATH Ed., Academic Press,
ch. 6, p. 477 (1963).
18. H.A. SCHERAGA, G. NEMETHY et I.Z. STEINBERG
J. Biol. Chem. 237, 2506 (1962).
19. M. BIXON, H.A. SCHERAGA et S. LIFSON
Biopolymers 1, 419 (1963).
20. G. NEMETHY, I.Z. STEINBERG et H.A. SCHERAGA
Biopolymers 1, 43 (1963).
21. D.C. POLAND et H.A. SCHERAGA
Biopolymers 3, 275 (1965).
22. S.E. OSTROY, et al.
Biopolymers 9, 749 -1970).
23. O.B. PTITSYN
Macromolecular Microsymposia VIII et IX, B. Sedlacek
Ed., IUPAC 1972.
24. N. LOTAN, A. BERGER et E. KATCHALSKI
Ann. Rev. Biochem. 41, 869 (1972).
25. G. BLAUER et Z.B. ALFASSI
Biochim. Biophys. Acta 133, 206 (1967).
26. S.R. CHAUDHURI et J.T. YANG
Biochemistry 7, 1379 (1968).
27. N. MURAI et S. SUGAI
Biopolymers 13, 1161 (1974).
28. Y.W. TSENG et J.T. YANG
Biopolymers 16, 921 (1977).
29. T. HAYAKAWA, M. MATSUYAMA et K. INOUE
Polymer 18, 854 (1977).
30. K.E.B. PLATZER, et al.
Macromolecules 5, 177 (1972).
31. P.Y. CHOU, M. WELLS et G.D. FASMAN
Biochemistry 11, 3028 (1972).

32. J.E. ALTER, G.T. TAYLOR et H.A. SCHERAGA
Macromolecules 5, 739 (1972).
33. H.E. VAN WART, G.T. TAYLOR et H.A. SCHERAGA
Macromolecules 6, 266 (1973).
34. J. ESTEVEZ et M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE
Biopolymers 15, 2101 (1976).
35. J. ESTEVEZ et M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE
Fed. Eur. Biochem. Soc. Letters 71, 157 (1976).
36. M. MIYAKE, et al.
Biopolymers 13, 1173 (1974).
37. S.J. SINGER
Adv. Prot. Chem. 17, 1 (1962).
38. A. TERAMOTO et H. FUJITA
J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. C15, 165 (1976).
39. S.N. TIMASHEFF
Acc. Chem. Res. 3, 62 (1972).
40. N. LOTAN, A. YARON, A. BERGER et M. SELA
Biopolymers 3, 625 (1965).
41. K. OKITA, A. TERAMOTO et H. FUJITA
Biopolymers 9, 717 (1970)
Polym. J. 5, 582 (1970).
42. C. TANFORD, P.K. DE et V.G. TAGGART
J. Am. Chem. Soc. 82, 6028 (1960).
43. P. CALLAGHAN et N.H. MARTIN
Biochem. J. 83, 144 (1962).
44. H. INOUE et S.N. TIMASHEFF
Adv. Chem. Ser. 84, 12 (1968).
45. S.N. TIMASHEFF et H. INOUE
Biochemistry 7, 2501 (1968).
46. H. INOUE et S.N. TIMASHEFF
J. Am. Chem. Soc. 90, 1890 (1968).

47. V.P. MERZLOV
Bibl. Hematol. 38, 819 (1971).
48. H. INOUE et S.N. TIMASHEFF
Biopolymers 11, 737 (1972).
49. H. INOUE
Polymer 14, 502 (1973).
50. T.T. MERSKOVITS et N.J. SOLLI
Biopolymers 14, 319 (1975).
51. E. MAES
Biopolymers 15, 293 (1976).
52. L. GOLDSTEIN et E. KATCHALSKI
Bull. Res. Counc. Isr. A9, 138 (1960).
53. G.D. FASMAN, C. LINDBLOW et E. BODENHEIM
Biochemistry 3, 155 (1964).
54. H.Y. YAMAMOTO
Polymer. 17, 1105 (1976).
55. M. MORCELLET et C. LOUCHEUX
Polymer. 18, 1082 (1977).
56. C. FEYEREISEN, M. MORCELLET et C. LOUCHEUX
Macromolecules 10, 485 (1977).
57. F.G. BLANCO, G.R.E. GOROSTIDI et A.R. MUNTANER
An. Quimica 72, 195 (1976).
58. H.A. ARFMAN, R. LABITZKE et K.G. WAGNER
Biopolymers 14, 1381 (1975).
59. R.C. PETERSEN
J. Phys. Chem. 64, 184 (1960).
60. P. ASSARSSON et F.R. EIRICH
J. Phys. Chem. 72, 2710 (1968).
61. C. DE VISSER, et al.
J. Chem. Eng. Data 22, 74 (1977).
62. F. SHAHIDI, P.G. FARRELL et J.T. EDWARD
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 73, 715 (1977).

63. C. DEVISSER, G. PERRON et J.E. DESNOYERS
J. Am. Chem. Soc. 99, 5894 (1977).
64. F. KAWAIZUMI, M. OHNO et Y. MIYAHARA
Bull. Chem. Soc. Jap. 50, 2229 (1977).
65. C.H. BAMFORD, A. ELLIOT et W.E. HANBY
in Synthetic Polypeptides, Academic Press, (1956).
66. J.K. CRAUER
J. Appl. Polym. Sci. 14, 1755 (1970).
67. I.M. KLOTZ et J.S. FRANZEN
J. Am. Chem. Soc. 84, 3461 (1962).
68. G. KORTUM et V. VALENT
Ber. Buns. Ges. Phys. Chem. 81, 753 (1977).
69. A.N. SIDOROV
Opt. Spectr. (U.S.S.R.) 8, 24 (1960).
70. G.D. HAMMES et W. KNOCH
J. Chem. Phys. 45, 4041 (1966).
71. J.R. JOHNSON, et al.
J. Phys. Chem. 72, 3223 (1968).
72. G.J. JANZ et R.P.T. TOMKINS
Non aqueous Electrolytes Handbook, vol. I, Academic
Press, (1972).
73. D.E. BOWEN, M.A. PRIESAND et M.P. EASTMAN
J. Phys. Chem. 78, 2611 (1974).
74. O.D. BONNER et Y.S. CHOI
J. Phys. Chem. 78, 1723 (1974).
- O. KIOMARA, G. PERRON et J.E. DESNOYERS
Can. J. Chem. 53, 3263 (1975).
- D. GIANNAKONDAKIS, et al.
Chem. Chron. 5, 167 (1976).
- M.A. RIZK et M.G. SHINOUDA
J. Chim. Phys. 74, 767 (1977).
- P.L. HUYSKENS, R.S. SMETS et D.H. MAS
Bull. Soc. Chim. Belg. 86, 741 (1977).

75. M. JOLY
Molecular Biology, vol. V, Academic Press (1965).
76. N. LOTAN, M. BIXON et A. BERGER
Biopolymers 5, 69 (1967).
77. G. CONIO, E. PATRONE et S. BRIGHETTI
J. Biol. Chem. 245, 3335 (1970).
78. H. STRASSMAIR, J. ENGEL et S. KNOF
Biopolymers 10, 1759 (1971).
79. G.E. GAJNOS et F.E. KARASZ
J. Phys. Chem. 76, 3464 (1972).
80. K.J. WEN et R.W. WOODY
Biopolymers 14, 1827 (1975).
81. H. INOUE et T. IZUMI
Biopolymers 15, 797 (1976).
82. Y.W. TSENG et J.T. YANG
Biopolymers 16, 921 (1977).
83. J. THAMSEN
Acta Chem. Scand. 19, 1939 (1965).
84. B.H. ZIMM et J.K. BRAGG
J. Chem. Phys. 31, 526 (1959).
85. J.H. GIBBS et E.A. DI MARZIO
J. Chem. Phys. 30, 271 (1959).
86. K. NAGAI
J. Chem. Phys. 34, 887 (1961).
87. S. LIFSON et A. ROIG
J. Chem. Phys. 34, 1963 (1961).
88. N. LOTAN, M. BIXON et A. BERGER
Biopolymers 8, 247 (1969).
89. M.J. BLANDAMER
Adv. Phys. Org. Chem. 14, 203 (1977).
90. G. NEMETHY et H.A. SCHERAGA
J. Chem. Phys. 36, 3382 (1962).
J. Chem. Phys. 36, 3401 (1962).

91. A.T. HAGLER, H.A. SCHERAGA et G. NEMETHY
Ann. N.Y. Acad. Sci. 204, 51 (1973).
92. H. FRANK et M.W. EVANS
J. Phys. Chem. 13, 507 (1945).
93. I.M. KLOTZ
Science 128, 815 (1958).
J. Am. Chem. Soc. 81, 5119 (1959).
94. F.H. STILLINGER
J. Solut. Chem. 2, 141 (1973).
95. G. HOJER et J. KELLER
J. Am. Chem. Soc. 96, 3746 (1974).
96. A. BEN-NAIM
J. Chem. Phys. 54, 1387 (1971)
54, 3696 (1971)
J. Phys. Chem. 79, 1268 (1975)
Biopolymers 14, 1337 (1975).
97. A. BEN-NAIM et M. YAACOBI
J. Phys. Chem. 79, 1263 (1975).
R. TENNE et A. BEN-NAIM
J. Chem. Phys. 67, 4632 (1977).
98. H.L. FRIEDMAN et C.V. KRISHNAN
J. Phys. Chem. 75, 3598 (1971)
J. Solution Chem. 2, 119 (1973)
Water - a comprehensive treatise, F. FRANKS Ed., Plenum
Press, vol. 3, ch. 1, (1973).
99. F. FRANKS
Water - a comprehensive treatise, F. FRANKS Ed., Plenum
Press, vol. 4 (1973).
100. C. TANFORD
The hydrophobic effect, Wiley (1973).
101. A. BEN-NAIM
Water and aqueous solutions, Plenum Press (1974).

102. F. FRANKS, M. PEDLEY et D.S. REID
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 72, 359 (1976).
103. S.J. GILL et I. WADSO
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 2955 (1976).
104. F. FRANKS, M.D. PEDLEY et D.S. REID
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 73, 290 (1977).
105. D. OAKENFULL et D.E. FENWICK
Aust. J. Chem. 30, 741 (1977).
106. L.R. PRATT et D. CHANDLER
J. Chem. Phys. 67, 3683 (1977).
107. J.H. HILDEBRAND
J. Phys. Chem. 72, 1841 (1968).
108. A. HOLTZER et M.F. EMERSON
J. Phys. Chem. 73, 26 (1969).
109. H.G. HERTZ
Angew. Chem. 9, 124 (1970).
110. R.D. CRAMER
J. Am. Chem. Soc. 99, 5408 (1977).

C H A P I T R E I I I

ETUDE DE L'ADSORPTION PREFERENTIELLE ET ABSOLUE

DANS LES MELANGES EAU/2-CHLOROETHANOL

III.1. INTRODUCTION

Lorsqu'une macromolécule est dissoute dans un mélange de solvants, la couche de solvation - c'est-à-dire les molécules de solvant qui se trouvent dans le voisinage immédiat du polymère - n'a pas la même composition que le mélange des solvants purs. Cela est dû au fait que le polymère a une affinité plus grande pour l'un des constituants du mélange. Lorsque la couche de solvation est ainsi enrichie, par rapport à la composition globale, en l'un des constituants du mélange de solvants, on considère qu'il y a ADSORPTION PREFERENTIELLE par ce constituant sur le polymère.

Dans le cas de macromolécules polypeptidiques dissoutes dans un mélange de solvants ou dans un mélange solvant/dénaturant, l'adsorption préférentielle peut évoluer avec la composition du mélange. En effet, la variation de la composition du mélange de solvants au voisinage de la macromolécule peut induire une transition conformationnelle. Ce qui a pour conséquence de modifier les interactions polypeptide - solvant : chaque conformère n'a pas toujours la même affinité pour un solvant donné. Ainsi, par exemple, la formation des liaisons hydrogène dans le squelette peptidique, qui accompagne la structuration en hélice α , diminue la capacité des groupements amides à former des liaisons hydrogène avec les petites molécules du milieu solvant extérieur. D'autre part, certains groupements chimiques peuvent être plus ou moins exposés ou soustraits à l'influence des molécules de solvant lors de la transition conformationnelle. Ce phénomène prend une très grande importance dans le cas de la dénaturation des protéines globulaires ¹.

C'est pourquoi l'étude de la variation de l'adsorption préférentielle et de l'adsorption absolue (c'est-à-dire la composition de la couche de solvation) en fonction de la composition du mélange de solvants est d'un grand intérêt,

dans la mesure où elle peut contribuer à la connaissance des mécanismes responsables de la transition conformationnelle.

TERMINOLOGIE

Nous emploierons la terminologie de SCATCHARD² et STOCKMAYER³ dans laquelle les indices pairs se rapportent aux polymères et les indices impairs aux petites molécules. Généralement l'indice 1 est attribué au solvant considéré comme "principal". Dans le cas des mélanges eau/solvant organique, eau/dénaturant et eau/sel, on choisit l'eau comme "solvant principal". Dans tout ce qui suit, l'indice 1 se rapportera donc à l'eau, l'indice 2 au polypeptide et l'indice 3 au solvant organique. D'autre part, le symbole 0

- en indice, indiquera que l'on se réfère aux mélanges des solvants purs ;
- en exposant, indiquera que l'on a effectué l'extrapolation à quantité nulle.

Nous utiliserons indifféremment les expressions adsorption préférentielle et solvataion préférentielle ; lorsqu'il y a adsorption préférentielle par l'eau, on écrira également hydratation préférentielle.

III.2. METHODES D'ETUDE DE LA SOLVATATION PREFERENTIELLE.

Nous décrirons rapidement le principe des différentes méthodes d'étude de la solvataion préférentielle pour décrire ensuite de manière plus approfondie la mesure des incréments de densité que nous avons utilisée dans ce travail.

III.2.1. La diffusion de la lumière

Lorsque l'on envisage la diffusion de la lumière par un homopolymère en solution dans un mélange binaire, on

constate que la masse moléculaire mesurée dépend à la fois de la nature et de la composition du mélange de solvants. Cela provient de la solvatisation préférentielle et en particulier de la variation de la valeur de l'incrément d'indice de réfraction de la solution. L'analyse théorique de ce phénomène ³⁻⁵ a permis de relier la variation de la masse apparente du polymère au coefficient d'adsorption préférentielle. Cette méthode a été appliquée, notamment, au système β -Lactoglobuline A/eau/Méthoxyéthanol ⁶ et eau/2-chloroéthanol ⁷⁻⁹, et au système PLGB/Chloroforme/Acide dichloracétique ¹⁰.

III.2.2. Les équilibres de dialyse

Le phénomène de dialyse entre une solution ternaire polymère/mélange de deux solvants et le mélange des 2 solvants purs est à la base d'une autre méthode pour déterminer les coefficients d'adsorption préférentielle ; cette dialyse, qui a pour effet d'égaliser les potentiels chimiques des deux solvants dans les deux phases, supprime en fait le phénomène de solvatisation préférentielle. La comparaison de la valeur d'un paramètre physico-chimique X, caractérisant le polymère, avant et après dialyse, permet de déterminer la valeur de l'adsorption préférentielle.

a- La réfractométrie différentielle

Dans ce cas X est égal à l'indice de réfraction ; on a alors la relation ¹¹⁻¹² :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = \frac{\frac{1}{(1 - \bar{v}_3 C_3)} \left[\left(\frac{\partial n}{\partial C_2}\right)_{\mu_3} - \left(\frac{\partial n}{\partial C_2}\right)_{m_3} \right]}{\left(\frac{\partial n}{\partial C_3}\right)_{m_2}} \quad (\text{III.1})$$

où :

$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ représente le coefficient d'adsorption préférentielle, C_i la concentration de i en g/ml

de solution, $(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{\mu_3}$, $(\frac{\partial n}{\partial C_2})_{m_3}$ et $(\frac{\partial n}{\partial C_3})_{m_2}$ les incréments d'indice de réfraction à potentiel chimique constant, à composition constante du solvant 3 et du mélange de solvants purs.

Cette méthode, qui est la plus utilisée, a servi à étudier des systèmes tels que β -Lactoglobuline A/eau/éthylène glycol ⁶, β -Lactoglobuline A/eau/méthoxyéthanol ⁶, β -Lactoglobuline A/eau/2-chloroéthanol ⁶⁻⁸, Sérumalbumine bovine/eau/LiCl ¹³, PLGA/eau/dioxanne ¹⁴, PHPG/eau/dioxanne ¹⁵, polylysine HBr/eau/solvants organiques ¹⁶, dérivés de la Polylysine/eau/sel ¹⁷.

b- Les incréments de densité

Dans ce cas X représente la densité de la solution. Cette méthode sera détaillée au § III.3.

III.2.3. L'ultracentrifugation

La masse moléculaire apparente du soluté dans un mélange de solvants peut également être reliée à l'adsorption préférentielle ¹⁸. Cette méthode a été utilisée pour déterminer l'hydratation préférentielle des protéines ¹⁹⁻²¹ et des polypeptides de synthèse ^{22,23} dans des mélanges eau/sel ou des mélanges eau/dénaturant ^{6,24-25}.

III.2.4. Autres méthodes

. La spectroscopie Infra-Rouge permet de mettre en évidence certaines interactions spécifiques entre l'un des solvants et un groupe fonctionnel porté par le polymère ²⁶⁻²⁸.

. La résonance magnétique nucléaire : on mesure le temps de relaxation spin - réseau des protons de l'un des deux solvants, qui dépend de la présence du polymère et de la composition de la couche de solvatation ²⁹⁻³².

. On peut encore citer la chromatographie par perméation de gel ³³, la diffusion libre ³⁴, la distillation isopièstique ³⁵, et la diffusion des rayons X aux petits angles ³⁶.

III.3. DETERMINATION DE L'ADSORPTION PREFERENTIELLE PAR MESURE DES INCREMENTS DE DENSITE

III.3.1. Introduction

La base théorique nécessaire à la détermination du coefficient d'adsorption préférentielle à partir des mesures des densités des solutions polymère/mélange de solvants a été établie par CASASSA et EISENBERG ¹¹, qui lui ont donné une justification rigoureuse à partir des données de la thermodynamique des solutions ¹². Les justifications théoriques présentées par d'autres auteurs ³⁷⁻⁴² reprennent, en fait, les mêmes méthodes que celles employées par CASASSA et EISENBERG, et aboutissent à un résultat semblable. Il n'est pas de notre propos de reprendre ici toute l'argumentation déployée par CASASSA et EISENBERG ¹²; nous nous contenterons d'un rappel des équations qui permettent de déterminer l'adsorption préférentielle à partir de mesures de densité.

III.3.2. Rappels théoriques

a - Définitions

- les concentrations g_i sont exprimées en grammes de composé i par gramme de composant l ; les concentrations C_i sont exprimées en grammes de composé i par ml de solution.

- le terme adsorption préférentielle, qui ne désigne aucun phénomène moléculaire particulier, est pris ici au sens large: il signifie que dans le domaine immédiat de la macromolécule, l'un des solvants est en excès par rapport à

la composition du reste du mélange. Il rend compte de tous les effets produits par les interactions polymère - mélange de solvants, depuis le retard que prend une molécule de solvant dans ses mouvements de rotation ou de translation lorsqu'elle arrive à proximité du polymère, jusqu'à l'adsorption sur des sites particuliers de la macromolécule, par liaison hydrogène ou électrostatique par exemple. L'adsorption préférentielle du solvant 3 est exprimée en grammes de solvant 3 par gramme de polymère et se symbolise par $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ pour le cas d'un système ternaire.

- Dans tout ce qui suit, on aura supposé que la température et la pression sont constantes ; il sera donc inutile d'indiquer "à T et P constants".

- L'incrément de densité est défini, par analogie avec l'incrément d'indice de réfraction, par l'augmentation de la densité d'une solution de solvants de densité ρ_0 lorsqu'on a ajouté C_2 grammes de polymère :

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right) = \frac{\rho - \rho_0}{C_2} \quad (\text{III.2})$$

où ρ désigne la densité de la solution résultante.

On peut également définir un incrément de densité spécifique $\left(\frac{\partial \rho}{\partial g_2}\right)$ et un incrément de densité molaire $\left(\frac{\partial \rho}{\partial m_2}\right)$.

Pour une solution diluée, on supposera que l'augmentation de la densité de la solution est une fonction linéaire de la concentration. On peut alors écrire :

$$\rho = \rho_0 + C_2 \left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right) \quad (\text{III.3})$$

- L'augmentation de volume d'un liquide liée à la dissolution d'un soluté, ramenée à un gramme de soluté, est appelée volume spécifique apparent (ϕ_2) du soluté ; elle est exprimée en ml/g. Dans le cas où cette augmentation est indépendante de la quantité relative masse de soluté/masse de

solvant, le volume spécifique apparent est identique au volume spécifique partiel (\bar{v}_2). Dans le cas contraire, le volume spécifique apparent ϕ_2 ne devient égal au volume spécifique partiel qu'à dilution infinie :

$$\bar{v}_2^0 = \lim_{C_2 \rightarrow 0} \phi_2 \quad (\text{III.4})$$

ou encore :

$$\phi_2 = \bar{v}_2^0 + g_2 \frac{\partial \phi_2}{\partial g_2} \quad (\text{III.5})$$

b - Détermination de l'adsorption préférentielle
à partir des mesures de densité d'après
CASASSA et EISENBERG ^{11,12}

L'addition de P_2 grammes de polymère à P_0 grammes d'un mélange de deux solvants de densité ρ_0 entraîne une variation Δv du volume du système et une variation $\rho - \rho_0$ de la densité de la solution. Le volume spécifique apparent ϕ_2 du polymère est alors :

$$\begin{aligned} \phi_2 &= \frac{\Delta v}{P_2} = \frac{1/\rho - \rho_0}{P_2} \\ &= \frac{1}{\rho} \left(1 - \frac{P_0 (\rho - \rho_0)}{P_2 \rho_0} \right) \\ &= \frac{1}{\rho_0} \left(1 - \frac{\rho - \rho_0}{C_2} \right) \end{aligned} \quad (\text{III.6})$$

Le phénomène d'adsorption préférentielle implique une modification des potentiels chimiques des solvants, μ_1 et μ_3 . Pour que la valeur de chacun des potentiels chimiques des solvants soit égale à celle qu'il a dans le mélange pur,

en l'absence de toute adsorption préférentielle, on devra ajouter P_2^* grammes de polymère à la solution :

$$P_2^* = P_2 \left[1 + \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{\mu_1, \mu_3} \right] \quad (\text{III.7})$$

L'augmentation de volume de la solution qui en résulte permet de définir un nouveau volume spécifique apparent, ϕ_2^* , à partir des nouvelles valeurs C_2^* et ρ^* prises par la concentration en polymère et par la densité de la solution :

$$\phi_2^* = \frac{1}{\rho_0} \left(1 - \frac{\rho^* - \rho_0}{C_2^*} \right) \quad (\text{III.8})$$

En fait, expérimentalement, pour ramener les potentiels chimiques des solvants dans la solution à leurs valeurs dans le mélange sans polymère, on dialyse la solution contre le mélange de solvants. On obtient alors, de la même façon, une nouvelle valeur du volume spécifique apparent du soluté :

$$\phi_2' = \frac{1}{\rho_0} \left(1 - \frac{\rho^* - \rho_0}{C_2} \right) \quad (\text{III.9})$$

L'équation (III.7) nous permet d'écrire :

$$C_2^* = C_2 \left[1 + \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{\mu_1, \mu_3} \right] \quad (\text{III.10})$$

alors :

$$\phi_2' = \phi_2^* - \left(\frac{1}{\rho_0} - \phi_2^* \right) \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{\mu_1, \mu_3} \quad (\text{III.11})$$

Or, vu les définitions employées, on a les relations :

$$\phi_2^* = \frac{\Delta^* v}{g_2^*}$$

et

$$\Delta^*_{\nu} = \Delta\nu + \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} \bar{v}_3 g_2$$

où \bar{v}_3 désigne le volume spécifique partiel du solvant 3 ;
d'où on déduit :

$$\phi_2^* = \frac{\phi_2 + \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} \bar{v}_3}{1 + \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}}$$

L'équation (III.11) devient alors :

$$\phi_2' = \phi_2 - \left(\frac{1}{\rho_0} - \bar{v}_3\right) \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} \quad (\text{III.13})$$

Grâce aux équations (III.6) et (III.9), on peut réécrire l'équation (III.13) sous la forme :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = \frac{\left(\frac{\rho^* - \rho_0}{C_2}\right) - \left(\frac{\rho - \rho_0}{C_2}\right)}{1 - \bar{v}_3 \rho_0} \quad (\text{III.14})$$

que l'on peut également mettre sous une autre forme, grâce à l'équation (III.2):

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = \frac{\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} - \left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right)_{m_3}}{1 - \bar{v}_3 \rho_0} \quad (\text{III.15})$$

où $\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ représente l'incrément de densité à potentiel chimique constant des solvants 1 et 3 et $\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right)_{m_1, m_3}$ l'incrément de densité à composition constante :

$$\rho^* = \rho_0 + C_2 \left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2} \right)_{\mu_1, \mu_3} \quad (\text{III.16})$$

$$\rho = \rho_0 + C_2 \left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2} \right)_{m_3} \quad (\text{III.17})$$

Au cas où les incréments de densité sont fonction de la concentration, il faut remplacer :

ϕ_2 et ϕ_2' par \bar{v}_2 et \bar{v}_2^0 dans l'éq. (III.13)

$\left(\frac{\rho^* - \rho_0}{C_2} \right)$ et $\left(\frac{\rho - \rho_0}{C_2} \right)$ par $\left(\frac{\rho^* - \rho_0}{C_2} \right)^0$ et $\left(\frac{\rho - \rho_0}{C_2} \right)^0$ dans l'éq. (III.14)

et

$\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2} \right)_{\mu_1, \mu_3}$ et $\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2} \right)_{m_3}$ par $\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2} \right)^0_{\mu_1, \mu_3}$ et $\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2} \right)^0_{m_3}$ dans l'éq. (III.15)

Les relations (III.13), (III.14) et (III.15) sont équivalentes et sont utilisées indifféremment, au gré des auteurs.

En conclusion, la détermination de $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2} \right)_{\mu_1, \mu_3}$ nécessite la détermination des densités des solutions de polymère, avant et après dialyse contre le mélange des solvants purs, en fonction de la concentration en polymère. Les mesures sont alors exploitées :

* en termes de volume spécifique partiel

(éq. III.13) 6,38-40,42,43

* en termes d'incrément de densité

(éq. III.14 et III.15) 37,38,41-45

C'est la méthode que nous avons choisie dans ce travail.

III.4. DETERMINATION DE L'ADSORPTION ABSOLUE

III.4.1. Définition

Si l'on se réfère à la définition de l'adsorption préférentielle, on constatera que celle-ci ne donne aucune information sur la composition exacte de la couche de solvation. En effet, si l'on veut établir une corrélation entre la transition conformationnelle du polypeptide et son état de solvation, il est nécessaire de connaître l'adsorption absolue, c'est-à-dire le nombre de grammes (ou de moles) de solvant 1 et de solvant 3 qui solvatent un gramme (ou une mole) de polymère. C'est pourquoi certains auteurs ont cherché à établir une relation entre la composition de la couche de solvation et l'adsorption préférentielle, paramètre dont il est possible de déterminer la valeur. Nous allons donc examiner les différentes théories développées à cet effet.

III.4.2. Relation adsorption préférentielle - adsorption absolue

a - Théorie de TANFORD (1969)

Selon TANFORD ⁴⁶, l'adsorption préférentielle d'une petite molécule est définie comme la quantité en excès de cette molécule liée sur la macromolécule, en excès par rapport à la quantité qui serait adsorbée si la couche de solvation avait la même composition que le mélange de solvants dans lequel la macromolécule est dissoute. Ainsi, si le mélange est constitué de n_1 moles d'eau et de n_3 moles du troisième composant et si an_1 et an_3 représentent le nombre de moles de 1 et de 3 qui seraient liées à la macromolécule si la couche de solvation était identique au mélange des solvants purs, l'adsorption préférentielle de 3 ($v_3, \text{pref.}$) sera définie par :

$$\bar{v}_3, \text{ pref} = \bar{v}_3 - an_3$$

où \bar{v}_3 représente le nombre moyen de moles de 3 liée à chaque molé de motif monomère de la macromolécule. Si \bar{v}_1 représente le nombre moyen de moles d'eau liée, on a :

$$\bar{v}_1 = \alpha n_1 \Rightarrow \alpha = \frac{\bar{v}_1}{n_1}$$

d'où :

$$\bar{v}_{3, \text{pref}} = \bar{v}_3 - \left(\frac{n_3}{n_1}\right) \bar{v}_1 \quad (\text{III.18})$$

Cette équation comporte deux inconnues : \bar{v}_3 et \bar{v}_1 . Pour déterminer l'une d'entre elles, il est nécessaire de fixer une valeur à l'autre : si l'on veut connaître la valeur de la solvation absolue par le composé 3, il est nécessaire de fixer certaines valeurs à \bar{v}_1 , c'est-à-dire à l'hydratation absolue. Ces valeurs, comme nous le verrons plus loin, peuvent être évaluées à partir de données expérimentales sur le degré d'hydratation des polypeptides en film, en solution aqueuse ou en mélange de solvants.

b - Théorie de INOUE et TIMASHEFF (1968-1972)

Considérons ^{1,6,47} un sac à dialyse formé par une membrane imperméable à la macromolécule mais perméable aux deux solvants. On introduit dans le sac un gramme de composant 1 et g_3 grammes de 3. Le sac est alors immergé dans un volume infini (en pratique, dans un large excès) du mélange de solvants de même composition. On ajoute maintenant au contenu du sac une quantité dg'_2 grammes de polymère. Si A_1 et A_3 représentent le nombre de grammes de composant 1 et 3 qui se lient à un gramme de polymère, la quantité de solvant non lié au polymère, dans le sac à dialyse, diminue de $A_1 dg'_2$ pour 1 et de $A_3 dg'_2$ pour 3.

La concentration du composant 3 devient alors :

$$g'_3 = \frac{g_3 - A_3 dg'_2}{1 - A_1 dg'_2} \quad (\text{III.19})$$

Lorsque l'équilibre de dialyse est atteint, les potentiels chimiques du composant 3 dans le sac à dialyse et à l'extérieur doivent être égaux :

$$\mu_3 = \mu'_3$$

soit :

$$RT \text{ Log } a_3 = RT \text{ Log } a'_3$$

où a désigne l'activité. Ou encore :

$$RT \text{ Log } g_3 + RT \text{ Log } \gamma_3 = RT \text{ Log } g'_3 + RT \text{ Log } \gamma'_3$$

Si on suppose que la différence entre les coefficients d'activités γ_3 et γ'_3 est uniquement due aux interactions avec le polymère, on peut écrire :

$$\gamma'_3 = \gamma_3 \cdot F_3$$

où F_3 désigne la fraction en poids de composant 3, dans le sac à dialyse, qui n'est pas liée au polymère. On a donc :

$$g'_3 \cdot F_3 = g_3$$

d'où :

$$g_3 - g'_3 = g'_3 \left(\frac{F_3 - 1}{F_3} \right) = dg_3$$

C'est la quantité de composant 3 qui doit diffuser à travers la membrane pour établir l'égalité $\mu_3 = \mu'_3$. L'équation (III.19) permet alors d'écrire :

$$dg_3 = g_3 - g'_3 = \frac{(A_3 - g_3 A_1) dg'_2}{1 - A_1 dg'_2}$$

La concentration en polymère dans le sac à dialyse est alors :

$$dg_2 = \frac{dg'_2}{1 - A_1 dg'_2}$$

d'où :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_3, \mu_1} = A_3 - g_3 A_1 \quad (\text{III.20})$$

INOUE et TIMASHEFF^{1,6,47} ont ainsi pu donner une relation entre le coefficient d'adsorption préférentielle et l'adsorption absolue par les composants du mélange de solvants. Cette relation, comme celle de TANFORD, comporte deux inconnues: A_1 et A_3 .

c - Théorie de REISLER, HAIK et EISENBERG (1977).

Le traitement théorique proposé par REISLER, HAIK et EISENBERG⁴² est constitué par une représentation en plusieurs étapes du phénomène de dissolution d'un polymère dans un mélange de solvants :

- à 1 ml du mélange de solvants, on ajoute C_2 grammes de polymère (Etape I) ;

- on mélange et on laisse les interactions soluté - solvants s'établir (Etape II) ;

- la fraction de volume occupée par le polymère est alors : $\frac{g_2 \bar{v}_2}{v} = C_2 \bar{v}_2$ puisque $v = 1$ ml. Mais l'étape II a provoqué une variation de volume de la solution. Pour retrouver le volume initial (1 ml), il faut enlever $C_2 \bar{v}_2 \rho_0$ grammes de mélange de solvants purs de densité ρ_0 (Etape III) ;

- il faut ensuite retrouver les valeurs initiales des potentiels chimiques de 1 et de 3, modifiées par le phénomène d'adsorption préférentielle. On appellera B_3 la quantité de solvant 3 liée au polymère, B_1 la quantité d'eau liée au polymère et E_3 la quantité de solvant 3 exclue de la couche de solvation par des phénomènes d'origine électrostatique.

Pour retrouver la valeur non perturbée du potentiel chimique du solvant 3, il faut alors :

- ajouter $(B_3 - E_3)C_2$ grammes de composant 3
(Etape IV) ;

- mélanger et laisser s'effectuer les différentes interactions (Etape V) ;

- enlever $(B_3 - E_3)C_2 \bar{v}_3 \rho_0$ grammes de mélange de solvants, afin de retrouver un volume de 1 ml (Etape VI) ;

- de même, pour maintenir le potentiel chimique de l'eau à sa valeur dans le mélange de solvants, il faudra ajouter $B_1 C_2$ grammes d'eau (Etape IV' et V') et enlever $B_1 C_2 \bar{v}_1 \rho_0$ grammes de mélange de solvants (Etape VI').

Pour retrouver un volume de 1 ml, il a donc fallu effectuer 9 opérations, ce qui se traduit par une variation de densité égale à :

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = 1 - \bar{v}_2^0 \rho_0 + (B_3 - E_3)(1 - \bar{v}_3 \rho_0) + B_1(1 - \bar{v}_1 \rho_0)$$

ou, en remplaçant $(1 - \bar{v}_1 \rho_0)$ par $-g_3(1 - \bar{v}_3 \rho_0)$

$$\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = (1 - \bar{v}_2^0 \rho_0) + (1 - \bar{v}_3 \rho_0) (B_3 - E_3 - g_3 B_1) \quad (\text{III.21})$$

Sachant que le coefficient d'adsorption préférentielle peut s'écrire ^{37,38,41}

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = \frac{\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} - (1 - \bar{v}_2^0 \rho_0)}{1 - \bar{v}_3 \rho_0}$$

L'équation (III.21) peut alors se mettre sous la forme :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = B_3 - E_3 - g_3 B_1 \quad (\text{III.22})$$



Cette expression est identique, en fait, à celle établie par INOUE et TIMASHEFF^{1,6,47} pour le cas où le composant 3 n'est pas un électrolyte : en effet, il suffit d'écrire :

$$B_3 = A_3, \quad B_1 = A_1 \quad \text{et} \quad E_3 = 0$$

d - Théorie de KOMIYAMA, MORI, YAMAMOTO et IIJIMA (1977)

Les résultats obtenus dans l'étude du système Poly-L-Lysine HBr / eau / solvant organique et solvant organique 1 / solvant organique 3, ont amené KOMIYAMA, MORI, YAMAMOTO et IIJIMA¹⁶ à élaborer un modèle théorique dans lequel chaque unité de répétition du polypeptide est constituée par j segments ayant des affinités différentes vis-à-vis des constituants du mélange de solvants. Ils ont ainsi considéré deux segments : la partie polaire de la chaîne latérale et le reste du résidu.

Soit :

- n^j la solvatation totale du segment j
(en moles/mole)
- n_i^j le nombre de moles du solvant i présentes dans la couche de solvatation du segment j
- x_i^j la fraction molaire du solvant i dans la couche de solvatation du segment j
- n^P la solvatation totale de chaque résidu

On a les relations :

$$x_i^j = \frac{n_i^j}{n^j}; \quad \sum_{i=1,3} x_i^j = 1 \quad \text{et} \quad \sum_j n^j = n^P$$

KOMIYAMA et ses collaborateurs ¹⁶ introduisent ensuite une constante d'échange, caractéristique de l'équilibre existant entre la couche de solvation du segment j et le mélange de solvants "extérieur au polymère" :

$$K_{3,1}^j = \frac{X_3^j X_1}{X_1^j X_3} \quad (\text{III.23})$$

où X_1 et X_3 représentent les fractions molaires des solvants 1 et 3 dans le mélange de solvants purs.

On a alors, en remplaçant X_3^j par $1 - X_1^j$ dans l'éq. (III.23) :

$$n_1^j = \frac{n^j X_1}{X_1 + K_{3,1}^j (1 - X_1)}$$

et

$$n_3^j = \frac{K_{3,1}^j n^j X_3}{1 + (K_{3,1}^j - 1) X_3}$$

En utilisant la relation entre l'adsorption préférentielle et l'adsorption absolue sous la forme :

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}^o = \sum_j n_3^j - \frac{X_3}{X_1} \sum_j n_1^j$$

on a :

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}^o = \sum_j \frac{(K_{3,1}^j - 1) n^j X_3}{1 + X_3 (K_{3,1}^j - 1)} \quad (\text{III.24})$$

On a là une équation comportant plusieurs inconnues :

$$n^1, n^2, \dots, n^j \quad \text{et} \quad K_{3,1}^1, K_{3,1}^2, \dots, K_{3,1}^j.$$

KOMIYAMA et ses coll. ont donné une méthode permettant de calculer les constantes d'échange dans le cas simple où $j = 2$: si dans un mélange de solvant donné le graphe de

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}^0 = f\left(\frac{X_3}{X_1}\right) \text{ est une fonction linéaire de } \frac{X_3}{X_1},$$

cela implique que :

$$V_{K_{3,1}^j}, K_{3,1}^j = 0$$

La pente du graphe est alors :

$$\sum_j (K_{3,1}^j - 1)n^j = -n^P$$

il est alors possible de déterminer la solvataion totale. En supposant que cette valeur était identique à celle du polypeptide dans un autre mélange de solvants où

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}^0 \text{ n'est pas une fonction linéaire de } \frac{X_3}{X_1},$$

les auteurs ont pu calculer les constantes d'échange grâce à la relation :

$$\text{Pente de } \left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}^0 = f\left(\frac{X_3}{X_1}\right)$$

$$\text{à l'origine} = \sum_j (K_{3,1}^j - 1)n^j$$

et à la relation (III.24), en ajustant la valeur de n^1 pour retrouver les valeurs expérimentales de l'adsorption préférentielle.

L'originalité de ce modèle est de représenter un résidu du polypeptide sous la forme de segments ayant des comportements différents vis-à-vis du mélange de solvants et de caractériser ces segments par une constante d'échange couche de solvataion - solvant et de chiffrer la solvataion absolue de chacun de ces groupements chimiques. Néanmoins, l'utilisation de ce modèle est limitée par la nécessité d'avoir un graphe linéaire de :

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}^0 = f \left(\frac{X_3}{X_1}\right)$$

e - Conclusion

Les modèles proposés par TANFORD ⁴⁶, par INOUE et TIMASHEFF ^{1,6,47} et par REISLER, HAIK et EISENBERG ⁴² aboutissent au même résultat, que nous reprendrons sous la forme proposée par INOUE et TIMASHEFF :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = A_3 - g_3 A_1$$

Elle comporte deux inconnues A_3 et A_1 . Afin de connaître l'une d'entre elles, il faut ou bien se fixer une valeur pour l'autre, ou bien déterminer l'autre par une méthode expérimentale indépendante. Nous y reviendrons plus loin.

III.5. MODE OPERATOIRE

Les densités des solutions sont mesurées sur un densimètre digital de précision, le DMAO2D ⁴⁸ de la firme Anton Paar, qui permet une mesure rapide et précise de la densité d'une solution. Des mesures répétitives sont effectuées et enregistrées par une imprimante Newport 810.

III.5.1. Mesure des densités

a - Principe du densimètre de précision DMA

La mesure de la densité est déduite de la détermination de la fréquence de vibration d'un oscillateur excité électroniquement, dont la masse effective est composée de sa masse propre et de la masse du liquide qu'on y introduit.

L'oscillateur est formé par un tube en U creux (voir figure III.1). Les limites du volume occupé par la solution qui prend part aux oscillations sont maintenues constantes par un changement brusque dans la section du tube. Le système d'excitation est conçu de façon à maintenir une oscillation non amortie du tube (fig. III.1). Le système peut être décrit par le modèle simple du ressort pesant, de constante d'élasticité C et de masse m :

$$m = M_0 + dV$$

où M_0 désigne la masse effective de l'oscillateur vide, d la densité de la solution et V le volume de la solution qui prend part aux oscillations. Si le système est en oscillation non amortie, sa fréquence de résonance f est donnée par :

$$2 \pi f = \left(\frac{C}{m} \right)^{1/2} = \left(\frac{C}{M_0 + Vd} \right)^{1/2}$$

La période correspondante T est alors :

$$T = \frac{2 \pi}{\left(\frac{C}{M_0 + Vd} \right)^{1/2}}$$

que l'on peut réécrire sous la forme :

$$T = 2 \pi \left(\frac{kVd + I_0}{C} \right)^{1/2}$$

où I_0 désigne le moment d'inertie du tube vide et k une constante dépendant de la géométrie de l'oscillateur.

$$\begin{aligned} \text{On a : } T^2 &= 4 \pi^2 \left(\frac{kVd + I_0}{C} \right) \\ &= Kd + \frac{4 \pi^2 I_0}{C} \end{aligned}$$

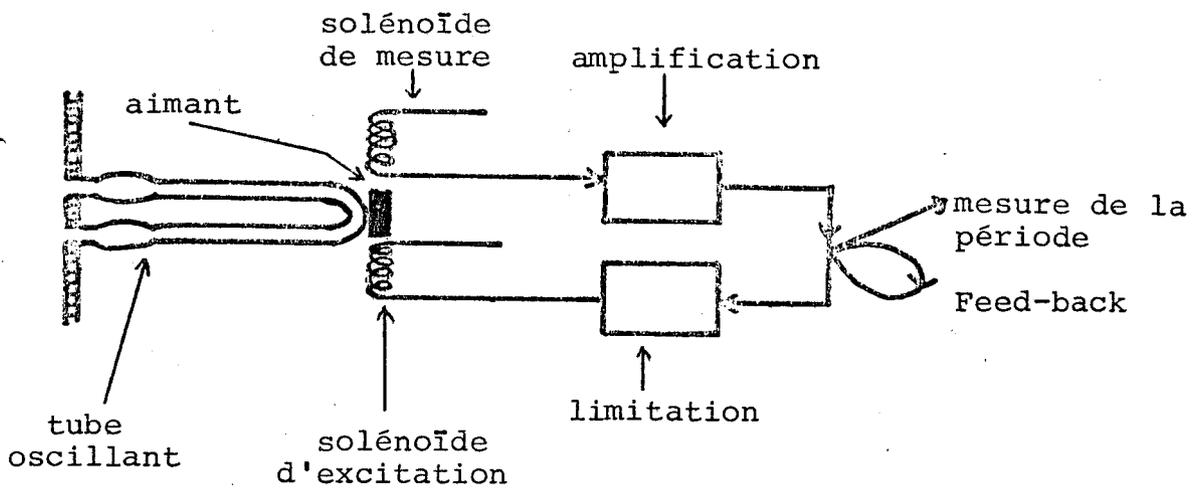


FIGURE III.1

Schéma illustrant le principe du densimètre de précision DMAO2
 (d'après KRATKY, LEOPOLD et STABINGER ⁴⁶⁾

$$\text{avec } K = \frac{4 \pi^2 kV}{C}$$

La densité est alors donnée par la relation :

$$d = \left(T^2 - \frac{4 \pi^2 I_0}{C} \right) \frac{1}{K}$$

La détermination de la constante K peut s'effectuer à l'aide de deux fluides de référence, de densités d_1 et d_2 connues, et de périodes de vibration correspondantes, mesurées T_1 et T_2 :

$$T_1^2 - T_2^2 = K(d_1 - d_2) \quad (\text{III.25})$$

b - Facteurs déterminant la précision des mesures

* la température : le coefficient de dilatation des liquides étant de l'ordre de 0,001/degré, la température de la cellule de mesure doit être maintenue constante avec une grande précision. Le tube oscillant est placé dans une enceinte remplie par un gaz à très haute conductivité thermique ; l'enceinte est thermostatée par une circulation d'eau commandée par un ensemble thermostaté. La base de temps consiste en un quartz résonnant à 1 MHz. La variation de la fréquence du quartz étant de l'ordre de 10^{-7} /degré, il faut s'assurer, si le quartz n'est pas thermostaté, que la température ambiante ne subit pas de variations trop importantes. Sinon, il faudra effectuer une nouvelle mesure de la constante K.

* la période d'oscillation du tube est de 3 à 4 millisecondes. Grâce au quartz de référence, on peut mesurer la période sur $4 \cdot 10^4$ cycles au maximum, ce qui donne une précision de $\pm 1 \cdot 10^{-5}$ secondes sur T ⁴⁸.

* impuretés : la propreté du tube peut être testée aisément en mesurant fréquemment la période du tube rempli

d'air, qui doit rester constante, à pression atmosphérique égale.

* dégazage : les gaz dissous dans la solution n'ont qu'un effet négligeable sur la densité ⁴⁸. Néanmoins, dans certains cas, le dégazage de la solution provoqué par une augmentation de la température peut entraîner la formation de bulles, qui déstabilisent le tube oscillant : les périodes mesurées varient alors considérablement. Il faut alors retirer la solution et la dégazer, en la portant à 1 ou 2 degrés de plus que la température de mesure .

* reproductibilité des mesures : il s'agit de vérifier qu'il n'y a pas de dérive systématique due à l'appareillage. Ainsi, la période mesurée de l'eau utilisée comme référence, était reproductible à $\pm 10 \cdot 10^{-5}$ secondes, sans variation systématique. De même, la constante K était reproductible à $\pm 0,01$ %, en erreur relative.

c - Protocole expérimental

* la thermostation est assurée par un thermostat LAUDA PTR20/2.

Toutes les mesures sont effectuées à $25^{\circ}\text{C} \pm 0,01^{\circ}$.

* détermination de la constante. A l'aide de deux fluides de référence, on peut déterminer la constante K (éq. III.25). Nous avons utilisé l'air et l'eau bidistillée, dont la densité, à 25°C , est :

$$\rho_{\text{eau}} = 0,997048 \text{ g/ml}$$

La constante est alors :

$$K = \frac{T_{\text{eau}}^2 - T_{\text{air}}^2}{0,997048 - \rho_{\text{air}}} \text{ à } P \text{ mm Hg}$$

* La densité d'une solution est alors déterminée par comparaison avec un fluide de densité connue. En effet, l'éq. III.25 permet d'écrire :

$$\rho_x = \frac{T_x^2 - T^2}{K} + \rho$$

Nous avons utilisé l'eau bidistillée comme étalon de référence :

$$\rho_x = \frac{T_x^2 - T_{\text{eau}}^2}{K} + 0,997048 \quad (\text{III.26})$$

* La solution est introduite dans le tube à l'aide d'une seringue. On attend quelques minutes afin que l'équilibre thermique soit assuré. On effectue alors une série de mesures de la période, jusqu'à reproductibilité satisfaisante. La solution est alors retirée du tube. Le nettoyage du tube est assuré par plusieurs lavages successifs à l'eau distillée, suivis de plusieurs lavages au méthanol. Le tube est ensuite séché à l'air, grâce à la pompe construite dans l'appareil, pendant plusieurs minutes. On mesure alors la période de l'air, qui doit être la même que celle mesurée pour l'étalonnage, afin de s'assurer de la propreté du tube. S'il y a lieu, on lave ou on sèche à nouveau le tube suivant le même processus. On peut alors introduire la solution suivante. L'étalonnage de l'appareil est effectué journalièrement.

* préparation des solutions.

Le mélange de solvants est réalisé volumétriquement :

$$\% \text{ 2-chloroethanol} = \frac{\text{volume de 2-chloroéthanol introduit}}{\text{volume total du mélange}} \times 100$$

Le mélange de solvants est ensuite filtré sur filtre Millipore (Millipore Corp. Type LS \varnothing 5 μm).

Une solution stock de polypeptide est filtrée sur filtre Millipore, lyophilisée et stockée dans un dessiccateur. La solution est alors préparée par pesées.

La concentration C_2 est ensuite convertie en g/ml par la relation :

$$C_2 = \frac{\text{Masse de polypeptide en grammes}}{\text{Masse de la solution en grammes}} \times \frac{1}{\rho}$$

où ρ représente la densité de la solution en g/ml. La mesure de la densité ne nécessite qu'un millilitre de solution ; néanmoins, afin d'améliorer la précision sur C_2 , on prépare environ 3 ml de solution. Nous nous sommes limités à la gamme $5 < C_2 < 20 \cdot 10^{-3}$ g/ml

* Les dialyses sont effectuées dans des sacs à dialyse (Union Carbide Co.) dans un grand excès de solvant (≈ 600 ml pour 4 solutions de 3 ml chacune). Une étude cinétique nous a montré qu'une durée de 24 heures était suffisante pour atteindre l'équilibre de dialyse. Afin d'éviter l'évaporation des solvants, la solution dialysée est prélevée directement dans le sac à dialyse à l'aide de la seringue qui sert à injecter la solution dans le densimètre.

III.5.2. Exploitation des résultats

a - Détermination des incréments de densité

Dans la gamme de concentration utilisée, nous n'avons pas observé de variation de l'incrément de densité avec la concentration. Il est donc inutile d'effectuer l'extrapolation à $C_2 = 0$.

Dans un premier temps, on vérifie graphiquement que tous les points expérimentaux (ρ, C_2) sont parfaitement alignés. Dans ce cas, l'incrément de densité est calculé par un calcul des moindres carrés. Dans un deuxième temps l'incrément de densité est déterminé par la valeur moyenne de $\frac{\rho - \rho_0}{C_2}$ (éq. III.2). La valeur retenue pour $\left(\frac{\partial \rho}{\partial C_2}\right)$ est alors la valeur moyenne des deux valeurs ainsi déterminées.

b - Précision des résultats

La précision maximale observée sur la période T est de $\pm 1.10^{-5}$ secondes, pour un temps de comptage de 4.10^4 cycles ⁴⁸.

Dans notre cas, pour un temps de comptage de 1.10^4 cycles, la précision sur T est typiquement de $\pm 5.10^{-5}$ secondes. Dans ces conditions $\Delta\rho = \pm 5.10^{-6}$ g/ml. Sachant que la précision des pesées est de $\pm 0,1$ mg, un calcul d'erreur montre que :

$$\Delta\left(\frac{\partial\rho}{\partial C_2}\right) \sim \pm 6.10^{-3}$$

Un calcul d'erreur sur l'éq. (III.15) donne alors :

$$\frac{\Delta\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}}{\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}} \sim 3 \%$$

III.6. RESULTATS EXPERIMENTAUX

III.6.1. Incréments de densité

Les variations des incréments de densité, à composition constante et à potentiel chimique constant des constituants du mélange de solvants, en fonction de la composition du mélange de solvants sont reportées sur la figure III.2 et sur le tableau III.1 pour la PHEG, et sur les figures III.3. à III.6 et sur les tableaux III.2. à III.5 pour les copolymères (HEG - co- BGl_n).

POLYMERE : PHEG					
% en volume de 2- chloroethanol	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$	$(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en moles/ moles	f_H
0	0,280				0
10	0,254	0,258	0,022	0,047	0,08
20	0,234	0,248	0,086	0,185	0,17
30	0,200	0,210	0,077	0,164	0,30
40	0,201	0,205	0,037	0,086	0,43
50	0,198	0,176	- 0,269	-0,576	0,56
60	0,163	0,146	- 0,273	-0,584	0,67
80	0,144	0,142	- 0,065	-0,138	0,83

TABLEAU III.1

Variation des incréments de densité à composition constante

$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$, des incréments de densité à potentiel chimique constant $(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle molaire $(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$, et de la fraction d'hélice αf_H (cf. § II.3.1.2.) de la PHEG à 25°C, en fonction de la composition du mélange eau/2-chloroéthanol.

COPOLYMERE BGl _n ₄					
% en volume de 2- chloroethanol	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en g/g	$(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en moles/ moles	f _H
0	0,275				0,07
10	0,253	0,259	0,032	0,068	0,14
20	0,230	0,252	0,134	0,290	0,28
30	0,217	0,245	0,211	0,455	0,41
40	0,205	0,210	0,046	0,099	0,50
50	0,185	0,168	- 0,204	- 0,439	0,60
60	0,176	0,155	- 0,341	- 0,735	0,70
80	0,151	0,132	- 0,674	- 1,453	0,87

TABLEAU III.2

Variation des incréments de densité à composition constante

$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$, des incréments de densité à potentiel chimique constant $(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle molaire $(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$, et de la fraction d'hélice α f_H (cf. §III.3.1.2.) du copolymère BGl_n₄, à 25°C, en fonction de la composition du mélange eau/2-chloroéthanol.

COPOLYMERE BGl _n ₇					
% en volume de 2- chloroethanol	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en g/g	$(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en moles/ moles	f_H
0	0,274				0,16
10	0,257	0,273	0,085	0,186	0,28
20	0,235	0,255	0,129	0,280	0,45
30	0,213	0,238	0,201	0,438	0,59
40	0,205	0,214	0,082	0,179	0,67
50	0,191	0,193	0,029	0,063	0,73
60	0,175	0,169	- 0,080	- 0,175	0,79
80	0,178	0,149	- 0,957	- 2,081	0,91

TABLEAU III.3

Variation des incréments de densité à composition constante

$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$, des incréments de densité à potentiel chimique constant $(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle molaire $(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$, et de la fraction d'hélice αf_H (cf. § II.3.1.2.) du copolymère BGl_n₇, à 25°C, en fonction de la composition du mélange eau/2-chloroéthanol.

COPOLYMERE BGl _n ₁₀					
% en volume de 2- chloroéthanol	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{1,3}$	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en g/g	$(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en moles/ moles	f_H
0	0,273				0,22
10	0,251	0,275	0,133	0,293	0,37
20	0,228	0,256	0,174	0,381	0,55
30	0,211	0,245	0,260	0,572	0,65
40	0,196	0,227	0,293	0,644	0,72
50	0,187	0,203	0,192	0,422	0,78
60	0,172	0,163	- 0,146	- 0,321	0,84
80					

TABLEAU III.4

Variation des incréments de densité à composition constante

$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$, des incréments de densité à potentiel chimique

constant $(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$,

de l'adsorption préférentielle molaire $(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$,

et de la fraction d'hélice αf_H (cf. § II.3.1.2.) du copo-

lymère BGl_n₁₀, à 25°C, en fonction de la composition du mé-

lange eau/2-chloroéthanol.

COPOLYMERE BGl _n ₁₅					
% en volume de 2- chloroéthanol	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$	$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$	$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en g/g	$(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en moles/ moles	f_H
0	0,262				0,40
10	0,244	0,245	0,007	0,017	0,57
20	0,222	0,256	0,205	0,456	0,70
30	0,196	0,262	0,512	1,138	0,78
40	0,194	0,237	0,415	0,923	0,81
50	0,188	0,215	0,336	0,748	0,84
60	0,154	0,165	0,170	0,378	0,87
80					

TABLEAU III.5

Variation des incréments de densité à composition constante

$(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{m_3}$, des incréments de densité à potentiel chimique constant $(\frac{\partial \rho}{\partial C_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$, de l'adsorption préférentielle molaire $(\frac{\partial m_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3}$, et de la fraction d'hélice αf_H (cf. § II.3.1.2.) du copolymère BGl_n₁₅, à 25°C, en fonction de la composition du mélange eau/2-chloroéthanol.

$$\frac{\delta\rho}{\delta C_2}$$

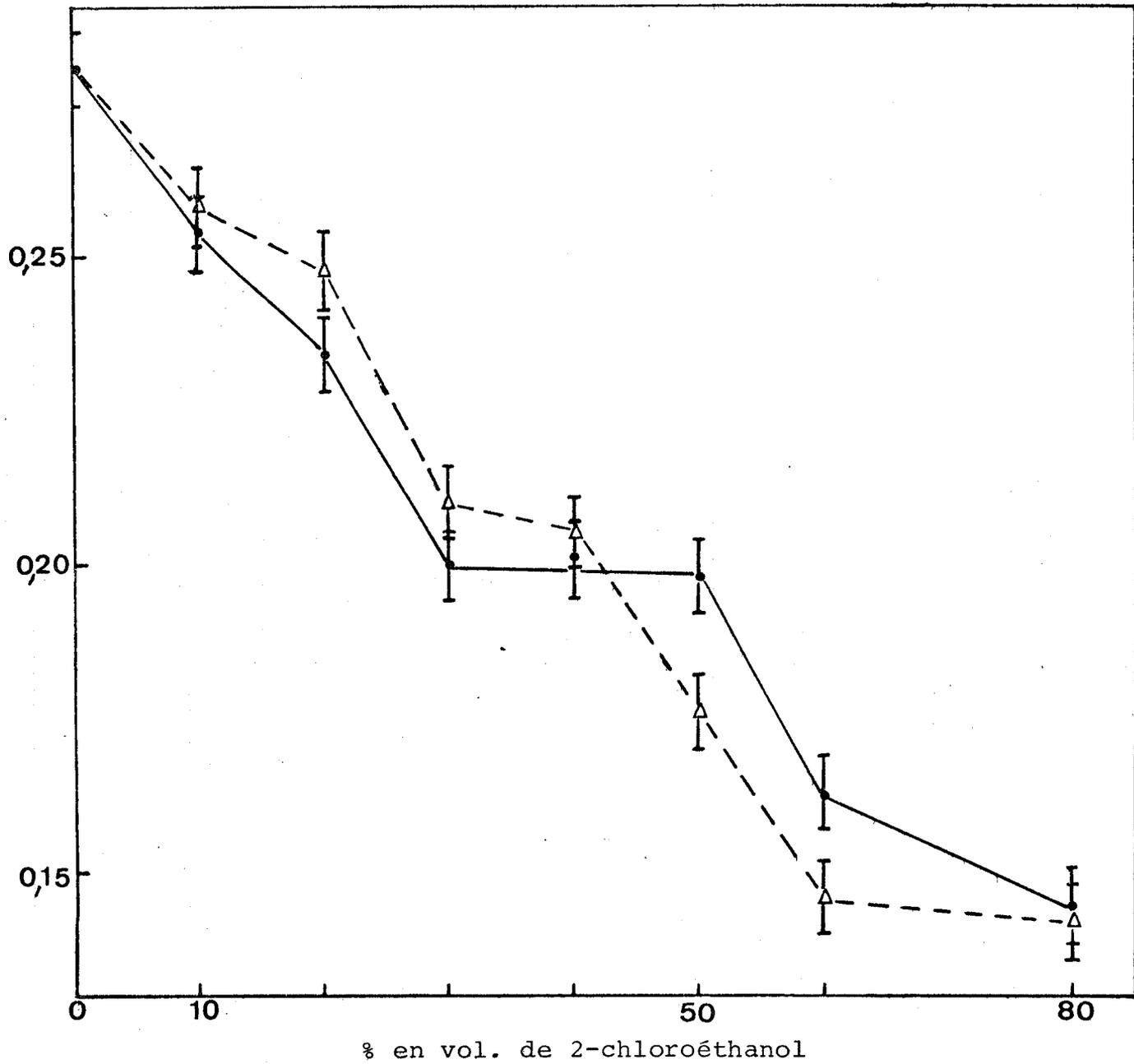


FIGURE III.2

Variation des incréments de densité à composition constante (—●—) et à potentiel chimique constant du mélange de solvants (-△-), de la PHEG en fonction de la concentration en 2-chloroéthanol, à 25°C.



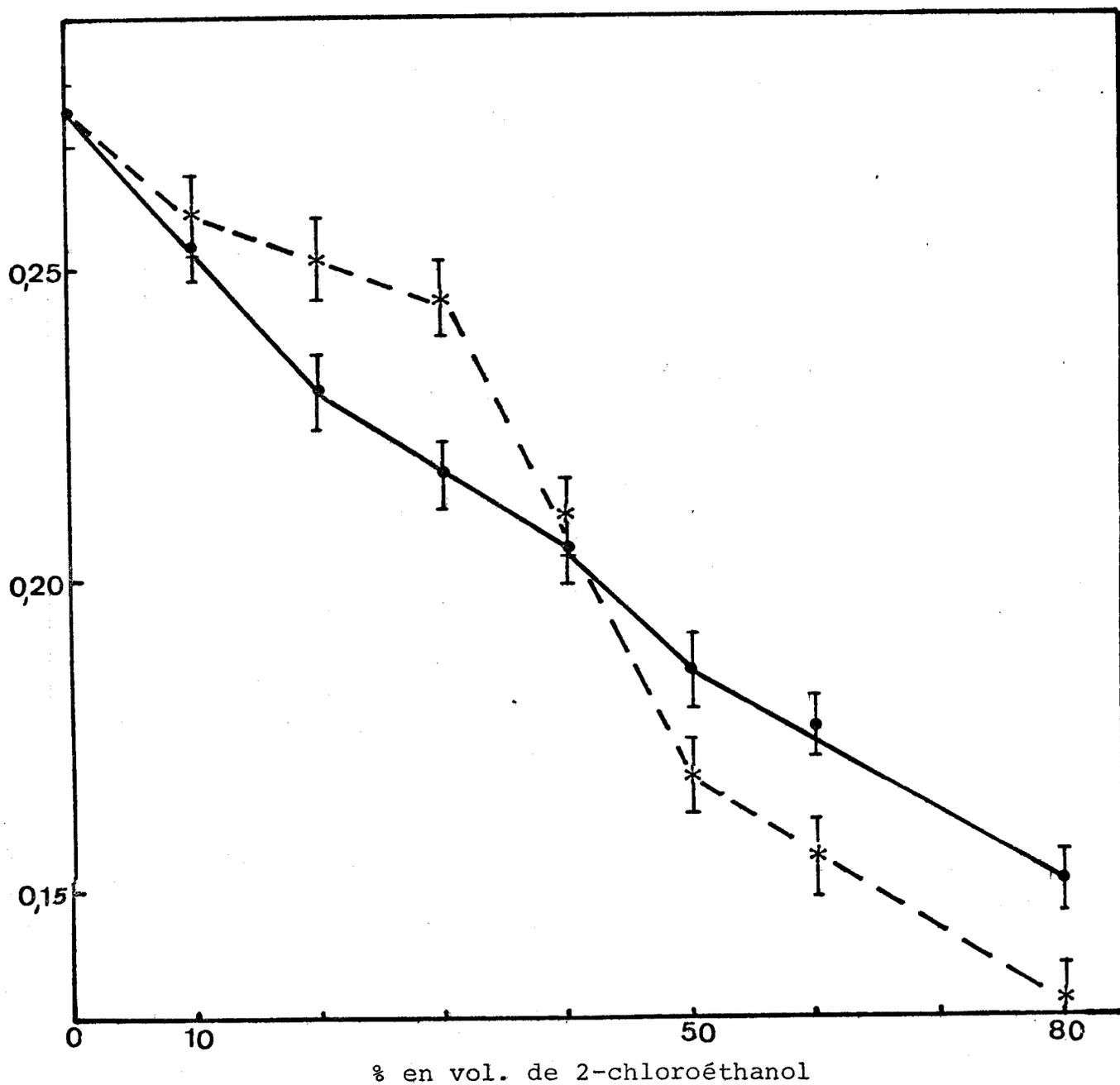
$\frac{\delta\rho}{\delta C_2}$ 

FIGURE III.3

Variation des incréments de densité à composition constante (—●—) et à potentiel chimique constant du mélange de solvants (--*--), du copolymère BGl_n, en fonction de la concentration en 2-chloroéthanol, à 25°C.



$$\frac{\delta\rho}{\delta C_2}$$

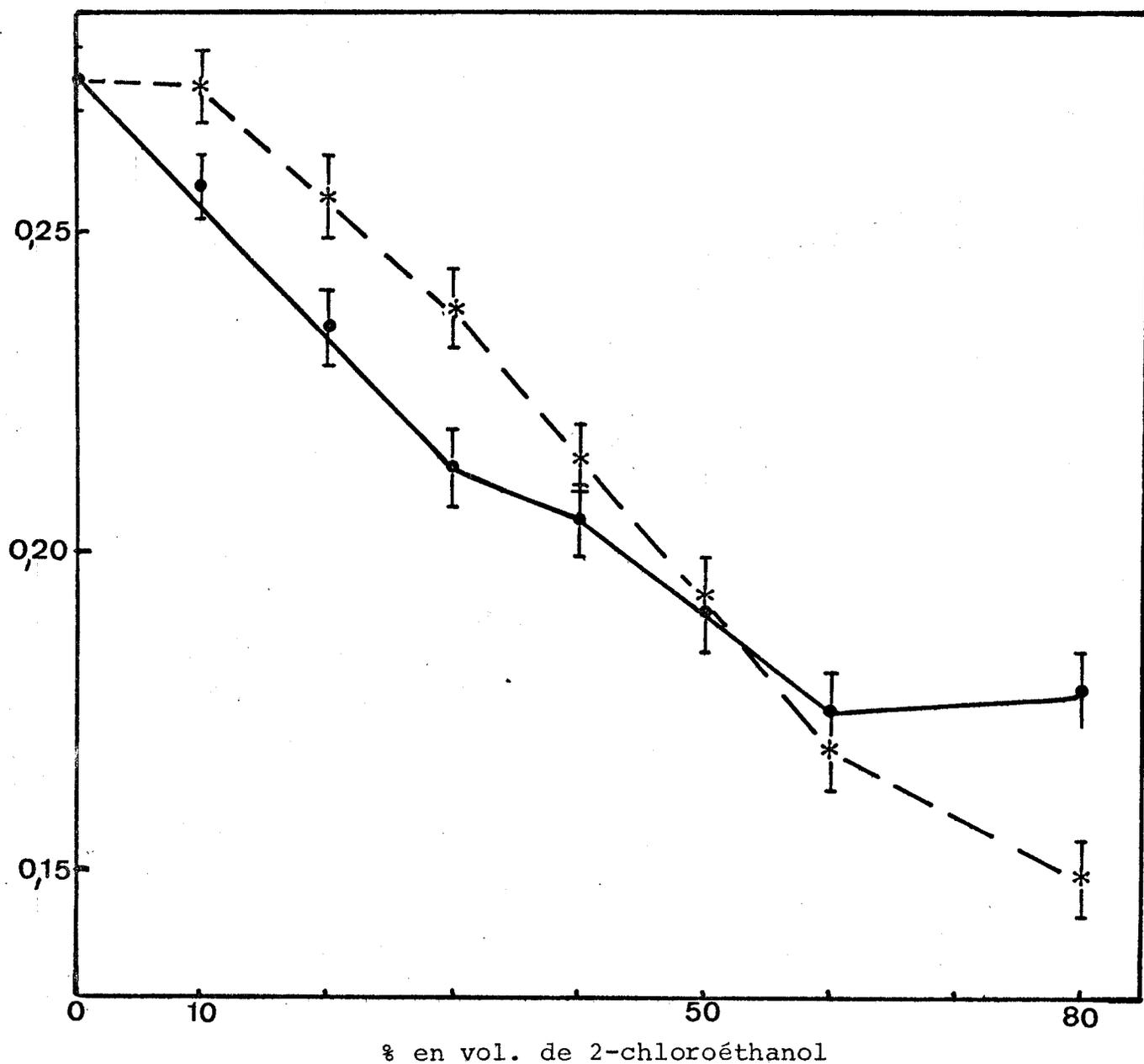


FIGURE III.4

Variation des incréments de densité à composition constante (—●—) et à potentiel chimique constant du mélange de solvants (--*--), du copolymère BGln₇, en fonction de la concentration en 2-chloroéthanol, à 25°C.

$$\frac{\partial \rho}{\partial C_2}$$

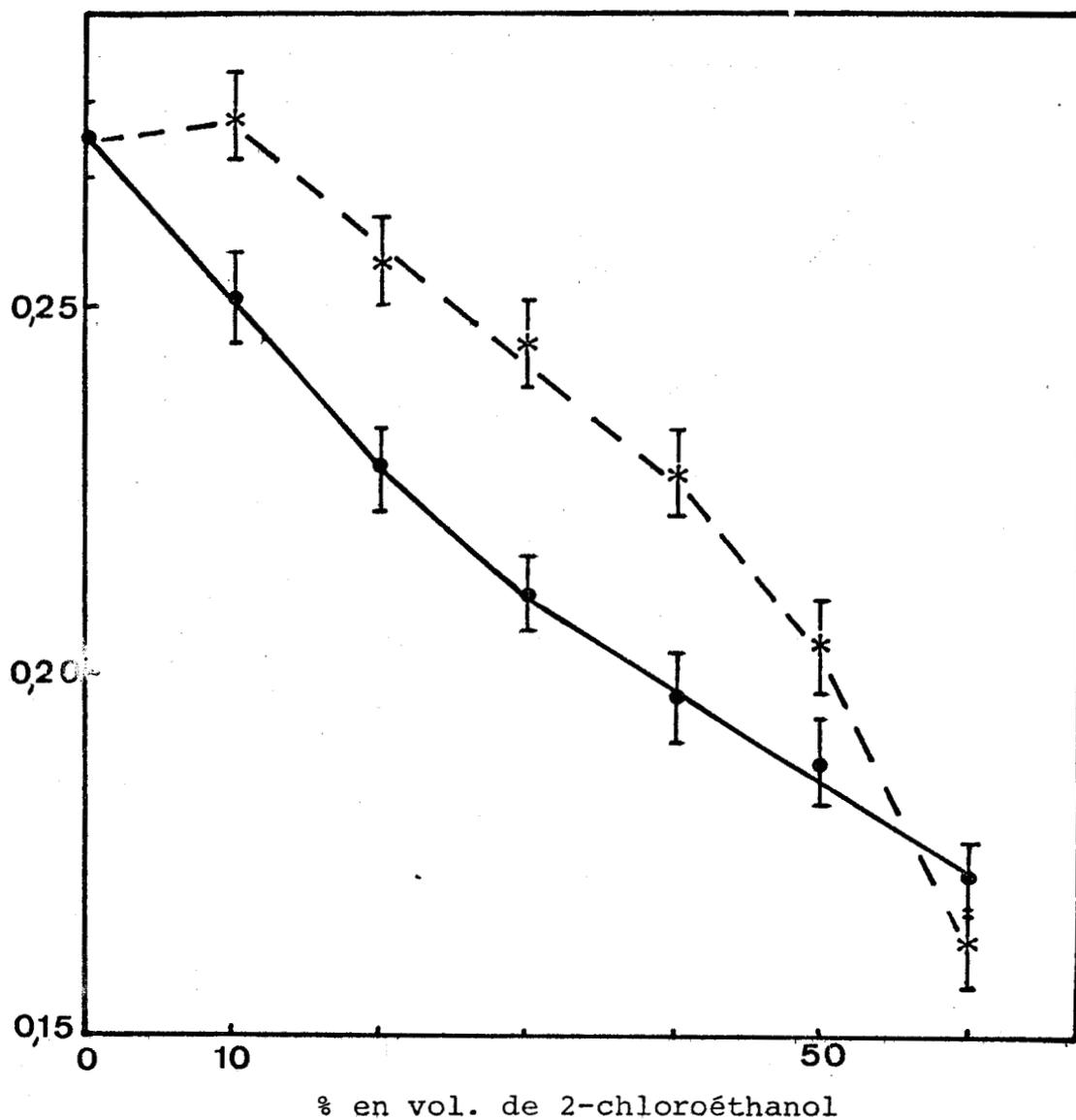


FIGURE III.5

Variation des incréments de densité à composition constante (—●—) et à potentiel chimique constant du mélange de solvants (---*---), du copolymère BGln₁₀ en fonction de la concentration en 2-chloroéthanol, à 25°C.

$$\frac{\delta\rho}{\delta C_2}$$

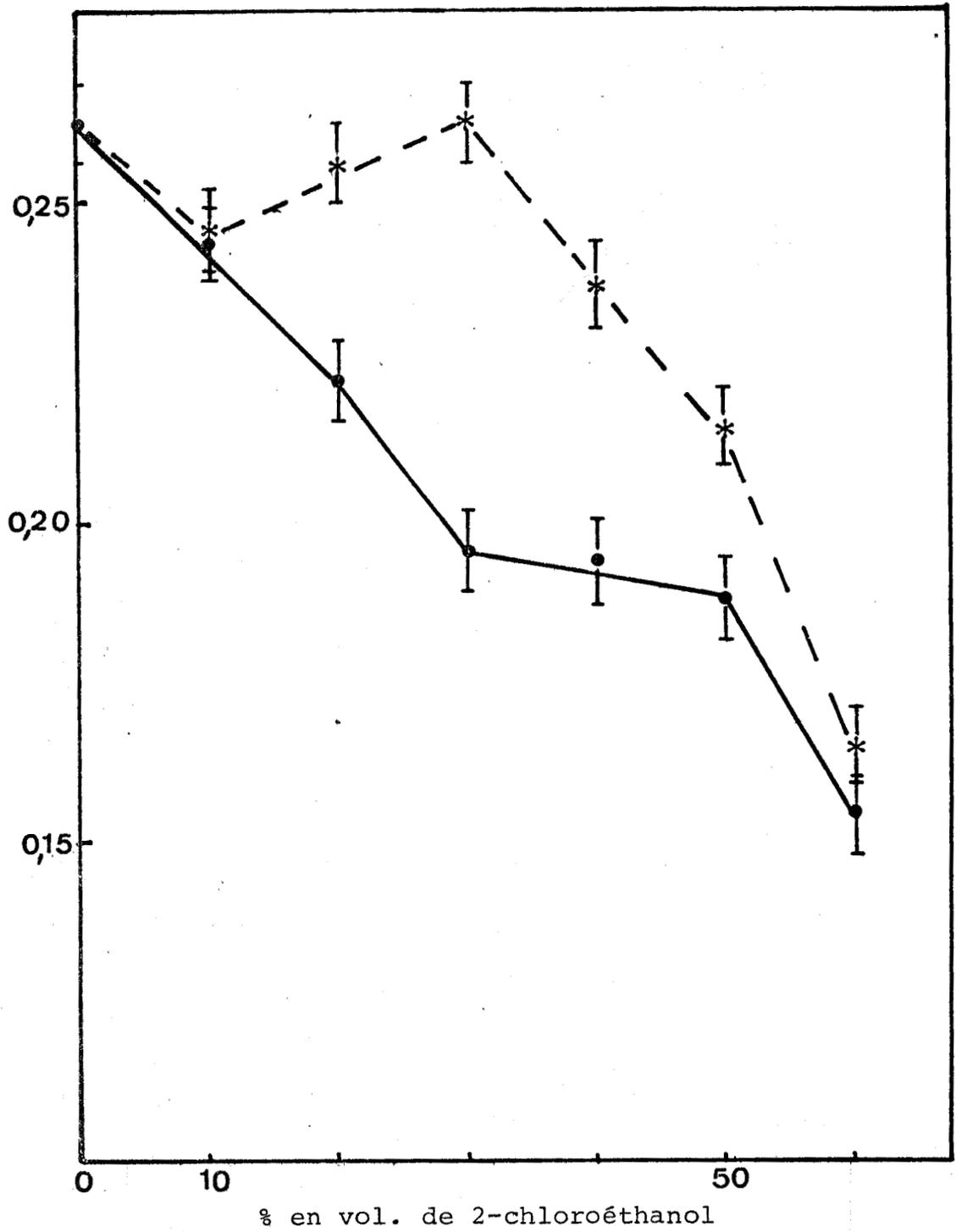


FIGURE III.6

Variation des incréments de densité à composition constante (—●—) et à potentiel chimique constant du mélange de solvants (---*---), du copolymère BGl_n₁₅ en fonction de la concentration en 2-chloroéthanol, à 25°C.



Aux fortes concentrations en 2-chloroéthanol (au-delà de 80 % en volume dans le cas de la PHEG et des copolymères BGLn₄ et BGLn₇, au-delà de 60 % en volume dans le cas des copolymères BGLn₁₀ et BGLn₁₅), les polypeptides sont insolubles dans le mélange de solvants. Pour les solubiliser, il faut ajouter (cf. § II.3) du 2-chloroéthanol pur à une solution aqueuse de polypeptide. Cependant, les solutions ainsi préparées se troublaient assez rapidement (agrégation et/ou précipitation du polymère). Les imprécisions et le manque de reproductibilité dus à cette méthode de préparation de ces solutions, et le phénomène de précipitation nous ont amené à abandonner l'étude dans ces domaines de composition. L'allure de la variation des incréments de densité avec la composition du mélange de solvants montre deux points d'inflexion dans le cas de la PHEG. Dans le cas du copolymère BGLn₄, on n'observe qu'un seul point d'inflexion, qui n'apparaît plus pour le copolymère BGLn₇. Dans le cas des copolymères BGLn₁₀ et BGLn₁₅, il apparaît un maximum de plus en plus prononcé. Au fur et à mesure que le taux en motifs (HEG) diminue dans les copolymères les caractéristiques de ce résidu (points d'inflexion) deviennent moins nettes.

II.6.2. Variation de l'adsorption préférentielle avec la composition du mélange eau/2-chloroéthanol

Les valeurs de l'adsorption préférentielle de la PHEG et des copolymères (HEG - co - BGLn), calculées par les relations (III.15) et (III.14), sont reportées dans les tableaux III.1 à III.5. Les valeurs de \bar{v}_3 ont été prises dans la littérature⁸. Dans la variation de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en fonction de la composition du solvant, on peut noter les caractéristiques suivantes (figure III.7) :

a) aux faibles concentrations en 2-chloroéthanol, il y a solvatation préférentielle ($(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3} > 0$) par le 2-chloroéthanol sur les cinq polypeptides étudiés ;

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} \text{ g/g}$$

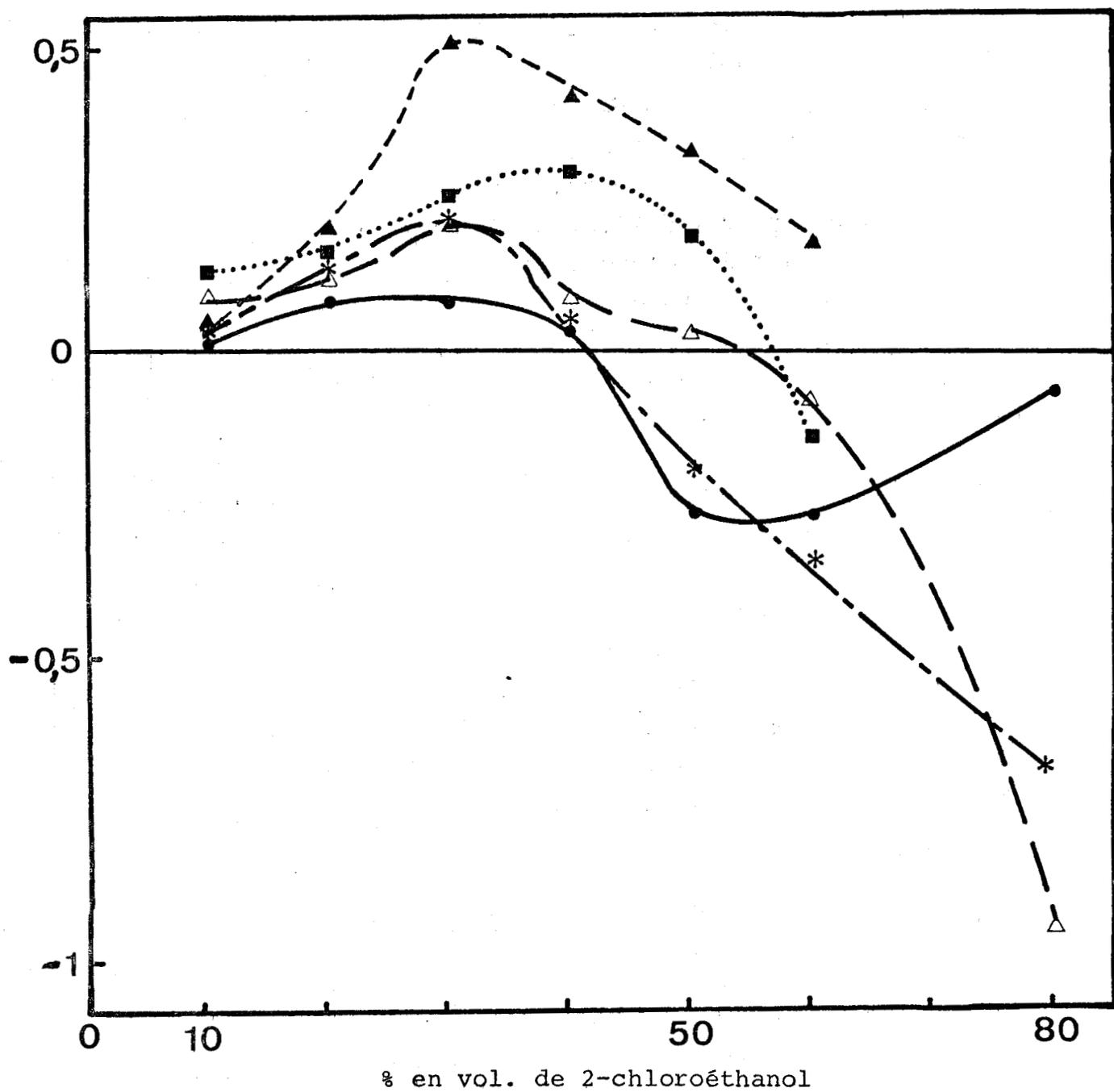


FIGURE III.7

Variation de l'adsorption préférentielle en fonction de la composition du mélange eau/2-chloroéthanol, à 25°C, sur la PHEG (●) et sur les copolymères BGln₄ (*), BGln₇ (Δ), BGln₁₀ (■) et BGln₁₅ (▲).

$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ augmente dans un premier temps, passe par un maximum puis diminue avant de s'annuler.

. Ce maximum est situé à 20 % en vol. de 2-chloroéthanol dans le cas de la PHEG, à 30 % dans le cas des copolymères BGLn₄, BGLn₇ et BGLn₁₅ et à 40 % dans le cas du copolymère BGLn₁₀. Il n'y a donc pas de variation systématique de la position du maximum avec la composition des copolymères; ce maximum apparaît, pour les cinq polypeptides étudiés, dans une zone de composition du solvant assez voisine (entre 20 et 40 % en 2-chloroéthanol).

. A chaque pourcentage en 2-chloroéthanol, on observe que les valeurs de $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ sont d'autant plus grandes que le polypeptide est plus riche en résidus (BGLn) (à quelques exceptions près). Cela est également vrai pour la valeur positive maximale de la solvatation préférentielle (figure III.8). Cette observation suggère l'existence d'une relation entre la valeur de l'adsorption préférentielle et la composition des copolymères. Nous avons tenté d'établir une relation simple entre $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ et le % en (BGLn), du type :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = C_1 \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} \text{ (PHEG)} + C_2 \left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} \text{ (BGLn)}$$

valeur expé- rimentale (copolymères)	valeur expéri- mentale (PHEG)	valeur théorique (à déterminer)
--------------------------------------------	----------------------------------	------------------------------------

où C₁ et C₂ sont des coefficients dépendant de la composition des copolymères - mais sans succès. La variation observée n'est pas linéaire, ce qui suggère une relation complexe. En outre, il faudrait tenir compte des différences de conformation des copolymères à chaque % de 2-chloroéthanol (cf. § III.7).

b) Mis à part le copolymère BGLn₁₅ pour lequel nous n'avons pas pu mener l'étude aux fortes concentrations

valeur positive maximale
de $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ (g/g)

% en vol. de 2-chloroéthanol
pour lequel $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = 0$
(valeur extrapolée pour
Copoly BGl_n₁₅)

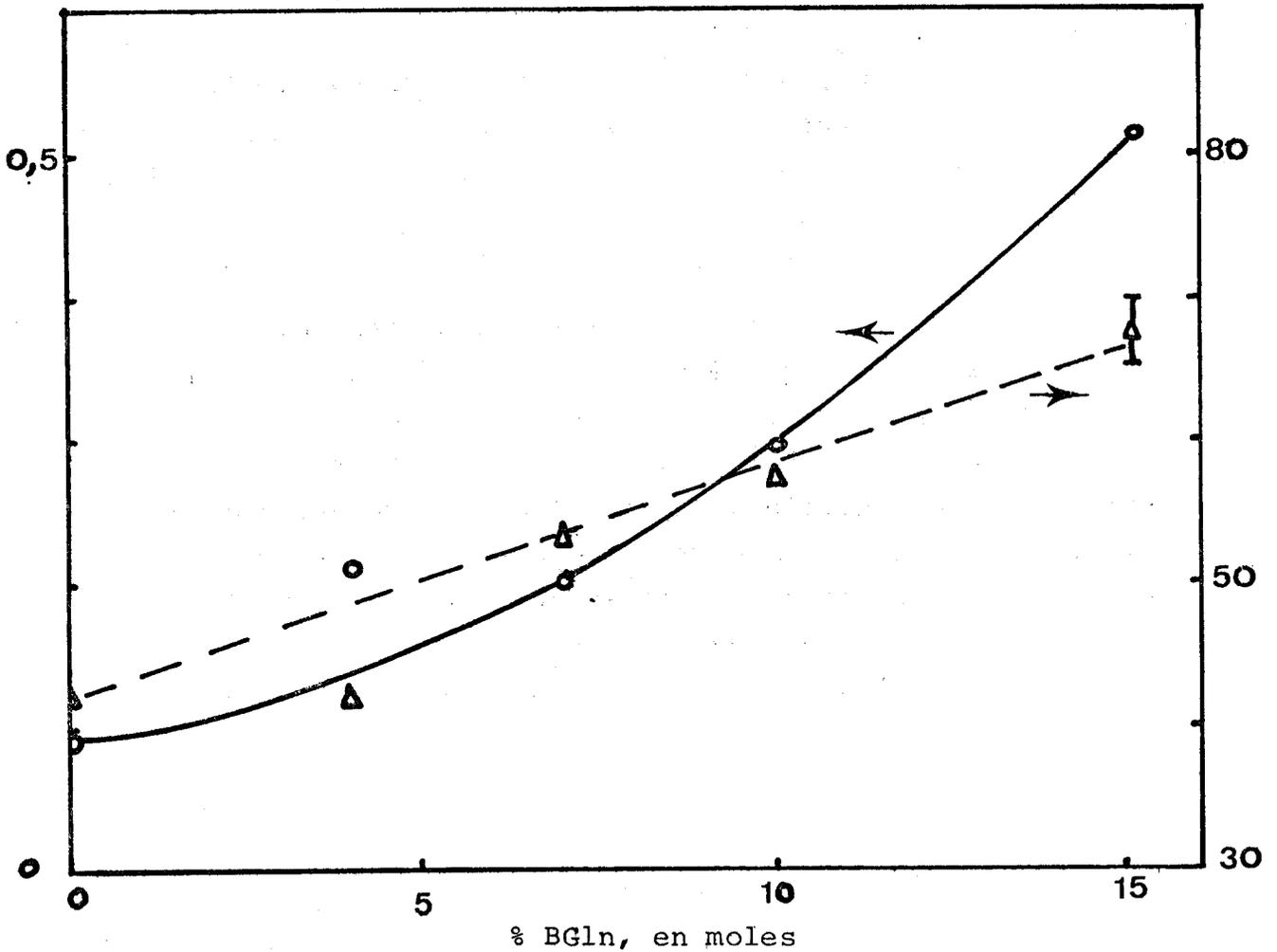


FIGURE III.8

Variation de la valeur positive maximale de l'adsorption préférentielle (—○—) et de la composition du mélange de solvants eau/2-chloroéthanol (exprimé en % en vol. de 2-chloroéthanol) au point d'inversion de l'adsorption préférentielle (--△--) en fonction du taux en motifs (BGl_n).

en 2-chloroéthanol, tous les polypeptides présentent une inversion du signe de l'adsorption préférentielle. Lorsque le taux de (BGln) augmente, la position de ce point d'inversion est déplacé vers des concentrations plus élevées en 2-chloroéthanol. Ce déplacement semble être une fonction linéaire de la composition des polypeptides (figure III.8). On observe donc une solvataion préférentielle par le 2-chloroéthanol dont l'ampleur est fonction du taux en (BGln) et qui s'étend sur un domaine de concentrations en solvant organique toujours plus large.

c) Lorsque $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3} < 0$, il y a adsorption préférentielle par l'eau ou encore hydratation préférentielle. Dans le cas de la PHEG, l'hydratation préférentielle passe par un maximum, puis diminue.

Par contre, dans le cas des copolymères, l'hydratation préférentielle augmente lorsque le solvant s'enrichit en 2-chloroéthanol. Contrairement à ce qui était observé dans les domaines où $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3} > 0$, les courbes ne varient plus de manière parallèle mais se recoupent, ce qui rend difficile l'établissement d'une relation entre la teneur en (BGln) et la valeur de l'hydratation préférentielle.

Lorsque l'on exprime l'adsorption préférentielle en moles de 2-chloroéthanol par mole de motif monomère, on observe les mêmes caractéristiques (tableaux III.1 à III.5).

En résumé de ce paragraphe, on notera que les variations de l'adsorption préférentielle avec la composition du mélange eau/2-chloroéthanol, sont analogues pour la PHEG et les copolymères (HEG-co-BGln), mais d'amplitudes différentes. Lorsque l'on trace les variations de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ en fonction du % en (BGln) pour les différents mélanges de solvants, on observe que les points expérimentaux ne sont ni alignés sur une droite, ni alignés sur une courbe régulière, ce qui exclut la possibilité d'une corrélation simple entre

$(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ et la composition des copolymères. Les interactions entre chaînes latérales de même nature et entre chaînes latérales de nature différente, la variation de la fraction en hélice α , et les interactions entre les groupements chimiques constitutifs du polypeptide et les constituants du mélange de solvants n'agissent certainement pas indépendamment les uns des autres. On ne peut pas alors rendre compte des variations de l'adsorption préférentielle avec la composition des copolymères par une simple additivité des effets. Ceci avait déjà été observé dans l'étude de l'hydratation de poudres de copolymères de la L-Lysine et de la N-succinyl-L-Lysine ⁴⁹. Néanmoins, l'augmentation constante de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ avec la teneur en (BGLn) des copolymères, pour un mélange eau/2-chloroéthanol donné, est en bon accord avec l'hypothèse selon laquelle le solvant marquerait une affinité certaine pour les groupements hydrophobes ^{1,6,47}. Cette affinité est d'ailleurs très marquée dans le cas du trichloroéthanol, comme cela a été démontré pour le système eau/trichloroéthanol/protéines globulaires ⁵⁰.

Nous nous étions fixé pour objectif à ce travail, d'étudier l'influence de la teneur en résidus hydrophobes sur la transition chaîne-hélice (ch. II) et sur les interactions polypeptide/mélange de solvants. Les résultats obtenus sont encourageants dans la mesure où l'adsorption préférentielle varie de façon constante avec la teneur en motifs monomères hydrophobes : la substitution du groupement hydrophile (-CH₂OH) de la PHEG par un groupement non polaire hydrophobe entraîne une augmentation des interactions polypeptide/solvant non polaire.

On pourrait également penser qu'une micellisation intramoléculaire pourrait avoir lieu pour les copolymères, comme c'est le cas pour les poly(2-vinyl pyridine) et les poly(4-vinyl pyridine) quaternisées par des bromures d'alkyle à longue chaîne hydrophobe ⁵¹ ou encore pour l'acide polyméthacrylique ⁵² lorsque le degré d'ionisation est

faible. Une micellisation de plus en plus importante pourrait avoir lieu lorsque l'hydrophobie du copolymère est augmentée. L'addition du 2-chloroéthanol provoque une déstabilisation de cette structure micellaire, ce qui aboutit à mettre en contact la "zone interne" hydrophobe avec le solvant. L'adsorption préférentielle du solvant organique sur le polypeptide sera alors d'autant plus forte que le polypeptide porte plus de motifs hydrophobes. On se rapproche alors du cas de la protéine globulaire : l'addition de solvant organique provoque une dénaturation de la structure native et un déplieement de la "zone interne" hydrophobe, qui était stabilisée par des interactions non-covalentes (interactions hydrophobes, liaisons hydrogène) ou des ponts disulfure. L'interprétation de nos résultats par des phénomènes de micellisation nous paraît hypothétique, aucune étude n'ayant démontré à ce jour l'existence de telles micelles ou de telles "zones internes" hydrophobes dans les polypeptides de synthèse.

Il ne nous est pas possible de comparer nos résultats avec ceux d'autres systèmes copolymères/mélange de solvants, notre étude étant la première de ce type à avoir été menée à bien. Néanmoins, il nous paraît intéressant de comparer nos résultats à ceux obtenus par d'autres auteurs dans l'étude de systèmes ternaires polypeptide/mélange de solvants, notamment dans l'étude de l'homologue supérieur de la PHEG, la PHPG.

Dans l'étude, menée au laboratoire, de l'adsorption préférentielle sur la PHPG dans le mélange eau/2-chloroéthanol, nous avons observé⁴⁵, aux faibles concentrations en solvant organique, une solvatation préférentielle par le 2-chloroéthanol, qui décroissait de façon monotone ; elle était suivie par une hydratation préférentielle, lorsque le milieu s'appauvrisait en eau. Mis à part le fait que nous n'avons pas observé de maximum dans la

variation de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$, on constate une certaine analogie entre la PHPG et les polypeptides étudiés dans ce travail. Le point d'inversion est cependant situé à une concentration en 2-chloroéthanol beaucoup plus faible (20 % en vol.). Les interactions de la PHEG avec le solvant organique sont moins importantes que celles de la PHPG ($(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ atteint 1,14 g/g) mais s'étendent sur un domaine de composition beaucoup plus vaste. Dans le cas des copolymères (HEG-co-BGln), le point d'inversion est déplacé vers les fortes concentrations en 2-chloroéthanol, lorsque leur caractère hydrophobe est accru. Dans le cas de la PHPG, plus hydrophobe que la PHEG, le point d'inversion est reculé vers les mélanges plus riches en eau. Il apparaît donc que le méthylène supplémentaire de la chaîne latérale de la PHPG, comparativement à la PHEG, s'il accroît l'hydrophobie du polypeptide, contribue de manière différente aux propriétés du polymère vis-à-vis des constituants du mélange de solvants. Il serait alors tentant de conclure que l'accroissement des affinités 2-chloroéthanol/copolymères serait dû essentiellement au groupement benzyle. Mais la complexité des effets mis en jeu (voir plus haut) ne nous autorise pas à formuler une telle hypothèse de manière définitive ; seule une étude comparative avec l'homologue supérieur, la poly(N⁵-(4-hydroxy butyl)-L-glutamine) ou avec des copolymères (HBG-co-BGln) permettrait de répondre à la question.

KOMIYAMA et ses coll. ¹⁶ ont effectué une étude systématique de l'adsorption préférentielle sur la Poly(L-Lysine HBr) des constituants des mélanges eau/solvant organique suivants : eau/diméthylsulfoxyde (DMSO), eau/diméthylformamide (DMF), eau/N-méthylformamide (NMF), eau/éthylène glycol (EG), eau/2-propanol (2 ProH) et eau/1-méthyl-2-pyrrolidinone (NMP). Dans le cas des trois premiers mélanges de solvants (figure III.9), le solvant organique est adsorbé préférentiellement sur une large gamme de composition, avec un maximum situé à 40 %, 50 % et 20 %, en volume, dans le cas du DMSO, du DMF et du NMF. La valeur

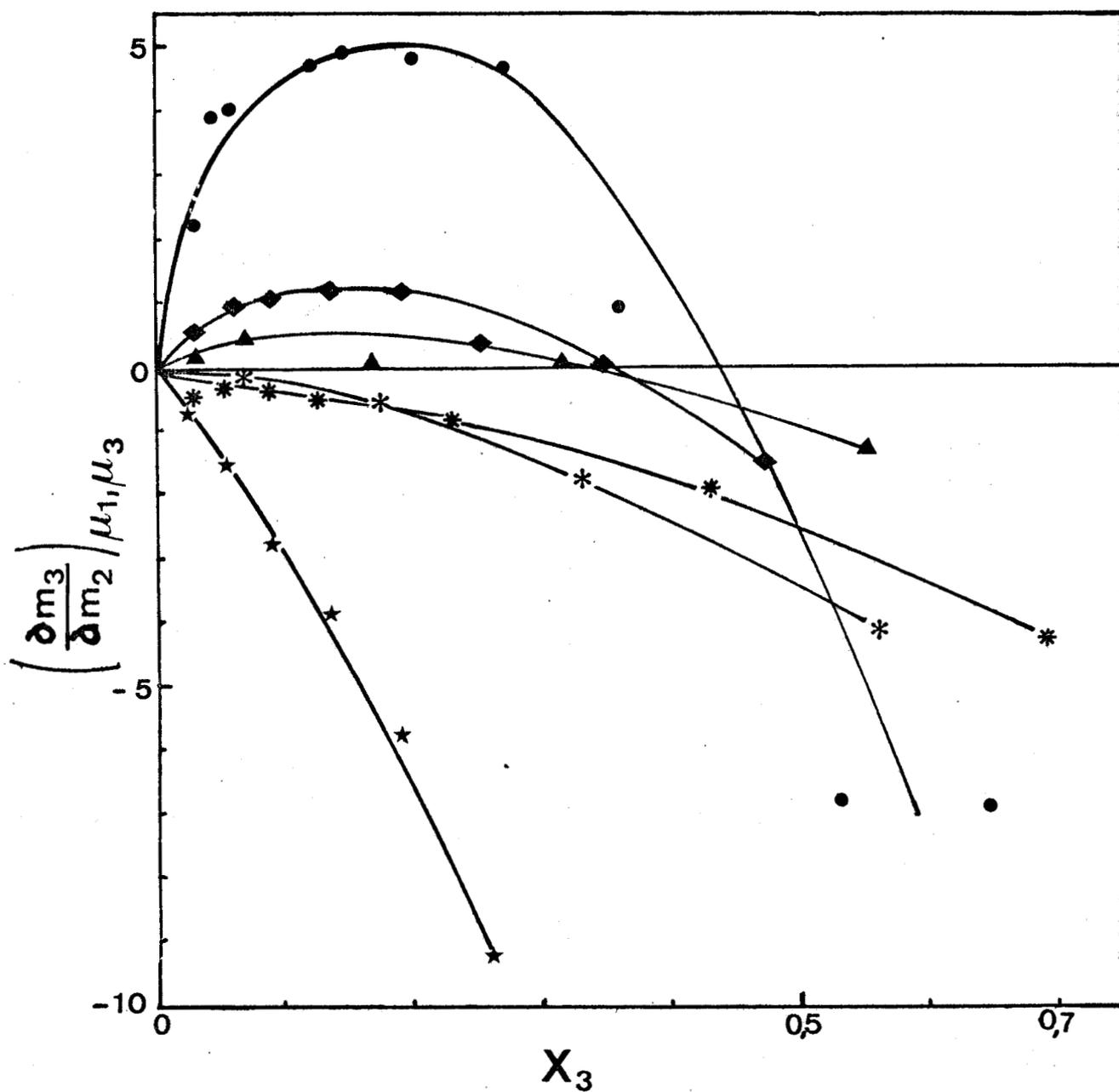


FIGURE III.9. Variation de l'adsorption préférentielle sur la Poly(L-Lysine HBr) en fonction de la fraction molaire X_3 du solvant organique dans des mélanges eau/solvant organique (D'après KOMIYAMA et coll. ¹⁶).

- H₂O/ DMSO
- ◆ H₂O/ DMF
- ▲ H₂O/ NMF
- * H₂O/ NMP
- * H₂O/ EG
- ★ H₂O/ 2PrOH

du maximum de l'adsorption préférentielle décroît dans l'ordre DMSO>DMF>NMF. Dans le cas des trois derniers mélanges de solvants (figure III.9), on observe une hydratation préférentielle croissante lorsque l'on enrichit le milieu en solvant organique. Au vu de ces résultats, il serait intéressant de comparer la variation de l'adsorption préférentielle sur la Poly(L-Lysine HBr) et la variation d'un paramètre physico-chimique caractérisant le solvant organique. Une classification des solvants organiques selon leur hydrophobie n'existe pas à ce jour. Quant au pouvoir donneur de liaisons hydrogène, les classifications disponibles⁵³ sont trop différentes les unes des autres pour que l'on puisse les utiliser. Une comparaison de la constante diélectrique ou du moment dipolaire des solvants organiques considérés ne donne pas non plus de résultats encourageants¹⁶. Les auteurs ont proposé une interprétation basée sur le calcul de constantes d'échange entre la couche de solvation du polypeptide et le solvant (cf. § III.4.d) pour la partie polaire et la partie non-polaire de la chaîne latérale. La constante d'échange caractérisant la partie polaire varie peu avec la nature du solvant organique ; par contre, la constante d'échange de la partie non-polaire de la chaîne latérale décroît dans le sens DMSO>DMF>NMF>EG>NMP>2-PROH. (rappelons que la solvation préférentielle maximale décroît dans le sens DMSO>DMF>NMF et que l'hydratation préférentielle croît dans le sens NMP<EG<2-PROH). Mais cette classification n'a pas pu être reliée à une classification des solvants par un paramètre physico-chimique caractéristique¹⁶. Tous les mélanges eau/solvant organique étudiés par KOMIYAMA et coll.¹⁶ n'introduisent aucune modification de la conformation de la poly(L-Lysine HBr) : la fraction d'hélice α reste nulle dans tous les cas. Les différences observées dans la variation de l'adsorption préférentielle ne trouvent donc pas leur origine dans des différences de conformation, mais bien dans des différences d'affinité solvant/polypeptide, comme le montre la variation de la constante d'échange K^1 de la partie non-polaire de la chaîne latérale :

DMSO	: $K^1 = 11$	solvatation préférentielle sur une large gamme de composition ; maximum prononcé (4,83 mole/mole)
DMF	: $K^1 = 3,4$	solvatation préférentielle sur une large gamme de composition ; maximum
NMF	: $K^1 = 2,0$	peu prononcé (1,15 et 0,37 mole/mole)
EG		
NMP	: $K^1 < 2$	hydratation préférentielle uniquement 2-PrOH

Ce sont également des différences d'affinité solvant/polypeptide qui doivent être à l'origine des différences notées dans la variation de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ sur la PHPG dans le mélange eau/2-chloroéthanol⁴⁵ et dans le mélange eau/dioxanne, étudié par INOUE et IZUMI¹⁵. Dans le premier cas, une adsorption préférentielle décroissante par le solvant organique précédait l'hydratation préférentielle (voir plus haut), alors que dans le second cas, l'eau est adsorbée préférentiellement dans tout le domaine de composition du mélange eau/dioxanne. Dans les deux cas, le solvant organique provoque une transition chaîne - hélice de la PHPG.

INOUE et TIMASHEFF ont étudié la variation de l'adsorption préférentielle sur des protéines globulaires dans les mélanges eau/2-chloroéthanol, eau/éthylène glycol et eau/méthoxyéthanol^{1,6,8,47}. Dans le cas de la β -Lactoglobuline A, ils ont observé une solvatation préférentielle croissante par l'éthylène glycol et le méthoxyéthanol⁶ ; dans le cas du 2-chloroéthanol^{6,8,24} la solvatation préférentielle par le solvant organique passe par un maximum, décroît, avant d'être remplacée par une hydratation préférentielle croissante aux faibles concentrations en eau. INOUE et TIMASHEFF ont supposé alors que les variations de l'adsorption préférentielle avec la composition du mélange eau/solvant organique diffèrent avec la nature du solvant organique, pour une protéine donnée. C'est ce que KOMIYAMA

et coll. observèrent dans le cas d'un polypeptide, la poly (L-Lysine HBr) ¹⁶ (voir plus haut). INOUE et TIMASHEFF ont étayé leur hypothèse par une étude comparée de plusieurs protéines globulaires en solution dans le mélange eau/ 2-chloroéthanol : la β -Lactoglobuline A, déjà citée, l'Insuline, la Sérum albumine bovine et le Lysozyme. Ils ont observé une variation analogue de l'adsorption préférentielle sur les quatre protéines ⁶ (voir tableau III.6) et ont conclu que la variation particulière de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ dans le mélange eau/2-chloroéthanol était une propriété du solvant et non de la protéine. L'allure de la courbe représentative de la variation de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ dans l'eau/2-chloroéthanol des protéines globulaires étudiées par INOUE et TIMASHEFF est analogue à celle de la PHEG et des copolymères (HEG-co-BGln) étudiés dans ce travail (voir tableau III.6), ce qui pourrait constituer un argument en faveur de l'hypothèse d'INOUE et TIMASHEFF. De même, les différences observées dans le cas de la Poly(L-Lysine HBr) dans différents mélanges de solvants, et dans le cas de la PHPG dans les mélanges eau/dioxanne ¹⁵ et eau/2-chloroéthanol ⁴⁵ militent également en faveur de cette hypothèse.

Les valeurs positives maximales atteintes par $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ diffèrent avec la nature de la protéine globulaire considérée (voir tableau III.6). Au vu des résultats que nous avons obtenus sur les copolymères (HEG-co-BGln), on pourrait attribuer ces variations à des différences d'hydrophobie de ces protéines, provenant de différentes compositions en acides aminés hydrophobes. Mais il est difficile d'extrapoler d'un polypeptide constitué par l'enchaînement de deux acides aminés non-ionisables à une protéine constituée par une vingtaine d'acides aminés, à chaînes latérales non-polaires et à chaînes latérales ionisables : la structure de la protéine n'est pas identique, aussi bien en ce qui concerne la couche superficielle hydrophile que la zone interne de caractère plus hydrophobe.



PROTEINE GLOBULAIRE ou POLYPEPTIDE	valeur posi- tive maximale de $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$ en g/g	% en vol. de 2-chloro- ethanol correspon- dant	% en vol. de 2-chloroethanol correspondant à $\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = 0$	Réf.
β -Lacto globuline A	0,718	40 %	65 % *	(6,8)
Insuline	0,664	40 %	65 % *	(6)
Lysozyme	0,44 *	30 % *	60 % *	(6)
Serumalbumine bovine	0,68 *	35 % *	60 % *	(6)
PHPG			20 %	(45)
PHEG	0,086	20 %	42 %	ce tra- vail
COPOLY BGl _n ₄	0,211	30 %	42 %	"
COPOLY BGl _n ₇	0,201	30 %	53 %	"
COPOLY BGl _n ₁₀	0,293	40 %	57 %	"
COPOLY BGl _n ₁₅	0,512	30 %	65-70 % **	"

TABLEAU III.6

Caractéristiques de la solvatisation préférentielle des protéines étudiées par INOUE et TIMASHEFF^{6,8} et de polypeptides à chaîne latérale non ionisable, dans les mélanges eau/2-chloroéthanol.

* valeurs déduites de la figure 2 de la référence 6

** valeur extrapolée (fig. III.7).



Les interactions du 2-chloroéthanol avec les chaînes polypeptidiques ont donc été étudiées avec les protéines globulaires et des polypeptides modèles à chaîne latérale non-ionisable, d'hydrophobie variable. On ne dispose à ce jour que d'études limitées sur des polypeptides poly-électrolytes : l'acide polyglutamique par exemple, n'a été étudié que dans le mélange eau/dioxanne ¹⁴. Dans le cas de polymères non peptidiques tels que le poly(hydroxy éthyl méthacrylate) ⁵⁴, l'acide polyméthacrylique ⁵⁵, ou des copolymères (méthacrylate de benzyle - co - acide méthacrylique) ⁵⁵ l'adsorption préférentielle varie de façon très différente suivant la nature du polymère, contrairement à ce que l'on constate dans le cas des protéines et des polypeptides.

Aux fortes concentrations en 2-chloroéthanol, il y a hydratation préférentielle sur la PHEG (figure III.7). Le fait qu'en milieu faiblement aqueux l'eau soit encore adsorbée préférentiellement sur le polymère démontre son caractère hydrophile, qui trouve son origine dans les groupes amides et alcools primaires. Lorsque l'on incorpore le résidu hydrophobe (BGln), l'hydratation préférentielle ne s'observe qu'à des concentrations de plus en plus fortes de 2-chloroéthanol, ce qui indique une diminution du caractère hydrophile du copolymère. Par contre, dans le cas de la PHPG ⁴⁵, plus hydrophobe que la PHEG, l'hydratation préférentielle apparaît dès 20 % en vol. de 2-chloroéthanol. Il y a là une contradiction, qui trouve peut-être son origine dans une différence d'affinité pour le 2-chloroéthanol entre le groupement hydroxypropyle et le groupement hydroxyéthyle.

CONCLUSION

L'étude des interactions des constituants du mélange de solvant eau/2-chloroéthanol avec la PHEG et les copolymères (HEG-co-BGln) nous a permis de mettre en évidence une variation concomittante entre les interactions

2-chloroéthanol/polypeptide (mesurée par la variation de l'adsorption préférentielle) et l'hydrophobie du polypeptide (déterminée par la variation de la teneur en résidus non-polaires (BGln)): lorsque l'on augmente le caractère hydrophobe du polypeptide, la solvataion préférentielle par le 2-chloroéthanol est accrue (sa valeur positive maximale est plus forte ; point d'inversion reculé vers de plus fortes concentrations en solvant organique). Ceci constitue une illustration particulièrement significative de l'hypothèse formulée par INOUE et TIMASHEFF^{1,6,8,47}, selon laquelle le 2-chloroéthanol interagit préférentiellement avec les sites hydrophobes des protéines.

En intégrant nos résultats à l'ensemble des études menées à ce jour sur les interactions polypeptide/mélange de solvant, nous avons vu que la nature du solvant organique n'était pas indifférente. Ceci peut s'expliquer si on considère que les interactions d'une chaîne macromoléculaire particulière avec les constituants d'un mélange eau/solvant organique donné, dépendent des caractéristiques propres du solvant organique : hydrophobie, pouvoir donneur ou receveur de liaisons hydrogène, propriétés électrostatiques par exemple. En outre, la formation de complexes eau/solvant organique peut également jouer un rôle important : les interactions entre les constituants du mélange de solvants doivent certainement interférer avec celles qui ont lieu entre le polypeptide et chacun des constituants du mélange de solvants. On ne peut également pas exclure la possibilité d'interactions entre le polypeptide et un complexe eau/solvant organique de stoechiométrie définie.

La valeur de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ est une mesure de l'excès ou du déficit du solvant organique dans la couche de solvataion du polymère, comparativement au solvant "extérieur". Il serait donc intéressant de pouvoir déterminer la variation de la composition exacte de la couche de solvataion avec la

composition des copolymères. Ce sera l'objet du § III.6.3. Nous avons vu au chapitre II que le 2-chloroéthanol était capable de provoquer une transition conformationnelle chaîne-hélice. Nous étudierons au § III.7 s'il existe une relation entre les propriétés hélicogènes du 2-chloroéthanol et les interactions polypeptide/mélange de solvants évaluées par la mesure de l'adsorption préférentielle et de l'adsorption absolue.

III.6.3. Variation de l'adsorption absolue avec la composition du mélange eau/2-chloroéthanol.

INTRODUCTION

Nous avons vu (§ III.4) qu'il était possible de relier la solvataion absolue par le solvant organique (A_3) et par l'eau (A_1), à l'adsorption préférentielle par une relation simple, que nous donnerons sous la forme proposée par INOUE et TIMASHEFF^{1,6,47} :

$$\left(\frac{\partial g_3}{\partial g_2}\right)_{\mu_1, \mu_3} = A_3 - g_3 A_1 \quad (\text{III.20})$$

où g_3 représente la concentration en 2-chlorométhanol, exprimée en g/g de solvant 1. Cette équation comporte deux inconnues : A_3 et A_1 . Si l'on se fixe pour but de déterminer A_3 , il faut :

- soit déterminer A_1 par une méthode expérimentale indépendante de la mesure de l'adsorption préférentielle ; la seule qui ait été utilisée à présent est la Résonance Magnétique Nucléaire. La méthode, mise au point par KUNTZ⁵⁶, consiste à geler rapidement l'échantillon dans l'azote liquide afin de figer l'état de solvataion existant à température ambiante. L'échantillon est ensuite amené à une température proche de

- 20°C ; dans ces conditions, l'eau "solvant" reste gelée tandis que l'eau incluse dans la couche de solvation du polymère ne l'est pas et donne naissance à un signal RMN. Pour déterminer la quantité d'eau à partir de la surface du pic obtenu, il faut avoir recours à un étalonnage avec une protéine dont le degré d'hydratation est connu par d'autres méthodes. INOUE et IZUMI¹⁵, dans l'étude du système PHPG/eau/dioxanne, ont eu recours à cette méthode pour déterminer les valeurs de A_1 et A_3 . MORCELLET⁵⁷ a montré qu'il existait une grande différence entre les valeurs expérimentales de $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$ obtenues par INOUE et IZUMI¹⁵ avec celles calculées par la relation (III.20) à partir des valeurs expérimentales de A_1 et A_3 . Le fait que de l'eau adsorbée puisse être gelée ou qu'une fraction de l'eau non liée ne soit pas gelée peut être à l'origine d'erreurs dans la détermination de A_1 et A_3 par cette méthode.

- soit évaluer A_1 à partir des données expérimentales disponibles sur l'hydratation d'autres polypeptides ou de protéines, en solution purement aqueuse ou en mélange de solvants, comme nous allons le faire.

EVALUATION DE L'HYDRATATION ABSOLUE

Des méthodes nombreuses ont été utilisées pour déterminer le degré d'hydratation des protéines en solution aqueuse (tableau III.7). En ce qui concerne les polypeptides, les résultats connus sont moins nombreux (tableau III.8). L'étude systématique menée par RMN à l'état "gelé" par KUNTZ et coll.⁵⁶ sur plusieurs polypeptides a permis de dégager quelques caractéristiques de l'hydratation des chaînes latérales :

METHODE DE DETERMINATION	PROTEINE	DEGRE D'HYDRATATION EN G D'EAU PAR G DE PROTEINE	REF.
Méthodes hydrodynamiques (diffusion et viscosité)	Ribonucléase	0,5	56
	β-Lactoglobuline A	0,5	56
		0,72	58
		0,61	58
	Sérum albumine Bovine	0,4	56
		0,48	59
		0,75	58
	Hémoglobine	0,6	56
		0,36	58
		Ovalbumine	0,45
	Lysozyme	0,89	58
R M N selon KUNTZ	Ovalbumine	0,3	56
	Sérum albumine Bovine	0,4	56
	Hémoglobine	0,4	56
	Lysozyme	0,3	56
Calorimétrie	Lysozyme	0,3	56
	β-lactoglobuline A	0,5	56
	Hémoglobine	0,3	56
Mesure du volume spécifique partiel	Sérum albumine Bovine	0,28	60
	Lysozyme	0,2	61

TABLEAU III.7

Degré d'hydratation de quelques protéines globulaires en solution aqueuse



METHODE DE DETERMINATION	POLYPEPTIDE	HYDRATATION EN MOLES D'EAU PAR MOLE DE RESIDU ACIDE AMINE	REF
R M N selon KUNTZ en solution purement aqueuse	PLGA	8	56
	Acide Poly Aspartique	2 à 8	
	Poly L Glycine	0,9	
	Poly L Valine	0,9	
	Poly L Proline	3,1	
	Poly L Arginine	3	
	Poly L Ornithine	4,5	
R M N selon KUNTZ en solution dans les mélanges eau/dioxanne	PHPG	2 à 4	15
Absorption des ondes ultrasonores en solution purement aqueuse	carbobenzoxy-Glycyl-L-hydroProline	10 *	62
	Carbobenzoxy-Glycyl-L-hydroxyproline-Glycine	19 *	

TABLEAU III.8

Hydratation de quelques polypeptides en solution

* exprimé en moles d'eau/mole de peptide



- * résidus à chaîne latérale ionisée : de 3 à 7 moles d'eau/
mole résidu
- * résidus à chaîne latérale polaire: de 2 à 4 moles d'eau/
non ionisée ou peu polaire mole résidu
- * résidus à chaîne latérale : \leq 1 mole d'eau/
non-polaire mole résidu

A partir des valeurs ainsi déterminées et en comparant les différents polypeptides entre eux, KUNTZ a pu évaluer le degré d'hydratation du groupe amide (1 mole d'eau/mole) et du groupe hydroxyle (1 mole d'eau/mole), valeurs en bon accord avec celles déterminées par les calculs quantiques^{63,64}. Ceci conduit à attribuer 3 moles d'eau/mole de motif monomère dans le cas de la PHPG, soit 0,31 g/g - valeur proche de la valeur expérimentale obtenue par RMN à l'état "gelé" en solution purement aqueuse¹⁵. C'est cette valeur que nous retiendrons pour la PHEG en solution aqueuse : 3 moles/mole, soit 0,31 g/g.

Lorsque du dioxanne est ajouté à la solution aqueuse de PHPG, le degré d'hydratation mesuré par INOUE et IZUMI¹⁵ baisse de façon sensible et atteint 0,20 g/g pour 60 % en poids de dioxanne. Ceci peut être attribué au fait que, lors de la transition chaîne-hélice induite par l'addition de dioxanne, l'aptitude à l'hydratation des groupes peptidiques diminue du fait de la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires. Ceci est confirmé par de nombreuses études de l'hydratation de chaînes polypeptidiques en fonction du taux d'hélicité^{17,57,65-69}. Il nous a donc paru indispensable de tenir compte d'une diminution de la valeur de A_1 avec une augmentation du % de solvant organique. Nous avons imposé à la valeur de A_1 une diminution identique à celle du degré d'hydratation de la PHPG dans le mélange eau/dioxanne¹⁵ (voir colonne 2 du tableau III.9). Les calculs que nous avons

% en vol. de 2-chloroéthanol	A ₁ g/g	PHEG	A ₃ g/g			
			COPOLY BGln ₄	COPOLY BGln ₇	COPOLY BGln ₁₀	COPOLY BGln ₁₅
10	0,31	0,06	0,07	0,13	0,17	0,05
20	0,28	0,17	0,22	0,21	0,26	0,29
30	0,25	0,20	0,34	0,33	0,39	0,64
40	0,24	0,23	0,23	0,27	0,48	0,60
50	0,23	0,03	0,06	0,29	0,46	0,61
60	0,21	0,09	0,03	0,28	0,22	0,54
80	0,20	0,86	0,25			

TABLEAU III.9

Détermination de A₃ : calcul n° 1



effectués montrent que l'amplitude de la diminution de A_1 ne modifie pas de façon critique la valeur de A_3 , pour peu que l'on se maintienne dans des limites raisonnables.

Nous avons également calculé la valeur de A_3 pour les différents copolymères, en gardant la même valeur de A_1 dans chaque cas (voir tableau III.9 et figure III.10). Ceci constitue le calcul n° 1.

Les travaux de KUNTZ cités au paragraphe précédent ont montré que les polypeptides à chaîne latérale non polaire sont très faiblement hydratés en solution aqueuse (≤ 1 mole d'eau/mole). Ainsi, l'introduction d'un groupement phénylique s'accompagne de la baisse du degré d'hydratation de 1 mole/mole de résidu, si l'on compare, par exemple, les degrés d'hydratation de la poly-L-Alanine et de la poly-L-phénylalanine. On pourrait alors considérer que le degré d'hydratation du résidu (BGl_n) est de $3 - 1 = 2$ moles d'eau/mole, soit 0,16 g/g.

Si on considère que les degrés d'hydratation des copolymères sont une fonction linéaire de leur composition, on écrira :

$$A_1 = A_1' (1-x) + A_1'' x$$

où A_1' et A_1'' représentent, respectivement, les degrés d'hydratation d'un motif (HEG) et d'un motif (BGl_n) pour une même composition du mélange de solvant, et x la fraction pondérale de motifs (BGl_n) dans le copolymère. Les valeurs de A_1' sont celles utilisées dans le calcul n° 1 et $A_1'' = 0,16$ g/g. Ceci constitue alors le calcul n° 2. On constate (voir figure III.10) que les valeurs de A_3 ainsi calculées sont peu différentes de celles obtenues par le premier calcul : pour un polymère donné, l'allure de la variation de A_3 n'en est pas modifiée.

Remarque. Si l'on veut tenir compte du caractère plus hydrophile de la PHEG, on peut augmenter la valeur du degré d'hydratation de 3 à 3,5 ou 4 moles d'eau/mole. La variation de

A_3 avec la composition du mélange de solvant reste parallèle à celle représentée sur la figure III.10.

VARIATION DE L'ADSORPTION ABSOLUE PAR LE 2-CHLOROÉTHANOL

Les variations de A_3 avec la composition du mélange de solvant montrent (figure III.10), pour la PHEG et les copolymères (HEG-co-BGln) les caractéristiques communes suivantes : lorsque la concentration en 2-chloroéthanol augmente, la valeur de A_3 augmente régulièrement dans un premier temps, passe par un maximum puis diminue. Passé le minimum (non observé dans le cas des copolymères BGln₇, BGln₁₀ et BGln₁₅), A_3 augmente à nouveau.

On n'observe pas, comme dans le cas des protéines globulaires⁴⁷, d'augmentation régulière de A_3 avec la concentration en solvant organique. INOUE et TIMASHEFF⁴⁷ avaient choisi des valeurs croissantes pour A_1 , afin de tenir compte de l'exposition graduelle de résidus d'acides aminés hydrophiles, placés dans la zone interne de la protéine, lors de la dénaturation restructurante par le solvant organique. Dans ces conditions, le produit $A_1 g_3$ croît plus vite que $(\frac{\partial g_3}{\partial g_2})_{\mu_1, \mu_3}$. Si, dans notre cas, nous calculons A_3 à partir de valeurs croissantes de A_1 (0,30 à 0,40 g/g au lieu de 0,30 à 0,20 g/g), les minima s'estompent et un palier apparaît à partir de 40 % en 2-chloroéthanol. Mais nous ne pouvons pas appliquer cette méthode aux polypeptides : il n'existe pas, à l'état natif, de zone interne "soustraite" au solvant, comparable à celle des protéines globulaires. Il y aurait alors une structure compacte, dont il faudrait démontrer l'existence par des techniques viscosimétriques. En outre, il faut tenir compte de la baisse du degré d'hydratation avec la structuration en hélice α . Dans le système PHPG/eau/dioxanne, INOUE et IZUMI¹⁵ ont observé par RMN une augmentation de A_3 aux faibles concentrations en dioxanne, et un palier ensuite. Il faut noter que, dans ce système, le dioxanne est très peu adsorbé :

$A_3 \leq 0,05$ g/g, soit 0,1 mole/mole. Ceci dénote que les interactions PHPG/dioxanne sont défavorisées au profit des interactions PHPG/eau - d'où l'hydratation préférentielle observée. Par contre, A_3 atteint 2 moles/mole dans le système PHPG/eau/2-chloroéthanol⁴⁵. Il apparaît donc que la PHPG possède plus d'affinités pour le 2-chloroéthanol que pour le dioxanne. Dans le cas de la PHEG, A_3 atteint 0,4 moles/mole : les interactions solvant non-polaire/polypeptide sont plus faibles pour le polypeptide plus hydrophile. Ceci est confirmé dans le cas des copolymères (HEG-co-BGln) : la valeur maximale de A_3 située à 30 - 40 % de 2-chloroéthanol est d'autant plus importante que le copolymère est plus riche en motifs hydrophobes (BGln) (fig. III.10) ; on retrouve là les interactions solvant non-polaire/sites hydrophobes du polypeptide dénotées au § III.6.2.

Nous avons tenté de trouver une relation entre les valeurs expérimentales de A_3 et la composition des copolymères, en traçant A_3 en fonction du taux de (BGln), pour les différents mélanges eau/2-chloroéthanol. Les points expérimentaux obtenus sont difficilement exploitables en vue de l'établissement d'une relation linéaire. Par contre, la valeur maximale située à 30 - 40 % de 2-chloroéthanol paraît être une fonction linéaire du taux de (BGln) (figure III.11). On aurait alors :

$$A_3^{\text{exp}} = A_3^{\text{HEG}} (1-x) + A_3^{\text{BGln}} x$$

où A_3^{HEG} et A_3^{BGln} représentent, respectivement, la solvation maximale par le 2-chloroéthanol sur un motif (HEG) et (BGln) et x la fraction pondérale en motifs (BGln). Graphiquement, on peut alors déterminer A_3^{BGln} : $A_3 \sim 2$ g/g soit 5 moles/mole. Il y a donc une affinité marquée des motifs (BGln) pour le 2-chloroéthanol. Cette relation indique que les deux motifs des copolymères agissent indépendamment les uns des autres du point de vue de la solvation maximale. Le fait que l'on ne retrouve pas cet effet

valeur maximale de A_3 située à 30 - 40 % de
2-chloroéthanol, en g/g.

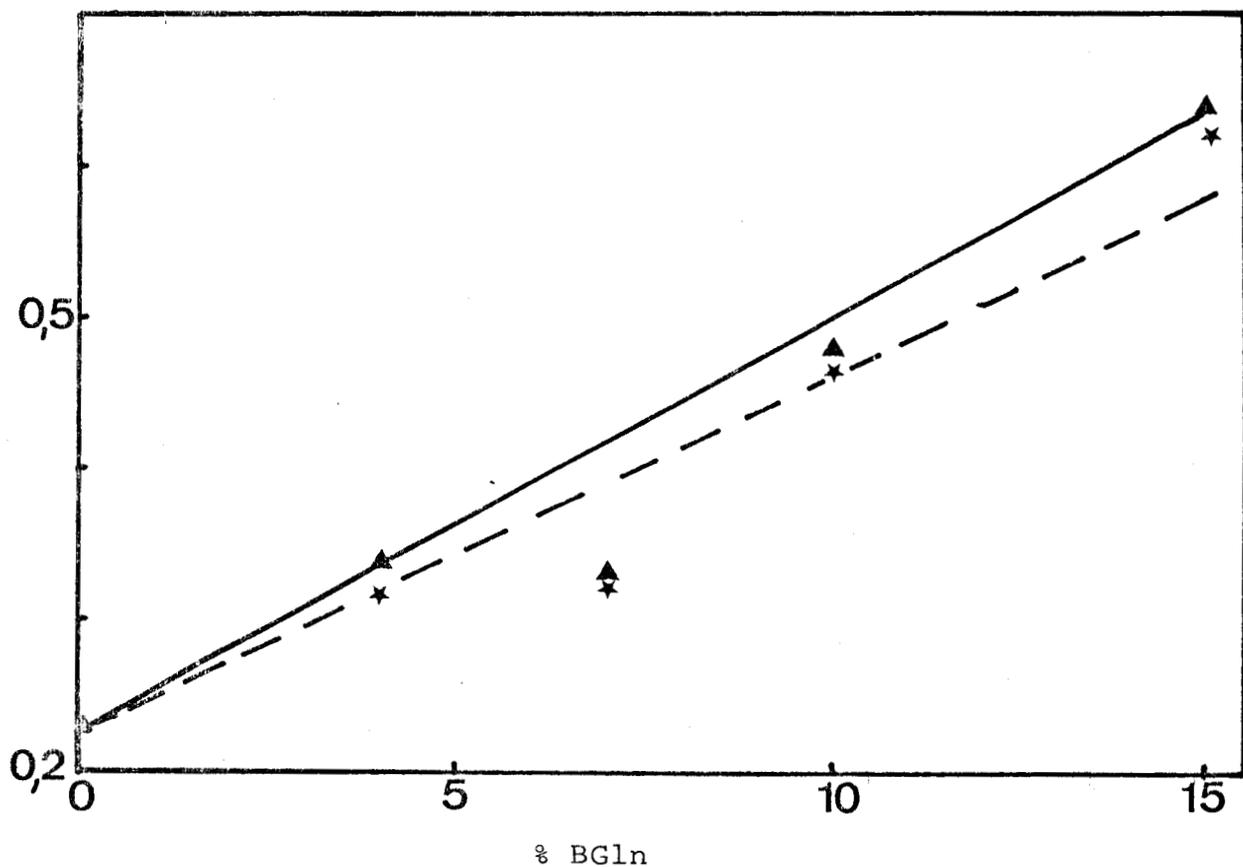


FIGURE III.11

Variation de la valeur maximale de A_3 , située à 30/40 % en vol. de 2-chloroéthanol, en fonction de la composition des polymères en motifs (BGl n).



— calcul N° 1
- - - calcul N° 2

dans tous les domaines de composition du mélange de solvants donne la limite d'une telle interprétation.

Cependant, l'allure de la variation de A_3 permet de retrouver ce que nous avons observé au § III.6.2. : les interactions solvant hydrophobe/polypeptide apparaissent être en relation avec l'hydrophobie du polypeptide mesuré par sa composition en résidus (BGln).

III.7. INTERACTIONS POLYPEPTIDE - MELANGE DE SOLVANT ET TRANSITION CHAINE-HELICE

La nature et l'importance des interactions déterminant la stabilité conformationnelle des protéines et des polypeptides en solution ont été étudiées aussi bien d'un point de vue expérimental^{1,47,70-74} que d'un point de vue théorique^{71,75-78}. Ces travaux ont montré que, dans une large mesure, la structure des chaînes polypeptidiques en solution était fonction de la structure du solvant et, à partir de là, de la nature des interactions chaîne polypeptidique/solvant. La mise au point de la théorie et des techniques expérimentales permettant de déterminer la composition de la couche de solvatation (§ III.2 à III.4) en termes d'adsorption préférentielle et absolue a permis d'étudier la dénaturation restructurante des chaînes polypeptidiques en relation avec la variation de leurs interactions avec les constituants des mélanges eau/dénaturant (solvant organique ou détergent)^{1,6-10,14-17,26,28,40,45}.

VARIATION DE L'ADSORPTION PREFERENTIELLE AVEC LA FRACTION D'HELICE α

Lorsque l'on trace la variation de l'adsorption préférentielle en fonction de la fraction d'hélice (déterminée dans chaque mélange de solvant, à partir des données du ch. II), on constate (figure III.12) que l'allure générale des courbes représentatives est sensiblement identique à celles représentées sur la figure (III.7).

$$\left(\frac{\partial m_3}{\partial m_2}\right)_{\mu_1, \mu_3}$$

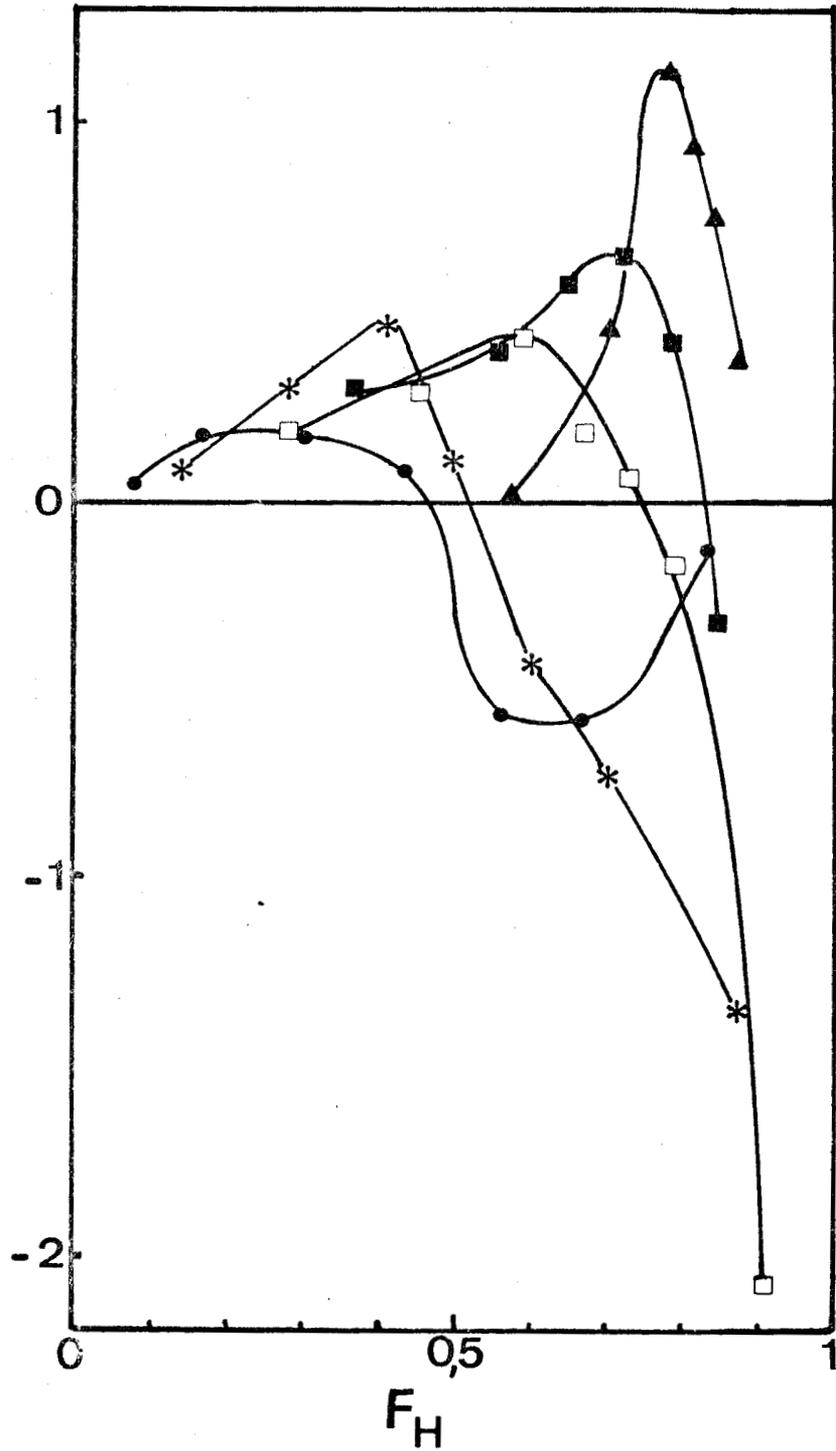


FIGURE III.12

Variation de l'adsorption préférentielle molaire en fonction de la fraction d'hélice f_H dans les mélanges eau/2-chloroéthanol. (Mêmes symboles que pour la figure III.10).

Pour les copolymères, les courbes sont déplacées les unes par rapport aux autres, ce qui traduit le fait que, dans chaque mélange de solvant, la fraction d'hélice α est plus importante lorsque le taux de (BGln) est plus grand. Pour une fraction d'hélice donnée, l'adsorption préférentielle est d'autant plus importante que le copolymère est plus riche en résidus (BGln).

Lorsque l'on trace :

- la variation de l'adsorption préférentielle en fonction du taux en résidus (BGln) pour une fraction d'hélice α donnée

- la variation de l'adsorption préférentielle en fonction de la fraction d'hélice pour un mélange de solvant donné,

les courbes représentatives obtenues ne permettent pas d'établir une relation simple entre la composition du mélange de solvants, la fraction d'hélice α des polypeptides, l'adsorption préférentielle et la composition des copolymères.

Par contre, la fraction d'hélice atteinte par les polypeptides à la valeur maximale positive de l'adsorption préférentielle et au point d'inversion, montre (figure III.13) une variation croissante avec la teneur en résidus (BGln). Dans le premier cas, la valeur positive maximale de l'adsorption préférentielle étant située à des concentrations en 2-chloroéthanol voisines, la variation observée traduit plutôt l'accroissement de la fraction d'hélice due à l'effet des interactions hydrophobes.

En résumé, l'allure des courbes représentées sur les figures III.12 et III.13 démontre que l'adsorption préférentielle n'est pas une fonction directe de la conformation de la macromolécule ; au vu des résultats discutés au § III.6, il apparaît que le facteur déterminant soit la composition du mélange de solvants (et les propriétés de celui-ci). Rappelons

f_H correspondant à la valeur maximale de $(\frac{\partial \mu_3}{\partial m_2})_{\mu_1, \mu_3} > 0$

f_H au point d'inversion de l'adsorption préférentielle.

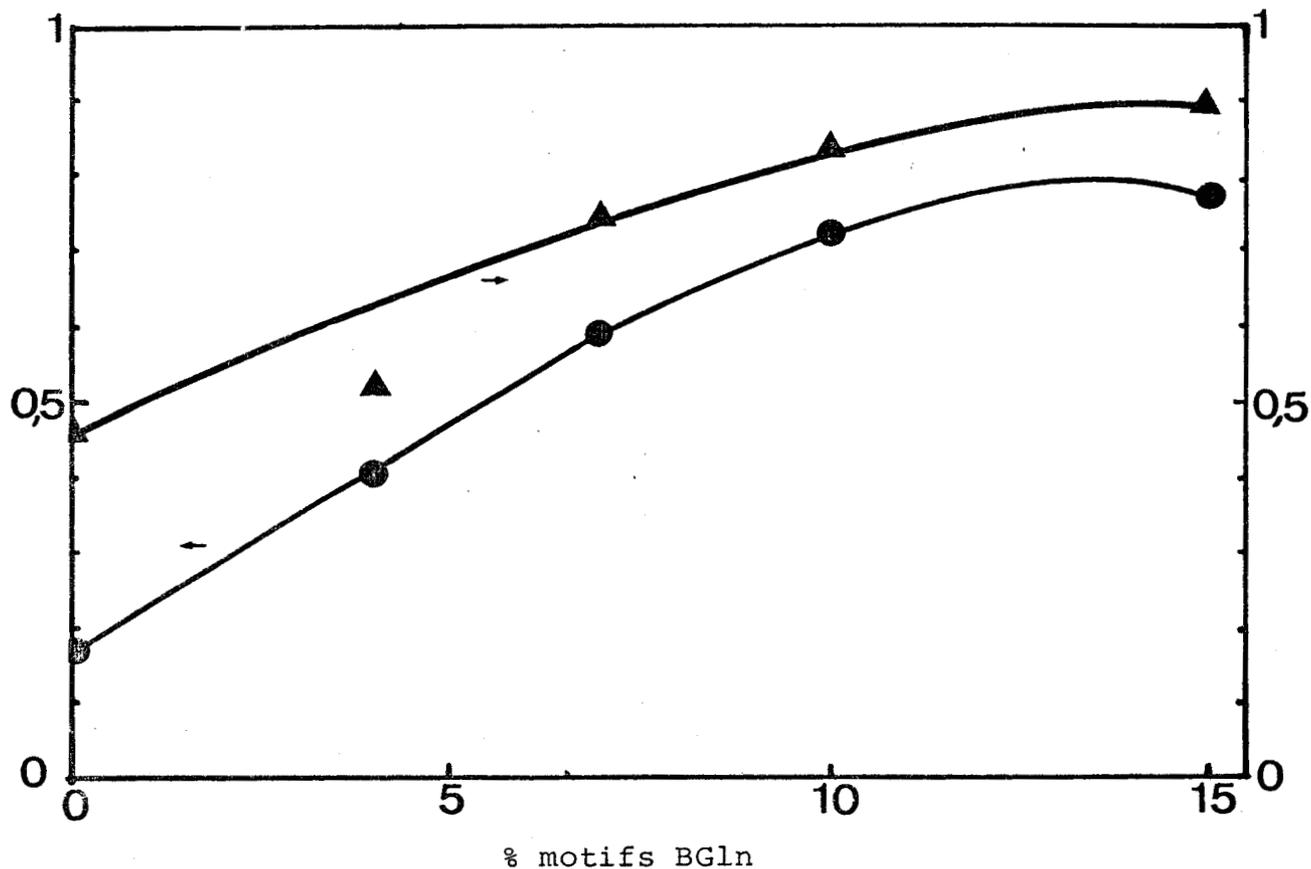


FIGURE III.13

Variation de la fraction d'hélice :

- correspondant à la valeur maximale positive de l'adsorption préférentielle (—●—)
 - correspondant au point d'inversion de l'adsorption préférentielle (—▲—)
- en fonction de la teneur en motifs (BGl).



que, pour la poly(L-Lysine HBr)¹⁶, en l'absence de tout changement conformationnel, ce sont les différences d'affinité du polypeptide avec les deux constituants du mélange de solvants qui déterminent la valeur de l'adsorption préférentielle.

VARIATION DE LA SOLVATATION ABSOLUE AVEC LA FRACTION D'HELICE α

On retrouve, dans la variation de la solvatisation absolue A_3 en fonction de la fraction d'hélice α , (figure III.14), les variations observées au § III.6.3. , si ce n'est que les courbes sont déplacées les unes par rapport aux autres, traduisant les différences de conformation entre les polypeptides. La valeur de la fraction d'hélice, f_H , pour laquelle on observe la valeur maximale de A_3 semble être une fonction linéaire de la composition des copolymères (figure III.15). Ceci traduit l'augmentation de f_H avec l'hydrophobie des polypeptides dans la zone de concentration en 2-chloroéthanol où est située la valeur maximale de A_3 (figure III.10).

En résumé, l'allure de la variation de l'adsorption préférentielle et absolue avec la fraction d'hélice α montre que la transition conformationnelle et les interactions polypeptide/solvant ne sont pas en relation directe. Nous avons vu, au ch. II, comment la transition chaîne-hélice pouvait s'expliquer en relation avec les propriétés de l'eau et du 2-chloroéthanol. Il s'agit maintenant d'étendre le schéma explicatif donné au ch. II aux variations des interactions polypeptide/mélange de solvants.

RELATION DE LA TRANSITION CONFORMATIONNELLE INDUITE PAR LA VARIATION DE LA COMPOSITION DU MELANGE EAU/2-CHLOROETHANOL AVEC LES INTERACTIONS POLYPEPTIDE/SOLVANTS.

Les premières études menées par INOUE et TIMASHEFF sur les interactions des protéines globulaires avec les mélanges eau/2-chloroéthanol^{1,6-9,47} ont montré qu'une

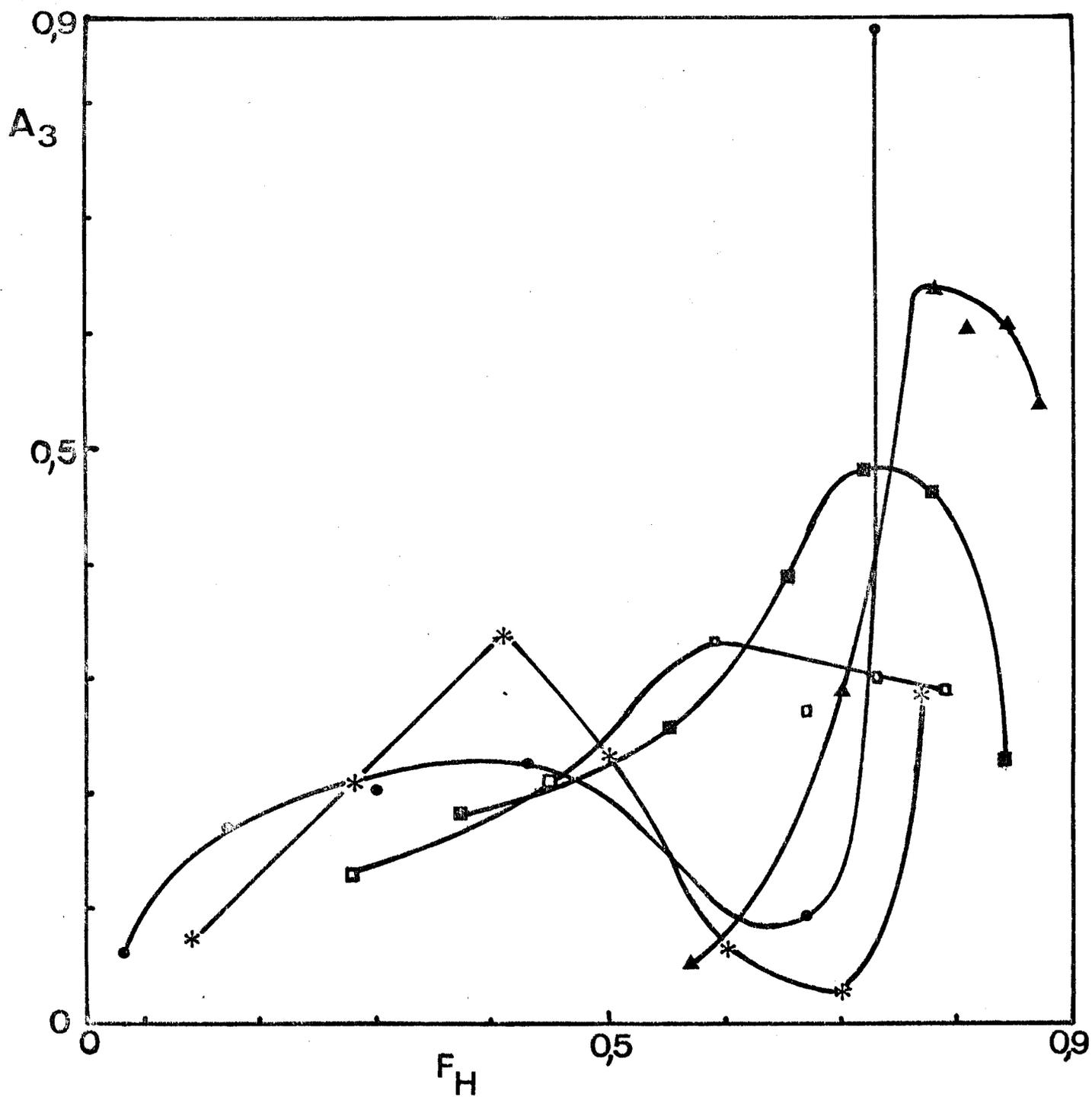


FIGURE III.14

Variation de la solvation absolue A_3 (calcul N° 1) avec la fraction d'hélice α (mêmes symboles que pour la figure III.10).

f_H pour laquelle
 A_3 est maximale

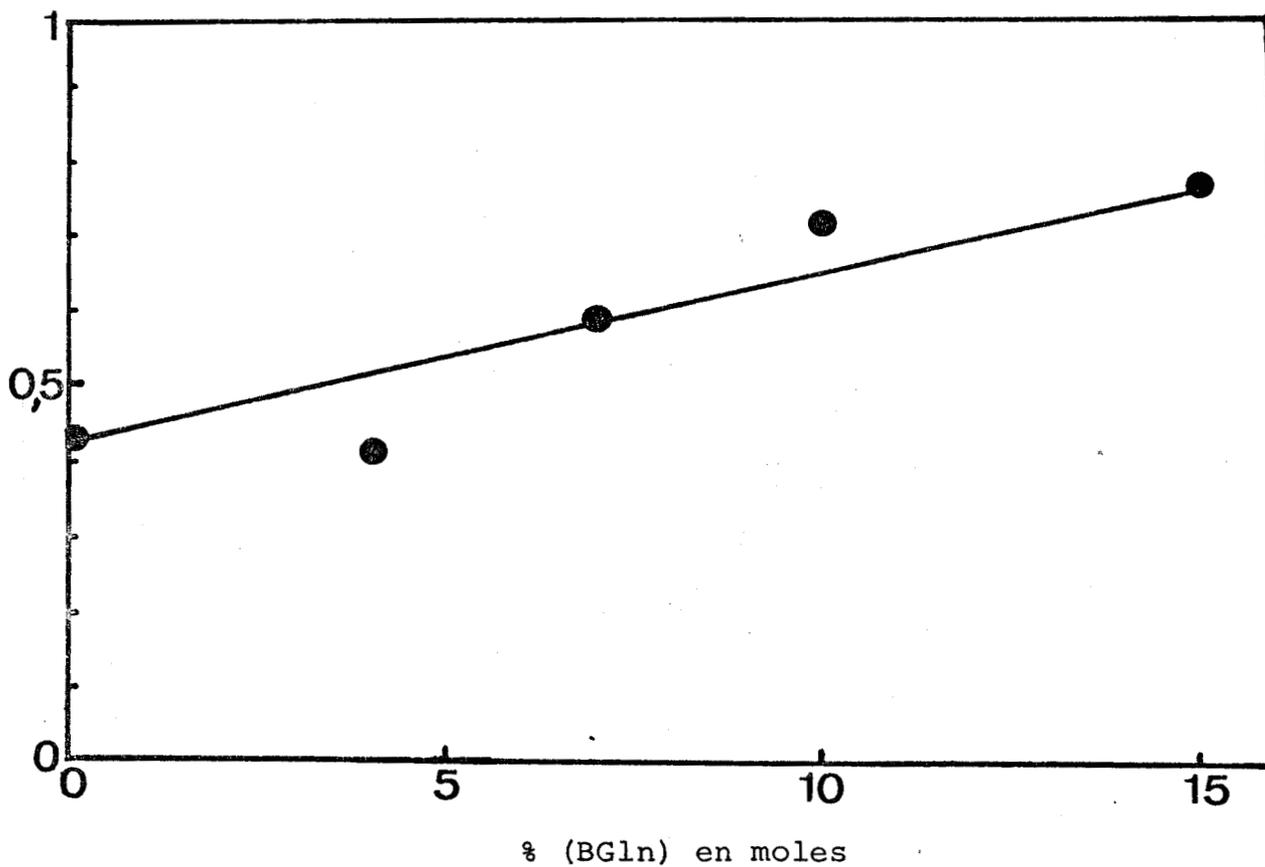


FIGURE III.15

Variation de la fraction d'hélice f_H correspondant à la valeur maximale de la solvatation absolue (située à 30 - 50 % en vol. de 2-chloroéthanol) en fonction de la teneur en motifs (BGln).

solvatation par le solvant organique accompagnait la dénaturation restructurante des protéines (cf. § III.6). Ils avaient interprété leurs observations de la manière suivante : les liaisons peptidiques possèdent une plus grande affinité pour l'eau que pour le solvant organique ; cette propriété explique la structuration en hélice des chaînes polypeptidiques lors de l'addition du solvant organique : les liaisons hydrogène intrapeptidiques prennent le pas sur les liaisons hydrogène eau/liaison peptidique *. On observe alors, aux faibles concentrations en 2-chloroéthanol, une solvatation de faible ampleur. Au fur et à mesure que la protéine se structure, les résidus d'acides aminés constitutifs de la zone interne hydrophobe sont progressivement mis en contact avec le mélange de solvants. Si l'on admet que les résidus hydrophobes ont une plus grande affinité pour le solvant non-polaire que pour l'eau, la structuration de la protéine va s'accompagner d'une augmentation des contacts résidus hydrophobes/solvant non-polaire, d'où une augmentation très nette de la solvatation absolue par le 2-chloroéthanol (de 0,13 g/g à 1 g/g pour le cas de la β -Lactoglobuline A dans 5 à 40 % en 2-chloroéthanol ⁴⁷). Lorsque la plus grande partie de cette zone interne de la protéine s'est structurée ($f_H \geq 0,5$), l'étendue des contacts résidus hydrophobes/solvant non-polaire n'augmente presque plus, et on assiste à un palier dans la variation de A_3 (1,004 g/g à 1,093 g/g pour 40 à 80 % en 2-chloroéthanol (voir figure III.16). Les différences de variation de l'adsorption préférentielle dans les systèmes protéines globulaires/eau/méthoxyéthanol et eau/éthylène glycol avaient été interprétées par INOUE et TIMASHEFF comme provenant de différences d'affinités de ces solvants pour les chaînes polypeptidiques. Ceci est confirmé par l'étude de la poly(L-Lysine HBr) dans différents mélanges de solvants ¹⁶ et par l'étude de la PHPG dans deux mélanges eau/solvant organique ^{15,45}.

* nous avons discuté ce mécanisme au § II.3.2.

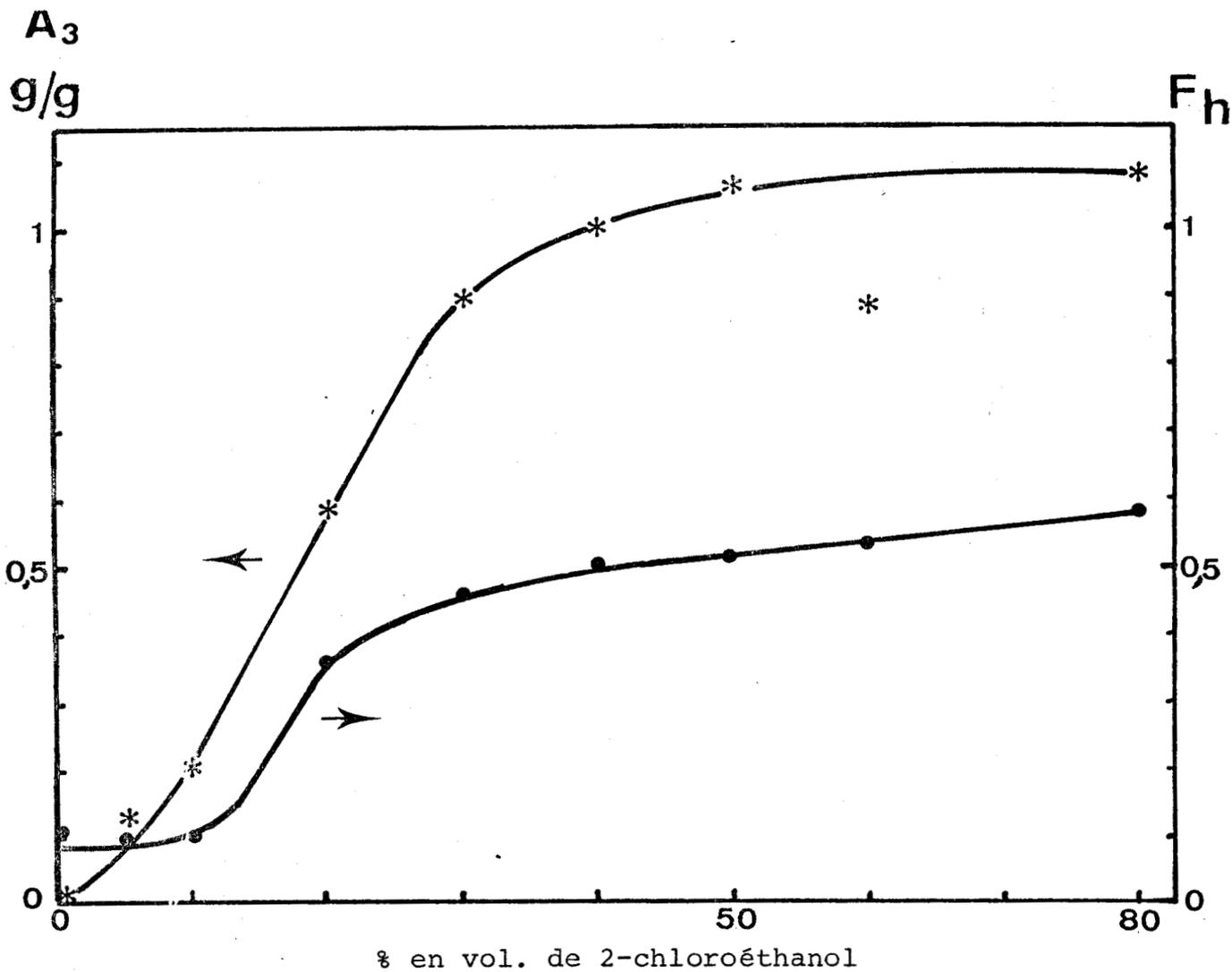


FIGURE III.16

Variation de la solvation absolue A_3 et de la fraction d'hélice f_H de la β -Lactoglobuline A en fonction de la composition du mélange eau/2-chloroéthanol (d'après INOUE et TIMASHEFF⁴⁷).

L'addition de 2-chloroéthanol à une solution aqueuse de PHEG provoque une baisse de l'activité de l'eau et un environnement favorable à la structuration de la chaîne polypeptidique. Il y a alors déficit d'eau dans la couche de solvatation du polymère; mais l'absence de sites véritablement hydrophobes sur la PHEG empêche une solvata-tion importante par le solvant organique. Lorsque le poly-mère se structure, les fortes interactions entre l'eau résiduelle du mélange de solvants et la chaîne latérale hydrophile du polypeptide prennent le pas sur les plus faibles interactions polymère/2-chloroéthanol : A_3 diminue devant A_1 et on observe une hydratation préférentielle sur la PHEG. Le fait que l'hydratation préférentielle ne s'ob-serve qu'à fraction d'hélice $\geq 0,5$ peut s'expliquer aussi par une plus faible affinité pour le 2-chloroéthanol des résidus sous forme hélicoïdale que sous forme désordonnée ; au aurait donc, schématiquement, la superposition de plu-sieurs effets :

- des interactions eau/liaison peptidique qui di-minuent lors de l'addition de 2-chloroéthanol et par suite de la structuration de la PHEG ;

- des interactions eau/chaîne latérale hydrophile importantes ;

- des interactions 2-chloroéthanol /PHEG, de fai-ble ampleur, diminuant lors de la structuration de la PHEG en hélice α ($f_H \geq 0,5$).

Dans le cas de la PHPG ⁴⁵, on observe également une hydratation préférentielle lorsque $f_H \geq 0,5$. On aurait donc, lorsque le polypeptide est essentiellement sous forme dé-sordonnée ($f_H < 0,5$) une solvatation par le 2-chloroéthanol, qui est plus importante dans le cas de la PHPG, polymère plus hydrophobe que la PHEG.

Dans le cas de la PHEG et de la PHPG, il y a donc une variation parallèle de la transition chaîne-hélice et de l'adsorption préférentielle : l'addition de 2-chloroéthanol

entraîne une stabilisation de l'hélice α , qui est d'autant plus rapide que le polymère est plus hydrophobe. Ce phénomène s'accompagne d'une adsorption de 2-chloroéthanol sur le polymère, qui est d'autant plus forte que le polymère est plus hydrophobe. Cette adsorption de solvant organique diminue lorsque le polypeptide est essentiellement sous forme hélicoïdale.

Dans le cas de la PHPG, on n'observe qu'une faible solvation par le dioxanne¹⁵; corrélativement, il faut plus de dioxanne pour induire la transition conformationnelle: 40 % de dioxanne et 25 % de 2-chloroéthanol à la demi-transition. Ceci confirme l'existence d'une corrélation entre l'ampleur des interactions solvant non-polaire/polypeptide et le pouvoir hélicogène du solvant non-polaire.

Dans le cas des copolymères (HEG-co-BGln), nous observons également une augmentation des interactions polypeptide/2-chloroéthanol lorsque le polypeptide est plus hydrophobe; cependant, elles s'étendent au-delà de $f_H = 0,5$, contrairement au cas de la PHEG et de la PHPG (figure III.12). Nous avons vu (figure III.8) qu'il existait une relation linéaire entre la teneur en motifs (BGln) des copolymères et la concentration en 2-chloroéthanol à laquelle il y a inversion du signe de l'adsorption préférentielle, et (figure III.11) la teneur en (BGln) et la valeur maximale de A_3 . Les interactions spécifiques du 2-chloroéthanol avec le groupe benzylique du résidu (BGln) pourraient être responsables alors du maintien de l'adsorption préférentielle par le solvant organique. Dans le cas des copolymères, le point d'inversion n'est plus situé à la demi-transition, mais varie en sens inverse (figure III.17) du sens de variation de la quantité de 2-chloroéthanol requise pour atteindre $f_H = 0,5$. Corrélativement, l'hydratation préférentielle (traduisant une baisse de A_3) a lieu à des fractions d'hélice d'autant plus importantes que le copolymère est plus hydrophobe, traduisant l'influence prépondérante des interactions hydrophobes dues aux résidus non-polaires sur l'hydrophilie des résidus (HEG).

f_H correspondant à la valeur maximale positive de l'adsorption préférentielle

f_H correspondant au point au point d'inversion de l'adsorption préférentielle

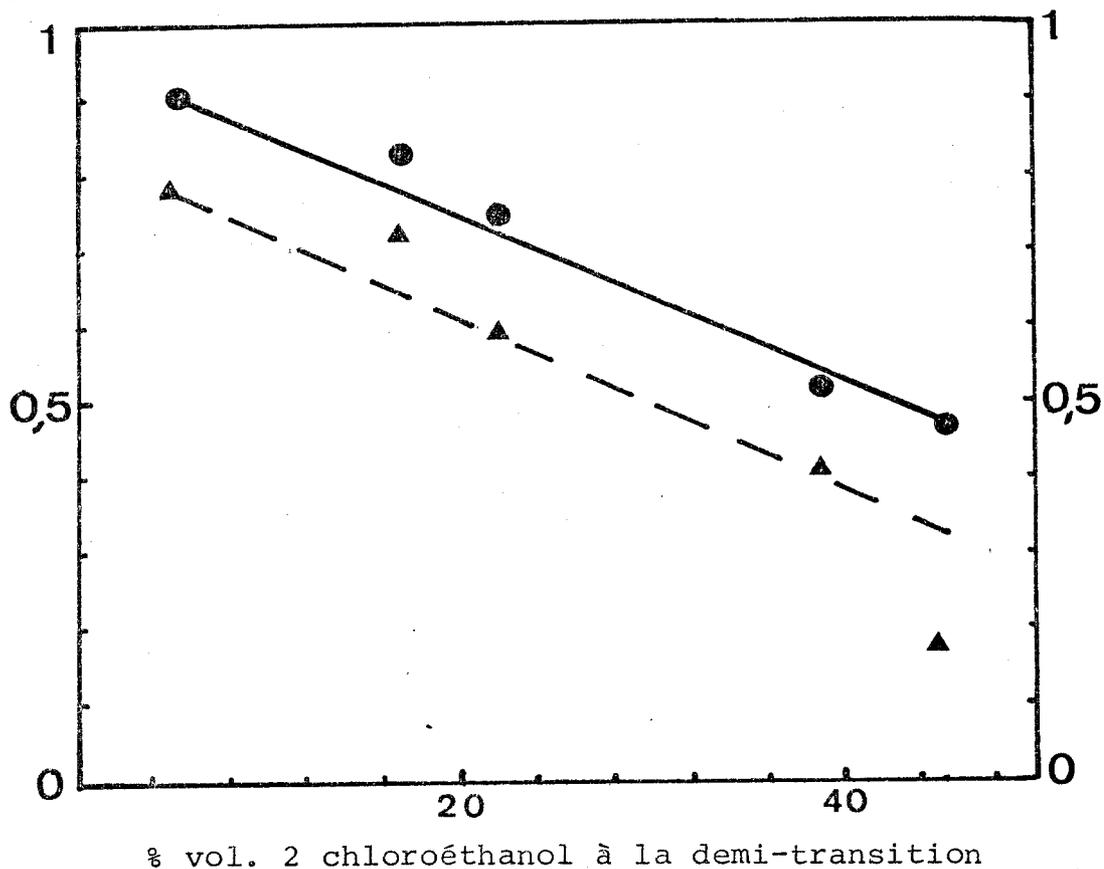


FIGURE III.17

Variation de f_H correspondant à la valeur maximale positive de l'adsorption préférentielle (---▲---) et au point d'inversion de l'adsorption préférentielle (—●—).



Rappelons que les modèles théoriques de l'interaction hydrophobe (cf. annexe du ch. II) font intervenir, lorsque l'on ajoute un solvant non-polaire, une diminution des interactions entre chaînes latérales non-polaires, qui deviennent tout aussi favorables que leurs interactions avec le solvant non-polaire. Ceci pourrait expliquer également l'adsorption croissante de 2-chloroéthanol aux faibles concentrations en solvant organique ; au vu des résultats consignés sur les fig. III.7, III.10, III.12 et III.14, ceci est indépendant de la conformation du polypeptide. Le fait que le maximum des interactions 2-chloroéthanol/polypeptide soit situé dans une même zone de composition du mélange de solvants, indique que ce maximum doit être relié aux propriétés particulières du mélange eau/2-chloroéthanol. Au-delà du maximum, la structuration du polymère entraîne une diminution de A_3 : le maximum est situé près de $f_H = 0,5$ pour la PHEG. Dans le cas des copolymères, la présence des résidus hydrophobes impose un maintien des interactions avec le solvant organique : le point d'inversion de l'adsorption préférentielle est reculé vers des % en 2-chloroéthanol et des f_H toujours plus grands.

III.8. CONCLUSION

L'étude de la variation de l'adsorption préférentielle et absolue avec la composition du mélange eau/2-chloroéthanol et avec la composition des copolymères a clairement montré la dépendance des interactions du solvant non-polaire avec la teneur en motifs monomères non-polaires. Nous avons pu établir que le 2-chloroéthanol interagissait spécifiquement, et de manière quantitative, avec les sites hydrophobes des copolymères.

Dans le cas de la PHEG et de la PHPG, les interactions polypeptide/2-chloroéthanol diminuent lorsque le polymère devient essentiellement hélicoïdal : les résidus d'acides aminés, sous forme d'hélice α , sont moins solvatés

que sous forme désordonnée. Le 2-chloroéthanol apparaît donc comme un solvant "inerte" ⁷⁴ vis-à-vis de l'hélice α . Par contre, on observe un maintien des interactions du 2-chloroéthanol avec les résidus (BGln), même lorsque le polymère est essentiellement sous forme structurée. L'effet stabilisant du 2-chloroéthanol sur la conformation hélicoïdale se superpose aux effets stabilisants des interactions hydrophobes :

- dans la zone de concentration de 2-chloroéthanol où la structuration des polymères en hélice α est la plus rapide (0 - 40 % en vol.) (fig. II.5 et II.6), l'adsorption du 2-chloroéthanol croît rapidement et atteint sa valeur maximale, et ceci quelle que soit la fraction d'hélice du copolymère dans l'eau pure (fig. III.7, III.10, III.12 et III.14) ; l'amplitude de ce phénomène est fonction de l'hydrophobie du polypeptide.

Ce phénomène doit être relié à une substitution des interactions hydrophobes entre chaînes latérales non-polaires au profit d'interactions hydrophobes avec le solvant organique.

- dans la zone de concentration située au-delà, on observe une baisse des interactions polypeptide/2-chloroéthanol, lorsque le polymère est essentiellement sous forme structurée. Cette diminution est contrebalancée par des interactions hydrophobes spécifiques entre groupes chimiques non-polaires.

1. S.N. TIMASHEFF
Accts. Chem. Res. 3, 62 (1969).
2. G. SCATCHARD
J. Am. Chem. Soc. 68, 2315 (1946).
3. W.H. STOCKMAYER
J. Chem. Phys. 18, 58 (1950).
4. B.E. READ
Trans. Faraday Soc. 56, 382 (1960).
5. C. STRAZIELLE et H. BENOIT
J. Chem. Phys. 58, 675 (1961).
6. S.N. TIMASHEFF et H. INOUE
Biochemistry 7, 2501 (1968).
7. H. INOUE et S.N. TIMASHEFF
Adv. Chem. Ser. 84, 12 (1968).
8. H. INOUE et S.N. TIMASHEFF
J. Am. Chem. Soc. 90, 1890 (1968).
9. H. INOUE et S.N. TIMASHEFF
Proc. Colloq. Prot. Biol. Fluids 16, 41 (1969).
10. C. STRAZIELLE, C. DUFOUR et E. MARCHAL
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris C 271, 720 (1970).
11. E.F. CASASSA et H. EISENBERG
J. Phys. Chem. 65, 427 (1961).
12. E.F. CASASSA et H. EISENBERG
Adv. Prot. Chem. 19, 287 (1964).
13. M.E. NOELKEN
Biochemistry 9, 4122 (1970).
14. M. MORCELLET et C. LOUCHEUX
Polymer 16, 401 (1975).
15. H. INOUE et T. IZUMI
Biopolymers 15, 797 (1976).

16. J. KOMIYAMA, T. MORI, K. YAMOMOTO et T. IIJIMA
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I 73, 203 (1977).
17. N. MURAI et S. SUGAI
Biopolymers 13, 1195 (1974).
18. H. EISENBERG
J. Chem. Phys. 36, 1837 (1962).
19. D.J. COX et V.N. SCHUMAKER
J. Am. Chem. Soc. 83, 2433 (1961).
20. J.B. LEFFT et J. VINOGRAD
J. Phys. Chem. 70, 2814 (1966).
21. S. LUNDH
J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed. 15, 733 (1977).
22. R. ALMASSY, et al.
Biopolymers 12, 2713 (1973).
23. D.S. SHARP, et al.
Biopolymers 15, 757 (1976).
24. H. INOUE
Polymer 14, 502 (1973).
25. E. MAES
Biopolymers 15, 293 (1976).
26. H. STRASSMAIR, J. ENGEL et G. ZUNDEL
Biopolymers 8, 237 (1969)
Biopolymers 10, 1759 (1971).
27. S. SUBRAMANIAN et H.F. FISHER
Biopolymers 11, 1305 (1972).
28. P. COMBELAS, C. GARRIGOU-LAGRANGE et J. LASCOMBE
Biopolymers 12, 611 (1973).
29. S. BROWNSTEIN, S. BYWATER et J.H. COWIE
J. Chem. Soc. Faraday Trans. 9, 2480 (1969).
30. R.G. BRUSSAU et H. SILLESCU
Ber. Bunsen Gesellsch. Phys. Chem. 76, 31 (1972).

31. L. GROSCH et F. NOACK
Biochim. Biophys. Acta 453, 218 (1976).
32. F. LAFUMA, B. CHAUFER et C. QUIVORON
Compt. Rend. Acad. Sc i Paris C 283, 183 (1976).
33. D. DEREK, T. BLEHA et Z. PEVNA
J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed., 14, 323 (1976).
34. B. PORSCH et H. KUBIN
Coll. Czech. Chem. Comm. 41, 862 (1976).
35. E.P. KIRBY MADE et C. TANFORD
J. Am. Chem. Soc. 89, 5034 (1967).
36. S.N. TIMASHEFF
Adv. Chem. Ser. 125, 327 (1973).
37. G. COHEN et H. EISENBERG
Biopolymers 6, 1077 (1968).
38. E. REISLER et H. EISENBERG
Biochemistry 8, 4572 (1969).
39. J.C. LEE et S.N. TIMASHEFF
Arch. Biochem. Biophys. 165, 268 (1974).
40. J.C. LEE et S.N. TIMASHEFF
Biochemistry 13, 257 (1974).
41. J.C.C. FU et D.W. GRUENWEDEL
Biopolymers 15, 265 (1976).
42. E. REISLER, Y. HAIK et H. EISENBERG
Biochemistry 16, 197 (1977).
43. S.N. TIMASHEFF, et al.
J. Colloid. Interface Sci. 55, 658 (1976).
44. S.N. TIMASHEFF
Adv. Chem. Ser. 125, 327 (1973).
45. C. FEYEREISEN, M. MORCELLET et C. LOUCHEUX
Macromolecules 10, 485 (1977).

46. C. TANFORD
J. Mol. Biol. 39, 539 (1969).
47. H. INOUE et S.N. TIMASHEFF
Biopolymers 11, 737 (1972).
48. O. KRATKY, H. LEOPOLD et H. STABINGER
Methods in enzymology vol. XXVII, p. 98.
C.H.W. HIRS et S.N. TIMASHEFF Ed. Academic Press (1973).
49. C.H. ROCHESTER et A.V. WESTERMAN
J. Chem. Soc. Farad. Trans. I. 72, 2753 (1976).
50. M.R. EFTINK, J.L. ZAJICEK et C.A. GHIRON
Biochim. Biophys. Acta 491, 473 (1977).
51. D. GHESQUIERE
Thèse de 3ème cycle. Lille 1973.
52. M. MANDEL et M.G. STADHOUDER
Makromol. Chem. 80, 141 (1964).
53. J.D. CROWLEY, G.S. TEAGUE et J.W. LOWE
J. Paint. Technol. 38, 269 (1966).
G.C. PIMENTEL et A.L. McCLELLAN
The hydrogen bond, Freeman and Co. (1960).
J.K. CRAVER
J. Appl. Polym. Sci. 14, 1755 (1970).
54. B. CARTON, V. BOTTIGLIONE, M. MORCELLET et C. LOUCHEUX
Publication soumise à "Die Makromolekulare Chemie".
55. V. BOTTIGLIONE
Thèse 3ème cycle Lille 1978.
56. I.D. KUNTZ, et al.
Science 163, 1329 (1969)
I.D. KUNTZ
J. Am. Chem. Soc. 93, 514 (1971)
I.D. KUNTZ et T.S. BRASSFIELD
Arch. Biochem. Biophys. 142, 660 (1971)
I.D. KUNTZ et W. KAUFMANN
Adv. Prot. Chem. 28, 239 (1974).

57. M. MORCELLET
Thèse Sc. Phys. Lille 1977.
58. C. TANFORD
Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley and Sons
(1961).
59. W. ANDEREGG, W. BEEMAN, S. SHULMAN et P. KAESBURG
J. Am. Chem. Soc. 77, 2927 (1955).
60. R. JAENICKE et M.A. LAUFER
Biochemistry 8, 3077 (1969).
61. F.J. MILLERO, G.K. WARD et P. CHETIRKIN
J. Biol. Chem. 251, 4001 (1976).
62. S.K. SADYKHOVA et I.Y. ELPINER
Biophysics 14, 590 (1969).
63. A.J. HOPPINGER
Macromolecules 4, 731 (1973)
Int. J. Polym. Mater. 4, 79 (1975).
64. A. PULLMAN et J. PORT
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris D 277, 2269 (1973).
65. Y.N. CHIRGADZE et A.M. OVSEPYAN
Biopolymers 11, 2179 (1972).
66. S. IKEDA, A. KITO, T. IMAE et H. MAEDA
J. Colloid. Interface Sci. 48, 256 (1974).
67. J. OAKES
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 72, 216 (1976).
68. C.H. ROCHESTER et A.V. WESTERMAN
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 73, 33 (1977).
69. M. SUWALSKY et A. LLANOS
Biopolymers 16, 403 (1977).
70. S.J. SINGER
Adv. Prot. Chem. 17, 1 (1962).
71. M.A. SCHERAGA
The Proteins, H.V. Neuroth Ed., ch 6, Ac. Press (1963).

72. G.D. FASMAN
Poly- α -amino acids, G.D. Fasman Ed., M. Dekker (1967).
73. H.A. SCHERAGA
Chem. Rev. 71, 195 (1971).
74. N. LOTAN, A. BERGER et E. KATCHALSKI
Ann. Rev. Biochem. 41, 869 (1972).
75. T.M. BIRSHTAIN et O.B. PTITSYN
Conformations of Macromolecules, Interscience (1966).
76. D. POLAND et H.A. SCHERAGA
Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers
Academic Press, (1970).
77. A.J. HOPFINGER
Conformational properties of macromolecules, Academic
Press (1973).
78. A. TERAMOTO et H. FUJITA
Adv. Polym. Sci. 18, '65 (1975)
J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Sci. C 15, 165 (1976).

C O N C L U S I O N G E N E R A L E

Nous nous étions fixé pour objectif dans ce travail d'étudier la variation des propriétés de copolymères d'hydrophobie variable dans des mélanges eau/solvant organique. Pour ce faire, nous avons synthétisé des copolymères comprenant un motif monomère dont le caractère hydrophile est connu, la N⁵-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine) et un motif monomère analogue comprenant un groupement phénylique, dont nous espérons qu'il introduirait un caractère hydrophobe marqué. En appliquant la méthode de synthèse des poly(N⁵-(hydroxyalkyl)-L-glutamine), nous avons pu obtenir les copolymères recherchés, dont nous avons pu déterminer la composition.

En solution aqueuse et en mélange eau/solvant organique, nous avons pu relier la structure secondaire des copolymères et la transition chaîne - hélice induite par l'addition de solvant organique à la composition des copolymères en résidus (N⁵- benzyl-L- glutamine). Nous avons pu ainsi confirmer l'effet stabilisant sur la structure ordonnée en hélice α des interactions spécifiques entre chaînes latérales non-polaires : la substitution, en bout de la chaîne latérale, du groupement méthylique du résidu (HEG) par un groupement benzylique, amenait, même en faible proportion, à un accroissement de la fraction d'hélice.

L'étude de l'adsorption préférentielle et absolue des constituants de mélanges eau/solvant organique sur les protéines globulaires et les polypeptides de synthèse avait amené de nombreuses hypothèses, notamment :

- pour une chaîne polypeptidique donnée, l'adsorption du solvant organique devait dépendre de la nature de ce solvant, c'est-à-dire de l'affinité de la chaîne pour ce solvant ;

- dans le cas du 2-chloroéthanol, la variation de l'adsorption préférentielle et absolue sur les protéines

avec la composition du mélange eau/2-chloroéthanol et avec la transition conformationnelle avait été interprétée en termes d'interactions hydrophobes spécifiques entre ce solvant organique et les résidus d'acides aminés non-polaires.

L'étude des polypeptides de synthèse, modèles simplifiés des protéines, dans les mélanges eau/solvant organique avait permis de confirmer de manière qualitative et quantitative la première hypothèse (étude de la PHPG dans les systèmes eau/dioxanne et eau/2-chloroéthanol ; étude de la poly(L-Lysine HBr) dans différents mélanges eau/solvant organique). En entreprenant l'étude d'une série de copolymères dont on faisait varier le rapport résidus hydrophobes / résidus hydrophiles, nous espérons pouvoir observer une variation de l'adsorption préférentielle et absolue avec ce rapport. Le choix du 2-chloroéthanol comme solvant organique nous était dicté pour deux raisons : le 2-chloroéthanol était susceptible d'interactions hydrophobes avec les groupements non-polaires, qui devaient entraîner la structuration en hélice des copolymères ; en outre, les protéines globulaires et la PHPG avaient été étudiés en solution dans les mélanges eau/2-chloroéthanol ce qui devait nous permettre de fructueuses comparaisons.

Les résultats que nous avons obtenus nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'adsorption par le 2-chloroéthanol sur les copolymères lorsque leur caractère hydrophobe était accru. Nous avons pu ainsi démontrer l'existence d'interactions hydrophobes spécifiques entre le 2-chloroéthanol et les résidus à chaîne latérale non-polaire. Le résultat majeur de ce travail est d'avoir pu dégager une dépendance de l'adsorption préférentielle et absolue du solvant organique avec la composition des copolymères d'hydrophobie variable. Bien que nous n'ayons pas pu interpréter cette dépendance sous la forme d'une simple additivité des effets provenant des deux motifs constitutifs des copolymères, nous avons pu

caractériser les résidus d'acides aminés hydrophiles (HEG) et hydrophobes (BGln) par leurs interactions avec l'eau et le 2-chloroéthanol et leurs capacités à stabiliser la conformation hélicoïdale en solution.

