

55376
1979
1
N° d'ordre : 448

THÈSE

présentée à

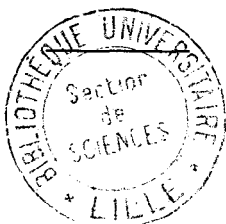
L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

par

NICOLE HELBECQUE
INGÉNIEUR CHIMISTE HEI

**SYNTHÈSE ET ÉTUDE CONFORMATIONNELLE
DE PEPTIDES ET DE POLYPEPTIDES MODÈLES DE LA PRP**
(protéine riche en proline provenant de la salive parotidienne humaine)



JURY :

Président : M. J. LHOMME
Rapporteurs : M^{me} M.-H. LOUCHEUX
M. E. BRICAS
M. H. SLIWA
Examineurs : M. H. ZAHN
M. M. DAUTREVAUX
M. G. BISERTE
M. B. ROQUES

soutenue le 24 mars 1979
devant la Commission d'Examen

Le sujet de ce travail m'a été confié par Madame M.-H. LOUCHEUX, Maître de Recherches au C.N.R.S. Il a été réalisé en ce qui concerne la partie synthèse dans le laboratoire de Biochimie Médicale (Professeur Paul BOULANGER) et le laboratoire de Biochimie Structurale (Professeur M. DAUTREVAUX) de la Faculté de Médecine de Lille. L'étude physico-chimique a été réalisée d'une part à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Professeur G. BISERTE), d'autre part au laboratoire de Chimie Organique de l'Université de Gand (Professeur M. ANTEUNIS) ainsi qu'au laboratoire de RMN de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg (Professeur G. WEILL).

Monsieur J. LHOMME, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, a bien voulu me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse ; qu'il veuille accepter mes remerciements respectueux.

Madame M.-H. LOUCHEUX, Maître de Recherches au C.N.R.S., a dirigé constamment mon travail. Outre ses multiples activités, elle en a suivi l'évolution avec le plus grand intérêt. Je lui dois ma formation de chercheur. Qu'elle veuille trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Monsieur E. BRICAS, Directeur de Recherches au C.N.R.S., a accepté malgré ses nombreuses occupations la charge de Rapporteur. Qu'il veuille accepter ma délicate gratitude.

Monsieur H. SLIWA, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, a bien voulu être Rapporteur de cette thèse ; qu'il veuille accepter mes remerciements respectueux.

C'est avec grand plaisir que je remercie Monsieur le Professeur H. ZAHN d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Ma formation dans le domaine de la synthèse peptidique n'aurait pas été complète sans le stage qu'il m'a permis de faire dans son laboratoire. Qu'il soit assuré de toute ma reconnaissance.

Monsieur M. DAUTREVAUX, Professeur à la Faculté de Médecine de Lille, m'a accueillie dans son laboratoire et m'a permis de réaliser ce travail. Il a accepté de faire partie de ce jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes remerciements respectueux.

C'est avec gratitude que je remercie Monsieur le Professeur G. BISERTE d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Durant la réalisation de ce travail, il m'a manifesté un intérêt constant malgré ses nombreuses occupations. Je lui en suis reconnaissante et le prie de croire à mon profond respect.

Monsieur B. ROQUES, Professeur à l'Université René Descartes (Paris V), a bien voulu faire partie de ce jury ; qu'il veuille accepter mes remerciements respectueux.

A l'occasion de cette thèse, je suis heureuse de pouvoir exprimer mon profond respect à Monsieur le Professeur Paul BOULANGER qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui m'a permis de réaliser ce travail.

L'étude présentée ici n'est qu'un volet d'une collaboration beaucoup plus large entre les équipes de Madame M.-H. LOUCHEUX et de Monsieur P. DEGAND, Professeur à la Faculté de Médecine de Lille. Que Monsieur P. DEGAND veuille accepter mes remerciements pour le temps qu'il m'a consacrée et les produits qu'il a fournis en vue de compléter ce travail.

Je tiens également à remercier ici Monsieur M. ANTEUNIS et Monsieur G. WEILL qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires respectifs, ce qui m'a permis de mener à bien une partie des études conformationnelles publiées dans ce travail.

Je ne voudrais pas terminer sans remercier aussi mes camarades qui, à titres divers, m'ont aidée dans ce travail : Monsieur P. LAGANT, Madame M.-P. HILDEBRAND, Mademoiselle F. PECKRE, Madame M.-F. DEMOUEAU, Monsieur C. DENIS, Monsieur L. DUCATEZ ainsi que Monsieur J.-P. AUBERT dont l'amitié m'a été très précieuse.

SOMMAIRE

Introduction	1
Chapitre 1 - Synthèse	3
A - Généralités	5
1 - Groupements protecteurs	5
a - Protection de la fonction amine	5
b - Protection de la fonction carboxyle	6
2 - Méthodes de formation de la liaison peptidique	7
3 - Choix d'une stratégie	9
4 - Racémisation	11
B - Schéma de synthèse des peptides	13
C - Polycondensation	16
1 - Principe	17
2 - Étude de la polycondensation	17
3 - Racémisation	18
D - Schéma de synthèse des polymères	19
E - Partie expérimentale	20
Chapitre 2 - Étude conformationnelle des peptides	25
A - Conformation des chaînes peptidiques	27
B - Dichroïsme circulaire	29
1 - Généralités	29
2 - Étude des oligomères de proline	29
a - Spectrophotométrie ultra-violet	30
b - Dichroïsme circulaire	31
3 - Étude de nos peptides	33
a - Spectrophotométrie ultra-violet	33
b - Dichroïsme circulaire	34
C - Résonance magnétique nucléaire	35
1 - Généralités	35
2 - Résonance magnétique nucléaire des peptides et des protéines	35
3 - Résonance magnétique nucléaire du proton. Cas de la glycine et de la proline	37
a - Analyse des spectres. Notation de Pople	37
b - Glycine	38
c - Proline	38

4 - Étude par RMN du proton de peptides contenant la liaison Gly-Pro ou la liaison Pro-Pro	39
a - Polyproline	40
b - Oligomères de proline	40
c - Peptides contenant la liaison Gly-Pro	41
5 - Étude de nos peptides par RMN du proton	42
a - H-[Gly-Pro] ₂ -OH	43
b - H-Gly-(Pro) ₂ -OH	47
c - H-Gly-(Pro) ₃ -OH	50
d - H-Gly-(Pro) ₄ -OH	52
e - Discussion générale sur les résultats obtenus par RMN du proton	54
6 - Résonance magnétique nucléaire du carbone-13	55
a - Généralités	55
b - Étude des amides et des peptides contenant la glycine et la proline	56
7 - Étude de nos peptides par RMN du carbone-13	60
a - H-[Gly-Pro] ₂ -OH	60
b - H-Gly-(Pro) ₂ -OH	63
c - H-Gly-(Pro) ₃ -OH	66
d - H-Gly-(Pro) ₄ -OH	68
D - Conclusion	70
1 - Conformations susceptibles d'exister	70
a - Géométrie du noyau pyrrolidine	71
b - Le résidu prolyle	72
c - Le résidu glycyle	73
d - Oligoprolines	74
2 - Conformations de nos peptides	76
a - H-[Gly-Pro] ₂ -OH	76
b - H-Gly-(Pro) ₂ -OH	78
c - H-Gly-(Pro) ₃ -OH	79
d - H-Gly-(Pro) ₄ -OH	80
Chapitre 3 - Étude conformationnelle des polymères	83
A - Conformations de la polyproline	85
1 - Dichroïsme circulaire	85
2 - Résonance magnétique nucléaire du proton	88
3 - Résonance magnétique nucléaire du carbone-13	89
B - Dichroïsme circulaire de polypeptides contenant des résidus glycyle et prolyle	91
1 - Études publiées antérieurement	91
2 - Études de nos polymères	92

C - Résonance magnétique nucléaire du proton de polypeptides contenant des résidus glycyle et prolyle	94
1 - Études publiées antérieurement	94
2 - Nos résultats	95
a - PRP	95
b - H-[Gly-(Pro) ₃] _n -OH	98
c - H-[Gly-(Pro) ₄] _n -OH	100
D - Résonance magnétique nucléaire du carbone-13 de polypeptides contenant des résidus glycyle et prolyle	101
1 - Études publiées antérieurement	101
2 - Nos résultats	102
a - H-[Gly-(Pro) ₃] _n -OH	102
b - H-[Gly-(Pro) ₄] _n -OH	104
E - Conclusion	106
1 - Études publiées par Bennick	106
2 - Études sur nos produits	109
a - H-[Gly-(Pro) ₃] _n -OH	109
b - H-[Gly-(Pro) ₄] _n -OH	110
c - PRP	111
Conclusion	113

GLOSSAIRE

PRP	protéine riche en proline
RMN	résonance magnétique nucléaire
DCCI	dicyclohexylcarbodiimide
Boc	tertio-butyloxycarbonyle
[θ]	ellipticité molaire
UV	ultra-violet
DSS	sel de sodium de l'acide triméthylsilyl-3-propane sulfonique
Gly	résidu glycyle
Pro	résidu prolyle
TSP	3-triméthylsilylpropionate de sodium deutéré
TMS	tétraméthylsilane
Hyp	résidu hydroxyprolyle
PP II	polyproline II
CaCl ₂	chlorure de calcium
CS ₂	sulfure de carbone
Phe	résidu phénylalanyle
AcProMeA	acétylprolineméthylamide
AcProMe ₂ A	acétylprolinediméthylamide

La L-proline est utilisée tout au long de ce travail.

Les abréviations utilisées dans cet exposé sont celles reconnues par l'IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (Eur. J. Biochem. (1977) 74, 1 - 6).

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

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

**PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Économiques, des Sciences et des Lettres**

MM. ARNOULT, M^{me} BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, M^{me} LELONG, L'HOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

**ANCIENS PRÉSIDENTS DE L'UNIVERSITÉ
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE**

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD.

**PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE**

M. M. MIGEON

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie	M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique	M. LEBRUN André	Électronique
M. BILLARD Jean	Physique du Solide	M. LEHMANN Daniel	Géométrie
M. BIAYS Pierre	Géographie	M ^{me} LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale		Chimie
M. BOUGHON Pierre	Algèbre	M. L'HOMME Jean	Biologie et
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale	M. LINDER Robert	Physiologie Végétales
M. CELET Paul	Géologie Générale		Sociologie
M. COEURE Gérard	Analyse	M. LOMBARD Jacques	Chimie Physique
M. CONSTANT Eugène	Électronique	M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique	M. LUCQUIN Michel	Sciences Économiques
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises	M. MAILLET Pierre	Biochimie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale	M. MONTREUIL Jean	Analyse
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique	M. PARREAU Michel	Géologie Générale
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale	M. PAQUET Jacques	Minéralogie
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale	M. PROUVOST Jean	Électronique
M. FAURE Robert	Mécanique	M. SALMER Georges	Géométrie
M. FOURET René	Physique du Solide	M ^{me} SCHWARTZ Marie-Hélène	Électrotechnique
M. GABILLARD Robert	Électronique	M. SEGUIER Guy	Sciences Économiques
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Économiques	M. STANKIEWICZ François	Physique Théorique
M. GRUSON Laurent	Algèbre	M. TILLIEU Jacques	Chimie Appliquée
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie	M. TRIDOT Gabriel	Automatique
M. HECTOR Joseph	Géométrie	M. VIDAL Pierre	Biologie Cellulaire
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale	M. VIVIER Emile	Physique Atomique et Moléculaire
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique	M. WERTHEIMER Raymond	Mécanique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale		
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire		

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire	M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M ^{me} BKOUCHE Rudolphe	Algèbre	M ^{me} LEHMANN Josiane	Analyse
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale	M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale	M. LOUAGE Francis	Electronique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale	M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. CARREZ Christian	Informatique	M ^{me} MARQUET Simone	Probabilités
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire	M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M ^{me} DACHARRY Monique	Géographie	M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale	M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie	M. RACZY Ladislav	Electronique
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique	M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale	M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale	M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFÉRENCE (et Chargés d'Enseignement)

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre	M ^{me} LEGRAND Denise	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse	M ^{me} LEGRAND Solange	Algèbre
M. BART André	Biologie Animale	M. LEVASSEUR Michel	Sciences Économiques
M ^{me} BATTIAU Yvonne	Géographie	M. LHENAFF René	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique	M. LOQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. BOBE Bernard	Sciences Économiques	M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. BONNELLE Jean-Pierre	Chimie	M. MACKE Bruno	Physique
M. BOSCO Denis	Probabilités	M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique	M ^{me} N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. BRUYELLE Pierre	Géographie	M. PARSY Fernand	Mécanique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique	M ^{me} PAUPARDIN Colette	Biologie et Physiologie Végétales
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie	M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. COURBIS Bernard	Sciences Économiques	M. PERTUZON Émile	Physiologie Animale
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique	M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée	M. POVY Lucien	Automatique
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique	M. RICHARD Alain	Biologie
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale	M. RIETSCH François	Chimie
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques	M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. DHAINAUT André	Biologie Animale	M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide	M. SALAMA Pierre	Sciences Économiques
M. DUBOIS Henri	Physique	M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Mathématiques
M. DUBRULLE Alain	Physique	M. SIMON Michel	Sociologie
M. DUEE Gérard	Géologie	M. SOMME Jean	Géographie
M. DYMENT Arthur	Mécanique	M ^{me} SPIK Geneviève	Biochimie
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide	M. STERBOUL François	Informatique
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction	M. TAILLIEZ Roger	Biologie
M. FONTAINE Hubert	Physique	M. TOULLOTTE Jean-Marc	Automatique
M. GAMBLIN André	Géographie	M. TREANTON Jean-René	Sociologie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre	M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. GREVET Patrick	Sciences Économiques	M. WALLART Francis	Chimie
M. JACOB Gérard	Informatique	M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre
M. KREMBEL Jean	Biochimie		
M. LAURENT François	Automatique		

De nombreuses études sur la composition de la salive parotidienne humaine ont montré que celle-ci contenait plusieurs protéines et glycoprotéines de composition inhabituelle ; en effet, ces substances sont composées, en ce qui concerne la partie protéique, de 70 à 85 % d'acide glutamique, de proline et de glycine (1,2,3). Bien qu'on ne connaisse pas le rôle biologique de ces protéines salivaires, Hay (4) a démontré que certaines d'entr'elles ont une forte affinité pour l'hydroxyapatite, ce qui amène à supposer qu'elles jouent un rôle lors de la minéralisation de l'émail. Il semble d'autre part que la protéine riche en proline PRP isolée de la salive soit en fait un précurseur métabolique rencontré lors de la biosynthèse des glycoprotéines contenues aussi dans la salive.

L'étude de la structure primaire de cette protéine s'est vite avérée extrêmement difficile, car il semble qu'elle contienne des enchaînements du type Gly-(Pro)₃ ou Gly-(Pro)₄. C'est ce qui nous a amenée à fabriquer les polypeptides synthétiques de formule H-(Gly-(Pro)₃)_n-OH et H-(Gly-(Pro)₄)_n-OH en tant que modèles de la PRP. Au cours de ces synthèses, nous avons isolé également les peptides linéaires H-Gly-(Pro)₃-OH et H-Gly-(Pro)₄-OH. Nous inspirant d'études publiées dans la littérature ces dernières années, nous avons pensé qu'il était possible que ces peptides adoptent déjà une structure secondaire précise en solution aqueuse. Voulant confirmer par RMN les résultats obtenus en dichroïsme circulaire, nous nous sommes trouvée confrontée à des spectres très complexes, particulièrement dans le cas de H-Gly-(Pro)₃-OH, ce qui nous a amenée à synthétiser et à étudier la conformation de peptides plus simples, à savoir H-(Gly-Pro)₂-OH et H-Gly-(Pro)₂-OH.

L'étude de la structure secondaire de la protéine riche en proline PRP isolée à partir de la salive parotidienne humaine a été faite récemment par dichroïsme circulaire (5). De notre côté, nous avons pensé qu'il serait intéressant de compléter ce travail par une étude en RMN de la PRP d'une part, et par une étude physico-chimique (dichroïsme circulaire et RMN) de la conformation de H-(Gly-(Pro)₃)_n-OH et H-(Gly-(Pro)₄)_n-OH en solution aqueuse d'autre part. Si nous n'avons pas étudié H-(Gly-Pro)_n-OH et H-(Gly-(Pro)₂)_n-OH, c'est que ces polypeptides ont déjà été beaucoup étudiés par d'autres et qu'ils ne nous semblaient pas pouvoir être considérés comme modèles de la PRP.

Cet exposé sera divisé en trois grands chapitres : tout d'abord, nous nous occuperons de la synthèse des peptides et polypeptides étudiés ici ; dans un

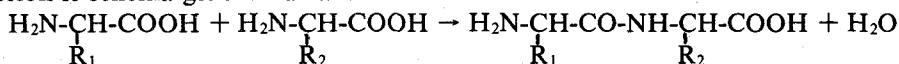
second chapitre, nous exposerons les résultats que nous avons obtenus concernant la conformation des peptides linéaires que nous avons mentionnés plus haut ; enfin, dans une troisième partie, nous nous pencherons sur la conformation des polymères synthétiques et de la PRP.

CHAPITRE I

SYNTHÈSE

A - Généralités

La synthèse peptidique consiste à faire réagir deux molécules d'acide α aminé $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$ en formant une liaison amide $-\text{CO}-\text{NH}-$, selon le schéma général suivant :



A l'état libre, ces acides α aminés existent sous forme de zwitterions $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{R})-\text{COO}^-$ et sont très peu réactifs. Tout le problème consiste donc, d'une part à protéger la (ou les) fonction(s) qui ne doit (doivent) pas réagir, et d'autre part à activer la fonction (carboxyle ou aminée) impliquée dans la formation de la liaison amide.

1 - Groupements protecteurs

Les fonctions à protéger sont le groupe amine ($\text{H}_2\text{N}-$) ou le groupe carboxyle ($-\text{COOH}$) terminal, ainsi que les groupes portés par les chaînes latérales ($\text{H}_2\text{N}-$ pour la lysine et l'ornithine, $-\text{COOH}$ pour les acides aspartique et glutamique, imidazole pour l'histidine, thiol pour la cystéine, hydroxyle pour la sérine et la thréonine, phénol pour la tyrosine, guanidine pour l'arginine, indole pour le tryptophane). Notre travail n'ayant impliqué que l'utilisation de la proline et de la glycine qui ne nécessitent aucune protection des chaînes latérales, nous nous bornerons à mentionner ici les principaux groupements protecteurs des fonctions $\text{H}_2\text{N}-$ ou $-\text{COOH}$ terminales. Ces groupements doivent pouvoir être introduits facilement sur l'acide α aminé ou le peptide impliqué dans la réaction et ne pas introduire de racémisation ; ils doivent être stables dans les conditions de formation de la liaison peptidique $-\text{CO}-\text{NH}-$; enfin il faut qu'on puisse les éliminer facilement sans toucher au peptide formé. Beaucoup d'auteurs se sont penchés sur ce problème et ont proposé une multitude de groupements protecteurs, que ce soit pour la fonction amine ou pour la fonction carboxyle. Néanmoins seuls certains groupes ont retenu l'attention de la majorité des chercheurs en synthèse peptidique.

a - Protection de la fonction amine

Nous citerons ici quatre des groupements protecteurs les plus couramment utilisés depuis plus de vingt ans. Il s'agit du benzyloxycarbonyl (6), encore appelé carbobenzoxy (Z) répondant à la formule $\varphi-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$, introduit par action du chlorure de benzyloxycarbonyl sur l'acide α aminé à protéger suivant une réaction du type Schotten-Baumann ; ce groupement peut être éliminé soit par action de l'acide bromhydrique gazeux en milieu acide trifluoro-

acétique, soit par hydrogénation catalytique sur palladium, soit par action du sodium dans l'ammoniac liquide. Le groupement para-toluènesulfonyl (7) ou tosyl (Tos), répondant à la formule $\text{H}_3\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2-$, est introduit sur l'acide α aminé ou le peptide à protéger par action du chlorure de tosyl. Ce groupe s'élimine par action du sodium dans l'ammoniac liquide ou par action de l'acide fluorhydrique anhydre à 0° C. Le groupe trifluoroacétyl (8) (Tfa), de formule $\text{F}_3\text{C}-\text{CO}-$, est introduit par action de l'anhydride de trifluoroacétyl sur l'acide α aminé à protéger ; il s'élimine soit par saponification en milieu acétone, soit par action de la pipéridine molaire. Enfin un autre groupe très largement utilisé est le tertio-butyloxycarbonyl (9) (Boc), de formule $(\text{H}_3\text{C})_3\text{C}-\text{O}-\text{CO}-$, introduit le plus souvent par action de l'azide de tertio-butyloxycarbonyl sur l'acide α aminé à protéger ; ce groupement peut être éliminé soit par action de l'acide chlorhydrique gazeux en milieu étheré, soit par action de l'acide trifluoroacétique pur ou en milieu dichlorométhane, soit encore par action du trifluorure de bore en milieu acétique.

Ces dernières années, d'autres groupes ont été introduits. Parmi les plus importants, citons le groupement 2-(parabiphényl)isopropoxy-carbonyl (10) (Bpoc), répondant à la formule $\text{C}_6\text{H}_5-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-\text{CO}-$, introduit par action du carbonate ou de l'azide de 2-(parabiphényl)isopropoxy-carbonyl sur l'acide α aminé à protéger ; ce groupement est très labile en milieu acide et peut s'éliminer, par exemple, par action de l'acide trifluoroacétique à 5 % dans le dichlorométhane. Un autre groupement introduit plus récemment est le 2,4-dichlorobenzoyloxycarbonyl (11) (Cl_2Z), de formule développée $\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{Cl})_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$, introduit par action du chlorure de 2,4-dichlorobenzoyloxycarbonyl sur le dérivé à protéger ; ce groupement très stable s'élimine cependant par action de l'acide fluorhydrique anhydre à 0 °C.

Il est bien évident que de nouveaux groupements protecteurs de la fonction amine apparaissent régulièrement dans la littérature ; notre propos ici n'est pas d'en donner une liste exhaustive, mais simplement de mentionner quelques groupes qui ont « fait leurs preuves ».

b - Protection de la fonction carboxyle

Nous nous limiterons ici aussi à citer les principales méthodes utilisées en synthèse peptidique pour bloquer la fonction carboxyle, qu'elle soit en α de la fonction amine ou bien portée par la chaîne latérale d'un acide aspartique ou glutamique. La plupart du temps cette fonction carboxyle est bloquée sous forme d'ester, que ce soit un ester d'alkyle (ester méthylique $-\text{O}-\text{CH}_3$ ou éthylique $-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$) (12), un ester benzylique ($-\text{O}-\text{Bzl}$) (13) ou un ester de tertio-butyle ($-\text{O}-\text{But}$) (14). Les esters d'alkyle sont introduits par action de l'alcool correspondant, la réaction étant catalysée par un acide tel que l'acide chlorhydrique gazeux, ou encore par action du diazométhane dans le cas de l'ester méthylique ;

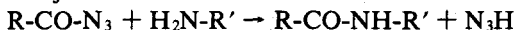
ces groupements protecteurs peuvent s'éliminer par saponification, la réaction étant le plus souvent conduite dans l'acétone. La fonction ester benzylique est introduite soit par action de l'alcool benzylique en présence d'un catalyseur acide, soit par action du bromure de benzyle sur le sel de sodium ou de lithium du dérivé à protéger ; ce groupement protecteur peut s'éliminer soit par hydrogénation catalytique sur palladium, soit par action du sodium dans l'ammoniac liquide, soit par saponification. Quant à la fonction ester de tertio-butyle, elle est obtenue le plus souvent par action de l'isobutylène en présence d'un catalyseur acide tel que l'acide sulfurique ; cette protection s'élimine facilement en milieu acide, par exemple par action de l'acide trifluoroacétique pur ou dilué, ou encore par action du trifluorure de bore dans l'acide acétique.

Une autre manière astucieuse de protéger la fonction carboxyle terminale est d'y accrocher un groupement hydrazide protégé (-NH-NH-Z ou -NH-NH-Boc) (15). Ce groupe est introduit par condensation du dérivé à protéger et de l'hydrazide protégé en présence de dicyclohexylcarbodiimide ; par coupure du benzyloxycarbonyl ou du tertio-butyloxycarbonyl par une des méthodes citées plus haut, on passe à l'hydrazide. Il ne reste plus qu'à l'activer en azide, ce qui permettra de former une liaison amide avec un autre acide α aminé ou avec un peptide.

2 - Méthodes de formation de la liaison peptidique

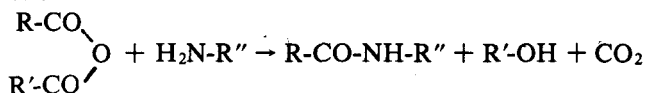
Pour être valable, une méthode de formation de la liaison peptidique doit satisfaire à plusieurs critères, à savoir une faible tendance à la racémisation et une vitesse de réaction suffisante. De plus, il faut qu'elle fournisse le peptide désiré avec un bon rendement, et que ce produit soit facile à extraire et à purifier. Toutes ces exigences ont conduit au fait que seules quelques méthodes de couplage soient utilisées couramment, ces méthodes reposant sur l'activation du carboxyle.

Dès 1902, Curtius (16) a introduit la méthode aux azides qui est encore utilisée de nos jours. La réaction s'écrit :

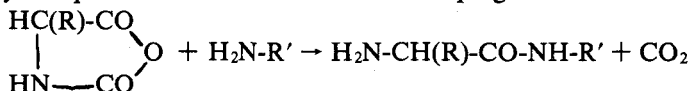


Les couplages réalisés en employant les azides ont été longtemps proclamés comme étant exempts de racémisation. En 1970 cependant, Sieber (17) a observé de forts taux de racémisation lors de couplages de fragments peptidiques en utilisant cette méthode aux azides.

Le couplage en utilisant les anhydrides mixtes (18) est une méthode très répandue également en synthèse peptidique. La réaction mise en jeu est la suivante :

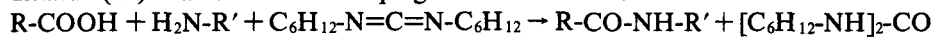


L'anhydride mixte le plus communément employé est obtenu par action du chloroformiate d'isobutyle sur l'acide α aminé N protégé en présence d'une base tertiaire, la réaction se faisant en milieu anhydre et à basse température. L'emploi de cette méthode fournit des peptides à très faible taux de racémisation, à condition de travailler dans des conditions bien définies (19). Cependant, quand on parle des anhydrides mixtes, il faut citer aussi les N-carboxyanhydrides, appelés aussi anhydrides de Leuchs. Ces dérivés sont obtenus par action du phosgène sur un acide α aminé en suspension dans un solvant organique inerte. Depuis quelques années, Katakai et coll. (20) les utilisent assez couramment en synthèse peptidique, car il n'y a pas racémisation lors du couplage. La réaction s'écrit :



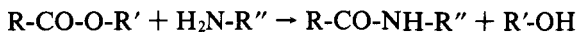
En 1973, Kamber (21) a constaté que les anhydrides de Leuchs pouvaient s'acyler quantitativement et donnaient des dérivés cristallins plus stables que les N-carboxyanhydrides non protégés, mais cependant aptes à réagir avec les amines. Néanmoins, ce moyen de couplage est relativement peu utilisé, ceci étant dû essentiellement aux problèmes posés par le peu de stabilité de ces anhydrides et par l'emploi du phosgène en cours de synthèse.

Une troisième méthode de formation de la liaison peptidique, universellement employée celle-ci, est la méthode à la dicyclohexylcarbodiimide (22). La réaction de couplage est la suivante :



L'inconvénient de cette méthode est le taux de racémisation des peptides obtenus. D'autre part une réaction secondaire très gênante, la formation de N-acylurée, ne peut être évitée. De nombreuses solutions ont été proposées pour surmonter ces problèmes et il semble que l'addition de N-hydroxysuccinimide (23) ou, mieux, de 1-hydroxybenzotriazole (24) au mélange réactionnel permettent d'avoir des couplages satisfaisants.

Une dernière méthode, très souvent utilisée également en synthèse peptidique, mérite d'être mentionnée ici. Il s'agit de la méthode aux esters activés. La réaction se fait selon le schéma :



C'est Bodanszky qui, en 1955, a introduit ce mode de couplage en synthèse peptidique, en utilisant les esters de paranitrophénol (25). Depuis, d'autres groupements ont été employés, les esters de N-hydroxysuccinimide (26), de 2,4,5-trichlorophénol (27), de pentachlorophénol (28) et d'orthonitrophénol (29) étant les plus courants.

Outre ces méthodes, très largement diffusées, il nous faut encore citer les efforts de différentes équipes pour trouver de nouveaux réactifs de couplage dérivés du phosphore (30). D'après leurs premiers résultats, il semblerait que la chimie du phosphore soit une voie prometteuse en vue de trouver de nouveaux réactifs de couplage. A cette famille de dérivés appartiennent le sulfonate de N-hydroxybenzotriazole introduit par Itoh et coll. en 1974 (31), ainsi que le benzotriazoloxo(trisdiméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (B.O.P.) proposé par Castro et coll. en 1975 (32).

3 - Choix d'une stratégie

Bien qu'ayant utilisé tout au long de ce travail la méthode classique de couplage «en pot», nous exposerons cependant les autres méthodes assez largement diffusées.

La synthèse peptidique consistant à faire réagir deux molécules d'acides α aminés correctement protégés (ou deux peptides) pour former une liaison amide -CO-NH-, on voit que ce processus peut être automatisé : pour cela, il suffit d'immobiliser un acide α aminé (ou un peptide) sur un support solide et d'y coupler pas à pas d'autres acides α aminés (ou, éventuellement d'autres peptides) selon la séquence que l'on désire obtenir. C'est Merrifield (33) qui, le premier, a eu l'idée d'automatiser la synthèse des peptides. La méthode (fig. 1) est basée à l'origine sur l'utilisation d'un ester benzylique d'un acide α aminé ou d'un peptide insolubilisé par accrochage sur un polymère tel que le polystyrène réticulé par du divinylbenzène. Sur ce composé on fixe un dérivé N-tertiobutyloxy-carbonylé d'un acide α aminé par le procédé à la dicyclohexylcarbodiimide ou par celui aux esters activés. Après élimination de la protection de la fonction amine par un réactif approprié, on peut coupler un second acide α aminé N protégé

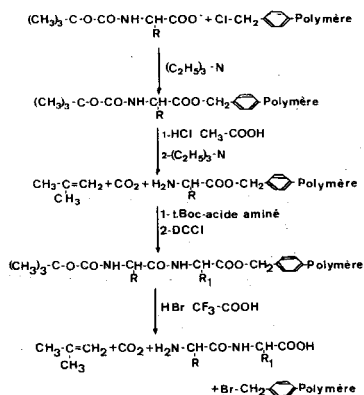


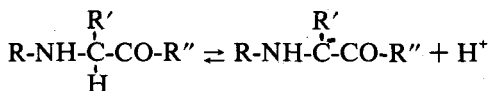
Figure 1 - Principe de la méthode de Merrifield (d'après Merrifield (33))

au premier précédemment fixé sur le polymère. En répétant les étapes de déprotection et de couplage, il est possible de construire n'importe quel peptide. Il reste alors à séparer le peptide de son support (action de l'acide bromhydrique gazeux dans l'acide trifluoroacétique, action de l'acide fluorhydrique anhydre ou encore transestérification) et à purifier le peptide. C'est cette dernière étape qui est longue et fastidieuse, car ce produit n'a subi aucune purification tout au long de la synthèse. Les risques de racémisation en cours de synthèse sont faibles, car c'est le groupement carboxylique de l'acide α aminé N protégé qui est activé en vue du couplage, la protection de la fonction amine étant assurée par un groupement de type uréthane. Quant au support utilisé, il s'agit d'une résine obtenue par copolymérisation du styrène avec du divinylbenzène (1 ou 2 %). Cette méthode a été et est encore beaucoup utilisée du fait de la rapidité d'obtention des produits. Sur le plan technologique, de nombreuses modifications ont été apportées à tous les stades, que ce soit pour le mode d'accrochage du premier acide α aminé à la résine, que ce soit pour les programmes de couplage et de déprotection, ou encore pour le mode de séparation du peptide de la résine. Mais le gros problème reste la purification du peptide. C'est pourquoi, lors d'études pour trouver de nouveaux supports, Bayer et coll. (34) ont proposé le polyéthylèneglycol. Contrairement à la résine proposée par Merrifield, ce polymère est soluble dans les solvants organiques utilisés couramment en synthèse peptidique ; cependant, l'addition d'éther éthylique anhydre au milieu le rend complètement insoluble. L'idée de Bayer et coll. est donc d'utiliser le polyéthylèneglycol comme groupement protecteur du carboxyle terminal au lieu du polystyrène réticulé employé par Merrifield. Toutes les réactions (accrochage du premier acide α aminé à la résine, déprotections, couplages, séparation du peptide de son support) peuvent se faire en milieu homogène en utilisant la plupart des groupements protecteurs et des méthodes de couplage connues en synthèse peptidique. La séparation du peptide en formation lié au polymère d'avec les sous-produits de la réaction peut se faire soit par précipitation du polymère, soit par ultrafiltration. Le fait que toutes les réactions se fassent en milieu homogène permet d'avoir des déprotections et des couplages quantitatifs, ce qui est essentiel, car ici non plus, comme dans le cas de la méthode de Merrifield, il n'y a pas de purification intermédiaire lors de la formation du peptide. Des peptides ainsi que des fragments d'hormones ont été obtenus purs sans nécessité de chromatographies ou d'électrophorèses ultérieures : c'est le cas des fragments 1-2, 3-8, 9-14, 15-27 d'un analogue de la sécrétine ayant des résidus ornithine en positions 12, 14, 18 et 21 (35) ; c'est le cas aussi d'oligoalanines (36) ainsi que de Boc-Leu-Ala-Gly-Val-OH (37). Il est clair que tous les peptides préparés par cette voie n'ont pas été obtenus purs directement. Néanmoins, les études publiées jusqu'ici sont en faveur de cette méthode de synthèse sur polymère soluble, car la purification semble beaucoup plus aisée que dans le cas de la méthode de Merrifield (38, 39).

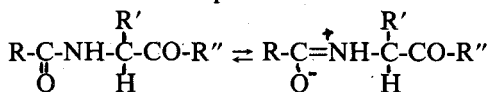
Lorsqu'on aborde une synthèse, il n'est pas évident de prime abord de choisir l'une ou l'autre de ces méthodes. Le procédé de Merrifield semble intéressant à utiliser lorsqu'il s'agit d'étudier l'activité d'un peptide ou lorsqu'il s'agit de préparer un peptide à des fins thérapeutiques, car le gain de temps que permet ce processus n'est pas négligeable. Cependant, dans le cas où le but principal du travail est une preuve de structure, une étude conformationnelle ou encore la détermination de la taille minimum d'un peptide pour que celui-ci ait une activité, il est préférable d'utiliser soit la méthode de Bayer et coll. qui ont eux-mêmes mené ce genre d'études sur des oligoalanines, sur le fragment 66-73 d'une myoglobine ainsi que sur la substance P (36), soit la méthode classique, beaucoup plus longue certes mais qui a été très utilisée dans ce cas jusqu'à ces dernières années (40).

4 - Racémisation

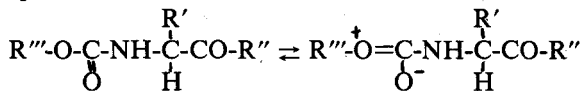
La racémisation a été et est toujours un très gros problème en synthèse peptidique. N'importe quel acide α aminé, mis à part la glycine, est susceptible de racémiser, cette réaction pouvant avoir lieu soit lors de l'étape d'activation du monomère ou du peptide H_2N - protégé, soit lors du couplage proprement dit. Cette réaction est extrêmement favorisée si l'on travaille en milieu alcalin. Le mécanisme proposé dans ce cas est un arrachement du proton porté par le carbone asymétrique suivi d'un réarrangement de la molécule selon :



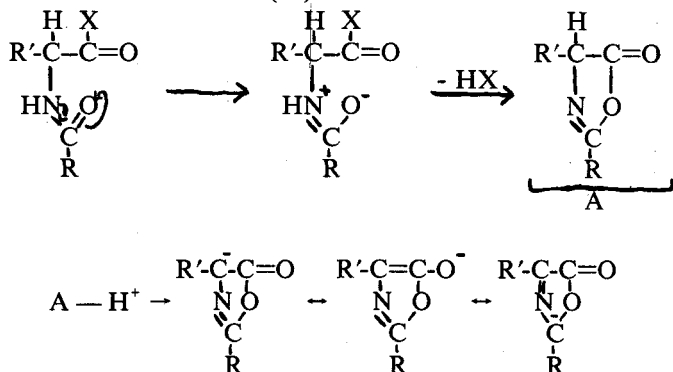
Selon le radical R utilisé pour protéger la fonction amine, la liaison CH sera plus ou moins stable ; s'il s'agit d'un radical acyle la coupure de cette liaison se fera facilement, car nous aurons alors l'équilibre :



L'effet contraire se produira si R est un radical du type uréthane (41), car nous aurons alors l'équilibre :



Cependant, ce mécanisme de racémisation n'est pas le plus fréquent et le passage d'un énantiomère à l'autre se fera, chaque fois que c'est possible, par l'intermédiaire d'une 5-oxazolone (42) selon la réaction :



Le schéma ci-dessus montre que la réaction se fait en deux étapes : il y a d'abord formation de la 5-oxazolone, qui est l'étape lente, puis dans un second temps il y a coupure de la liaison CH par une base présente dans le milieu.

Wünsch (43), dans une revue sur la synthèse peptidique, préconise plusieurs moyens pour essayer de limiter au maximum la racémisation due au passage par une oxazolone. En premier lieu, il conseille d'utiliser un acide aminé dont la fonction H_2N - soit protégée par un groupement de type uréthane ; ceci n'est cependant pas la panacée universelle, car aucune équipe n'a encore réussi à ce jour à fabriquer une histidine H_2N - protégée qui soit optiquement pure (44). Ensuite il suggère d'utiliser des acides aminés N-acylés activés qui ne racémisent pas (ou peu), comme les azides ou certains esters actifs. Enfin Wünsch préconise l'adjonction d'additifs au milieu réactionnel, ces dérivés permettant d'une part de diminuer la basicité du partenaire aminé et d'autre part de stabiliser le partenaire carboxylique sous forme activée ; ceci a beaucoup été étudié et de nombreux additifs ont été proposés.

D'autre part, des études systématiques ont été menées pour comparer les différentes méthodes de couplage entre elles et pour étudier l'influence des conditions opératoires sur le taux de racémisation observé. Outre le travail de Young et coll. (45) qui ont montré que l'utilisation de solvants polaires, la présence de sels et le travail à haute température augmentait beaucoup la vitesse de racémisation, il nous faut mentionner aussi les études récentes menées en particulier par Benoiton et coll. (46) de l'influence de la séquence à synthétiser sur le taux de racémisation observé.

Enfin, avant de passer à l'exposé de notre travail proprement dit,

nous allons étudier le cas de la proline. Il s'agit là d'un imino-acide et il est clair que les acides aminés N-substitués et les imino-acides sont moins susceptibles de racémiser que les dérivés ayant une fonction amine primaire. En effet, s'ils sont acylés, l'atome d'azote ne porte plus d'hydrogène ; il ne peut donc y avoir énolisation et donc la réaction de cyclisation, si elle se fait, aboutira à la formation d'un sel d'oxazonium et sera beaucoup plus lente que dans le cas d'un acide aminé, aucune catalyse par les bases n'étant possible ici. D'autre part, la proline est stériquement encombrée de par la présence du cycle pyrrolidine et, en règle générale, on n'observera pas la formation d'un second cycle contigu au premier (47). Dans des conditions bien particulières cependant, la formation d'un intermédiaire de type oxazonium a été observée (couplage de $\text{Bz}(\text{NO}_2)\text{-Pro-OH}$ avec le par-nitrophénol en présence de DCCI (48)). Il a été montré également (49) que certains dérivés acylés de la proline pouvaient racémiser sous l'action de l'anhydride acétique en milieu acide acétique et il y aurait là aussi passage par un intermédiaire du type oxazonium. Cependant, ces cas de racémisation de dérivés acylés de la proline sont très rares et nous pouvons dire qu'en règle générale la vitesse de racémisation est beaucoup plus faible que la vitesse de couplage et que par conséquent on n'observe pas de racémisation dans le cas de la proline.

B - Schéma de synthèse des peptides

Un des buts de ce travail étant de déterminer si la protéine riche en proline PRP extraite de la salive parotidienne humaine contient des séquences répétitives du type Gly-(Pro)_3 ou plutôt du type Gly-(Pro)_4 , nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier la conformation non seulement de ces copolypeptides séquentiels, mais aussi celle des peptides, unités monomères pour la polycondensation. Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons synthétisé la série de peptides $\text{H-Gly-(Pro)}_n\text{-OH}$ avec $n = 2$ à 4 inclus, ainsi que $\text{H-[Gly-Pro]}_2\text{-OH}$, le peptide H-Gly-Pro-OH ayant été étudié par d'autres. Notre but étant une étude conformationnelle, nous avons opté pour la synthèse classique au détriment de la méthode de Merrifield, bien que Rothe et coll. (50) aient utilisé la synthèse en phase solide pour fabriquer des oligoprolines en vue d'une étude de conformation. Si nous n'avons pas employé la méthode de synthèse sur polymère soluble (34), c'est parce que celle-ci n'a été développée qu'après que nous ayons terminé la synthèse des peptides.

Pour le choix des groupements protecteurs ainsi que des méthodes de couplage, nous nous sommes inspirée des travaux de Blout et coll. (51) qui ont synthétisé des oligoprolines totalement protégées. Les schémas de synthèse sont représentés sur les figures 2, 3, 4a, 5a. Nous avons opté pour le groupement tertio-butyloxycarbonyl (Boc) pour la protection des fonctions amine ;

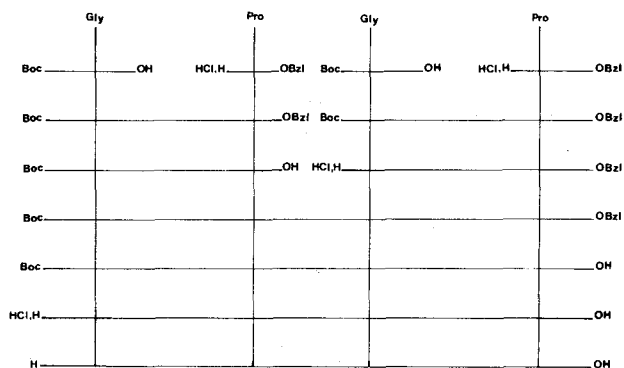


Figure 2 - Synthèse de H-Gly-Pro-Gly-Pro-OH

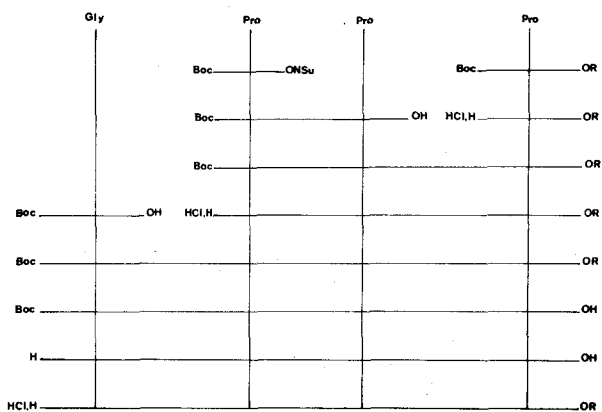


Figure 4 - Synthèses de H-Gly-(Pro)₃-OH¹ et de H-[Gly-(Pro)₃]_n-OH²
¹ R = Bzl et ² R = Cl₃Ph

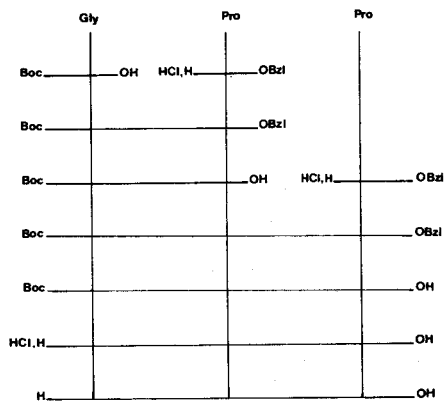


Figure 3 - Synthèse de H-Gly-(Pro)₂-OH

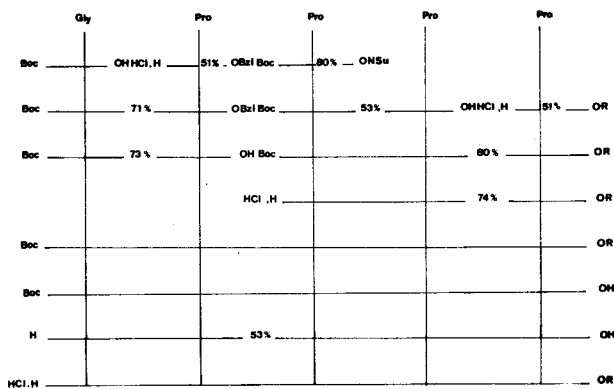


Figure 5 - Synthèses de H-Gly-(Pro)₄-OH¹ et de H-[Gly-(Pro)₄]_n-OH²
¹ R = Bzl et ² R = Cl₃Ph



la régénération du H_2N a été réalisée par action de l'acide chlorhydrique gazeux en milieu acide acétique glacial (52). Quant à la fonction carboxyle, elle a été protégée sous forme d'ester benzylique, ce groupement ester étant éliminé par hydrogénation catalytique sur noir de palladium. La méthode de couplage qui a donné les meilleurs rendements est la méthode aux anhydrides mixtes, qui fut d'ailleurs utilisée également par Blout et coll. lors de leur travail sur les oligo-prolines.

Il nous faut cependant signaler que nous avons utilisé un ester de N-hydroxysuccinimide pour fabriquer du Boc-Pro-Pro-OH. Le rendement de cette réaction n'a jamais excédé 50 %, ce qui n'est pas très satisfaisant. Récemment Savrda (53) a étudié de près cette réaction de couplage et il a constaté l'apparition d'un contaminant de structure



avec un rendement de 40 %. Il a identifié ce produit par RMN du proton, spectroscopie infra-rouge et spectrométrie de masse. Par contre, cette réaction secondaire ne semble pas avoir lieu si l'on protège la fonction amine par le groupement benzyl-oxycarbonyle plutôt que par le tertio-butyloxycarbonyle. Lors d'essais préliminaires en vue de la mise au point d'un procédé de synthèse de nos peptides, nous avons utilisé le groupement carbobenzoxy pour protéger la fonction amine de la proline. Malheureusement, les rendements de couplage étaient en général inférieurs à ceux obtenus avec le tertio-butyloxycarbonyle, ce qui nous avait conduite à opter finalement pour le Boc.

Tous les dérivés intermédiaires ont été purifiés et caractérisés par la mesure du point de fusion, celle du pouvoir optique rotatoire et par chromatographie en couche mince. Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux donnés dans la littérature. Quant aux produits nouvellement décrits, ils ont été caractérisés de façon beaucoup plus complète : analyse élémentaire, analyse d'acides aminés, point de fusion, mesure du pouvoir optique rotatoire, chromatographie en couche mince et électrochromatographie (cette dernière technique n'a été utilisée que pour les peptides déprotégés).

C - Polycondensation

Le but à atteindre est d'obtenir le produit désiré avec un bon rendement et une faible polydispersité, tout en évitant la racémisation.

1 - Principe

La synthèse d'un polypeptide séquentiel peut se schématiser de façon très simple par l'équation suivante :

$$\text{HX}, \text{H-AA}_1\text{-AA}_2\text{.....-AA}_n\text{-OY} + \text{base} \longrightarrow \text{H-(AA}_1\text{-AA}_2\text{.....-AA}_n\text{)}_x\text{-OH}$$
où AA représente un résidu d'acide α aminé, HX un sel d'acide fort et Y un groupement ester. Cette méthode a été introduite dès 1906 par Fischer (54) et est encore très largement employée. Y est un groupe ester activé ; les esters les plus couramment utilisés sont ceux de paranitrophénol, de N-hydroxysuccinimide et de pentachlorophénol d'après ce qui ressort d'une revue sur ce sujet publiée par Johnson en 1974 (55). L'introduction de cette fonction ester activée sur le monomère à polycondenser peut se faire soit par introduction d'un résidu d'acide α aminé portant cette fonction, soit par introduction de ce groupe ester sur le peptide N-protégé. Quant à la polycondensation proprement dite, c'est une réaction très difficile à contrôler. Le processus général consiste à préparer une solution concentrée du monomère activé sous forme de sel d'acide fort et à ajouter une base à la solution. Mais le rendement de la réaction varie beaucoup d'un laboratoire à l'autre selon les méthodes utilisées pour isoler le polymère. Dans une revue récente, Goren (56) a étudié en détail l'influence des principaux facteurs pouvant intervenir lors de la polycondensation d'esters activés, mais il n'a pu tirer de conclusion générale quant aux conditions optimales à remplir pour la synthèse de polypeptides séquentiels.

Dans ce domaine, d'autres procédés de synthèse ont été développés. En particulier, pour fabriquer des produits de longueur de chaîne déterminée, la méthode de Merrifield a été utilisée (57) ; il s'agit dans ce cas de coupler des blocs de peptides à la chaîne en formation sur le support insoluble. Cette méthode est vraisemblablement la meilleure dans ce cas particulier, bien que les rendements de couplage ne dépassent guère 40 %.

Une autre méthode de polycondensation d'esters activés a été décrite dès 1975 dans le cas de polydepsipeptides (58), puis l'année suivante dans le cas de polypeptides séquentiels (59) ; il s'agit de la condensation thermique sous vide de monomère activé sous forme de sel d'acide fort, ce monomère étant déposé sur une matrice du type célite. Cette méthode est reportée comme donnant rapidement des polymères de haut poids moléculaire.

2 - Étude de la polycondensation

Lors de la synthèse de polypeptides séquentiels, de nombreux facteurs entrent en jeu, les plus importants étant la longueur de chaîne du monomère, sa tendance à la cyclisation ainsi que le choix des conditions de polycondensation.

La plupart du temps, la longueur de chaîne du peptide à polycondenser de même que sa séquence sont imposées par le travail que l'on s'est proposé de réaliser. Parfois, cependant, il est possible de modifier quelque peu ces facteurs : c'est ainsi que l'on utilisera de préférence un tétrapeptide à un dipeptide comme unité monomère, étant donnée la très grande tendance qu'ont les dipeptides à se cycliser pour former des dicétopipérazines (60). De même, il est possible de jouer sur la séquence à obtenir : on peut très bien utiliser une séquence $AA_3-AA_1-AA_2$ plutôt que $AA_1-AA_2-AA_3$ comme unité monomère ; c'est ainsi que Stewart (61) a pu montrer qu'en changeant la séquence d'un hexapeptide, on augmentait sa solubilité et que la polycondensation pouvait alors avoir lieu.

Quant au choix des conditions de réaction, il est primordial. En particulier, le choix de l'agent de polymérisation joue un très grand rôle (tableau 1) ;

Agent de polymérisation	Facteur de polymérisation
Ester de N-hydroxysuccinimide	100
Ester de pentachlorophénol	> 95
Ester de 2,4,5-trichlorophénol	60
Ester de paranitrophénol	30
DCCI + N-hydroxysuccinimide	7
DCCI	5

Tableau 1 - Choix de l'agent de polymérisation

mais l'influence du solvant est loin d'être négligeable. Celui-ci doit en effet solubiliser les polypeptides de grande taille, car le degré de polymérisation est abaissé lorsque le polymère en formation précipite, mais en même temps le solvant ne doit pas réagir avec le monomère activé. Les solvants les plus couramment utilisés sont le diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde, car ce sont eux qui donnent en général les meilleurs rendements et les plus hauts degrés de polymérisation. Dans certains cas cependant, un effet de conformation peut avoir lieu et ceci a été observé par Spach et coll. (62) alors qu'ils voulaient fabriquer du polyglutamate de benzyle en milieu apolaire ; par contre, cet effet n'a pas été observé en travaillant dans un solvant polaire.

On voit que de nombreux facteurs jouent sur la polycondensation et les revues publiées tant par Johnson (55) que par Goren (56) tendent à prouver que chaque cas est en fait un cas particulier.

3 - Racémisation

Plus encore que le rendement ou que le degré de polymérisation, la pureté optique du polymère obtenu est très importante. D'une façon générale, on peut dire que la polymérisation en présence d'agents de condensation donne un plus fort taux de racémisation que la polycondensation de monomères sous forme

d'esters activés. De toutes façons, Nitecki et coll. (63) ont montré qu'il y a en général racémisation lors de la préparation de l'ester activé à partir du monomère N-protégé ; il semble donc plus intéressant de partir d'un acide α aminé sous forme d'ester activé en vue de la synthèse d'un monomère à polycondenser. Néanmoins, il semble qu'on puisse obtenir quand même un polymère partiellement racémisé, même dans le cas où l'on part d'un monomère optiquement pur (64). Il faut noter cependant que les séquences racémisées donnent en général des polymères de plus faible poids moléculaire que lorsqu'il n'y a pas racémisation, ces dérivés pouvant être éliminés lors du fractionnement qui suit la polycondensation. D'après les études faites tant par Nitecki et coll. (63, 64) que par d'autres (65), il semble que la racémisation lors de la polycondensation soit essentiellement dépendante de la quantité de base utilisée pour libérer le monomère activé de son sel et induire la réaction. Ceci est en accord avec le fait que Goodman et coll. (66) n'observent pas de racémisation lors de la synthèse de poly(Gly-Val-Ala) en utilisant leur méthode de polycondensation thermique en présence de célite, car dans ce cas aucune addition de base n'est nécessaire pour initier la réaction.

D - Schéma de synthèse des polymères

Pour fabriquer les deux polymères $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ et $\text{H-[Gly-(Pro)}_4\text{]}_n\text{-OH}$, nous avons utilisé la polycondensation des esters de pentachlorophénol des peptides ayant la séquence désirée. Bien qu'il n'y ait pas de risques de racémisation dans notre cas particulier, nous avons préféré introduire la fonction ester activé dès le début de la synthèse en utilisant l'ester de pentachlorophénol de la proline (fig. 4 b et 5 b). Quant à la polycondensation proprement dite, cette réaction fut menée en milieu diméthylformamide ; nous avons travaillé à une concentration 0,5 M en monomère activé en présence de deux équivalents de triéthylamine, un équivalent de base servant à libérer le monomère de son chlorhydrate, l'autre servant à neutraliser le pentachlorophénol libéré en cours de réaction (56). Les polypeptides formés furent fractionnés, l'un sur Séphadex LH-20 en milieu méthanol ($\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$) et l'autre sur Bio-Gel P-10 en milieu eau ($\text{H-[Gly-(Pro)}_4\text{]}_n\text{-OH}$), ce qui a fourni des polymères de poids moléculaires d'environ 4900 et 6800 respectivement, c'est-à-dire de masse suffisamment élevée pour que leur conformation puisse être étudiée. Cependant les quantités obtenues étaient insuffisantes pour pouvoir mener une étude conformationnelle au moyen de la résonance magnétique nucléaire du carbone-13. C'est pourquoi nous avons fabriqué d'autres échantillons de ces mêmes polymères en nous inspirant de la méthode de Goodman (polycondensation thermique sur support de célite). Le fractionnement des polymères fut alors mené sur Séphadex G-25 en milieu eau et le pic exclus fut repris et dialysé contre de l'eau, ce qui a fourni les deux polymères désirés en quantité suffisante pour l'étude que nous envisageons.

E - Partie expérimentale

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Sunvic et ne sont pas corrigés. Les analyses élémentaires ont été faites sur un appareil Perkin-Elmer C, H, N, modèle 240. Les pouvoirs optiques rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Perkin-Elmer, modèle 141. Les compositions en acides aminés ont été déterminées, après hydrolyse totale de 24 heures par HCl 5,6 N à 110 °C, sur un appareil Jéol, modèle 5AH.

Les solvants utilisés pour les chromatographies en couches minces sont :

I - butan-1-ol, acide acétique, eau (3 : 1 : 1 en volumes),

II - chloroforme, méthanol, acide acétique (95 : 5 : 3 en volumes).

Pour les électrochromatographies, nous avons utilisé un tampon à 8 % d'acide formique, pH 1,9, pour faire l'électrophorèse et la phase supérieure du système butan-1-ol, acide acétique, eau (4 : 1 : 5 en volumes) pour faire la chromatographie.

Nous ne décrivons ici que les synthèses non publiées avant ce travail. En règle générale, la pureté des produits est vérifiée par chromatographie en couches minces ainsi que par mesure du point de fusion. Les analyses élémentaires n'ont été faites que pour certains produits. Quant aux peptides déprotégés, ils ont été caractérisés par électrochromatographie, par analyse d'acides aminés ainsi que par mesure du pouvoir optique rotatoire et du point de fusion.

HCl, H-Gly-Pro-OBzl (I)

365 mg (1 mM) de Boc-Gly-Pro-OBzl sont dissous dans 2 ml d'une solution d'HCl N dans l'acide acétique glacial. On laisse agiter la solution pendant 3 heures à température ambiante avant d'évaporer à sec le solvant au rotavapor, ce qui fournit une huile qu'il nous a été impossible de faire cristalliser par la suite.

Boc-(Gly-Pro)₂-OBzl (II)

272 mg (1 mM) de Boc-Gly-Pro-OH sont dissous dans 20 ml de chloroforme. A cette solution portée à - 20 °C, on ajoute successivement 0,14 ml (1,1 mM) de chloroformiate d'isobutyle et 0,11 ml (1 mM) de N-méthylmorpholine. On agite vigoureusement pendant 30 minutes avant d'ajouter 299 mg (1 mM) de HCl, H-Gly-Pro-OBzl (I) fraîchement préparé en suspension dans 10 ml de chloroforme, puis 0,11 ml (1 mM) de N-méthylmorpholine. On agite la solution vigoureusement pendant encore 10 minutes, puis plus lentement pendant une nuit. On filtre alors l'insoluble avant de diluer le filtrat avec 1 volume de chloroforme. La couche organique est lavée à l'eau saturée en chlorure de sodium, au bicarbonate de sodium 1 M, puis de nouveau à l'eau saturée en chlorure de sodium jusqu'à neutralité. La phase organique est alors séchée sur sulfate de sodium avant que le chloroforme ne soit évaporé à sec sous pression réduite. On reprend l'huile obtenue dans l'acétate d'éthyle. Le produit précipite par addition de cyclohexane : m = 423 mg, soit un rendement de 82,0 %. $F_p = 164 - 165$ °C. $R_F = 0,58$ (solvant II).

Boc-(Gly-Pro)₂-OH (III)

Ce produit est obtenu par hydrogénation catalytique en présence de noir de palladium du Boc-(Gly-Pro)₂-OBzl (II) dissous dans le tertio-butanol. Le rendement de la réaction est de 81,4 % $F_p = 167 - 169$ °C. $R_F = 0,28$ (solvant II).

H-(Gly-Pro)₂-OH (IV)

1,07 g (2,5 mM) de Boc-(Gly-Pro)₂-OH (III) sont dissous dans 8 ml d'une solution de HCl N dans l'acide acétique glacial. On laisse agiter la solution pendant 5 heures à température ambiante. Puis on évapore à sec le solvant sous pression réduite, ce qui donne un résidu solide que l'on reprend par de l'eau et qu'on lyophilise : m = 830 mg, soit un rendement de 91,4 %. Ce dérivé est libéré de son chlorhydrate par action de la N-méthylmorpholine et purifié par passage sur Séphadex G-10. On détecte le peptide à la ninhydrine, les anions Cl⁻ par réaction au nitrate d'argent. On obtient ainsi 386,5 mg de peptide dont la pureté est testée par électrochromatographie. Composition en acides aminés : Pro 0,99 Gly 1,00. $F_p = 134 - 135$ °C. $[\alpha]_{576} = - 216^\circ$ (c = 0,13, H₂O) à 22 °C.

Boc-Gly-(Pro)₂-OBzl (V)

544,6 mg (2 mM) de Boc-Gly-Pro-OH sont dissous dans 20 ml de chloroforme. A cette solution portée à -20°C , on ajoute successivement 0,28 ml (2,2 mM) de chloroformiate d'isobutyle et 0,22 ml (2 mM) de N-méthylmorpholine. On agite vigoureusement pendant 30 minutes avant d'ajouter 483,4 mg (2 mM) de HCl, H-Pro-OBzl en suspension dans 5 ml de chloroforme, puis 0,22 ml (2 mM) de N-méthylmorpholine. Le mode opératoire suivi est alors le même que pour (II), mais le produit est précipité par addition de cyclohexane à une solution dans l'acétate d'éthyle : $m = 390\text{ mg}$, soit un rendement de 42,5 %. $F_p = 56 - 57^{\circ}\text{C}$. $R_F = 0,45$ (solvant II). $R_F = 0,77$ (solvant I).

Boc-Gly-(Pro)₂-OH (VI)

Ce dérivé est obtenu par hydrogénation catalytique de (V) en milieu tertio-butanol en présence de noir de palladium. On obtient ainsi une huile que l'on emploie telle quelle pour l'étape suivante. $R_F = 0,62$ (solvant II).

H-Gly-(Pro)₂-OH (VII)

L'huile obtenue précédemment (2 mM) est dissoute dans 5 ml d'une solution de HCl N dans l'acide acétique glacial. Le mode opératoire suivi est le même que pour (IV). On obtient ainsi 236 mg de peptide (rendement global 31,9 %) dont la pureté est testée par électrochromatographie. Composition en acides aminés : Pro 1,94 Gly 1,00. $F_p = 176 - 177^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{576} = -181^{\circ}$ ($c = 1,19$, H_2O) à 22°C .

Boc-Gly-(Pro)₃-OBzl (VIII a)

593,9 mg (3,4 mM) de Boc-Gly-OH sont dissous dans 15 ml de chloroforme. A cette solution portée à -20°C , on ajoute successivement 0,49 ml (3,7 mM) de chloroformiate d'isobutyle et 0,37 ml (3,4 mM) de N-méthylmorpholine. On agite vigoureusement pendant 30 minutes avant d'ajouter 1,48 g (3,4 mM) de HCl, H-(Pro)₃-OBzl fraîchement préparé en suspension dans 10 ml de chloroforme et 0,37 ml (3,4 mM) de N-méthylmorpholine. Le mode opératoire suivi est alors le même que pour (II). On obtient le dérivé attendu sous forme d'huile qu'on ne peut faire cristalliser. Le rendement de la réaction est de 88,3 %.

Boc-Gly-(Pro)₃-OH (IX)

L'huile obtenue précédemment est dissoute dans le tertio-butanol et hydrogénée en présence de noir de palladium. On obtient ici encore un dérivé huileux. Le rendement de la réaction est de 82,9 %. $R_F = 0,30$ (solvant II).

H-Gly-(Pro)₃-OH (X)

On suit le même mode opératoire que pour (IV). A partir de 1,15 g de (IX), on obtient 515 mg de produit (rendement 57,0 %) dont la pureté est testée par électrochromatographie. Composition en acides aminés : Pro 3,30 Gly 1,00. $F_p = 160 - 161^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{576} = -144^{\circ}$ ($c = 1,02$, H_2O) à 22°C .

Boc-Gly-(Pro)₄-OBzl (XI a)

634,5 mg (2,4 mM) de Boc-Gly-Pro-OH sont dissous dans 20 ml de chloroforme. A cette solution portée à -20°C , on ajoute successivement 0,34 ml (2,6 mM) de chloroformiate d'isobutyle et 0,26 ml (2,4 mM) de N-méthylmorpholine. On agite vigoureusement pendant 20 minutes avant d'ajouter 1,03 g (2,4 mM) de HCl, H-(Pro)₃-OBzl fraîchement préparé en suspension dans 5 ml de chloroforme, puis 0,26 ml (2,4 mM) de N-méthylmorpholine. Le mode opératoire suivi est alors le même que pour (II). On obtient le dérivé attendu sous forme d'huile qu'on ne peut faire cristalliser.

Boc-Gly-(Pro)₄-OH (XII)

Ce peptide est préparé par hydrogénation catalytique du dérivé benzylé (XI a) dissous dans l'alcool tertio-butylque, le noir de palladium étant utilisé comme catalyseur. On obtient un dérivé amorphe par trituration sous éther.

H-Gly-(Pro)₄-OH (XIII)

On suit le même mode opératoire que pour (IV). On obtient ainsi 354,3 mg de peptide (soit un rendement de 31,9 %, basé sur le Boc-Gly-Pro-OH de départ) dont la pureté est testée par électrochromatographie. Composition en acides aminés : Pro 3,85 Gly 1,00. $F_p = 190 - 191^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{576} = -15,2^{\circ}$ ($c = 2,5$, H_2O) à 22°C .

Boc-Pro-Pro-OH (XIV)

A 6,24 g (20 mM) de Boc-Pro-ONSu en solution dans 35 ml de dioxanne à une température comprise entre + 5 °C et + 10 °C, on ajoute simultanément 2,53 g (22 mM) de proline et 3,53 g (42 mM) de bicarbonate de sodium en solution dans 35 ml d'eau. On laisse agiter 2 heures à froid puis 3 jours à température ambiante. Après avoir filtré l'insoluble, on évapore le solvant à sec sous pression réduite. On reprend le résidu dans du bicarbonate de sodium 0,5 M et on extrait à l'éther le Boc-Pro-ONSu qui n'a pas réagi. Après acidification, la phase aqueuse est extraite au chloroforme. La couche organique est récupérée, lavée à l'eau saturée de chlorure de sodium et évaporée à sec sous pression réduite après avoir été séchée sur sulfate de sodium. Le produit précipite à partir d'un mélange acétate d'éthyle-cyclohexane : m = 4,08 g, soit 62,5 % de rendement. $F_p = 173 - 174$ °C. $R_F = 0,50$ (solvant II). Analyse élémentaire ($C_{15}H_{24}N_2O_3$) : calculé C 57,72 H 7,68 N 8,97 ; trouvé C 57,38 H 7,70 N 8,72. $[\alpha]_{576} = -121,0^\circ$ (c = 1,96, $CHCl_3$) à 22 °C.

HCl, H-Pro-OC₃Ph (XV b)

On dissout 3,7 g (7,9 mM) de Boc-Pro-OC₃Ph dans 40 ml d'acétate d'éthyle. On fait alors passer HCl gazeux dans la solution maintenue à une température de 4 °C. Très rapidement, le chlorhydrate recherché précipite : m = 2,98 g, soit un rendement de 94,1 %. $F_p = 177 - 178$ °C. $R_F = 0,10$ (solvant I).

Boc-(Pro)₃-OC₃Ph (XVI b)

2,19 g (7 mM) de Boc-Pro-Pro-OH (XIV) sont dissous dans 90 ml de chloroforme. A cette solution portée à - 20 °C, on ajoute successivement 1,01 ml (7,7 mM) de chloroformiate d'isobutyle et 0,77 ml (7 mM) de N-méthylmorpholine. On agite vigoureusement pendant 30 minutes avant d'ajouter 2,80 g (7 mM) de HCl, H-Pro-OC₃Ph en suspension dans 10 ml de chloroforme, puis 0,77 ml (7 mM) de N-méthylmorpholine. Le mode opératoire suivi est alors le même que pour (II). Le produit cristallise à partir de l'éther éthylique : m = 4,07 g, soit 88,8 % de rendement. $F_p = 82 - 85$ °C. $R_F = 0,92$ (solvant II).

HCl, H-(Pro)₃-OC₃Ph (XVII b)

4,07 g (6,2 mM) de Boc-(Pro)₃-OC₃Ph (XVI b) sont dissous dans 10 ml d'une solution d'HCl N dans l'acide acétique glacial. On laisse agiter 3 heures à température ambiante avant d'évaporer à sec sous pression réduite. On reprend le résidu obtenu sous éther, ce qui entraîne la cristallisation du chlorhydrate : m = 1,79 g, soit 48,7 % de rendement. $F_p = 155 - 158$ °C. $R_F = 0,08$ (solvant II).

Boc-Gly-(Pro)₃-OC₃Ph (VIII b)

Couplage et extraction du produit se font de la même manière que pour la préparation de Boc-Gly-(Pro)₃-OBzl (VIII a), mais ici le produit est purifié par filtration sur gel Séphadex LH-20 en milieu méthanol avant d'être précipité à partir d'un mélange acétate d'éthyle-cyclohexane : m = 357 mg, soit un rendement de 52,1 %. $F_p = 146 - 149$ °C. $R_F = 0,83$ (solvant II).

HCl, H-Gly-(Pro)₃-OC₃Ph (XVIII b)

On dissout 165 mg du peptide N-protégé dans 10 ml d'une solution d'HCl N dans l'acide acétique glacial. On laisse agiter 4 heures à température ambiante avant d'évaporer le solvant sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'eau et lyophilisé : m = 122 mg, soit un rendement de 81,1 %. Composition en acides aminés : Pro 2,9 Gly 1,1. Ce dérivé est utilisé tel quel pour la polycondensation.

Boc-Gly-(Pro)₄-OC₃Ph (XI b)

Ce produit est préparé de la même façon que Boc-Gly-(Pro)₄-OBzl (XI a) à partir de 544,6 mg (2 mM) de Boc-Gly-Pro-OH que l'on couple à 1,19 g (2 mM) de HCl, H-(Pro)₃-OC₃Ph (XVII b). On obtient ainsi 800 mg de produit pur, soit un rendement de 49,3 %. $F_p = 122$ °C. $R_F = 0,76$ (solvant II). Analyse élémentaire ($C_{32}H_{48}N_5O_8Cl_3$) : calculé C 48,8 H 4,9 N 8,6 ; trouvé C 48,2 H 5,3 N 7,8.

HCl, H-Gly-(Pro)₄-OC₃Ph (XIX b)

On le prépare de la même manière que (XVIII b) avec un rendement de 78,7 %. Composition en acides aminés : Pro 4,0 Gly 1,0. Ce dérivé est utilisé tel quel pour la polycondensation.

H-[Gly-(Pro)₃]_n-OH

390 mg (0,6 mM) de HCl,H-Gly-(Pro)₃-OCl₂Ph (XVIII b) sont dissous dans 1 ml de diméthylformamide. A cette solution, on ajoute 3 ml de dioxanne ainsi que 960 mg de hyflo-supercel. Après avoir évaporé les solvants sous pression réduite, on reprend le résidu par 1 ml de diméthylformamide et 3 ml de dioxanne. On évapore les solvants de nouveau sous pression réduite et on sèche le résidu obtenu sur P₂O₅. On pulvérise alors très finement le produit et on le met à chauffer sous pression réduite 5 heures à 40 °C, puis 3 jours à 125 °C. Pour extraire le polymère ainsi formé, on reprend le mélange par 20 ml d'éther et on extrait par de l'acide acétique à 5 %. On concentre la phase acide ; on la centrifuge de façon à éliminer l'hyflo-supercel restant ; puis on évapore le solvant sous pression réduite. On précipite le polymère en le dissolvant dans 5 ml de méthanol auquel on ajoute 50 ml d'éther. Le produit obtenu est récupéré par centrifugation et fractionné sur Séphadex G-25 (50,0 × 2,2 cm) en milieu H₂O, puis dialysé. On récupère ainsi 70 mg de polymère.

H-[Gly-(Pro)₄]_n-OH

Le mode opératoire utilisé pour la synthèse et la purification de ce polymère est le même que celui décrit précédemment. On part de 400 mg (0,54 mM) de HCl,H-Gly-(Pro)₄-OCl₂Ph que l'on dissout dans un mélange diméthylformamide-dioxanne (1 ml - 3 ml) et auquel on ajoute 960 mg de hyflo-supercel. Après fractionnement sur Séphadex G-25 (50,0 × 2,2 cm) en milieu H₂O et dialyse, on obtient 60 mg de polymère.

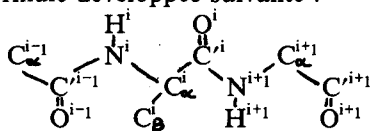
CHAPITRE II

ÉTUDE CONFORMATIONNELLE DES PEPTIDES

Dans ce chapitre, nous nous limitons à l'étude conformationnelle des peptides synthétisés lors de ce travail, à savoir $\text{H-[Gly-Pro]}_2\text{-OH}$ et $\text{H-Gly-(Pro)}_n\text{-OH}$ où $n = 2, 3$ et 4 . Pour cette étude, nous avons utilisé essentiellement deux techniques, le dichroïsme circulaire et la résonance magnétique nucléaire aussi bien du proton que du carbone-13.

A - Conformation des chaînes peptidiques

Un peptide est, par définition, une molécule composée d'un enchaînement d'acides α aminés reliés entre eux par des liaisons amide, le plus souvent secondaire, parfois tertiaire comme c'est le cas ici avec la proline. On peut schématiser un résidu par la formule développée suivante :



La plupart du temps on considère que la liaison peptidique $\text{C}'\text{O-NH}$ est plane. Mais, dans le plan défini par ces quatre atomes, une rotation est possible autour des liaisons $\text{N-C}\alpha$ et $\text{C}\alpha\text{-C}'$. Par conséquent, pour préciser la structure des peptides, il ne suffit pas de connaître la configuration des atomes autour du carbone asymétrique, mais il faut aussi connaître les positions respectives des différents groupes constituant la molécule prise dans son ensemble.

Pour repérer ces positions, on a adopté la nomenclature préconisée par l'IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (67). Si on se réfère au schéma précédent, on désignera par Φ_i l'angle de torsion autour de la liaison $\text{N-C}\alpha$ et par Ψ_i l'angle de torsion autour de la liaison $\text{C}\alpha\text{-C}'$; quant à ω_i , c'est l'angle de torsion autour de la liaison $\text{C}'\text{-N}$. Toujours en se référant à ce schéma, on dira que les liaisons $\text{C}\alpha\text{-C}'^i$ et $\text{N}^i\text{-H}^i$ sont en position cis par rapport à la liaison $\text{N}^i\text{-C}\alpha$ et on aura dans ce cas, par convention : $\Phi_i = 180^\circ$; de même les liaisons $\text{N}^i\text{-C}\alpha$ et $\text{C}'^i\text{-O}^i$ sont en position cis par rapport à la liaison $\text{C}\alpha\text{-C}'^i$ et on aura dans ce cas, par convention : $\Psi_i = 180^\circ$. Par contre, les liaisons $\text{C}'^i\text{-O}^i$ et $\text{N}^{i+1}\text{-H}^{i+1}$, telles qu'elles sont représentées sur le schéma, sont en position trans par rapport à la liaison $\text{C}'^i\text{-N}^{i+1}$; dans ce cas, on aura, par convention : $\omega_i = 180^\circ$. En règle générale, dans des peptides linéaires, les liaisons peptidiques adoptent la conformation trans ($\omega_i = 180^\circ$), sauf lorsque des imino-acides tels que la proline ou la

B - Dichroïsme circulaire

1 - Généralités

Lorsqu'une onde électromagnétique linéairement polarisée traverse un milieu possédant un groupement chromophore optiquement actif, ses composantes circulairement polarisées gauche et droite ne sont pas absorbées de la même manière ; il y a apparition de dichroïsme circulaire.

En pratique, on parle d'ellipticité molaire $[\theta]$, cette grandeur étant proportionnelle à la différence entre les coefficients d'extinction molaire ϵ pour la lumière polarisée droite et gauche. On a la relation :

$$[\theta] = 3300 (\epsilon_G - \epsilon_D)$$

où $[\theta]$ s'exprime en $\text{degré} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{décimole}^{-1}$, unité hors système consacrée par l'usage. Quant aux résultats de dichroïsme circulaire, ils sont donnés sous forme de courbes : $[\theta] = f(\lambda)$. Le dichrographe fournit directement la différence de densité optique ($A_G - A_D$) à la sortie de l'échantillon. La loi de Beer-Lambert nous donne :

$$\epsilon_G - \epsilon_D = M_0 (A_G - A_D) s \text{ l}^{-1} \text{ c}^{-1}$$

M_0 : masse moléculaire du composé étudié, en grammes, ramenée à un groupement chromophore.

c : concentration du soluté, en $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

l : épaisseur de la cuve, en cm.

La différence $A_G - A_D$ est mesurée sur le spectre en mm.

s : sensibilité, en mm^{-1} .

2 - Étude des oligomères de proline

Comme cela a été montré par Blout et coll. (70), des peptides linéaires contenant de la proline peuvent exister dans deux conformations différentes suivant que les liaisons peptidiques sont cis (c) ou trans (t). C'est pourquoi on a pu définir deux conformations différentes pour la polyproline : soit une hélice droite, dans laquelle toutes les liaisons amide sont cis (forme I), soit une hélice gauche, dans laquelle toutes les liaisons amide sont trans (forme II). La polyproline II est stabilisée dans de bons solvants, tels que l'eau ou l'acide acétique. Quant à la polyproline I, on la rencontre dans de mauvais solvants, tels que la pyridine ou les alcools aliphatiques. Intuitivement, on peut penser que les oligomères de proline auront tendance à adopter une structure en polyproline I ou II selon le solvant, une fois qu'ils auront atteint une longueur de chaîne suffisante.

Deux équipes se sont penchées sur l'étude d'oligomères de proline par spectrophotométrie ultra-violette et dichroïsme circulaire. Il s'agit d'une part

de Sakakibara et coll. (76) qui ont étudié ces dérivés sous forme de tertio-amyl-oxycarbonylprolines, avec des enchaînements de 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 8 résidus prolyle, et d'autre part de Rothe et coll. (77, 78) qui ont étudié ces dérivés non protégés ; pour ce travail, ils ont synthétisé toute la série H-(Pro)_n-OH avec des poids moléculaires jusque 1500 ainsi que quelques dérivés d'ordre supérieur.

a - Spectrophotométrie ultra-violette

Les spectres obtenus expérimentalement présentent une bande assez large, qui recouvre en fait plusieurs transitions, certaines caractéristiques du chromophore imide, d'autres caractéristiques du chromophore carboxyle. En fait, le chromophore -CO-N- est caractérisé par deux bandes, l'une correspondant à la transition $\pi-\pi^*$ et dont le maximum d'absorption est situé entre 196 et 202 nm pour des solutions aqueuses (79), l'autre correspondant à la transition $n-\pi^*$ et située vers 212 nm. Le chromophore -COOH est caractérisé lui aussi par deux bandes ; mais celle correspondant à la transition $\pi-\pi^*$ présente un maximum d'absorption situé vers 172 - 173 nm, longueur d'onde qui n'est pas accessible expérimentalement sauf si l'on dispose d'un appareil sous vide ; seule sera accessible la bande correspondant à la transition $n-\pi^*$ qui présente un maximum d'absorption vers 205 nm, toujours en solution aqueuse.

Dans leur étude sur les oligomères de proline non protégés en solution aqueuse, Rothe et coll. (77) ont observé un déplacement du maximum d'absorption de leurs peptides en fonction de la longueur de chaîne (fig. 7). Cet effet se manifeste surtout lors du passage du dimère au trimère ; au stade heptaproline, la longueur d'onde du maximum d'absorption est la même que pour la polyproline II (202 nm).

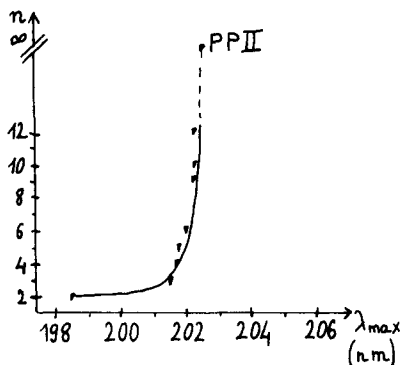


Figure 7 - Longueur d'onde des maxima d'absorption des oligoprolines en fonction de la longueur de chaîne (d'après Rothe (77))

Lors d'une étude analogue sur des oligoprolines N-protégées, Sakakibara et coll. (76) ont constaté que déjà au stade du pentamère la longueur

d'onde du maximum d'absorption était la même que pour la polyproline II (203 nm, selon eux). De plus, ils ont remarqué que le coefficient d'absorption de leurs dérivés au maximum d'absorption augmentait avec la longueur de chaîne, ce qui semble indiquer que les transitions π - π^* parallèles à l'axe de l'hélice que forme la polyproline II contribuent de façon non négligeable à la bande d'absorption observée aux alentours de 200 nm.

b - Dichroïsme circulaire

L'activité optique d'une molécule est caractérisée par l'apparition d'une force rotationnelle R_i associée à une transition $o \rightarrow i$ et dont l'expression mathématique a été donnée par Rosenfeld (80) :

$$R_i = I_m \langle o | \mu | i \rangle \cdot \langle i | m | o \rangle$$

où μ et m représentent les opérateurs moments dipolaires électrique et magnétique respectivement, I_m indiquant qu'il s'agit de la partie imaginaire de ce produit scalaire.

Pour qu'une substance soit optiquement active et qu'elle exhibe donc un dichroïsme circulaire, il faut qu'elle comporte des chromophores soit intrinsèquement dissymétriques (l'activité optique est dans ce cas inhérente à la géométrie du chromophore), soit intrinsèquement symétriques mais perturbés de façon dissymétrique (l'activité optique est alors induite dans le chromophore par son environnement). Cette perturbation peut être soit statique, venant du champ de la distribution de charge de la molécule (théorie à un électron de Condon, Altar, Eyring (81)) ; soit cette perturbation peut être dynamique, couplant les transitions électriquement permises de chromophores voisins dans la molécule (théorie de la polarisabilité de Kirkwood (82)).

Le travail exposé ici ayant trait à l'étude conformationnelle de peptides et de polypeptides, seul le chromophore amide est mis en jeu. Les transitions qui peuvent avoir lieu sont : $n - \sigma^*$ vers 150 nm ; $\pi_2 - \pi^*$ vers 165 nm ; $\pi_1 - \pi^*$ vers 190 nm et $n - \pi^*$ vers 220 nm. Certaines, telles $\pi_2 - \pi^*$ et $\pi_1 - \pi^*$ sont caractérisées par une bande d'absorption intense en ultra-violet et se traduisent par une variation du moment dipolaire électrique μ du chromophore. D'autres, telle $n - \pi^*$, sont caractérisées par une bande d'absorption en ultra-violet d'intensité au moins dix fois moindre ; lors de la transition, il y a variation du moment dipolaire magnétique m du chromophore étudié.

Lors de la formation d'un enchaînement polypeptidique, on observe des perturbations des spectres d'absorption, celles-ci pouvant être des perturbations excitoniques (il y a interaction entre les mêmes états excités de différents chromophores amide et deux bandes dichroïques apparaissent ; mécanisme de type Kirkwood), les autres perturbations étant dues à des interactions non

résonantes entre un chromophore dans un état excité donné et tous les autres chromophores dans des états excités différents (mécanisme μm (83)).

Il est parfaitement envisageable de calculer l'activité optique associée à une géométrie donnée de la chaîne à condition de connaître l'origine et la position des différentes bandes d'absorption relatives aux transitions étudiées. De tels calculs ont pu être réalisés avec succès pour les transitions $n - \pi^*$ et $\pi_1 - \pi^*$ des chromophores amide secondaire dans des homopolypeptides de différentes conformations (84) et il a été montré que le terme excitonique était prépondérant pour la transition $\pi_1 - \pi^*$ alors qu'il n'intervenait pas pour la transition $n - \pi^*$.

Pour la polyproline par contre, homopolypeptide comportant des chromophores imide, les calculs d'activité optique n'ont pas permis, jusqu'en 1974, de retrouver un spectre dichroïque voisin de celui obtenu expérimentalement. Ce désaccord entre résultats théoriques et expérimentaux peut s'expliquer par le fait que, alors que les transitions dans l'ultra-violet lointain n'ont qu'une très faible contribution à l'activité optique des polypeptides, ceci n'est plus vrai dans le cas de la polyproline. C'est ce qu'ont montré Ronish et Krimm (85) dans leur travail théorique publié en 1974. Dans leurs calculs, ils ont fait intervenir d'une part la transition $n - \pi^*$ imide qu'ils ont centrée à 230 nm, et d'autre part la transition $\pi_1 - \pi^*$ imide centrée à 198 nm. Ils ont observé que, si le degré de polymérisation augmente, il y a un déplacement du centre apparent de la transition ainsi que décomposition en deux bandes centrées respectivement à 185 et 206 nm, la composante à 206 nm ayant une polarisation parallèle et étant plus intense que l'autre. Si l'on se réfère au formalisme excitonique, la décomposition de la transition $\pi - \pi^*$ provient de l'interaction entre de telles transitions dans des résidus voisins. Mais cette interaction n'explique pas le déplacement du centre de la transition et il faut pour cela faire intervenir une perturbation causée par les transitions du groupement peptidique en UV lointain, perturbation des transitions $\pi_2 - \pi^*$ et $n - \sigma^*$ que l'on ne peut chiffrer exactement et que l'on approxime au moyen d'une correction de polarisabilité. Les résultats de ce calcul sont représentés sur la figure 8, ainsi que le spectre obtenu expérimentalement constitué de deux bandes, l'une faiblement positive située vers 226 - 228 nm, l'autre fortement négative vers 197 - 205 nm.

Dans leur étude expérimentale sur les oligomères de proline non protégés en solution aqueuse, Rothe et coll. (78) ont constaté que les spectres dichroïques des oligomères de degré supérieur au trimère présentaient les traits caractéristiques du spectre de la polyproline II ; cependant les valeurs de l'ellipticité n'atteignaient des valeurs comparables à celles obtenues pour la polyproline II qu'à partir de l'eicosaproline.

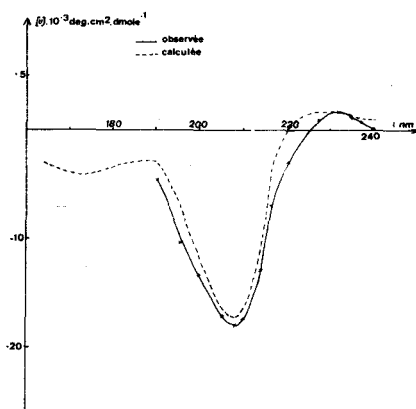


Figure 8 - Spectre dichroïque calculé de la polyproline II comparé au spectre expérimental (d'après Krimm (85))

Sakakibara et coll. (76) sont arrivés aux mêmes conclusions. Par comparaison avec les résultats obtenus par spectrophotométrie ultra-violette, ils attribuent la bande fortement négative observée dans le spectre dichroïque de la polyproline II à une transition $\pi - \pi^*$ du chromophore imide ; quant à la faible bande positive qui apparaît vers 226 - 228 nm et dont l'intensité diminue au fur et à mesure que la chaîne polypeptidique s'allonge, elle est vraisemblablement due d'après eux à une transition $n - \pi^*$ imide. En fait, d'après Ronish et Krimm (85), cette bande serait due à une contribution de la transition $n - \pi^*$ imide à laquelle se superposerait la composante positive de la transition $\pi - \pi^*$ de la polyproline II, ceci expliquant alors l'évolution du spectre de la polyproline II lorsqu'on ajoute du chlorure de calcium à la solution (cette bande positive disparaît alors).

3 - Étude de nos peptides

Les spectres dichroïques de nos peptides ont été enregistrés sur un dichrographe Jobin-Yvon R.J. Mark III. Nous avons travaillé à température ambiante en solution aqueuse avec une cuve d'épaisseur 0,01 cm. Les concentrations respectives des différentes solutions étaient 0,13 mg/ml pour H-[Gly-Pro]₂-OH, 1,18 mg/ml pour H-Gly-(Pro)₂-OH, 1,02 mg/ml pour H-Gly-(Pro)₃-OH et 0,51 mg/ml pour H-Gly-(Pro)₄-OH, ce qui correspond à des densités optiques de l'ordre de 0,5 pour chacun des peptides.

Nos peptides diffèrent des oligomères de proline étudiés précédemment, car ils contiennent une liaison Gly-Pro à côté des liaisons Pro-Pro.

a - Spectrophotométrie ultra-violette

D'après Schellman et coll. (86), Gly-Pro en solution aqueuse à pH 6,6 présente un maximum d'absorption à 200 nm alors que ce maximum est

situé à 198 nm dans le cas de Pro-Pro en solution dans l'eau à pH 7,2.

Si l'on se réfère aux études menées précédemment sur les oligomères de proline, on peut penser que le peptide H-Gly-(Pro)₄-OH présentera un maximum d'absorption à la même longueur d'onde que la polyproline II. C'est bien ce que l'on observe en effet : alors que H-[Gly-Pro]₂-OH présente un maximum d'absorption à 195 nm, H-Gly-(Pro)₂-OH et H-Gly-(Pro)₃-OH ont un maximum d'absorption vers 200 nm et H-Gly-(Pro)₄-OH présente ce maximum à 202 nm.

b - Dichroïsme circulaire

Si notre hypothèse est exacte, à savoir que le pentamère en solution aqueuse adopte une conformation proche de celle de la polyproline II (toutes les liaisons peptidiques trans), cela doit se voir en dichroïsme circulaire avec l'apparition d'une faible bande positive située vers 226 - 228 nm.

Les spectres dichroïques de nos peptides sont présentés sur la figure 9 ainsi que ceux de quelques oligomères de proline tirés du travail de Sakakibara et coll. (76). On voit qu'effectivement H-Gly-(Pro)₄-OH présente un spectre dichroïque qui n'est pas sans rappeler celui de la polyproline II (85), à savoir qu'il présente un minimum centré à 202 nm (au lieu de 206 nm pour la polyproline II) ainsi qu'une faible bande positive vers 227 nm. Ces résultats seuls ne nous permettent cependant pas de conclure de façon définitive que ce peptide adopte une

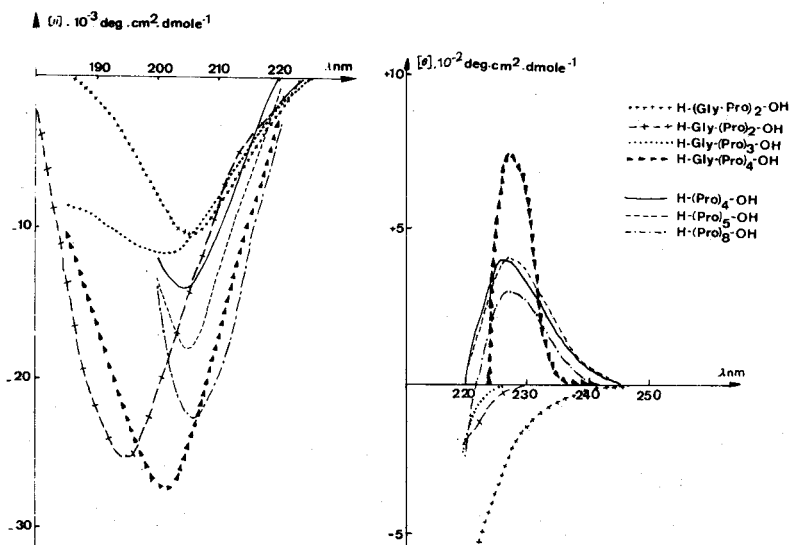


Figure 9 - Spectres dichroïques de nos peptides comparés à ceux d'oligoprolines (d'après Sakakibara (76))

conformation du type polyproline II ; pour pouvoir affirmer cela, il est nécessaire de posséder le spectre de résonance magnétique nucléaire en carbone-13 de ce dérivé : on verra alors si toutes les liaisons peptidiques de H-Gly-(Pro)₄-OH en solution aqueuse sont effectivement trans. Quant aux autres peptides étudiés ici, les résultats obtenus en dichroïsme circulaire montrent que ces produits n'adoptent pas de conformation particulière en solution aqueuse. Ceci est un résultat attendu, étant donné la longueur de chaîne de ces dérivés et ce résultat est tout à fait en accord avec les conclusions tirées précédemment par Sakakibara et coll. (76) et par Rothe et coll. (78) qui ont montré qu'un oligomère de proline adopte une conformation hélicoïdale à partir du tétramère.

C - Résonance magnétique nucléaire

1 - Généralités

Lorsque des particules élémentaires placées dans un champ magnétique absorbent une radiation électromagnétique, on parle de résonance magnétique. De plus, si cette absorption est attribuée au noyau, on parlera de résonance magnétique nucléaire. Les résultats sont exprimés en terme de glissement chimique δ , cette grandeur étant définie par la relation :

$$\delta = (\nu_s - \nu_r) \times (\nu_r)^{-1} \times 10^6$$

ν_s : fréquence de résonance du noyau étudié (en Hz)

ν_r : fréquence de résonance de la référence (en Hz)

δ : glissement chimique du noyau considéré (en ppm).

Une autre constante très utilisée en RMN est la constante de couplage J. En effet, le fait d'appliquer un champ magnétique à un noyau appartenant à un atome ou à une molécule perturbera automatiquement un autre noyau de cet atome ou de cette molécule et la constante de couplage J entre deux noyaux N₁ et N₂ (J_{N₁N₂}) sera une mesure de l'intensité de cet effet. De nombreux livres ont été écrits sur ce sujet ; nous ne citerons ici que celui de Wüthrich (87) consacré à la RMN appliquée à la biologie.

2 - Résonance magnétique nucléaire des peptides et des protéines

Le proton ayant un moment magnétique important, il est très facile de détecter sa résonance. C'est pourquoi la RMN du proton est beaucoup plus développée que celle des autres noyaux. Le premier spectre d'un acide α aminé a été obtenu en 1957 par Jardetzky et coll. (88). Bien que la RMN des acides α aminés n'ait pas grand intérêt en soi, quoiqu'apportant quand même un grand nombre d'informations sur la structure de ces molécules et sur leur comportement en solution, elle est cependant utile en ce sens que c'est la base pour l'interprétation des spectres RMN des protéines. Si, en première approximation, on peut assimiler le spectre d'un peptide (ou celui d'une protéine) à la somme des spectres des acides α aminés le constituant, ceci n'est qu'une base de travail très grossière. On observe

en effet de multiples différences entre ces deux spectres, différences dues d'une part aux effets de structure primaire, et d'autre part aux effets de structures secondaire et tertiaire dans la molécule étudiée.

Théoriquement, la RMN peut servir à déterminer la séquence primaire d'un peptide (ou d'une protéine). Pour cela, on se base sur les changements en fonction du pH observés pour les résonances NH et CαH des dérivés examinés. Ces variations avec le pH sont fonction de la position du résidu dans la molécule peptidique (89). Pratiquement, cette méthode n'est applicable que pour des petits peptides, jusqu'à l'heptamère (90).

Une autre application de la RMN du proton, très employée celle-là, est l'étude de la conformation des molécules. Dès 1959, Karplus (91) a proposé une loi applicable à toute molécule organique comportant des atomes d'hydrogène portés par des carbones voisins. Cette loi relie la constante de couplage 3J entre protons dits « voisins » et la géométrie de la molécule étudiée. Il s'agit d'une relation trigonométrique faisant intervenir l'angle θ du dièdre formé par les plans H-C-C' et C-C'-H (fig. 10) de la molécule et la valeur expérimentale de la constante de couplage $^3J_{CH-C'H}$. On a :

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

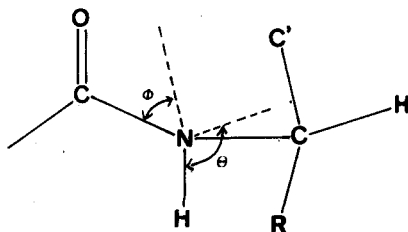
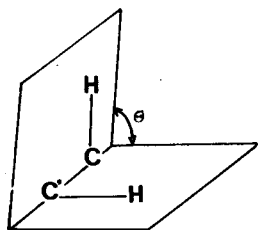


Figure 10 - Angle dièdre θ des plans H-C-C' et C-C'-H

Figure 11 - Angles θ et Φ peptidiques

Par analogie, de nombreux chercheurs ont voulu établir une loi valable dans le cas des peptides et des protéines. Cette loi fait intervenir la constante de couplage entre le proton de la liaison amide et l'hydrogène porté par le carbone α d'une unité peptidique $^3J_{NH-C\alpha H}$. Bystrov et coll. (92) ont pu relier cette constante à l'angle θ du dièdre formé par les plans H-N-C α et N-C α -H de la molécule par la loi :

$$^3J_{NH-C\alpha H} = A \cos^2\theta - B \cos\theta + C \sin^2\theta$$

Cet angle θ est relié à l'angle de torsion Φ défini précédemment par la relation :

$$\theta = |60 - \Phi| \text{ avec } 0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$$

Par contre, la RMN du proton ne permet pas de déterminer l'angle Ψ de torsion autour de la liaison $C\alpha-C'$. Aussi, bien qu'insuffisante à elle seule pour définir totalement la conformation d'un peptide ou d'une protéine en solution, cette technique est cependant très employée car elle apporte de précieux renseignements en ce qui concerne la conformation de petits peptides naturels ou synthétiques, et elle permet aussi de mettre en évidence des changements conformationnels dans les polypeptides et les protéines.

Ces dernières années, avec le développement de la technologie, est apparue la RMN d'autres noyaux tels que le fluor-19, le carbone-13, l'azote-15 ou le phosphore-31 pour ne citer que les noyaux les plus utilisés en biologie. Nous dirons un mot ici de la RMN du carbone-13, car cette technique est de plus en plus employée dans le cas des peptides et des protéines. Les spectres obtenus sont beaucoup plus simples que dans le cas du proton, ceci étant dû principalement à trois raisons : un spectre beaucoup plus étalé (200 ppm au lieu de 20 environ pour le proton) ; la possibilité de découpler totalement les protons en les irradiant simultanément, d'où obtention d'un seul pic correspondant à chaque résonance (et non plus un massif, comme dans le cas du proton) ; la suppression des couplages homonucléaires, due à la trop faible abondance naturelle du carbone-13 (1 %). Cette technique permet également des études dynamiques des molécules par mesure des temps de relaxation des différents atomes ; mais nous reviendrons plus en détail là-dessus dans la suite de cet exposé. Signalons simplement, pour terminer, que le premier spectre RMN du carbone-13 en abondance naturelle pour une protéine a été obtenu en 1970 pour le lysozyme (93).

3 - Résonance magnétique nucléaire du proton. Cas de la glycine et de la proline

a - Analyse des spectres. Notation de Pople

La facilité relative rencontrée lors de l'analyse des spectres RMN est fonction des amplitudes relatives des champs locaux dus au masquage d'une part, et au couplage spin-spin d'autre part, amplitudes traduites par le glissement chimique δ et la constante de couplage J .

Si $J \ll \delta$, les noyaux des deux ensembles précèdent par rapport à deux champs locaux très différents à deux fréquences différentes. Pour la prédiction des transitions, on opère alors en deux étapes : d'abord on prédit la position des bandes en négligeant le couplage spin-spin ; puis, dans un deuxième temps, on prédit le dédoublement des bandes par suite de ce couplage. C'est ce que l'on appelle une analyse au premier ordre.

Si $J \approx \delta$, les noyaux d'ensembles différents vont précéder à des fréquences sensiblement égales et certaines transitions pourront se produire simultanément dans les deux ensembles. La distribution des noyaux entre les niveaux d'énergie changera en même temps dans les deux ensembles, si bien que la condition qui veut que le

noyau induisant le dédoublement maintienne son orientation pendant la transition de son voisin ne sera plus satisfaite. On obtiendra alors des spectres complexes, difficiles à résoudre.

Sur cette base, Pople et coll. (94) ont développé une notation systématique selon laquelle A, B, C... désignent les ensembles de noyaux magnétiquement équivalents ($J \approx \delta$), X, Y, Z... désignent les ensembles où $J \ll \delta$, K, L, M... étant utilisés dans les cas intermédiaires.

b - Glycine

Le résidu glycyle a pour formule développée $\text{-HN-CH}_2\text{-CO-}$. Selon la notation de Pople, on a affaire à un système A_2 ou à un système AB, selon que les protons portés par le C_α sont ou non magnétiquement équivalents.

Dans l'acide aminé glycine, ces protons sont équivalents et ne donnent donc naissance qu'à une seule bande en RMN, bande dont le glissement chimique δ varie en fonction du pH (95), ce qui reflète la titration des groupes carboxyle et amine terminaux.

Dans le cas des peptides, c'est le résidu glycyle qui intervient et on a affaire tantôt à un système A_2 , tantôt à un système AB. L'origine de cette non-équivalence a fait le sujet de nombreuses études : certains (96) l'attribuent au fait que les deux protons mis en cause sont sujets à des différences de gradient de champ électrique ; d'autres (97) pensent que cette non-équivalence est à relier à la conformation du squelette du peptide étudié ; d'autres encore (98) pensent que la conformation des chaînes latérales joue un rôle important pour la non-équivalence des protons portés par la glycine, ceci n'étant vrai que dans le cas des acides aminés aromatiques (96). D'après une étude récente (99), il semblerait que l'origine de cette non-équivalence soit attribuable à des changements de conformation du peptide étudié plutôt qu'à des différences de gradient de champ électrique subies par ces deux protons.

c - Proline

Le résidu prolyle a pour formule développée

$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}\beta \text{ --- } \text{C}\gamma\text{H}_2 \\ | \qquad \qquad | \\ \text{-OC-C}\alpha\text{H} \quad \text{C}\delta\text{H}_2 \\ \quad \quad \quad \diagdown \quad \diagup \\ \quad \quad \quad \text{N} \end{array}$$

Selon la notation de Pople, on a affaire ici à un système très complexe du type ABCKPRX (A, B, C = $\beta_1, \gamma_1, \gamma_2$; K = β_2 ; P, R = δ_1, δ_2 ; X = α). Ce système est cependant analysable grâce à l'utilisation des ordinateurs. C'est ainsi que récemment Ellenberger et coll. (100) ont pu déterminer la conformation de la proline à différents pH. En particulier, dans cette étude ils ont mis en évidence la très grande mobilité du C_γ par rapport au plan $C_\beta, C_\alpha, N, C_\delta$ ainsi que l'influence de l'orientation du plan du carboxyle (rotation autour de l'axe $C_\alpha\text{-C}$) sur le glissement

chimique du proton β_2 et donc sur la forme du massif $H\alpha$ (101). Leurs résultats sont reportés sur la figure 12. Dans des peptides contenant des liaisons X-Pro, c'est la rotation du plan du carboxyle qui, d'après ces auteurs, est à l'origine des différences observées dans le spectre des protons α pour les isomères cis et trans.

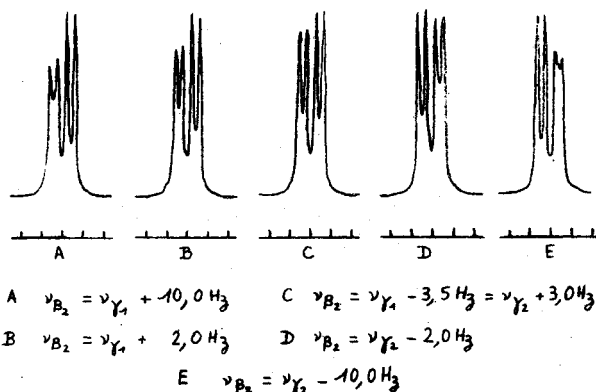


Figure 12 - Massif $H\alpha$ selon Ellenberger (101)

Ellenberger et coll. ont également étudié le résidu prolyle (102) lors d'un travail sur l'acétylprolinamide en solution dans l'eau lourde. Ils ont pu séparer les formes cis et trans et donner leurs paramètres RMN. A l'aide d'une relation du type Karplus, ils ont déterminé la géométrie du noyau pyrrolidine et montré que l'introduction de deux liaisons peptidiques est à l'origine d'une conformation $C\gamma$ endo ($C\gamma$ est déplacé du même côté du plan $C\beta$, $C\alpha$, N, $C\delta$ que le carboxyle) du noyau pyrrolidine. De plus, ils en sont arrivés à la conclusion que l'isomère cis est plus rigide que l'isomère trans, ceci étant dû à des interactions moléculaires différentes dans les deux isomères.

Les résultats de ces travaux ont permis de montrer que le noyau pyrrolidine est plus flexible dans l'acide α aminé que dans les peptides contenant ce résidu, résultats confirmant les conclusions tirées par Ramachandran et coll. (103) lors de calculs énergétiques sur la proline d'une part et le résidu prolyle d'autre part.

4 - Étude par RMN du proton de peptides contenant la liaison Gly-Pro ou la liaison Pro-Pro

Étant donné la complexité du spectre d'un résidu prolyle (spectre ABCKPRX), les études faites sur des peptides contenant plusieurs résidus prolyle n'ont pas permis de déterminer la conformation exacte de ces dérivés. En effet, il est très difficile, si ce n'est pas même impossible, d'extraire les différentes constantes de couplage des spectres expérimentaux. De plus, les spectres obtenus sont encore

compliqués du fait de la présence d'isomères cis et trans autour de la liaison X-Pro.

a - Polyproline

Avant de nous intéresser plus en détail aux travaux antérieurs faits sur les oligomères de proline, nous rappellerons ici les résultats expérimentaux obtenus pour la polyproline. Ceci nous aidera pour la suite de la discussion.

Comme nous l'avons mentionné lors de l'étude en dichroïsme circulaire, ce polypeptide peut exister sous deux formes, selon le solvant utilisé. La polyproline I, stabilisée par les mauvais solvants du type pyridine ou alcools aliphatiques, est un dérivé où toutes les liaisons amide sont sous forme cis ($\omega = 0^\circ$), avec $\Phi = -83^\circ$ et $\Psi = 158^\circ$; elle adopte une conformation en hélice droite de symétrie 10_3 (3,33 résidus par tour) ; en RMN la bande de résonance correspondant aux protons α est située à 4,3 - 4,4 ppm par rapport au DSS si l'on travaille dans l'eau lourde (104). La polyproline II, stabilisée dans de bons solvants tels l'eau ou l'acide acétique, est définie théoriquement comme un polypeptide dans lequel toutes les liaisons amide sont sous forme trans ($\omega = 180^\circ$), et $\Phi = -77,2^\circ$, $\Psi = 145,9^\circ$ ce polypeptide adopte une conformation en hélice gauche de symétrie 3_1 (3 résidus par tour) ; en RMN la bande de résonance correspondant aux protons α est située à 4,7 ppm (témoin DSS) si l'on travaille dans D_2O (104). Il nous faut cependant signaler que, par RMN, Mandelkern et coll. (105) ont observé la présence de 2 à 3 % de résidus cis dans la polyproline II en solution dans D_2O .

b - Oligomères de proline

Wüthrich et coll. (72) ont montré que la variation d'énergie libre était comprise entre 0,3 et 1,4 kcal/mole lors de l'isomérisation cis-trans de peptides linéaires contenant la liaison X-Pro. Par conséquent, les formes cis et trans peuvent être présentes simultanément, ce qui complique singulièrement l'étude conformationnelle de peptides contenant ce type de liaison. Lors de cette isomérisation cis-trans, les protons α des noyaux pyrrolidine changent de position par rapport au groupement carbonyle (fig. 13). Leur environnement est donc différent ; c'est ce qui explique que les protons correspondant aux deux isomères résonnent à des champs différents (cf polyproline I et II).

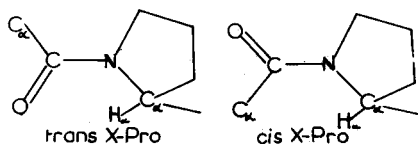


Figure 13 - Formes cis et trans de la liaison X-Pro

En outre, comme l'ont montré Okabayashi et coll. (106), il nous faut signaler que le proton α du résidu carboxyle terminal résonne à champ plus haut que les protons α des autres résidus.

D'autre part, des études en dichroïsme circulaire (76, 78) ont montré que la pentaproline en solution aqueuse adopte une conformation proche de celle de la polyproline II. Si ce résultat est vrai, on doit observer une simplification du spectre RMN des oligoprolines à partir du pentamère. C'est effectivement ce qu'ont remarqué Blout et coll. (70) lors d'une étude sur des dérivés du type Boc-(Pro)_n-OBzl avec $n = 2, 3, 4, 5$ et 6 en milieu deutérochloroforme ; alors que Boc-(Pro)₂-OBzl existe comme un mélange de trois isomères conformationnels (sur les quatre possibles), que pour l'oligomère $n = 3$ ils mettent en évidence cinq des huit isomères possibles, et que pour l'oligomère $n = 4$ seuls huit des seize isomères possibles sont détectables par RMN, tous les résidus prolyle sauf le N-terminal adoptent une conformation trans dans Boc-(Pro)₅-OBzl. Rothe et coll. (78, 107) sont arrivés à la même conclusion lors d'un travail qu'ils ont réalisé sur les oligoprolines non protégées ; d'après leurs conclusions, la di- et la triproline en solution dans D₂O existent sous forme d'un mélange d'isomères cis et trans alors qu'on ne trouve que des liaisons trans dans la tétraproline.

Dans ce même travail, ils ont montré que la conformation adoptée par les produits étudiés était fonction non seulement de la longueur de chaîne, mais également du solvant utilisé. C'est ainsi que dans de bons solvants, tels que l'acide trifluoroacétique, l'acide acétique ou l'eau, solvants favorisant la conformation en polyproline II, les oligoprolines suffisamment longues ne présentent que des liaisons imide trans ; par contre, dans le méthanol, solvant favorisant la conformation en polyproline I, le pourcentage de liaisons imide cis augmente avec la longueur de la chaîne. D'après ce que nous venons de voir, il est vraisemblable que le pourcentage d'isomère cis augmentera avec le pH, ce qui a été confirmé expérimentalement (108).

c - Peptides contenant la liaison Gly-Pro

Le dérivé le plus simple appartenant à cette famille est le peptide H-Gly-Pro-OH qui a été étudié d'une part par Blout et coll. (70) en tant que Boc-Gly-Pro-OBzl en solution dans le deutérochloroforme et dans le diméthylsulfoxyde deutéré, d'autre part par Fromageot et coll. (109) sous forme H-Gly-Pro-OH en solution aqueuse. Dans les deux cas a été mise en évidence l'existence simultanée des deux isomères possibles, cis et trans. De plus, l'examen des spectres obtenus a montré que les protons méthyléniques de la glycine ne sont pas équivalents dans le cas de la liaison Gly-Pro cis, alors qu'on obtient un singulet correspondant à la résonance $C\alpha H_2$ de Gly dans le cas de l'isomère trans.

Lors d'une étude par RMN sur des dérivés du type H-(Pro-Pro-Gly)_n-OH avec n = 1, 2, 3, 4, 5, 10 et 15, Kobayashi et coll. (110) ont observé l'existence d'isomères cis et trans aussi bien autour de la liaison Gly-Pro qu'autour des liaisons Pro-Pro. Le quartet correspondant au résidu glycyle carboxyle terminal ne résonne pas à la même fréquence que celui correspondant au résidu glycyle central (3,75 ppm pour le terminal, 4,25 ppm pour le résidu central) pour n = 2. Par contre, au fur et à mesure que la longueur de chaîne augmente, la contribution du résidu terminal devient négligeable.

Si l'on étudie la conformation de H-Gly-Pro-OH en fonction du pH (99), on remarque d'une part que le pourcentage d'isomère cis augmente avec le pH, d'autre part que la résonance des CαH₂ du résidu glycyle est fortement déplacée vers les hauts champs en milieu basique, ceci correspondant à la titration du groupement H₂N- terminal (tableau 2). Dans le cas de H-Gly-Pro-OH, cette résonance sort dans le massif correspondant aux protons δ de la proline, compliquant encore cette partie du spectre. Pour notre part, nous n'avons pas toujours pu attribuer ce pic en milieu basique.

pD = pH + 0,4	CαH ₂ Gly ppm	CαH Pro ppm	% isomère trans
1,7	cis 3,85 trans 4,00	cis 4,58 trans 4,51	80
4,7	cis 3,77 trans 3,95	cis 4,26 trans 4,30	62,5
9,7	cis 3,56 trans 3,56	cis 4,24 trans 4,27	

Le TSP interne est utilisé comme référence

Tableau 2 - Étude de H-Gly-Pro-OH en fonction du pH d'après Anteunis (99)

5 - Étude de nos peptides par RMN du proton

Les spectres RMN des peptides ont été enregistrés sur un spectromètre Varian opérant à 300 MHz en onde continue. Les résultats présentés ici ont été obtenus en travaillant à température ambiante, les peptides étant en solution dans D₂O à des concentrations de 50 mg/ml ; la référence interne utilisée tout au long de ce travail a été le DSS. Pour faciliter l'interprétation des spectres et en particulier pour nous aider à attribuer les différentes bandes de résonance observées, nous avons étudié chacun des peptides en fonction du pH ; pour ajuster le pH, nous avons utilisé alternativement DCl et NaOD en solution dans D₂O.

Un des buts de ce travail est d'approcher la conformation des peptides H-[Gly-Pro]₂-OH et H-Gly-(Pro)_n-OH avec n = 2, 3, 4 à l'état de zwitterions. Bien que, d'après les études menées antérieurement par d'autres, nous sachions que les spectres obtenus seraient très complexes, nous avons quand même entrepris

cette étude en RMN du proton, pensant que cette méthode pourrait nous apporter des renseignements intéressants tout au moins quant à la conformation des petits peptides, à savoir H-[Gly-Pro]₂-OH et H-Gly-(Pro)₂-OH.

a - H-[Gly-Pro]₂-OH

Sur la figure 14 est représenté le spectre obtenu pour ce peptide à l'état de zwitterion en solution dans D₂O. Comme on pouvait s'y attendre du fait de la nature du résidu prolyle (spectre du type ABCKPRX), le spectre obtenu est très complexe. On peut cependant le diviser en trois zones principales : la région 1,7 - 2,5 ppm dans laquelle on trouve toutes les résonances correspondant aux protons β et γ des deux résidus prolyle ; la région 3,3 - 3,7 ppm où sortent toutes les bandes de résonance dues aux protons δ des deux résidus prolyle ; enfin la région 3,7 - 4,8 ppm dans laquelle on trouve toutes les résonances correspondant aux protons α tant des résidus prolyle que des résidus glycyle. Il est malheureusement impossible de tirer quelque renseignement conformationnel que ce soit à partir des pics correspondant aux protons β , γ et δ des résidus prolyle ; ces informations sont déjà très difficiles à extraire du spectre d'un dérivé ne contenant qu'un résidu prolyle, ceci étant dû à l'existence d'isomères cis et trans autour de la liaison X-Pro ; par suite, dans l'état actuel de nos connaissances, le spectre d'un composé contenant plusieurs liaisons X-Pro est inexploitable tout au moins en ce qui concerne la région où résonnent les protons β , γ et δ des résidus prolyle à moins de deutérer sélectivement le cycle pyrrolidine.

Par contre, il peut être intéressant d'examiner de plus près la zone 3,7 - 4,8 ppm de résonance des protons α . Le spectre étendu de cette région du spectre de H-[Gly-Pro]₂-OH sous forme zwitterion en solution dans D₂O est présenté sur la figure 15 ainsi que les attributions des différents massifs. Pour faciliter ces attributions, nous avons également enregistré les spectres RMN de ce peptide en milieu acide d'une part (pD 1,5) et en milieu basique d'autre part (pD 11,5), les valeurs des glissements chimiques observées pour les protons α étant reportées dans le tableau 3. Le passage en milieu acide permet de distinguer les résonances dues aux deux résidus prolyle, celles dues au résidu C-terminal devant se déplacer beaucoup plus que les autres lors du changement de pH. Inversement le passage en milieu basique permet de distinguer les bandes de résonance des deux résidus glycyle, celles dues au résidu N-terminal devant se déplacer d'une valeur non négligeable lorsqu'il y a déprotonation du H₂N- terminal.

Examinons maintenant la forme des différents massifs dus aux protons α . Dans le cas des résidus prolyle, une analyse au premier ordre est impossible, car les protons α sont couplés à tous les autres protons du cycle pyrrolidine (système ABCKPRX). Dans le cas des résidus glycyle, la situation est beaucoup plus simple ; ces protons α sortent le plus souvent sous forme de doublets AB et

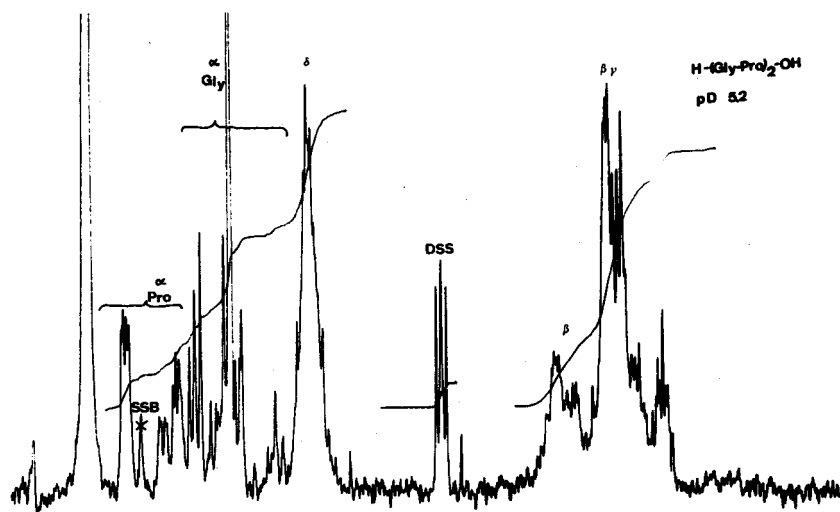


Figure 14 - Spectre de $H-[Gly-Pro]_2-OH$ à l'état de zwitterion

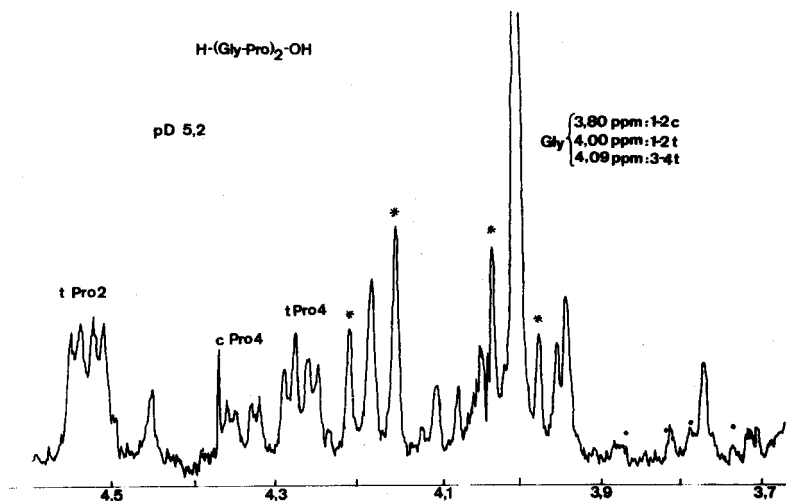


Figure 15 - Zone $C\alpha H$ de $H-[Gly-Pro]_2-OH$ à l'état de zwitterion

pD = pH + 0,4	CaH ₂ Gly 1 ppm	CaH Pro 2 ppm	CaH ₂ Gly 3 ppm	CaH Pro 4 ppm
1,5	1-2 cis 3,85 ² 1-2 trans 4,00 % 1-2 trans : n.d.	1-2 cis n.v. 1-2 trans 4,54	1-2 cis n.v. 3-4 trans 4,11	3-4 cis 4,68 3-4 trans 4,45 % 3-4 trans : 85
5,2	1-2 cis 3,80 1-2 trans 4,00 % 1-2 trans : 86	1-2 cis n.v. 1-2 trans 4,53	3-4 cis n.v. 3-4 trans 4,09	3-4 cis 4,34 3-4 trans 4,27 % 3-4 trans : 69
11,5	1-2 cis n.v. ¹ 1-2 trans 3,48 ¹	1-2 cis n.v. 1-2 trans 4,49	3-4 cis n.v. 3-4 trans 4,08	3-4 cis 4,35 3-4 trans 4,26

¹ Caché sous le massif α Pro

² Cette partie du spectre n'ayant pas été étalée, nous n'avons pas pu déterminer la valeur de J avec suffisamment de précision

n.v. : non visible

n.d. : non déterminé

1 2 3 4
Tableau 3 - Étude de H-Gly-Pro-Gly-Pro-OH en fonction du pH

ce n'est que l'étude en fonction du pH qui permet de faire l'attribution des différents pics observés. Une analyse au premier ordre est envisageable dans ce cas et on obtient ainsi $|J| = 16,0$ Hz pour Gly 1, la liaison Gly 1-Pro 2 étant sous forme cis ; par contre, si cette liaison est trans, les protons α du résidu glycyle sortent sous forme de singulet. De même, on obtient $|J| = 17,0$ Hz pour Gly 3 lorsque la liaison Gly 3-Pro 4 est trans et il est vraisemblable que ces mêmes protons α sortent sous forme de doublets AB si la liaison Gly 3-Pro 4 est sous forme cis, mais nous n'avons pas pu les attribuer dans le spectre. Les valeurs des constantes de couplage $^2J_\alpha$ mesurées ici correspondent aux valeurs attendues, car d'après Anteunis et coll. (99), nous devons avoir $^2J_\alpha = -16,4 \pm 0,3$ Hz pour Gly en position H₂N- terminal, et $^2J_\alpha = -16,9 \pm 0,2$ Hz pour un résidu glycyle situé à l'intérieur d'une chaîne peptidique. D'autre part, ces valeurs expérimentales de $^2J_\alpha$ nous permettent d'évaluer les valeurs probables des angles Φ et Ψ des résidus glycyle à partir d'une carte conformationnelle établie par Barfield et coll. (111) ; cette carte, représentée sur la figure 16, a été obtenue par calculs théoriques sur le N-acétylglycinamide ; les régions ombrées sur la carte sont énergétiquement inaccessibles car elles correspondent à des zones d'interactions stériques trop importantes. Nous avons donc plusieurs couples de valeurs possibles tant pour Φ_1, Ψ_1 que pour Φ_3, Ψ_3 ; quelques-unes sont reportées dans le tableau 4 et nous verrons plus loin quelles sont les valeurs les plus plausibles pour H-[Gly-Pro]₂-OH.

Cependant, s'il est vrai que les spectres obtenus sont complexes, on peut en tirer des renseignements quant aux pourcentages respectifs des différentes

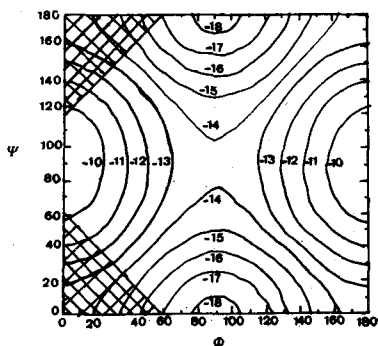


Figure 16 - Carte conformationnelle du résidu Gly pour le N-acétylglycinamide (d'après Barfield (111)) conformations susceptibles d'exister en solution dans D₂O. Dans le cas du spectre de notre peptide, quatre isomères (ctc, ctt, ttc et ttt) sont prévisibles, car, s'il y a possibilité d'isomérisation cis-trans autour de la liaison Gly-Pro (fig. 13), par contre la liaison Pro-Gly est obligatoirement trans. Ces pourcentages, obtenus par pesées, sont reportés dans le tableau 3.

Φ_1	50°	60°	70°	80°	90°	100°	110°	120°	130°
Ψ_1	15°	22°	30°	33°	38°	34°	31°	23°	16°
	165°	158°	150°	147°	142°	146°	149°	157°	164°
Φ_3		60°	70°	80°	90°	100°	110°	120°	
Ψ_3		0°	20°	25°	27°	26°	18°	7°	
		180°	160°	155°	153°	154°	162°	173°	

Tableau 4 - Quelques valeurs de Φ_1 , Ψ_1 et Φ_3 , Ψ_3 pour H-(Gly-Pro)₂-OH (d'après Barfield (111))

Plusieurs conclusions s'imposent à nous : quand on passe du milieu acide au milieu neutre, le doublet de doublets correspondant à Gly 3 s'élargit, ce qui signifie que l'environnement de ce résidu change et que la conformation au niveau de ce résidu devient plus rigide. D'autre part, que le pH soit acide ou neutre, les pourcentages d'isomères trans sont à peu près identiques pour Gly 3-Pro 4 aux valeurs obtenues par Anteunis et coll. (99) dans le cas de H-Gly-Pro-OH (tableau 2). Pour la séquence Gly 1-Pro 2, on ne peut estimer le pourcentage d'isomères trans en milieu acide, car le pic

situé à 4,00 ppm cache alors un autre pic ; en milieu neutre, ce pourcentage est évalué à 86 %. Enfin, nous ne nous apesentirons pas sur le spectre obtenu en milieu basique, car celui-ci est beaucoup moins bien résolu qu'en milieu acide et il est difficile de l'interpréter correctement ; il nous aura cependant été utile pour attribuer les bandes dues au résidu Gly 1, celles-ci se déplaçant fortement vers les hauts champs, à tel point que certaines sont cachées par le massif δ Pro.

b - H-Gly-(Pro)₂-OH

Sur la figure 17 est représenté le spectre obtenu pour ce peptide à l'état de zwitterion en solution dans D₂O ainsi que l'attribution des différentes zones, attribution analogue à celle faite dans le cas de H-[Gly-Pro]₂-OH. Ici aussi, nous nous intéresserons essentiellement à la région 3,7 - 4,8 ppm où résonnent les protons α . Dans le tableau 5 sont reportées les valeurs des glissements chimiques en fonction du pH, les spectres correspondant (en milieux acide et neutre) étant reproduits sur la figure 18.

Suivant l'isomérisation de la liaison peptidique, quatre isomères sont possibles pour ce peptide (ct, cc, tt, tc). L'étude un peu approfondie des spectres obtenus à différents pH montre qu'en milieu acide la liaison Pro-Pro existe essentiellement sous forme trans et qu'un des conformères possibles n'existe

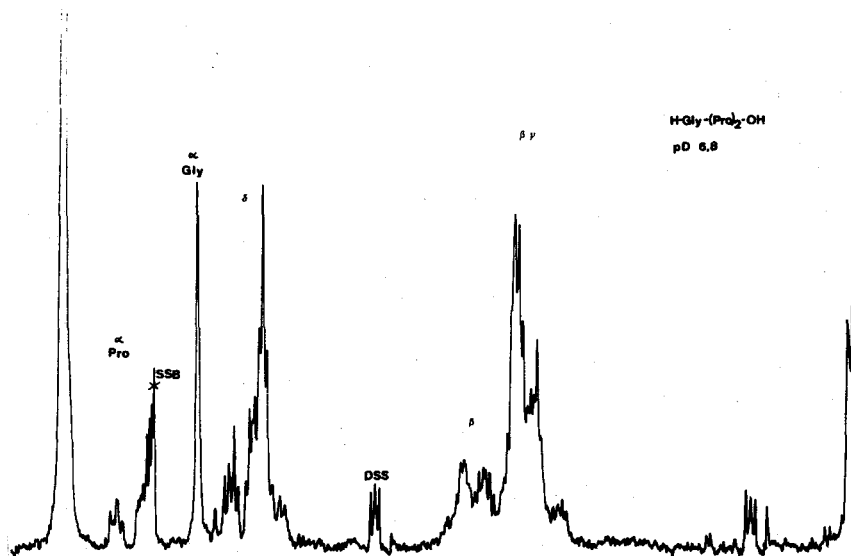


Figure 17 - Spectre de H-Gly-(Pro)₂-OH à l'état de zwitterion

pD = pH + 0,4	CaH ₂ Gly 1 ppm	CaH Pro 2 ppm	CaH Pro 3 ppm
1,8	1-2 cis n.v. 1-2 trans 4,00 % 1-2 trans : n.d.	cis 4,53 trans 4,78 ³ % trans : n.d.	2-3 cis 4,65 2-3 trans 4,47 % 2-3 trans : 93
6,8	1-2 cis 3,79 1-2 trans 3,99 % 1-2 trans : 79	cis 4,49 cis 4,46 trans 4,76 ¹ % trans : 74	2-3 cis 4,34 2-3 trans 4,27 % 2-3 trans : 75
11,1	1-2 cis n.v. 1-2 trans 3,49 ² % 1-2 trans : n.d.	cis 4,48 cis 4,40 trans 4,73 ³ % trans : n.d.	2-3 cis 4,33 2-3 trans 4,28 % 2-3 trans : 78

¹ Caché par le pic HDO

² Caché par le massif δ Pro

³ Partiellement caché par le pic HDO

n.v. : non visible

n.d. : non déterminé

1 2 3

Tableau 5 - Étude de H-Gly-Pro-Pro-OH en fonction du pH

pas dans ces conditions (tableau 5 et fig. 18 : apparition d'un deuxième massif α cis Pro 2 en milieu neutre). Par contre, les spectres obtenus sont trop complexes pour pouvoir en tirer des informations quant à la conformation des cycles pyrrolidine des résidus prolyle ; un des moyens d'y arriver serait de deutérer les cycles en position δ . Cependant, l'observation attentive de la forme des multiplets α Pro (isomères trans) permet d'obtenir quelques renseignements complémentaires. D'après Ellenberger et coll. (101), la forme de ces multiplets serait due à la rotation du groupement carboxylique : si le plan π du $-\text{COO}^-$ est perpendiculaire au proton β_2 , celui-ci résonnera à haut champ et on observera l'effet inverse dans le cas où ce plan π est parallèle au plan $\text{C}'\text{-C}\alpha\text{-N}$. Toujours selon ces mêmes auteurs, la forme de ces multiplets est à relier également aux positions relatives des fréquences de résonance du proton β_2 et des protons β_1 , γ_1 , γ_2 (fig. 12). C'est pourquoi, dans le cas de H-Gly-(Pro)₂-OH, on aura en milieu acide une relation du type :

$\nu_{\beta_2} = \nu_{\gamma_2} - 10,0 \text{ Hz}$, alors qu'en milieux neutre et basique la forme des multiplets attribuables aux protons α des résidus prolyle permet d'écrire $\nu_{\beta_2} = \nu_{\gamma_1} - 3,5 \text{ Hz}$ et $\nu_{\beta_2} = \nu_{\gamma_2} + 3,0 \text{ Hz}$. D'autre part, toujours en se référant à ces mêmes travaux, on est amené à penser que, vu la forme en milieu acide du multiplet correspondant au proton α du résidu prolyle terminal, le groupement carboxylique aura tendance dans ces conditions à s'orienter perpendiculairement au proton β_2 .

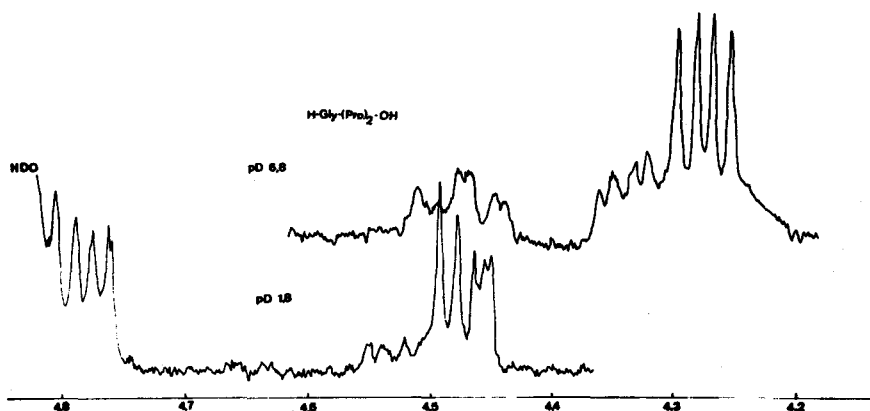


Figure 18 - Zone CaH de H-Gly-(Pro)₂-OH en milieu acide et à l'état de zwitterion

Alors qu'en milieu acide, la conformation du résidu prolyle terminal change, de même en milieu basique la conformation du résidu glycyle doit changer. Malheureusement, le pic correspondant fait alors partie du massif δ Pro, ce qui nous empêche de tirer quelque conclusion que ce soit. Quant aux valeurs des constantes de couplage $^2J_{\alpha}$ en milieux acide et neutre ($|J| = 16,5$ Hz), elles correspondent aux valeurs attendues, puisque, d'après Anteunis et coll. (99), on doit avoir $^2J_{\alpha} = -16,4 \pm 0,3$ Hz pour Gly en position H₂N- terminal. D'autre part, cette valeur expérimentale nous permet d'évaluer les angles Φ_1 et Ψ_1 pour ce résidu Gly à partir d'une carte conformationnelle établie par Barfield et coll. (111) et représentée sur la figure 16. Dans le tableau 6 sont reportés quelques couples de valeurs possibles et nous verrons plus loin quelles sont les valeurs les plus plausibles pour H-Gly-(Pro)₂-OH.

Φ_1	60°	70°	80°	90°	100°	110°	120°
Ψ_1	14° 166°	25° 155°	28° 152°	30° 150°	28° 152°	25° 155°	14° 166°

Tableau 6 - Quelques valeurs de Φ_1 , Ψ_1 pour H-Gly-(Pro)₂-OH (d'après la carte de Barfield (111))

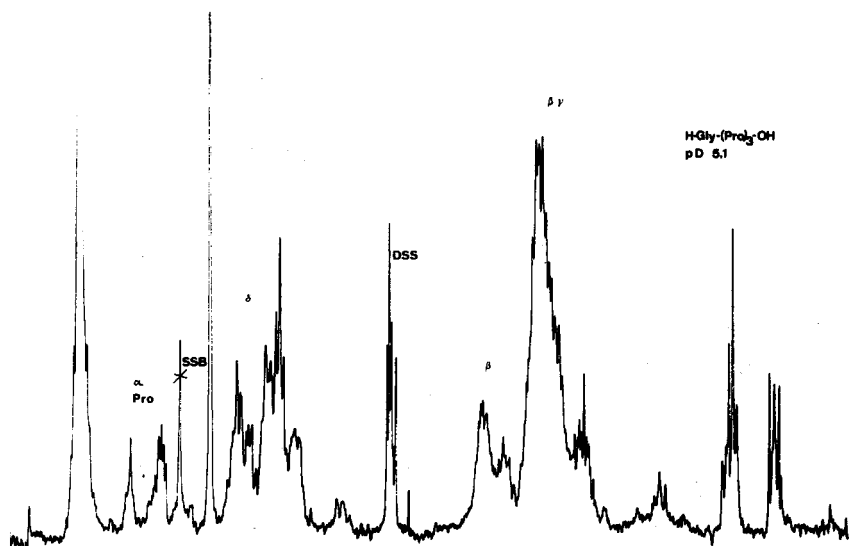


Figure 19 - Spectre de H-Gly-(Pro)₃-OH à l'état de zwitterion

c - H-Gly-(Pro)₃-OH

Sur la figure 19 est représenté le spectre obtenu pour ce peptide à l'état de zwitterion en solution dans D₂O ainsi que l'attribution des différentes zones, attribution analogue à celle faite dans les cas précédents. De même que pour les autres peptides de la série, nous nous intéresserons uniquement à la région 3,9 - 4,8 ppm où résonnent les protons α . Dans le tableau 7 sont reportées les valeurs des glissements chimiques de ces protons en fonction du pH ; les spectres correspondant enregistrés en milieux acide et neutre sont reproduits sur la figure 20. Ces spectres sont beaucoup plus complexes que ceux obtenus pour les autres peptides de cette série. Quant au spectre correspondant au milieu basique, il est inexploitable car le peptide a précipité sous forme de gel en cours de manipulation, ce gel s'étant révélé insoluble lorsqu'on a voulu repasser en milieu légèrement acide. Si l'on examine le tableau 7, on voit qu'il est très incomplet, car certains massifs cis X-Pro sont trop peu intenses pour qu'on puisse les situer avec précision ; par suite, le pourcentage d'isomère trans autour de chaque liaison X-Pro donné dans le tableau n'est qu'approximatif. Cependant des massifs cis X-Pro qui n'existaient pas en milieu acide (ou étaient trop peu intenses) apparaissent en milieu neutre, ce qui nous amène à penser que, parmi les huit isomères possibles, tous ne sont pas présents en milieu acide. Pour pouvoir tirer quelques conclusions sur les formes existantes, il faudrait deutérer sélectivement les protons α Pro, ce qui, sur le plan

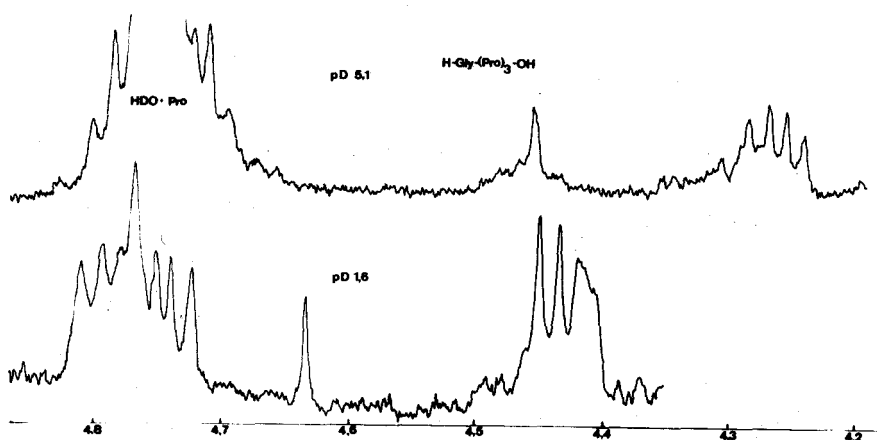


Figure 20 - Zone CaH de H-Gly-(Pro)₃-OH en milieu acide et à l'état de zwitterion

pD = pH + 0,4	CaH ₂ Gly 1 ppm	CaH Pro 2 ppm	CaH Pro 3 ppm	CaH Pro 4 ppm
1,6	1-2 cis n.v. 1-2 trans 3,98 1-2 trans 4,11	cis 4,47 trans 4,79	cis 4,39 cis 4,37 trans 4,74	3-4 cis 4,59 3-4 trans 4,43
5,1	1-2 cis n.v. 1-2 trans 3,98 % trans : 80	cis 4,47 cis 4,45 trans 4,78 % trans : 86	cis 4,33 trans 4,72 % trans : 86	3-4 cis 4,29 3-4 trans 4,26 % 3-4 trans : 84
9,6	1-2 cis n.v. ¹ 1-2 trans 3,66 ¹	cis n.v. trans n.v. ²	cis n.v. trans n.v. ²	3-4 cis n.v. 3-4 trans 4,24

¹ Caché sous le massif δ Pro

² Caché sous le pic HDO

n.v. : non visible

1 2 3 4
Tableau 7 - Étude de H-Gly-Pro-Pro-Pro-OH en fonction du pH

synthèse, représente un travail assez fastidieux.



En ce qui concerne le résidu glycyle, nous constatons que les protons α correspondants résonnent sous forme de singulet, que ce soit à pH acide

ou à pH neutre ; nous pensons donc que l'environnement du résidu glycyle ne change pas de façon drastique dans ces conditions. Par contre, la forme du pic α du résidu prolyle terminal évolue de la même manière que pour H-Gly-(Pro)₂-OH, c'est-à-dire d'une forme dissymétrique pour laquelle on avait $\nu_{\beta_2} \approx \nu_{\gamma_1} - 10,0$ Hz (fig. 12) à une forme beaucoup plus symétrique dans le cas de zwitterion. Par conséquent en milieu acide le groupement carboxylique aura tendance à s'orienter perpendiculairement au proton H β_2 , si l'on suit les conclusions d'Ellenberger et coll. (101). Enfin, nous voyons que les spectres obtenus sont beaucoup trop complexes pour nous fournir quelque renseignement que ce soit en ce qui concerne la conformation des cycles pyrrolidine.

d - H-Gly-(Pro)₄-OH

Le spectre obtenu pour ce peptide à l'état de zwitterion en solution dans D₂O est très complexe lui aussi ; il est représenté sur la figure 21, et sur cette figure sont reportées également les différentes régions du spectre. Tout comme pour les autres peptides de la série, nous nous limiterons ici à l'étude de la zone où résonnent les protons α Gly et Pro. Les spectres enregistrés tant à pH acide qu'à pH neutre sont reportés sur la figure 22. Alors qu'à pD 1,2, aucun massif correspondant à une forme cis X-Pro n'est apparent, des multiplets bien que très peu

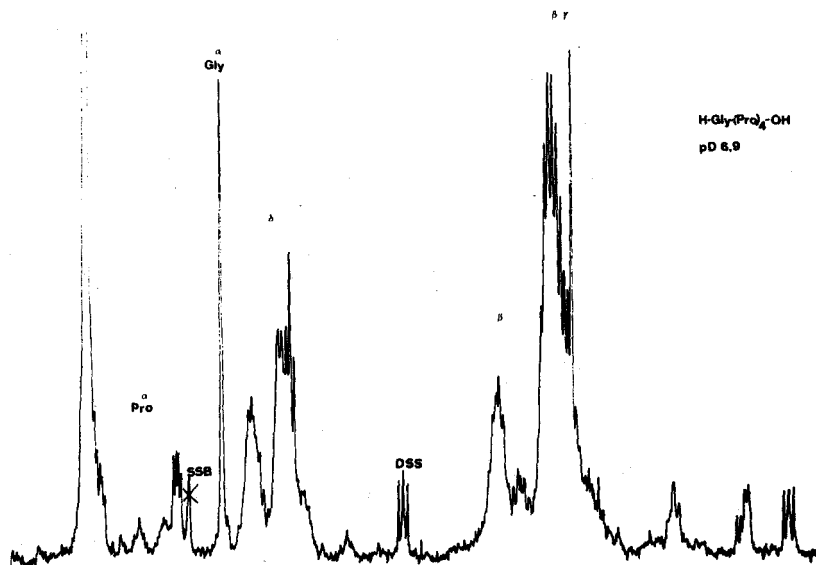


Figure 21 - Spectre de H-Gly-(Pro)₄-OH à l'état de zwitterion

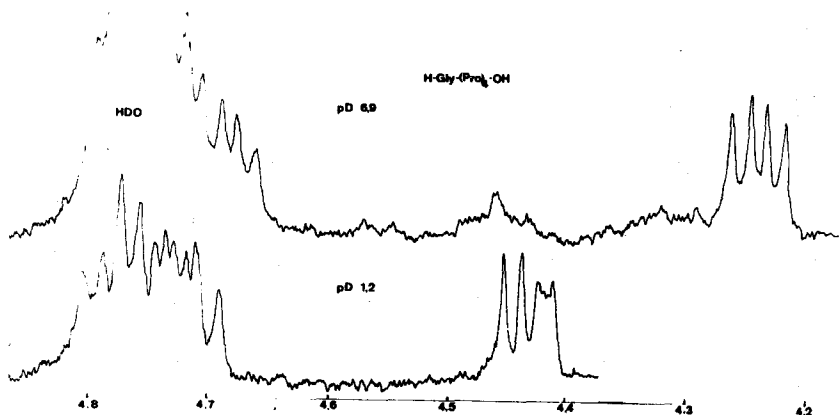


Figure 22 - Zone CαH de H-Gly-(Pro)₄-OH en milieu acide et à l'état de zwitterion

intenses apparaissent dans le cas du zwitterion. Les bandes observées sont superposées et mal définies et il nous est très difficile dans ces conditions d'une part d'attribuer ces multiplets aux différents résidus prolyle, d'autre part de calculer le pourcentage de conformères trans pour chaque résidu. Aussi les résultats reportés dans le tableau 8 ne le sont-ils qu'à titre indicatif.

pD	CαH ₂ Gly 1 ppm	CαH Pro 2 ppm	CαH Pro 3 ppm	CαH Pro 4 ppm	CαH Pro 5 ppm
1,2	cis trans 3,99 % trans : 100	cis trans 4,78 % trans : 100	cis trans 4,75 % trans : 100	cis trans 4,71 % trans : 100	cis trans 4,43 % trans : 100
6,9	cis trans 3,97 % trans : 100	cis 4,56 trans 4,77 % trans : 87	cis 4,47 trans 4,74 % trans : 73	cis 4,45 trans 4,68	cis 4,32 trans 4,23 % trans : 94
11,4	cis ¹ trans ¹	cis ³ trans ²	cis ³ trans 4,73	cis ³ trans 4,68	cis ³ trans 4,24

¹ Pics masqués par le massif δ Pro

² Pic masqué par le pic HDO

³ Massifs mal définis

1 2 3 4 5
Tableau 8 - Étude de H-Gly-Pro-Pro-Pro-Pro-OH en fonction du pH

Si nous regardons le spectre représenté sur la figure 21, nous voyons que les protons α du résidu glycyle donnent un singulet, et il en est de même lorsque le peptide est protoné, ce qui amène à penser que l'environnement du résidu glycyle ne change pas de façon sensible lors de cette transition de pH. Par contre la forme du pic α Pro du résidu terminal varie : alors qu'à pD 1,2 ce pic est très dissymétrique et correspond à $\nu_{\beta 2} = \nu_{\gamma 2} - 10,0$ Hz (le dessin obtenu est superposable à celui obtenu par Ellenberger et coll. (fig. 12)), à pD 6,9 ce pic est au contraire très symétrique et correspond à $\nu_{\gamma 1} < \nu_{\beta 2} \leq \nu_{\gamma 2}$ (101). Ceci nous permet d'écrire qu'il est probable que le groupement carboxylique aura tendance à s'orienter perpendiculairement au proton β_2 dans le cas du peptide protoné.

Par contre aucun renseignement ne peut être tiré concernant la conformation des cycles pyrrolidine, les spectres obtenus étant trop complexes pour qu'on puisse en extraire les différentes constantes de couplage.

e - Discussion générale sur les résultats obtenus par RMN du proton

Les résultats exposés ici sont à eux seuls nettement insuffisants pour permettre la détermination de la (ou des) conformation (s) probable (s) adoptée (s) par nos peptides en solution dans D_2O . La RMN du proton ne permet d'avoir que des informations fragmentaires. En particulier, elle ne permet d'atteindre, dans des cas favorables, que l'angle Φ de rotation autour de la liaison N-C α par application de la relation de Bystrov et coll. (92), cette loi nécessitant la connaissance d'une constante de couplage J_{CH-NH} . Par contre l'angle Ψ de rotation autour de C α -C' n'est pas accessible par cette technique et par conséquent la conformation globale d'un peptide ne peut être déterminée en utilisant la RMN du proton seule.

Un autre problème qui s'est posé à nous est celui de l'attribution des massifs aux différents résidus composant nos peptides. Nous nous sommes délibérément désintéressée des massifs β , γ , δ Pro, ceux-ci étant beaucoup trop complexes et nous avons uniquement attribué les massifs α Gly et Pro. Pour cela, nous pouvions soit utiliser les lanthanides, soit étudier les déplacements des différents massifs en fonction du pH et c'est cette dernière méthode que nous avons utilisée. En faisant varier l'acidité du milieu, il est facile de mettre en évidence les résidus C ou N terminaux, les massifs α y correspondant se déplaçant de façon importante lors du passage de pH neutre à acide (C-terminal), ou de pH neutre à basique (N-terminal). L'anté-pénultième résidu se déplace également, bien que de façon moins nette, lors du changement de pH et il est encore possible, dans des cas favorables, d'attribuer les massifs correspondants. Dans le cas de H-Gly-(Pro) $_2$ -OH, nous nous sommes trouvée devant un cas extrêmement favorable où nous avons pu attribuer tous les massifs pour le zwitterion. Par contre, les attributions ont été plus complexes pour les autres peptides de la série, car nous avons alors observé une superposition des massifs dus aux différents résidus prolyle.

D'autre part, mis à part le cas de $\text{H-Gly-(Pro)}_2\text{-OH}$, nous sommes ici dans un cas extrêmement défavorable, nos peptides contenant des enchaînements de résidus prolyle. Or le spectre d'un résidu Pro est très complexe par lui-même (spectre ABCKPRX) et n'a pu être résolu, à notre connaissance, que dans des cas très simples tels que l'étude de l'acétylprolinamide (102). D'autre part, l'étude se complique encore du fait de l'existence d'isomères cis et trans autour de la liaison X-Pro, X pouvant être lui-même un résidu prolyle. Il était bien évident dès le début de notre étude que les résultats que pouvait nous fournir la RMN du proton ne seraient que très fragmentaires. Par contre, la RMN du carbone-13 s'est révélée être la technique à utiliser dans le cas de peptides contenant des résidus Pro, car les formes cis et trans autour de X-Pro ont des bandes de résonance nettement différenciées au niveau des carbones β et γ et c'est pourquoi nous avons utilisé cette technique afin d'avoir des renseignements complémentaires quant à la (aux) conformation (s) probable (s) des peptides étudiés dans ce travail.

6 - Résonance magnétique nucléaire du carbone-13

Le carbone-13 est un isotope relativement peu abondant, puisqu'il ne représente que 1,11 % des atomes de carbone en abondance naturelle. Son moment magnétique est 0,70, alors qu'il est 2,79 pour le proton. Par conséquent, il est nécessaire d'avoir des appareils beaucoup plus sensibles pour pouvoir détecter les bandes d'absorption du carbone-13. Ce n'est que ces dernières années, avec l'apparition sur le marché des appareils à transformée de Fourier, que cette technique s'est développée.

a - Généralités

Le domaine de fréquences dans lequel on observe les bandes d'absorption en RMN du proton n'est que de 20 ppm. Il est beaucoup plus large en RMN du carbone-13 (200 ppm), ceci étant dû au grand nombre d'électrons entourant le noyau.

Alors que les spectres obtenus en RMN du proton comportent de multiples bandes dues aux couplages interatomiques, les spectres obtenus en RMN du carbone-13 se présentent en général sous une forme relativement simple, car il est possible de supprimer les bandes correspondant aux couplages hétéro-atomiques en irradiant simultanément tous les protons. Bien que les constantes de couplage $^1J_{\text{CH}}$ traduisent le pourcentage de caractère s sur le noyau C et qu'elles soient aussi très sensibles à l'électronégativité des substituants portés par le carbone, elles ne sont pas utilisées en pratique lors d'études de protéines ou de peptides, car elles sont difficiles d'accès et elles n'apportent pas de résultats fondamentaux concernant la conformation de ces molécules. Ce qui par contre est très employé qualitativement est le couplage C-H en vue de l'attribution des différentes bandes. Pour cela, on enregistre plusieurs spectres, l'un découplé totalement

(irradiation simultanée de tous les protons), l'autre découplé partiellement (déplacement de la fréquence d'irradiation des protons : c'est la technique d'off-resonance) ou même non découplé. Dans ce cas, les couplages C-H subsistent partiellement ou totalement et la multiplicité des massifs permet une attribution des bandes dans le spectre découplé. Quant aux couplages entre atomes de carbone-13, ils ne se voient pas sur les spectres, ceci étant dû à la faible abondance naturelle de ce noyau. Il est possible de travailler avec des produits enrichis en cet isotope, mais cela nécessite des synthèses supplémentaires (enrichissement au moyen d'algues) ; aussi cette technique n'est-elle utilisée que par quelques équipes spécialisées. Par suite, les constantes de couplage J_{CC} ont été très peu étudiées. On peut envisager une loi de variation du type Karplus entre $^3J_{CC}$ et l'angle Φ de rotation autour de la liaison N-C α ; cependant cette loi n'a pas encore été établie dans le cas des peptides. Quant à $^1J_{CC}$, cette constante traduit essentiellement le caractère s des carbones concernés ; elle reflète également les degrés d'ionisation et de protonation des groupements C-terminaux et elle est reliée à l'orientation relative des différents substituants portés par le carbone. Mais comme en règle générale ces couplages ne sont pas observés sur les spectres, ces constantes ne sont pas utilisées.

Un autre aspect de la RMN du carbone-13 qu'il est intéressant d'envisager dans notre cas est son application à l'étude dynamique des molécules en solution. On appelle relaxation le phénomène de retour à l'équilibre d'un spin nucléaire ; ce retour aux conditions d'équilibre est causé par des champs fluctuants (magnétiques ou électriques), ces champs résultant de mouvements des atomes à l'intérieur de la molécule ou résultant d'interactions avec le solvant ou avec d'autres molécules de soluté (on parle de champ créé par le réseau). Divers mécanismes peuvent être à l'origine de cette relaxation : la rotation de spin (création d'un champ magnétique par rotation d'un groupement portant un moment magnétique), l'anisotropie de déplacement chimique, le couplage scalaire (un noyau X couplé à un autre noyau Y qui se relaxe rapidement peut être relaxé par interaction spin-spin entre les deux noyaux), l'interaction électrique quadrupolaire et la relaxation dipôle-dipôle intramoléculaire qui est le mécanisme prépondérant la plupart du temps. Ce que l'on mesure expérimentalement est le temps de relaxation spin-réseau T_1 . S'il est vrai que la relaxation existe quel que soit le noyau mis en jeu, la mesure des T_1 est plus facile à mettre en œuvre dans le cas du carbone-13 que dans celui du proton et c'est pourquoi nous n'en avons pas parlé précédemment.

b - Étude des amides et des peptides contenant la glycine et la proline

Dans tout ce qui suit, les glissements chimiques seront donnés par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence.

Alors que les alcanes absorbent dans la région 0 - 50 ppm, les carbonyles des amides présentent des bandes d'absorption vers 160 - 180 ppm, la confor-

mation du (ou des) substituant (s) à l'azote par rapport au carbonyle ayant une grosse influence sur ce glissement chimique : le carbone de la chaîne en position syn par rapport au carbonyle résonne en général à plus haut champ que l'isomère anti (113, 114). D'après Roques et coll. (115), ceci semble vrai pour les carbones dans lesquels les effets de compression stérique sont faibles ; néanmoins cet auteur recommande d'utiliser une méthode d'attribution sans ambiguïté telle que l'effet Overhauser dans l'analyse conformationnelle des amides.

En 1970 apparut la première étude (116) d'un peptide par RMN du carbone-13. Depuis, de nombreuses publications sont sorties sur ce sujet. Christl et Roberts (117), pour leur part, ont étudié les variations de glissements chimiques des différents résidus d'acides aminés en fonction du pH et en fonction de leur position dans la chaîne peptidique. Les résultats qu'ils ont obtenus pour les résidus prolyle et glycyle sont reportés dans le tableau 9. Cette étude a montré que la nature de l'acide aminé voisin n'influe pas sur le glissement chimique d'un résidu sauf s'il s'agit de la proline ; dans ce cas on observe un déplacement à haut champ de 1 ppm ou plus pour le carbone α du résidu précédant la proline, ceci étant attribué à un effet stérique dû au carbone γ du cycle pyrrolidine. L'intérêt de cette étude est qu'elle permet de faire une première attribution des spectres.

	C α	C β	C γ	C δ
Pro C-terminal				
cation	176,4	61,2	30,1	26,0
zwitterion	179,3	63,3	32,5	23,5
anion	180,2	63,3	32,5	23,7
Pro non-terminal				
cation				
zwitterion	174,1	62,3	27,9	24,5
anion				49,1
Gly N-terminal				
cation	168,7	42,2		
zwitterion	168,9	42,2		
anion	165,5	44,8		
Gly non-terminal				
cation	172,7	43,8		
zwitterion	171,6	43,8		
anion	172,4	43,8		

Les mesures expérimentales ont été faites par rapport à CS₂. Les valeurs données dans le tableau sont exprimées en ppm par rapport au TMS

Tableau 9 - Glissements chimiques des résidus Pro et Gly en RMN du carbone-13 dans l'eau (d'après Christl et Roberts (117))

En ce qui concerne plus spécifiquement la proline, l'étude de Bovey et Dorman (108) est intéressante. A partir de spectres de dérivés contenant le résidu prolyle, ces auteurs ont déterminé les zones de glissement chimique pour les différents atomes du résidu prolyle, et ce pour les isomères cis et trans. Leurs résultats sont reportés dans le tableau 10. D'après eux, les glissements chimiques correspondant aux carbones γ et β du cycle pyrrolidine permettent de déterminer la conformation de la liaison X-Pro. D'après le tableau 10, on voit qu'il existe une différence sensible entre les déplacements chimiques des carbones du cycle dans les isomères cis et trans de diverses N-acylprolines, différence notée également par d'autres auteurs (106). Ces écarts peuvent provenir d'effets électroniques, électriques ou stériques dus à des changements de conformation de la chaîne, du cycle pyrrolidine, ou du carbonyle de la fonction acide. D'après Roques et coll. (118), il semble que le rôle primordial soit joué par la chaîne latérale R. Siemion et coll. (119) ont établi pour leur part une relation linéaire entre la différence de glissement chimique des atomes C β et C γ , $\Delta\delta_{\beta\gamma}$, et l'angle dièdre θ (O, C, C α , C β). On a :

$$\Delta\delta_{\beta\gamma} = 0,081 |\theta| + 2,47 \text{ pour l'isomère cis}$$

$$\Delta\delta_{\beta\gamma} = 0,036 |\theta| + 0,73 \text{ pour l'isomère trans,}$$

cette loi étant valable pour $0^\circ \leq \theta \leq 100^\circ$ [$\theta = \Psi - 60^\circ$].

	Isomère cis	Isomère trans
Co	175,2 - 179,2	175,4 - 179,9
C α	60,3 - 62,6	57,9 - 62,9
C β	30,3 - 32,6	29,9 - 31,0
C γ	23,1 - 23,5	24,6 - 25,5
C δ	45,2 - 48,2	47,1 - 49,4

Les valeurs sont exprimées en ppm par rapport au TMS. Les mesures ont été faites par rapport au CS₂

Tableau 10 - Glissements chimiques du résidu Pro en RMN du carbone-13 dans l'eau (d'après Bovey (108))

D'autre part, l'étude dynamique de peptides contenant de la proline a été menée par différentes équipes et en particulier par Deslauriers et coll. (120, 121, 122) qui ont beaucoup étudié les hormones peptidiques. Tous ces auteurs sont d'accord pour considérer que le mécanisme de relaxation qui entre en jeu dans le cas de peptides contenant de la proline est essentiellement du type dipôle-dipôle intramoléculaire. On peut alors relier le temps de corrélation τ_{eff} au temps de relaxation T₁ mesuré expérimentalement par une relation du type (120) :

$$(T_1)^{-1} = \langle r^{-6} \rangle N \hbar^2 \gamma_C^2 \gamma_H^2 \tau_{\text{eff}}$$

r : distance internucléaire C-H

γ_C , γ_H : rapports gyromagnétiques du carbone et de l'hydrogène

$\hbar = h (2 \pi)^{-1}$ où h : constante de Planck

N : nombre d'hydrogènes liés directement au carbone subissant la relaxation

On désigne par temps de corrélation la période pendant laquelle deux noyaux main-

tiennent une orientation donnée l'un par rapport à l'autre. Dans le cas où le mouvement moléculaire est anisotrope, le temps de corrélation doit être divisé en plusieurs composantes, chacune décrivant le mouvement d'un vecteur C-H donné. C'est ainsi que, dans le cas de la proline, le temps de corrélation reflète les mouvements de réorientation globale de la molécule ainsi que les mouvements internes des carbones du cycle pyrrolidine. Torchia et coll. (123) ont décomposé τ_{eff} suivant la loi : $(\tau_{\text{eff}}^i)^{-1} = (\tau_{\text{eff}})^{-1} + (\tau_{\text{noyau}}^i)^{-1}$, où i représente l'un des carbones du noyau, $(\tau_{\text{eff}})^{-1}$ représente la vitesse de réorientation du squelette peptidique et $(\tau_{\text{noyau}}^i)^{-1}$ représente la vitesse de réarrangement du carbone i considéré. Ces mêmes auteurs ont relié temps de corrélation et temps de relaxation mesuré expérimentalement par l'égalité : $\tau_{\text{eff}} = 4,72 \times 10^{-11} (\text{NT}_1)^{-1}$, cette relation n'étant valable que si $(\omega_H + \omega_C)^2 \tau_R^2 \ll 1$ (dans cette expression, ω_H et ω_C désignent les fréquences de résonance de l'hydrogène et du carbone, τ_R représente le temps de corrélation moléculaire).

	Proline ¹	Lys-vasopressine ²	LHRH ³	H-Gly-Pro-OH ⁴		Ac-Pro-NH ₂ ⁵	
				cis	trans	cis	trans
α CH	4,3	0,13	0,12	1,0	1,2	1,9	1,8
β CH ₂	7,5	0,20	0,38	1,6	1,7	3,4	3,2
γ CH ₂	8,6	0,28	0,40	1,6	1,7	3,2	3,0
δ CH ₂	7,0	0,12	0,18	1,3	1,3	2,2	2,4

¹ A pD 6,4, c = 100 mg/ml

² A pD 4,2, c = 100 mg/ml

³ A pD 5,3, c = 200 mg/ml

⁴ A pD 5,0, c = 170 mg/ml

⁵ c = 250 mg/ml et 100 mg/ml

Tableau 11 - Valeurs expérimentales de NT_1 dans différents peptides contenant la proline dans D_2O (d'après Deslauriers (121))

Dans le tableau 11 sont reportées quelques valeurs de T_1 obtenues expérimentalement par Deslauriers et coll. pour des peptides contenant de la proline. Dans leur travail, ces auteurs concluent que les valeurs mesurées reflètent une interconversion rapide entre plusieurs formes distordues du noyau pyrrolidine et il semble que le carbone γ soit le plus mobile en règle générale. Si l'on substitue le carboxyle terminal de la proline, on n'observe que peu de différences dans la conformation moyenne du cycle pyrrolidine ; seul le carbone β perd de sa mobilité. Par contre, une substitution sur l'azote terminal de la proline entraîne une diminution de la mobilité du carbone δ . Enfin dans les peptides comportant un résidu prolyle non-terminal, le carbone δ devient en général aussi peu mobile que le carbone α , les autres atomes du cycle étant plus mobiles.

On voit donc que la RMN du carbone-13 est complémentaire de la RMN du proton et qu'elle apporte de nombreux renseignements intéressants dans le cas de peptides contenant de la proline, renseignements relatifs à la conformation de la liaison X-Pro (cis ou trans) ainsi qu'à la conformation du cycle pyrrolidine.

7 - Étude de nos peptides par RMN du carbone-13

Les manipulations ont été faites sur un spectromètre Perkin-Elmer R 32 opérant à 22,63 MHz et muni d'une transformée de Fourier. Les résultats présentés ici ont été obtenus en travaillant à 31 °C, les peptides étant en solution dans D₂O à des concentrations de 150 mg/1,5 ml ; la référence externe utilisée tout au long de ce travail a été le TMS. Les mesures de temps de relaxation ont été faites en employant la méthode d'inversion-récupération de Freeman et Hill (124).

Avant de passer à l'étude proprement dite de nos peptides, nous avons reporté dans le tableau 12 les glissements chimiques obtenus pour le résidu prolyle de l'acétylprolinamide en solution dans D₂O à pH 7,0 (122). Pour l'attribution des différents pics obtenus dans notre étude, nous nous sommes basée sur les résultats publiés par d'autres auteurs et résumés dans les tableaux 9, 10, 12. Bien que nous nous intéressions à la conformation des peptides à l'état de zwitterion, nous avons été amenée à enregistrer les spectres en milieu acide de façon à confirmer nos attributions. Les résultats obtenus nous ont permis de calculer les pourcentages d'isomères cis et trans pour chacun des peptides à l'état de zwitterion. Ces résultats sont reportés ci-dessous ainsi que les mesures des temps de relaxation T₁.

	cis	trans
Co	178,39	178,39
C α	62,66	61,12
C β	32,90	31,36
C γ	23,81	25,45
C δ	48,30	49,69

Les valeurs sont exprimées en ppm
par rapport au TMS

Tableau 12 - Glissements chimiques du résidu Pro de l'acétylprolinamide en solution dans D₂O à pH 7,0 (d'après Deslauriers (122))

a - H-[Gly-Pro]₂-OH

Dans le tableau 13 sont reportés glissements chimiques, attributions des pics et pourcentages d'isomères cis et trans pour ce peptide en solution dans D₂O à l'état de zwitterion. Le spectre obtenu est représenté sur la figure 23. Les attributions ont été faites en étudiant les déplacements chimiques en fonction du pH. Deux effets sont liés à la variation de pH : en milieu acide, le pourcentage d'isomères cis autour d'une liaison X-Pro est plus faible qu'en milieu neutre ou basique ; d'autre part, les glissements chimiques caractéristiques du résidu Pro 4

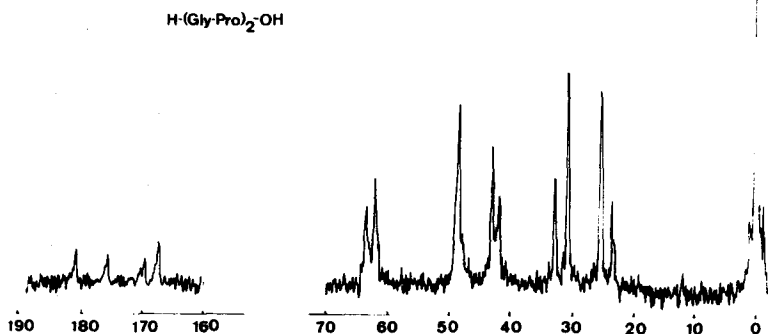


Figure 23 - Spectre en RMN du carbone-13 de $H-[Gly-Pro]_2-OH$ à l'état de zwitterion dans D_2O

pH acide	pH neutre		pH acide	pH neutre	
	23,0	γ 2 cis	48,0	48,0	δ 2 trans
23,3	23,5	γ 4 cis	48,3	48,4	δ 4 trans
25,4	25,4	γ 2 trans	60,7	63,0	α 4 trans
25,6	25,4	γ 4 trans	61,8	61,8	α 2 trans
30,1	30,7	β 2 et 4 trans	167,1	167,1	Co Gly 1
32,2	32,8	β 2 et 4 cis	170,2	169,5	Co Gly 3
41,7	41,7	α Gly 1	175,6	175,4	Co Pro 2
42,8	42,8	α Gly 3	177,2	180,2	Co Pro 4

Les valeurs sont exprimées en ppm par rapport au TMS

% d'isomère trans

calculé à partir de γ : 1-2 82,8

3-4 75,8

calculé à partir de β : 1-2 + 3-4 68,9

Tableau 13 - Étude de $H-[Gly-Pro]_2-OH$ en solution dans D_2O par RMN du carbone-13

varieront davantage que ceux dus à Pro 2 lorsqu'on passera du milieu acide au milieu neutre, car il y a alors déprotonation du carboxyle terminal ; de même, si on passe du milieu neutre au milieu basique, on mettra en évidence une variation de glissement chimique plus importante pour Gly 1 que pour Gly 3. Si l'on étudie plus attentivement les attributions reportées dans le tableau 13 pour le zwitterion, on constate qu'on ne peut pas différencier les $C\beta$ ni les $C\gamma$ des deux résidus prolyle lorsque les liaisons 1-2 et 3-4 sont trans, ni les $C\beta$ lorsque ces liaisons sont cis ; d'autre part, les pics α et δ correspondant aux conformations cis Gly-Pro n'ont pas été mis en évidence, ce qui n'est pas très surprenant car les différences de glissement chimique pour les formes cis et trans au niveau de ces deux carbones sont faibles.

Pour confirmer les attributions faites par variation de pH, nous avons également comparé les valeurs de glissements chimiques obtenues ici avec celles publiées par Fermandjian et coll. (109) pour H-Gly-Pro-Gly-OH en milieu D₂O. Déjà nous avons pu constater que les valeurs que nous obtenions correspondaient à celles données par Bovey et Dorman (tableau 10, (108)) pour les liaisons X-Pro cis ou trans. De plus, les valeurs obtenues pour Gly 1 et Pro 2 sont identiques à un ppm près (cette différence étant sans doute due à la référence, Fermandjian et coll. ayant utilisé le TMS en solution dans le chloroforme comme référence externe) aux valeurs obtenues par Fermandjian et coll. pour H-Gly-Pro-Gly-OH, sauf pour le C=O du Pro 2. Il est possible que l'oxygène de ce carbonyle soit impliqué dans une conformation particulière qu'il nous est difficile de préciser pour le moment.

Les pourcentages d'isomères trans autour des liaisons Gly-Pro sont calculés à partir des hauteurs des pics C β et C γ . On obtient ainsi des résultats voisins de ceux obtenus par RMN du proton (tableau 3).

D'autre part, la RMN du carbone-13 permet d'obtenir une valeur approximative de l'angle Ψ de rotation autour de la liaison C α -C' des résidus prolyle par application de la relation linéaire publiée par Siemion et coll. (119). Cette loi n'est valable que dans certaines conditions (cf 6.b) ; aussi n'avons-nous pu estimer Ψ que dans le cas où les liaisons Gly-Pro étaient cis. Cette loi donnant un résultat en valeur absolue, nous obtenons à chaque fois deux possibilités pour Ψ , soit : $\Psi = -25,6^\circ$ ou $+145,6^\circ$ pour Pro 4 et $\Psi = -29,3^\circ$ ou $+149,3^\circ$ pour Pro 2.

Enfin, la mesure des temps de relaxation T₁ permet de se faire une idée approximative sur la rigidité du peptide étudié. Les résultats des mesures faites sur H-[Gly-Pro]₂-OH dans D₂O à l'état de zwitterion sont reportés dans le tableau 14. Les valeurs obtenues sont relativement grandes, ce qui nous amène à penser que le peptide doit adopter une conformation assez libre en solution aqueuse. Si on les compare aux valeurs obtenues par Deslauriers et coll. (121) et reportées dans le tableau 11, on constate que les temps de relaxation observés dans le cas de notre peptide ont des valeurs comparables à celles observées pour H-Gly-Pro-OH ou pour l'acétylprolinamide. Une différence notable est à remarquer cependant au niveau des carbones β et γ . En effet, alors que ceux-ci ont des mobilités relatives comparables dans le cas des peptides étudiés par Deslauriers et coll., ce n'est pas le cas en ce qui nous concerne, où C γ est plus mobile que C β ; ceci a été observé aussi dans le cas des hormones polypeptidiques (tableau 11) et nous amène à conclure que, si la mobilité du squelette peptidique est plus importante dans notre cas que dans le cas d'hormones polypeptidiques, par contre la mobilité relative des carbones du cycle pyrrolidine est comparable dans les deux cas. En ce qui concerne les résidus glycyle, l'étude des résultats reportés dans le tableau 14 montre que les temps de relaxation des C α Gly sont supérieurs à ceux observés pour C α Pro :

Atome considéré	NT ₁ (s)	τ_{eff} (10 ⁻¹¹ s)
γ 2 cis + γ 4 cis	1,56	
γ 2 trans + γ 4 trans	1,24	
β 2 trans + β 4 trans	1,08	
β 2 cis + β 4 cis	0,70	
α Gly 1	0,91	5,2
α Gly 3	0,88	5,4
δ 2 trans + δ 4 trans	0,75	
α 2 trans	0,53	8,9
α 4 trans	0,66	7,1

Concentration de la solution : 150 mg / 1,5 ml

Nous n'avons pas pu calculer τ_{noyau} , car les résonances des deux résidus prolyle sortent au même endroit

Tableau 14 - Temps de relaxation T_1 de H-Gly-Pro-Gly-Pro-OH à l'état de zwitterion

cela veut dire que les résidus glycyle sont plus mobiles que les résidus prolyle, ce qui est logique puisque Gly n'a pas de chaîne latérale.

b - H-Gly-(Pro)₂-OH

Les résultats obtenus pour ce peptide sont reportés dans le tableau 15, le spectre du zwitterion en solution dans D₂O étant tracé sur la figure 24. Les attributions ont été faites par comparaison avec des résultats publiés (108, 109, 125, 126, 127) ; le résidu prolyle C-terminal étant plus sensible que l'autre à l'acidité du

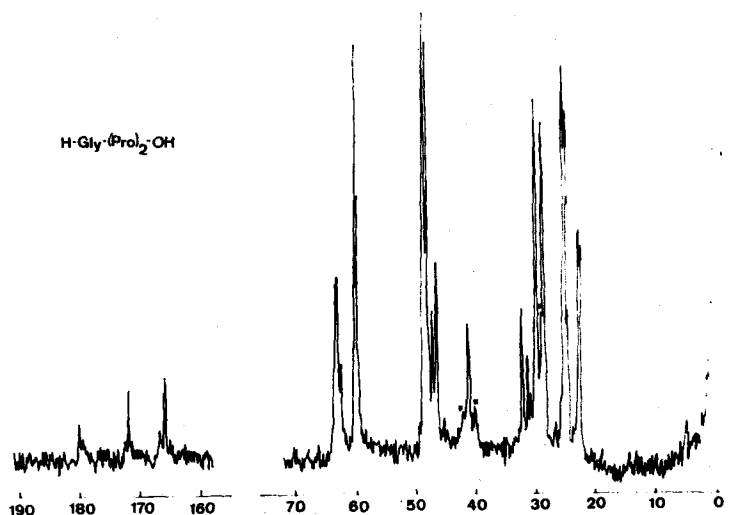


Figure 24 - Spectre en RMN du carbone-13 de H-Gly-(Pro)₂-OH à l'état de zwitterion dans D₂O

pH acide	pH neutre		pH acide	pH neutre	
23,1	23,0	γ 2 cis		40,4	α Gly 1 cis
23,1	23,2	γ 3 cis	41,5	41,6	α Gly 1 trans
25,5	25,5	γ 2 trans	48,3	48,2	δ 3 trans
25,8	25,7	γ 3 trans	48,7	48,7	δ 2 trans
29,3	29,3	β 2 trans-trans	60,1	60,1	α 2 trans
	29,7	β 2 trans-cis	61,4	63,2	α 3 trans
30,1	30,5	β 3 trans	166,5	166,3	Co Gly 1
	31,4	β 2 cis-trans	173,0	172,3	Co Pro 2
	31,9	β 2 cis-cis	178,0	180,4	Co Pro 3
	32,8	β 3 cis			

Les valeurs sont exprimées en ppm par rapport au TMS

% des différents isomères : cc 17

ct 9

tc 12

tt 62

Tableau 15 - Étude de H-Gly-(Pro)₂-OH dans D₂O par RMN du carbone-13

milieu, nous avons pu attribuer les résonances de ces résidus en étudiant les déplacements chimiques en fonction du pH. Les valeurs des glissements chimiques correspondent à celles données par Bovey et Dorman (108) pour les liaisons X-Pro cis et trans, et il y a une assez bonne concordance entre les résultats obtenus ici et ceux publiés précédemment par Fromageot et coll. (109) ainsi que par Evans et Rabenstein (125) sur H-Gly-Pro-OH et H-Gly-Pro-Gly-OH en solution dans D₂O, de même qu'avec ceux de Cann et coll. (126, 127) sur H-Arg-Pro-Pro-OH et sur H-Ser-Pro-Pro-OH en milieu aqueux. Si l'on observe attentivement le spectre représenté sur la figure 24, on voit qu'il existe 6 pics situés dans la zone C β Pro. Ces pics ont été attribués comme reporté dans le tableau 15 en s'inspirant des résultats publiés par Cann et coll. (127). Les différences de glissements chimiques entre les formes cis et trans pour le même carbone β (cas du zwitterion) sont similaires à celles publiées pour d'autres peptides : $\delta(\beta \text{ cis} - \beta \text{ trans})$ est de 2,3 ppm pour Pro 3, de 2,6 ppm pour Pro 2 cis-cis et de 2,1 ppm pour Pro 2 cis-trans ; ces valeurs sont à rapprocher de 2,3 ppm pour Pro 3 et 2,8 ppm (cc) et 2,3 ppm (ct) pour Pro 2 dans H-Ser-Pro-Pro-OH (Cann et coll. (127)), 2,05 ppm pour H-Gly-Pro-OH (Williams et coll. (128)), 2,2 ppm pour H-Gly-Pro-Gly-OH (Fromageot et coll. (109)), 2,2 ppm pour H-(Gly-Pro)_n-OH et 2,6 ppm pour H-(Gly-Gly-Pro-Gly)_n-OH (Torchia et coll. (123)).

La proportion d'isomères cis et trans autour des liaisons X-Pro est donnée par le rapport des hauteurs des pics correspondant à chaque isomère (pics C β Pro et C α Gly). Les résultats sont reportés dans le tableau 15 ; ils sont comparables à ceux obtenus par RMN du proton (tableau 5).

Atome considéré	NT_1 (s)	τ_{eff} (10^{-11} s)	τ_{noyau} (10^{-11} s)
γ 2 cis + γ 3 cis	1,00		9,2
γ 2 trans	0,98		9,6
γ 3 trans	0,96		10,0
β 2 trans	1,02		8,9
β 3 trans	0,98		9,6
β 3 cis	0,78		16,3
α Gly 1	0,76	6,2	
δ 3 trans	0,64		31,5
δ 2 trans	0,66		27,7
α 2 trans	0,49	9,6	
α 3 trans	0,49	9,6	

Concentration de la solution : 150 mg / 1,5 ml

Tableau 16 - Temps de relaxation T_1 de H-Gly-(Pro)₂-OH à l'état de zwitterion

La RMN du carbone-13 permet également d'obtenir une valeur approximative de l'angle Ψ des résidus prolyle par application de la relation linéaire publiée par Siemion et coll. (119). Cette loi donne une valeur absolue de l'angle θ et n'est applicable que dans des conditions bien déterminées. Pour le peptide qui nous intéresse, nous obtenons $\Psi = +151^\circ$ ou -31° pour Pro 3 si la liaison Pro-Pro est cis, la loi n'étant pas valable si cette liaison est trans ; de même nous obtenons $\Psi = +133^\circ$ ou -13° pour Pro 2(ct) et $\Psi = +145^\circ$ ou -25° pour Pro 2(tt) ainsi que $\Psi = +139^\circ$ ou -19° pour Pro 2(cc) et $\Psi = +156^\circ$ ou -36° pour Pro 2(tc).

Mais il ne faut pas oublier que la RMN du carbone-13 permet d'étudier la dynamique des molécules en solution. Les valeurs obtenues pour les temps de relaxation spin-réseau T_1 de H-Gly-(Pro)₂-OH à l'état de zwitterion sont reportées dans le tableau 16 (valeurs moyennes sur 4 mesures). Ces valeurs sont plus élevées que les résultats reportés par Deslauriers et coll. (120) pour différentes hormones peptidiques, ce qui signifie que notre peptide est plus mobile. La lecture du tableau 16 fait apparaître que les carbones β et γ des deux résidus prolyle sont beaucoup plus mobiles que les autres ; ce résultat n'est pas du tout inattendu et reflète un mouvement isotrope global ainsi qu'un équilibre interne entre deux conformations stables ayant des temps de vie équivalents, selon le schéma donné par London (129) :



Comme il a été montré par plusieurs auteurs que le mécanisme de relaxation entrant en jeu dans le cas de peptides contenant de la proline est essentiellement du type dipôle-dipôle intramoléculaire, nous avons pu calculer le temps de corrélation à partir des mesures expérimentales de T_1 suivant la relation :

$\tau_{\text{eff}} = 4,72 \times 10^{-11} (NT_1)^{-1}$ (cf. 6.b) et le décomposer en deux termes, l'un représen-

tant la vitesse de réorientation du squelette peptidique, l'autre représentant la vitesse de réarrangement du carbone i du cycle pyrrolidine considéré (Torchia et coll. (123)). Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 16 ; ils montrent que les carbones β et γ sont très mobiles et ont à peu près la même mobilité tous deux ; ces atomes sont cependant moins mobiles que dans H-Gly-Pro-OH trans (NT₁ C β 1,42 s, C γ 1,68 s, mais C α 0,79 s ; d'où $\tau_{\text{noyau}}^{\beta}$ $7,7 \times 10^{-11}$ s et $\tau_{\text{noyau}}^{\gamma}$ $5,0 \times 10^{-11}$ s), cette différence de mobilité étant due à une plus grande rigidité du squelette peptidique dans H-Gly-Pro-Pro-OH et non à une rigidité différente du cycle. Enfin, l'étude des résultats obtenus ici montre que le temps de relaxation de C α Gly est supérieur à ceux observés pour C α Pro : cela veut dire que le résidu glycyle est plus mobile que le résidu prolyle, ce qui est logique étant donné que Gly n'a pas de chaîne latérale. Mais cela signifie aussi que le squelette de la molécule subit des mouvements fragmentaires, mouvements coopératifs cependant car les différences de temps de relaxation pour Gly et Pro sont très faibles dans ce peptide alors qu'elles sont beaucoup plus importantes dans le cas de ces résidus pris isolément l'un de l'autre (Torchia et coll. (123)).

c - H-Gly-(Pro)₃-OH

Dans le tableau 17 sont reportés glissements chimiques, attributions des pics et pourcentages d'isomères cis et trans pour ce peptide à l'état de zwitterion en solution dans D₂O. Le spectre correspondant est représenté sur la figure 25. Les valeurs de glissements chimiques, à l'exception de celles attribuées aux carbones γ des isomères cis, correspondent à celles données par Bovey et Dorman (tableau 10, (108)). Mise à part la valeur obtenue pour le C δ , les valeurs présentées par le résidu prolyle C-terminal de notre peptide sous forme trans coïncident à 0,2 ppm près avec

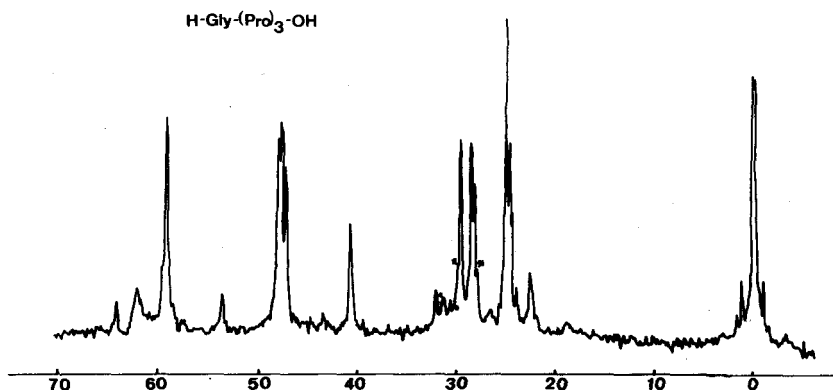


Figure 25 - Spectre en RMN du carbone-13 de H-Gly-(Pro)₃-OH à l'état de zwitterion dans D₂O

22,1	γ 4 cis	28,6	β 3 trans
22,5	γ 3 cis	29,8	β 4 trans
23,0	γ 2 cis	30,8	β 2 cis
24,5	γ 4 trans	31,5	β 3 cis
24,7	γ 3 trans	32,2	β 4 cis
25,1	γ 2 trans	40,9	α Gly 1
28,4	β 2 trans	47,5	δ 4 trans
28,1	} β non attribués	48,0	δ
30,1		48,2	δ
30,5		59,3	α 2, 3 trans
31,4		62,3	α 4 trans

Les valeurs sont exprimées en ppm par rapport au TMS

% d'isomère trans ¹

Calculé à partir de γ : 3-4 85,1

Calculé à partir de β : 1-2 + 2-3 82,1

2-3 + 3-4 83,6

3-4 81,3

¹ Valeurs approximatives, car on n'a tenu compte que des pics β majeurs

Tableau 17 - Étude de H-Gly-(Pro)₃-OH à l'état de zwitterion dans D₂O par RMN du carbone-13

celles obtenues par Fromageot et coll. (109) dans le cas de H-Gly-Pro-OH trans à pH 6,5, cet écart de 0,2 ppm pouvant être dû à la référence (Fromageot et coll. ont utilisé le TMS en solution dans le chloroforme, nous avons pris le TMS seul) ; quant aux valeurs de glissements chimiques des résidus centraux sous forme trans, elles coïncident à 1 ppm près avec celles publiées par Fromageot et coll. (109) pour H-Gly-Pro-Gly-OH à pH 7,2 ; cet écart est le même que celui observé pour H-[Gly-Pro]₂-OH et peut être dû à l'influence de la chaîne C-terminale du peptide.

Si on observe avec plus d'attention le massif C β Pro, on voit quelques épaulements situés à 28,1, 30,1, 30,5 et 31,4 ppm correspondant à différents isomères difficiles à identifier. Contrairement au cas rencontré pour H-Gly-Pro-OH, ici le résidu glycyle semble ne présenter qu'un pic correspondant à la configuration trans de la liaison Gly-Pro. Si l'on considère que cette liaison est uniquement sous forme trans, il doit y avoir 8 pics dans la zone C β Pro si tous les autres isomères possibles sont présents. Nous en observons en fait 10, dont quelques-uns ne sont que de faibles épaulements correspondant sans doute à une isomérisation cis de la liaison Gly-Pro, les autres liaisons étant tantôt sous forme cis, tantôt sous forme trans.

Les pourcentages d'isomères trans calculés ici à partir des hauteurs des pics β et γ et reportés dans le tableau 17 ne sont qu'approximatifs car on n'a pas tenu compte des épaulements dans la zone β ; cependant ces valeurs sont en assez bon accord avec celles obtenues par RMN du proton (tableau 7). Quant à l'angle ψ de rotation autour de la liaison C α -C' pour les résidus prolyle calculé au moyen de la loi de Siemion et coll. (119), il a pour valeurs les plus probables — 34° ou + 154° (Pro 4 forme cis) et — 39° ou + 159° (Pro 4 forme trans) ; pour les résidus centraux,

nous obtenons -12° ou $+132^\circ$ (Pro 3 forme cis), -28° ou $+148^\circ$ (Pro 3 forme trans), -2° ou $+122^\circ$ (Pro 2 forme cis) et -11° ou $+131^\circ$ (Pro 2 forme trans).

Enfin, la mesure des temps de relaxation T_1 des différents carbones de la molécule nous permet d'avoir une idée de leur mobilité relative. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 18 et ne concernent que les résidus sous forme trans, les résidus cis donnant des pics trop peu intenses pour permettre une mesure, même approximative, des T_1 . On constate que, comme dans la plupart des peptides linéaires contenant de la proline, les carbones β et γ sont beaucoup plus mobiles que les autres et ont une mobilité équivalente à celle observée dans le cas de H-Gly-(Pro)₂-OH. Par contre, les carbones α Gly et α Pro sont moins mobiles que dans le tripeptide ; nous en déduisons que la mobilité des cycles pyrrolidine est équivalente pour ces deux peptides linéaires, alors que la mobilité moyenne du squelette peptidique est plus faible dans le cas de H-Gly-(Pro)₃-OH, ce qui semble indiquer que cette molécule aurait tendance à adopter une conformation privilégiée.

Atome considéré	NT_1 (s)
γ 4 trans	0,90
γ 2 trans + γ 3 trans	1,04
β 2 trans + β 3 trans	0,90
β 4 trans	0,92
α Gly 1	0,46
δ 4 trans	0,60
δ 2 trans + δ 3 trans	0,66
α 2 trans + α 3 trans	0,22
α 4 trans	

Concentration de la solution 150 mg / 1,5 ml

Tableau 18 - Temps de relaxation NT_1 de H-Gly-(Pro)₃-OH à l'état de zwitterion dans D₂O

d - H-Gly-(Pro)₄-OH

Dans le tableau 19 sont reportés glissements chimiques et attributions des pics pour ce peptide à l'état de zwitterion en solution dans D₂O. Nous avons également reporté les résultats correspondant au peptide H-Gly-Pro-OH sous forme trans (108, 125) ainsi que ceux obtenus pour la polyproline II et rapportés par Bovey et Dorman (108). Le spectre correspondant est représenté sur la figure 26.

Les résultats obtenus ici ne permettent de mettre en évidence qu'une forme trans pour les liaisons X-Pro. Si l'on s'en réfère à leurs glissements chimiques, les résidus prolyle situés à l'intérieur de la chaîne ont un comportement analogue à ces mêmes résidus situés dans la polyproline II. Quant au résidu C-terminal, il se rapproche du résidu prolyle dans H-Gly-Pro-OH trans ainsi que du résidu prolyle

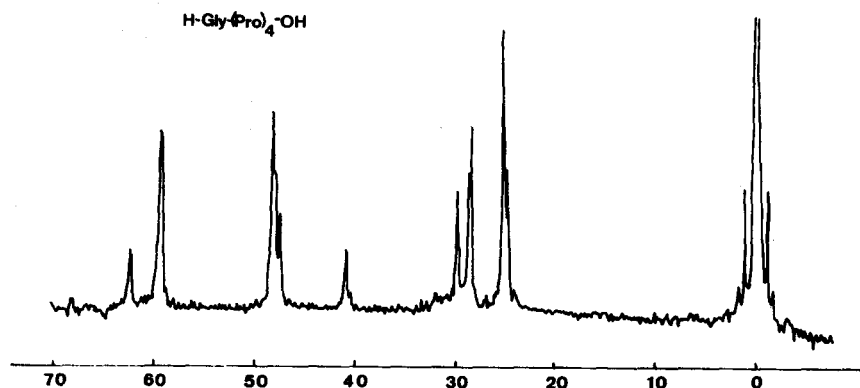


Figure 26 - Spectre en RMN du carbone-13 de H-Gly-(Pro)₄-OH à l'état de zwitterion dans D₂O

Valeur expérimentale	Attribution	H-Gly-Pro-OH trans ¹ (125)	H-Gly-Pro-OH trans ² (108)	Polyproline II ² (108)
24,9	γ 5	25,0	25,2	
25,2	γ 2, 3, 4			25,5
28,6	β 2, 3, 4			28,8
28,8				
29,9	β 5	30,3	30,5	
41,1	α Gly 1			
47,6	δ 5	47,5	47,6	
48,1	δ 2, 3, 4			48,5
48,3				
59,5	α 2, 3, 4			59,4
62,5	α 5	62,8	62,9	

Les valeurs sont exprimées en ppm par rapport au TMS

¹ Mesure expérimentale par rapport au dioxanne (δ = 67,4 ppm par rapport au TMS)

² Mesure expérimentale par rapport à CS₂ (δ = 193,7 ppm par rapport au TMS)

Tableau 19 - Étude de H-Gly-(Pro)₄-OH à l'état de zwitterion dans D₂O par RMN du carbone-13

C-terminal dans H-Gly-(Pro)₃-OH trans.

La valeur obtenue pour l'angle Ψ en suivant la loi de Siemion et coll. (119) est de - 20° ou + 140° pour les résidus prolyle centraux (Cβ à 28,8 ppm).

Enfin, la mesure des temps de relaxation T₁ des différents atomes de carbone constituant la molécule nous permet d'avoir une idée de leur mobilité rela-

Atome considéré	NT ₁ (s)	PP II : NT ₁ (s)
γ 2, 3, 4	0,48	0,218
β 2, 3, 4	0,42	0,158
β 5	0,66	
α Gly 1	0,84	
δ 2, 3, 4	0,28	0,088
α 2, 3, 4	0,23	0,077
α 5	0,29	

Concentration de la solution 150 mg / 1,5 ml

Tableau 20 - Temps de relaxation T₁ de H-Gly-(Pro)₄-OH à l'état de zwitterion et de la polyproline II (d'après Torchia (123))

tive. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 20 conjointement aux valeurs déterminées par Torchia et coll. (123) dans le cas de la polyproline II. A la lecture du tableau, une première constatation s'impose, à savoir que les T₁ ont des valeurs moitié de celles obtenues pour les autres peptides de la série (comparez le tableau 20 aux tableaux 16 et 18) et que ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par Deslauriers et coll. pour le LHRH (tableau 11). Ceci est en faveur d'une conformation assez rigide pour H-Gly-(Pro)₄-OH. Les valeurs des glissements chimiques des résidus prolyle centraux se rapprochent de ceux observés dans le cas de la polyproline II et c'est pourquoi nous avons pensé comparer les temps de relaxation de notre peptide et ceux du polymère. Bien que relativement peu mobile comparé à H-Gly-(Pro)₂-OH et à H-Gly-(Pro)₃-OH, le pentapeptide étudié ici est encore plus mobile que la polyproline II. Dans ce cas-ci également les atomes C β et C γ ont des mobilités comparables, ce qui est en faveur d'une rapide interconversion entre deux conformations stables ayant des temps de vie équivalents, ces conformations ayant l'atome de carbone β ou γ déviant du plan formé par les quatre autres atomes du noyau pyrrolidine.

D - Conclusion

Avant d'essayer de déterminer les conformations les plus probables de nos peptides à l'état de zwitterions en solution aqueuse, nous allons résumer quelles sont celles qui sont susceptibles d'exister d'après des résultats de cristallographie et de calculs conformationnels publiés par d'autres auteurs.

1 - Conformations susceptibles d'exister

Trois équipes, celles de Ramachandran, de Tonelli et de Scheraga, se sont penchées sur ce problème et ont obtenu des résultats comparables. Dans tout ce qui va suivre, nous utiliserons les conventions IUPAC-IUB données en 1970 (67).

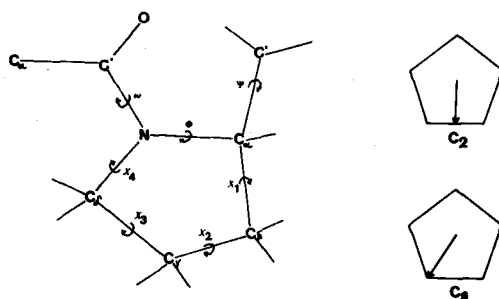


Figure 27 - Schéma d'un résidu prolyle

a - Géométrie du noyau pyrrolidine

Sur la figure 27 est représenté un résidu prolyle avec les différents angles utilisés pour en préciser la conformation. Du fait de la nature cyclique de la proline, la rotation autour de la liaison N-C α est limitée ; d'après Venkatachalam et coll. (130), l'angle Φ peut varier de -35° à -85° et Madison, par des calculs théoriques (131), a trouvé une corrélation entre la valeur de l'angle Ψ et la géométrie du noyau pyrrolidine :

Φ	Conformère favorisé
$< -80^\circ$	Cs-C β ^{exo}
$\approx -70^\circ$	C γ -C β ^{exo} -C δ ^{endo}
$\approx -60^\circ$	Cs-C γ ^{exo} ou Cs-C δ ^{endo}
$\approx -50^\circ$	C γ -C β ^{endo} -C δ ^{exo}
$> -40^\circ$	Cs-C δ ^{endo}

Les symboles C $_2$ et C $_s$ désignent des formes symétriques utilisées dans le cas du cyclopentane et représentées sur la figure 27. Les résultats obtenus par cet auteur coïncident avec les structures observées à l'état solide et en solution.

En outre, Ramachandran et coll. (132) d'une part, De Tar et coll. (133) d'autre part, ont collecté jusqu'à quarante études cristallographiques sur des peptides contenant de la proline ; ils ont constaté que les atomes C β , C α , N et C δ étaient pratiquement coplanaires et que le noyau pyrrolidine ne pouvait adopter que deux conformations bien distinctes résumées dans le tableau 21. Des calculs conformationnels menés sur le résidu prolyle (103) ont conduit au même résultat. La conformation A se caractérise par le fait que C γ est situé au-dessus du plan C β , C α , N, C δ alors que le carboxyle est au-dessous de ce plan (exo). Dans la conformation B, le C γ ainsi que le carbone du carboxyle sont situés tous deux au-dessous

Angle dièdre	Conformation A	Conformation B
χ_1	0° à — 30°	20° à 35°
χ_2	15° à 55°	— 30° à — 40°
χ_3	— 15° à — 30°	20° à 35°
χ_4	5° à 25°	— 5° à — 20°

Liaisons	Longueurs A	Angles	Valeurs des angles degrés
C α -C	1,52 ($\pm$ 0,02)	C-C α -C β	111 ($\pm$ 3)
C α -C β	1,54 ($\pm$ 0,04)	C-C α -N	111 ($\pm$ 3)
C β -C γ	1,51 ($\pm$ 0,04)	C β -C α -N	103 ($\pm$ 2)
C γ -C δ	1,52 ($\pm$ 0,03)	C α -C β -C γ	105 ($\pm$ 3)
C δ -N	1,49 ($\pm$ 0,03)	C β -C γ -C δ	106 ($\pm$ 4)
N-C α	1,48 ($\pm$ 0,03)	C γ -C δ -N	103 ($\pm$ 2)
C=O	1,24 ($\pm$ 0,02)	C δ -N-C α	113 ($\pm$ 2)
C-N	1,33 ($\pm$ 0,03)	Co-N-C α	122 ($\pm$ 3)
		Co-N-C δ	124 ($\pm$ 3)
		Oo-Co-N	121 ($\pm$ 2)
		Co-Co-N	118 ($\pm$ 3)
		Co-Co-O	121 ($\pm$ 3)

Tableau 21 - Conformations du noyau pyrrolidine d'un résidu prolyle
(d'après Ramachandran (132) et De Tar (133))

du plan C β , C α , N, C δ (endo).

b - Le résidu prolyle

Nous allons voir dans quelle mesure peuvent varier les angles Φ , Ψ et ω caractéristiques du résidu prolyle. Nous savons déjà que Φ ne peut varier que dans la zone — 35° à — 85°.

Flory et coll. (134) ont montré par des calculs conformationnels que l'énergie correspondant à un résidu prolyle isolé était minimale pour deux valeurs de Ψ , à savoir Ψ compris entre — 20° et — 80° (liaison Pro C α -C' cis') ou Ψ compris entre 120° et 180° (liaison Pro C α -C' trans'), mais il ne semble y avoir aucune corrélation entre la valeur de Ψ et la conformation du noyau pyrrolidine.

En ce qui concerne l'angle ω de rotation autour de la liaison peptidique, nous avons vu (70) que la liaison X-Pro, où X représente un résidu d'acide aminé quelconque (même Pro), peut adopter la configuration cis ($\omega = 0^\circ$) ou trans ($\omega = 180^\circ$) (fig. 13). Il semble, si l'on se réfère aux travaux de Winkler et coll. (73) ou de Ramachandran (74), que l'angle ω puisse varier quelque peu autour de ces valeurs ; cependant Scheraga et coll. (75) ont montré dans une étude récente que la

non-planéarité éventuelle de la liaison peptidique n'était pas significative pour les propriétés conformationnelles moyennes des molécules.

c - Le résidu glycyle

Du fait de l'absence de chaîne latérale, ce résidu est très flexible. D'après des calculs conformationnels (135), il apparaît que la conformation C_5 (totalement étendue) est celle de plus faible énergie. Cependant le résidu glycyle complètement bloqué n'existe pas sous une seule forme, mais plutôt comme un mélange de conformations, dont celle en C_5 .

La séquence peptidique Gly-Pro peut exister aussi bien sous forme cis que sous forme trans (fig. 13). Des calculs conformationnels ont été menés dans les deux cas, en supposant que le résidu prolyle est isolé dans une chaîne polypeptidique. Flory et coll. (134) se sont penchés sur le cas du trans-prolyle et ont montré que celui-ci limitait les conformations possibles pour le résidu qui le précède immédiatement. La carte obtenue dans le cas d'une séquence Gly-Pro trans est reproduite sur la figure 28 a. Tonelli (136) a mené des calculs analogues avec le résidu cis-prolyle et il a montré que la liaison X-Pro cis réduisait encore le nombre de conformations possibles pour X par rapport au cas du résidu trans-prolyle. La carte obtenue dans le cas d'une séquence Gly-Pro cis est reproduite sur la figure 28 b

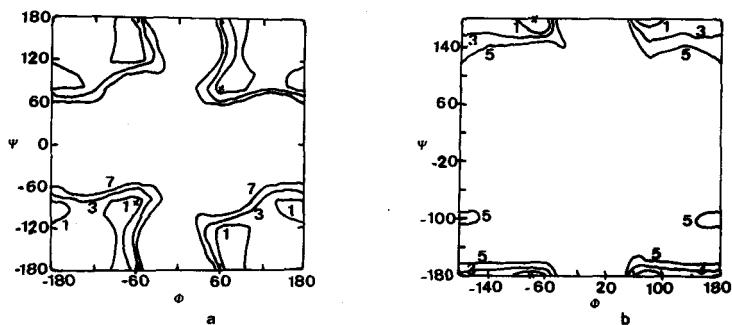


Figure 28 - Diagramme énergétique pour un résidu Gly

a suivi par un résidu trans-Pro (d'après Flory (134))

b suivi par un résidu cis-Pro (d'après Tonelli (136))

Les contours sont donnés en kcal/mole et les minima sont désignés par x

Mais ici la conformation du résidu Pro est fonction de l'état conformationnel du Gly, ce qui n'était pas le cas pour la liaison X-Pro trans. Tonelli conclut son étude en affirmant que la liaison X-Pro trans est cependant préférée à la forme cis, car son entropie de conformation est plus importante.

d - Oligoprolines

Schellman et coll. (86) ont montré d'une part que les fractions de conformères dans diverses acétylprolinamides sont très sensibles à l'encombrement du groupement protecteur C-terminal, et d'autre part que le solvant joue un rôle d'autant plus important sur ces équilibres conformationnels que le groupement protecteur C-terminal est plus petit.

Tonelli (137) et Scheraga et coll. (138) se sont attachés à prédire au moyen de calculs conformationnels les fractions de conformères dans les oligoprolines. Ils ont tous deux pris pour modèle la série d'acétylprolineméthylamides, faisant varier le nombre de résidus prolyle de 2 à 5. Leurs résultats, comparés aux valeurs expérimentales obtenues par Blout et coll. (51) par RMN du proton, sont reportés dans le tableau 22. Ils diffèrent entre eux du fait que Tonelli a négligé les interactions à longue distance alors que Scheraga et coll. en ont tenu compte ainsi que de la contribution due à l'énergie de libration. Mais ces résultats ne permettent pas d'expliquer l'apparition constatée expérimentalement d'une structure en polyproline à partir du stade pentaproline : en effet, si on s'en réfère aux calculs de Tonelli, les résidus centraux sont sous forme trans dès la triproline ; quant à Scheraga et coll., leurs calculs montrent que les conformations « tout trans » sont favorisées énergétiquement quel que soit l'oligomère considéré, mais leurs résultats semblent indiquer l'existence de plusieurs conformères en solution, même au stade pentaproline.

Oligomère*		Valeur calculée (Tonelli)	Valeur calculée (Scheraga)	Valeur expérimentale (Blout)
Diproline	1	0,57	0,94	0,60
	2	0,87	0,85	0,80
Triproline	1	0,67	0,79	0,60
	2	0,99	0,82	0,80
	3	0,73	0,78	0,76
Tétraproline	1	0,67	0,88	0,60
	2	0,99	0,84	0,80
	3	0,99	0,93	0,80
	4	0,73	0,66	0,80
Pentaproline	1	0,67	0,88	0,60
	2	0,99	0,83	0,99
	3	0,99	0,68	0,99
	4	0,99	0,93	0,99
	5	0,73	0,51	0,99

* Les chiffres indiquent la place du résidu dans la chaîne, le premier représentant le N-terminal

Tableau 22 - Probabilité de trouver des résidus dans la conformation trans pour les oligoprolines

Venkatachalam et coll. (130) ont apporté eux aussi leur contribution à l'étude théorique de conformations énergétiquement favorisées d'une séquence diprolyle à l'intérieur d'une chaîne peptidique. Leurs calculs ont montré que trois conformations stables existaient pour ce dimère, à savoir : trans'-cis ($\Psi \simeq 160^\circ$, $\omega = 0^\circ$), trans'-trans ($\Psi \simeq 160^\circ$, $\omega = 180^\circ$) et cis'-trans ($\Psi \simeq -40^\circ$, $\omega = 180^\circ$), les notations trans' et cis' se référant à la rotation autour du $C\alpha-C'$ d'un résidu prolyle. Cette étude a également montré que la flexibilité des noyaux pyrrolidine jouait un rôle très important dans la détermination des conformations énergétiquement favorisées de ce dipeptide.

En effet nous avons vu en étudiant le résidu prolyle que ce noyau était très flexible et qu'il adoptait en général la conformation A ou B (tableau 21). Dans la plupart des calculs conformationnels, les auteurs ont tenu compte de cette flexibilité. C'est ainsi que Scheraga et coll. (138) sont arrivés à la conclusion que les chaînes d'oligoprolines dans lesquelles les noyaux pyrrolidine adoptent tous la même conformation sont plus stables que les autres ; d'autre part, lorsque ces chaînes s'allongent, celles ayant tous les noyaux en conformation B ($\Phi = -75,0^\circ$) sont plus stables que celles ayant tous les cycles pyrrolidine en conformation A ($\Phi = -67,6^\circ$). C'est déjà le cas d'ailleurs, d'après leurs calculs, pour la di- et la triproline, oligomères pour lesquels l'énergie conformationnelle est minimale dans le cas d'une succession de noyaux pyrrolidine de conformation B.

Pour sa part, Madison (131) a calculé les énergies potentielles intramoléculaires en fonction de l'angle Ψ pour les isomères cis et trans en conformation A ou B. Les modèles utilisés pour ces calculs sont l'acétylprolinediméthylamide pour simuler la liaison Pro-Pro dans une chaîne peptidique linéaire (fig. 29 a) et l'acétylprolineméthylamide pour simuler la liaison X-Pro dans les mêmes conditions (fig. 29 b). Ces résultats, qui lui ont permis de déterminer les populations

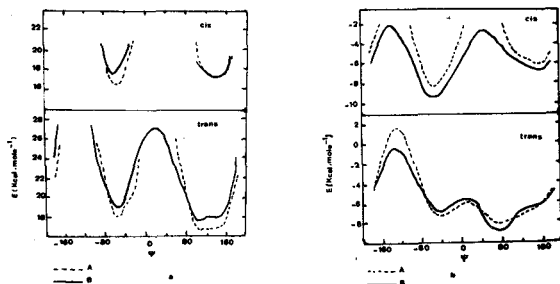


Figure 29 a - Énergie potentielle intramoléculaire minimum pour Ac-Pro-Me₂A (d'après Madison (131))

Figure 29 b - Énergie potentielle intramoléculaire minimum pour Ac-Pro-MeA (d'après Madison (131))

Région conformationnelle	Conformation du noyau	Populations relatives	
		acétylproline-méthylamide	acétylproline-diméthylamide
trans-trans'	A	0,25	0,26
trans-trans'	B	0,38	0,12
trans-cis'	A	0,03	0,02
trans-cis'	B	0,02	0,00
cis-trans'	A	0,00	0,10
cis-trans'	B	0,00	0,08
cis-cis'	A	0,05	0,31
cis-cis'	B	0,27	0,11

Tableau 23 - Populations relatives en différents conformères pour des diamides dérivés de la proline (d'après Madison (131))

relatives en différents conformères pour Pro-Pro et pour X-Pro (tableau 23), sont à rapprocher des résultats de Scheraga et coll. (la conformation B est plus stable lorsque la chaîne d'oligoproline s'allonge).

2 - Conformations de nos peptides

Il n'est évidemment pas question de déterminer les conformations exactes de nos peptides, le dichroïsme circulaire et la RMN ne permettant de mettre en évidence que l'existence d'équilibres entre plusieurs formes plausibles. Nous essaierons donc ici de proposer des structures susceptibles d'exister pour chacun de nos oligomères. Il est vraisemblable qu'une étude cristallographique nous apporterait de précieux renseignements dans ce domaine, mais cela pose le problème de la cristallisation des peptides.

a - H-[Gly-Pro]₂-OH

La courbe de dichroïsme circulaire obtenue pour ce peptide à l'état de zwitterion en solution aqueuse (fig. 9) présente un minimum situé vers 205 nm et d'ellipticité $-10000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmole}^{-1}$. Si on ne peut pas comparer ce spectre à ceux obtenus dans le cas des oligoproline, par contre on voit qu'il a une forme rappelant le spectre dichroïque de la séquence Gly-Pro, spectre calculé par Schellman et coll. (86), ce qui nous amène à penser que notre peptide à l'état de zwitterion n'adopte pas de conformation particulière dans l'eau.

Les résultats obtenus par RMN, aussi bien du proton que du carbone-13, semblent confirmer cette interprétation. Théoriquement quatre isomères sont possibles(ctc,ctt,ttc,ttt)si l'on considère l'isomérisation cis-trans autour des liaisons X-Pro. D'après les résultats obtenus par RMN du proton (tableau 3), il semble que ces quatre isomères soient en équilibre quel que soit le pH de la solution.

Cependant des changements se produisent lorsqu'on change le pH. En particulier le pourcentage d'isomères trans diminue si on élève le pH ; de même, le doublet de doublets AB attribué aux protons α Gly 3 s'élargit, ce qui nous indique que l'environnement de ce résidu change et que Gly 3 adopte vraisemblablement une conformation assez rigide. Ceci nous suggère l'existence d'une conformation précise adoptée par le peptide en solution aqueuse, conformation du type coude β ou γ par exemple, qui serait en équilibre avec d'autres formes inordonnées. Les résultats de dichroïsme circulaire et de carbone-13 nous amènent à rejeter l'existence d'un coude γ qui est caractérisé par l'existence d'une bande négative vers 230 nm en dichroïsme circulaire ainsi que par une valeur anormale (à champ trop haut) des glissements chimiques du carbone β de la proline (139) ; d'autre part ce genre de conformations est en général peu stable en milieu polaire (140) et se rencontre le plus souvent dans des solvants tels que le dioxanne et le chloroforme. Une conformation en coude β aurait par contre une plus grande probabilité théorique d'existence ; on sait en effet qu'un résidu prolyle en position 2 et un résidu glycyle en position 3 sont très favorables à ce genre de conformation. Malheureusement la courbe de dichroïsme circulaire ici encore nous amène à rejeter ce type de conformation et nous suggère plutôt la formation d'une structure vraisemblablement cyclique (C_5 , C_7 ...) et stabilisée par des ponts hydrogène intra- ou intercaténaux (140). Blanchard (141) a montré l'existence d'un cycle en C_7 pour H-Gly-Pro-Gly-OH à l'état de zwitterion, ce cycle étant stabilisé par une liaison hydrogène entre le CO du Gly 1 et le NH du Gly 3. Un tel cycle, qui implique des liaisons peptidiques trans et un résidu Pro cis', peut également exister dans le cas de notre peptide. Mais ce n'est certainement pas la seule conformation existant pour H-[Gly-Pro] $_2$ -OH en solution aqueuse. L'évolution du spectre dichroïque de ce peptide, que ce soit en fonction de la concentration ou en fonction de la température, est similaire, ce qui nous amène à penser que des molécules de peptide peuvent former des liaisons intracaténaux impliquant par exemple le CO du Pro 2 et le NH du Gly' 3 ou le NH du Gly 1 et le CO du Pro' 4. En effet, d'après Madison et coll. (140) une bande dichroïque négative intense située vers 205 - 210 nm peut être due à des ponts hydrogène non plans entre deux groupements peptidiques plans. L'évolution du spectre obtenu en RMN du proton avec le passage du milieu acide au milieu neutre peut s'expliquer par le fait que le cycle en C_7 dont nous venons de parler n'existe plus en milieu acide, mais qu'il y a alors formation d'un autre cycle en C_7 impliquant le CO de Gly 3 et le COOH du Pro 4 et simultanément formation d'un cycle en C_5 stabilisé par une liaison hydrogène entre NH_3^+ et CO de Gly 1 (ceci dans le cas de l'isomère ttt qui est le plus favorisé à pH acide). Toujours à pH acide, l'isomère ctt serait essentiellement formé du cycle en C_7 (CO Gly 3...HOOC Pro 4). Pour les isomères ttc et ctc on retrouverait le cycle en C_5 (NH_3^+ ...OC Gly 1) ainsi qu'un autre cycle en C_5 stabilisé par une liaison NH ...OC Gly 3. Les résultats obtenus par la mesure des temps de relaxation montrent que le peptide étudié ici est très mobile, ce qui signifie que les conformations indiquées ici sont vraisemblablement en équilibre avec des formes

désordonnées.

b - H-Gly-(Pro)₂-OH

La courbe de dichroïsme circulaire obtenue pour ce peptide à l'état de zwitterion en solution aqueuse (fig. 9) rappelle celle obtenue par Cann et coll. (126) pour H-Ser-Pro-Pro-OH. Elle se différencie de celle obtenue par ces mêmes auteurs pour H-Arg-Pro-Pro-OH par l'absence d'une bande positive vers 225 nm. Elle se différencie aussi de celles obtenues pour la triproline par Rothe et coll. (78) et par Sakakibara et coll. (76) par la position de son minimum. En milieu acide (pH 1,5), il y a apparition d'une bande positive dont le maximum est situé à 221 nm ; ce phénomène est analogue à celui observé par Cann et coll. (126) dans le cas de H-Ser-Pro-Pro-OH et est attribuable à une isomérisation cis-trans autour des liaisons Gly-Pro et Pro-Pro. Ces résultats nous amènent à penser que, tout comme la triproline et H-Ser-Pro-Pro-OH, notre peptide n'adopte pas de conformation déterminée, ce qui est logique pour un peptide de cette taille.

Plus intéressants sont les résultats obtenus par RMN. La RMN du proton (fig. 18) nous permet de dire qu'à pH acide trois isomères sur les quatre possibles existent en solution aqueuse. Par contre les quatre isomères cc, ct, tc et tt sont en équilibre pour ce peptide en solution aqueuse à l'état de zwitterion ou en milieu basique. La RMN du carbone-13 est encore plus précise, car elle nous permet d'évaluer les pourcentages de ces différents isomères : 9 % ct, 12 % tc, 17 % cc et 62 % tt pour le zwitterion. Ces résultats sont assez voisins de ceux trouvés par Cann et coll. (127) pour H-Ser-Pro-Pro-OH en solution aqueuse à pH 7 : 6 % ct, 9 % tc, 20 % cc et 65 % tt, alors qu'à pH 1 ils ont : ≈ 0 % cc, 3 % ct, 6 % tc et 91 % tt. Ces résultats sont très différents de ceux obtenus expérimentalement (RMN du proton) par Blout et coll. (51) pour Boc-(Pro)_n-OBzl ainsi que de ceux prédits aussi bien par Tonelli (137) que par Scheraga et coll. (138), en particulier en ce qui concerne la stabilité de l'isomère cc pour le zwitterion. Cet isomère n'existant pas dans le cas du peptide totalement protoné, nous pouvons penser a priori qu'il est stabilisé par des interactions du type $\text{NH}_3^+ \dots \text{OOC}(\text{Pro } 3)$, alors qu'en milieu acide il y a répulsion $\text{NH}_3^+ \dots \text{HOOC}(\text{Pro } 3)$. Ceci a d'ailleurs été suggéré, mais non démontré, dans le cas de H-Ser-Pro-Pro-OH et nécessite d'avoir $\Psi(\text{Pro } 2)$ cis' (interaction $\text{NH}_3^+ \dots \text{O}=\text{C}$) et $\Psi(\text{Pro } 3)$ cis' (interaction $\text{NH}_3^+ \dots \text{OOC}$), ce qui correspond à -31° pour $\Psi(\text{Pro } 3)$ et -17° pour $\Psi(\text{Pro } 2)$, valeurs trouvées expérimentalement par la loi de Siemion et coll. La constante de couplage 2J du résidu glycyle ayant pour valeur absolue 16,5 Hz, cela signifie que l'on doit avoir Φ compris entre 60° et 120° , la valeur de Ψ oscillant autour de 150° à 165° (tableau 6 et fig. 28 a et b). Pour les résidus prolyle, l'existence des dérivés cis-cis' mentionnés ci-dessus, bien que non mise en évidence en 1975 par Venkatachalam et coll. (130), l'a été en 1977 par Madison (131) et il semble que dans ce cas les noyaux pyrrolidine adoptent la conformation A (tableau 21) selon la notation de Ramachandran et coll. (132)

($\Phi = -67,6^\circ$, soit une symétrie du type $C_2-C_{\text{exo}}^B-C_{\text{endo}}^Y$). L'existence de l'isomère tt en grande quantité est tout à fait attendue du fait que les liaisons peptidiques dans les protéines adoptent une configuration trans ; il n'y a que dans le cas où elles impliquent la proline que l'on peut observer une configuration cis, qui est quand même moins stable. Cet isomère tt est plus stable à pH acide que dans le cas du zwitterion ; à priori cela nous amène à penser que l'hydrogène du carboxyle est impliqué dans une liaison hydrogène, sans doute avec l'oxygène du C=O de Pro 2, car il y a alors formation d'un cycle en C_7 , conformation favorisée ; dans ce cas, Ψ (Pro 2) peut être indifféremment cis' ou trans' alors que Ψ (Pro 3) est trans'. Enfin les isomères ct et tc, aussi peu favorisés l'un que l'autre que le pH soit acide ou neutre, sont sans doute stabilisés par des liaisons $NH_3^+ \dots O=C$ (Pro 2). Les quatre isomères possibles sont représentés sur la figure 30. Les résultats obtenus par la mesure des temps de relaxation sont en accord avec les conformations proposées ici, puisqu'ils montrent que les carbones β et γ sont très mobiles.

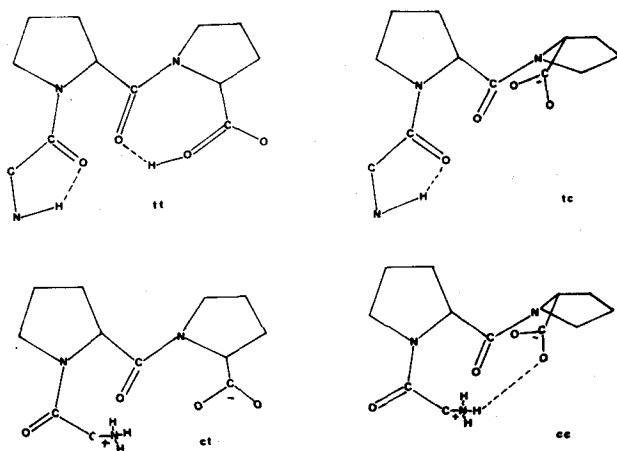


Figure 30 - Représentation des quatre isomères possibles pour H-Gly-(Pro)₂-OH

c - H-Gly-(Pro)₃-OH

Étudié par dichroïsme circulaire (fig. 9), ce tétrapeptide sous forme de zwitterion présente une bande négative située vers 202 nm ainsi qu'une bande faiblement positive dont le maximum est situé vers 230 nm. En milieu acide (pH 2,12) l'intensité de cette bande est quadruplée et son maximum est déplacé à 227 nm ; simultanément, l'intensité de la bande négative est légèrement plus forte que pour le zwitterion. Ces observations sont en accord avec une augmentation du pourcentage de formes trans autour des liaisons X-Pro lorsqu'on est en milieu acide. Tout

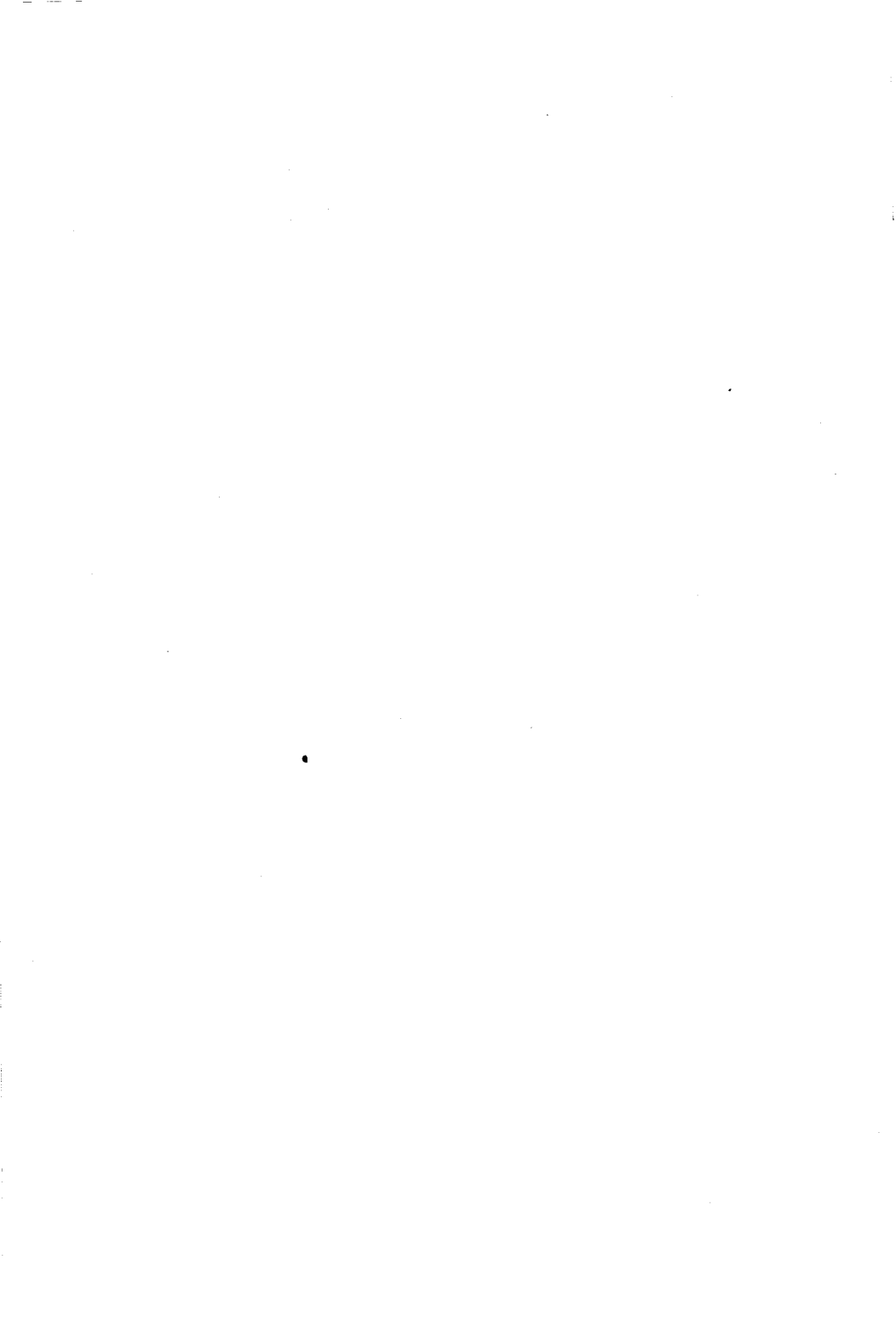
comme pour le spectre de la polyproline II, nous pouvons attribuer la bande négative observée pour notre peptide à une des composantes d'une transition π - π^* imide, la faible bande positive observée pour le zwitterion étant due à la superposition de la bande due à la transition n - π^* du chromophore imide et de l'autre composante de la transition π - π^* imide. Le spectre du zwitterion est à rapprocher de celui obtenu par Sakakibara et coll. (76) dans le cas de Aoc-(Pro)₃-OH (Aoc = tertioamyloxy-carbonyl) et il nous amène à conclure que H-Gly-(Pro)₃-OH en solution aqueuse n'adopte pas de conformation préférentielle.

Les études par RMN montrent que les huit conformations possibles existent pour le térapeptide à l'état de zwitterion. Les pourcentages respectifs des différentes formes sont difficiles à calculer, car certaines ne donnent que des épaulements sur le spectre du carbone-13. Par contre les pourcentages globaux de conformations trans pour chacun des résidus prolyle ont été calculés et ils sont reportés dans le tableau 17. Ils sont similaires pour chaque résidu et de l'ordre de 80 à 85 % ; ces valeurs sont à rapprocher de celles trouvées par Scheraga et coll. (138) par leurs calculs théoriques se rapportant à la triproline. Par contre nos résultats sont, comme dans le cas de H-Gly-(Pro)₂-OH, très différents de ceux obtenus expérimentalement par Blout et coll. (51) qui, pour leur part, n'ont observé que cinq des huit conformères possibles pour Boc-(Pro)₃-OBzl en solution dans le chloroforme. Cependant il faut noter que certaines formes n'existent qu'en faible quantité (épaulements sur le spectre en carbone-13 situés à 28,1, 30,1, 30,5 et 31,4 ppm) ; ceci peut expliquer qu'elles n'aient pas été identifiées par Blout et coll. qui ont utilisé uniquement la RMN du proton à 220 MHz. Il semble cependant, d'après la mesure des temps de relaxation, que le squelette peptidique soit relativement peu mobile dans le cas de H-Gly-(Pro)₃-OH, ce qui nous suggère qu'entre autres conformations, ce peptide adopte une structure en polyproline II ; cette hypothèse est supportée par l'existence d'une faible bande positive située vers 230 nm en dichroïsme circulaire ainsi que par la valeur des glissements chimiques des résidus Pro 2 et Pro 3 en carbone-13. Cependant, ce n'est pas la seule forme existant pour le zwitterion en solution aqueuse et nous avons alors affaire à un équilibre entre plusieurs conformations, les autres étant difficiles à préciser. En ce qui concerne la configuration adoptée par les cycles pyrrolidine, il ne nous a pas été possible de la déterminer à l'aide de nos résultats expérimentaux. La mesure des temps de relaxation montre que ces cycles ont une mobilité équivalente à celle observée dans le cas de H-Gly-(Pro)₂-OH. A priori nous pensons que ces cycles adoptent la configuration B (notation de Ramachandran et coll.) qui est théoriquement la plus stable.

d - H-Gly-(Pro)₄-OH

Les résultats obtenus tant en dichroïsme circulaire (apparition d'une bande positive située vers 226 - 228 nm, bande dont l'intensité ne varie pas avec le pH) qu'en RMN du carbone-13 (valeurs des glissements chimiques des résidus pro-

lyle centraux) suggèrent que le pentapeptide en solution aqueuse a tendance à adopter une conformation rappelant celle de la polyproline II, même si cette conformation est en équilibre avec d'autres (apparition de massifs cis X-Pro dans le spectre RMN du proton quand on passe du pH acide à pH neutre). D'après Madison (131), la polyproline II est caractérisée par $\omega = 180^\circ$, $\Phi = -77,2^\circ$ et $\Psi = 145,9^\circ$. Si l'on admet que les résidus prolyle centraux adoptent une conformation en polyproline II, cela signifie que les liaisons Pro-Pro sont trans' ($\Psi = 145,9^\circ$) et que les noyaux pyrrolidine adoptent la conformation B (Φ voisin de $-75,0^\circ$). Les autres formes de H-Gly-(Pro)₄-OH existant en équilibre avec cette conformation polyproline II sont difficiles à préciser ; pour cela, il serait nécessaire de voir les résonances correspondantes en RMN du carbone-13, ce qui nécessite l'utilisation de solutions très concentrées en peptide et l'enregistrement du spectre sur un spectromètre à haut champ. D'autre part, la mesure des temps de relaxation montre que ce peptide est assez rigide comparé aux autres peptides de la série, ce qui est en accord avec l'existence d'une conformation privilégiée. Cependant ce pentapeptide est quand même plus mobile que la polyproline II (tableau 20) ce qui est assez logique étant donné que le squelette ne comporte que cinq résidus, ce qui est relativement peu. Tous ces résultats nous amènent à penser que H-Gly-(Pro)₄-OH à l'état de zwitterion adopte une structure rigide voisine de celle de la polyproline II, mais pas tout à fait identique (valeurs de l'ellipticité vers 227 nm plus élevée dans le cas du peptide que pour le polymère, valeurs de T₁ plus élevées aussi pour le peptide) ; il est probable qu'une (ou plusieurs) autre(s) structure(s) existe(nt) à côté de cette forme polyproline II (spectre RMN du proton), mais en quantité négligeable.



CHAPITRE III

ÉTUDE CONFORMATIONNELLE DES POLYMÈRES

Le point de départ de ce travail a été de synthétiser et d'étudier la conformation de polypeptides modèles d'une protéine riche en proline PRP extraite de la salive parotidienne humaine par Degand et coll. (3). Cette protéine est assez remarquable de par sa composition en acides aminés : elle est constituée d'environ 30 % de résidus prolyle, 20 % de résidus glycyle et 19 % de résidus glutamyle et ne contient ni acides aminés soufrés, ni tryptophane. Cependant la détermination de la structure primaire de cette protéine n'a pu être menée à bien jusqu'ici, ceci étant sans doute dû à la présence de séquences répétitives du type $[\text{Gly}-(\text{Pro})_3]$ ou $[\text{Gly}-(\text{Pro})_4]$. Ces résultats préliminaires nous ont amenée à fabriquer les polymères $\text{H}-[\text{Gly}-(\text{Pro})_3]_n-\text{OH}$ et $\text{H}-[\text{Gly}-(\text{Pro})_4]_n-\text{OH}$ et à en étudier la conformation par les méthodes physico-chimiques classiques, à savoir le dichroïsme circulaire ainsi que la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone-13.

A - Conformations de la polyproline

La proline est un imino-acide cyclique, ce qui a amené de nombreux chercheurs à penser que la polyproline devait adopter une conformation particulière. En effet, du fait de la structure cyclique de la proline, l'angle Φ est fixé à $-76,5^\circ$ (conformation B [(132), tableau 21], favorisée dans le cas des longs enchaînements de résidus Pro) d'après les mesures faites aux rayons X. Par contre, l'isomérisation cis-trans autour de la liaison peptidique est facile dans le cas des liaisons X-Pro et Pro-Pro. Par conséquent on peut s'attendre à observer essentiellement deux conformations stables pour la polyproline. Toutes deux sont hélicoïdales ; dans une de ces conformations, toutes les liaisons peptidiques sont en configuration cis (polyproline I), cette forme étant favorisée par les mauvais solvants (alcools aliphatiques) ; dans l'autre conformation, toutes les liaisons peptidiques sont en configuration trans (polyproline II), cette forme étant favorisée par l'eau ou les acides. Les caractéristiques de ces deux structures, données par Madison (131), sont reportées dans le tableau 24. Il est évident que, puisque ces conformations sont totalement différentes, les paramètres physico-chimiques s'y rapportant seront aussi différents. C'est ce que nous allons voir ci-dessous.

1 - Dichroïsme circulaire

Cette technique est très sensible à la conformation et est très utilisée pour l'étude des biopolymères en solution. Cependant pour en tirer le maximum d'informations, il est nécessaire de pouvoir interpréter théoriquement les spectres

	Symétrie	Nombre de résidus par tour ¹	Angle de liaison NCαC' (°)	Φ (°)	Ψ (°)
Polyproline I	10 ₃	3,33	114	— 83	158
Polyproline II	3 ₁	— 3,0	110,0	— 77,2	145,9

¹ Si la valeur est positive, l'hélice tourne à droite, si elle est négative, l'hélice tourne à gauche

Tableau 24 - Conformations de la polyproline (d'après Madison (131))

obtenus. C'est pourquoi de nombreux auteurs se sont intéressés au calcul de spectres dichroïques, en particulier dans le cas de la polyproline, qu'elle soit sous forme I ou II. Une caractéristique de ces spectres (obtenus expérimentalement ou calculés théoriquement) réside dans le fait qu'ils ne sont pas conservatifs dans la zone 180 - 250 nm. Ceci veut dire que certaines transitions électroniques situées à basse longueur d'onde apportent des contributions non négligeables au spectre dichroïque de la polyproline. Comme ces transitions ne sont pas bien connues, car non accessibles expérimentalement, elles n'ont pas été prises en compte dans les calculs théoriques jusqu'à ces dernières années. Par contre Krimm et coll. (85) les ont introduites sous forme d'une approximation de polarisabilité, ce qui leur a permis d'obtenir un spectre théorique de la polyproline II correspondant au spectre expérimental. Les paramètres utilisés dans cette étude sont reportés dans le tableau 25, tandis que sur les figures 31 a et b sont reproduits spectres calculés et spectres expérimentaux pour la polyproline I et II. En 1975, Pysh et coll. (142) ont publié des spectres expérimentaux de la polyproline enregistrés sur un dichrographe très performant descendant jusque 135 nm. Pour une solution de polyproline II dans le trifluoroéthanol, ils ont observé une bande positive vers 227 nm, une bande négative 17 fois plus intense centrée à 206 nm ainsi qu'une autre bande négative d'intensité moindre centrée à 167 nm ; l'ellipticité s'annule vers 223 nm. Ce spectre rappelle

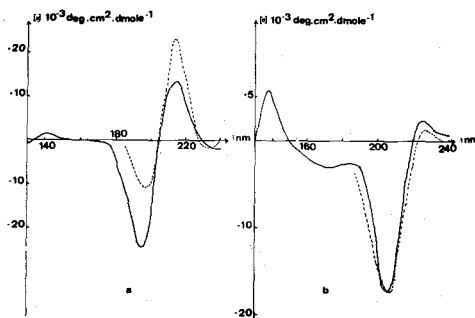


Figure 31 - Spectres dichroïques de la polyproline I (a) et II (b) (d'après Krimm (85))

	Transition $\pi-\pi^*$ (nm)	Transition $n-\pi^*$ (nm)	ω (°)	Φ (°)	Ψ (°)
Polyproline I	198	230	0	— 80	170
Polyproline II	198	230	180	— 65	165

Tableau 25 - Paramètres utilisés pour le calcul des spectres dichroïques de la polyproline (d'après Krimm (85))

fortement ceux enregistrés par d'autres (143, 144), ce qui amène Pysh et coll. à admettre qu'apparemment tant que le solvant utilisé favorise la conformation en polyproline II, le spectre dichroïque est indépendant du solvant.

Cependant, les propriétés de la polyproline en solution aqueuse subissent d'importantes modifications en présence de sels, en particulier en présence de chlorure de calcium. Ceci s'observe facilement en dichroïsme circulaire, où le spectre caractéristique de la polyproline forme I ou forme II disparaît en solution 4 - 6 M de chlorure de calcium. En particulier, la bande positive disparaît et la bande négative est remplacée par une courbe moins intense présentant un minimum vers 205 nm. Krimm et coll. (145) ont interprété ce spectre comme étant celui de la polyproline sous forme désordonnée, la transition se faisant d'après eux par une variation de l'angle Ψ plutôt que par isomérisation cis-trans autour de la liaison peptidique. Mattice et coll. (146) ont observé pour leur part que le chlorure de calcium modifie le spectre dichroïque de la polyproline de la même manière que l'acide chlorhydrique et ils interprètent ce résultat en supposant qu'il y a formation d'un complexe entre les ions Ca^{2+} et la polyproline, complexe résultant d'une interaction dipôle-ion entre le cation et le groupement carbonyle du polypeptide ; ils n'excluent cependant pas la possibilité d'une isomérisation cis-trans autour de la liaison peptidique. Ce dernier travail fait suite à une publication plus ancienne de la même équipe (147), dans laquelle les auteurs ont décomposé en gaussiennes le spectre dichroïque de la polyproline en présence de chlorure de calcium : il semble d'après leurs conclusions que deux courbes de signes opposés centrées respectivement à 221 et 206 nm soient nécessaires pour reconstituer le spectre expérimental, tout au moins tant que la concentration en chlorure de calcium est inférieure à 3,8 M. Pour des concentrations plus importantes, deux courbes de signes opposés ou une courbe négative permettent de reconstituer le spectre expérimental. De leur étude, ces auteurs concluent que la polyproline subit un changement de conformation en présence de chlorure de calcium, changement dont le mécanisme est très discuté et qui a été étudié par d'autres techniques que le dichroïsme, en particulier par résonance magnétique nucléaire.

2 - Résonance magnétique nucléaire du proton

De nombreuses études sur de petits peptides linéaires ou cycliques (51, 78, 106, 107) contenant de la proline ont montré que les protons α cis et α trans résonnent à des fréquences différentes. On doit donc logiquement s'attendre à observer de tels écarts dans les spectres de polyproline I ou II. C'est effectivement le cas et Bovey et coll. (104) ont observé qu'en solution dans D_2O à 22 °C les protons α de la polyproline I résonnent à 4,4 ppm alors que ceux de la polyproline II résonnent à 4,7 ppm. Sur la figure 32 sont représentés les spectres RMN des deux formes de la polyproline. Le spectre correspondant à la polyproline I comporte un pic α cis dédoublé présentant une résonance à 4,3 ppm ; ceci a été interprété par Bovey et coll. comme correspondant à un proton α cis situé dans un environnement magnétique différent des autres protons α cis : 20 minutes après la dissolution dans D_2O , il y a déjà isomérisation de la polyproline I en polyproline II, isomérisation commençant par le $-COOH$ terminal. La résonance à 4,3 ppm correspond au proton α cis à la jonction ...cis cis cis trans trans... Cette résonance à 4,3 ppm a également été observée par Mandelkern et coll. (105) pour plusieurs échantillons de polyproline dissoute dans D_2O : ils attribuent ce pic à l'existence de 2 à 3 % de résidus cis dans la polyproline en solution aqueuse. Mais les spectres RMN des deux formes de la polyproline diffèrent aussi dans la région des protons δ : sur la figure 32, on voit que la polyproline II présente deux pics centrés respectivement à 3,6 et 3,8 ppm alors que les protons δ de la polyproline I résonnent vers 3,6 ppm sous forme d'un pic large.

Quant à la conformation du noyau pyrrolidine dans la polyproline II, elle a été étudiée par Torchia (148) qui, par simulation, a pu reproduire le spectre

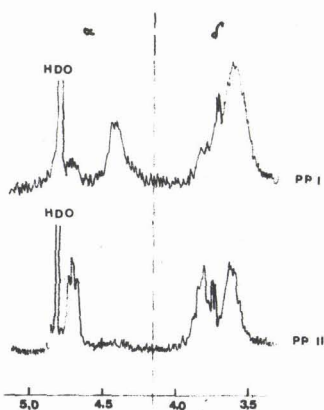


Figure 32 - Spectres RMN du proton à 220 MHz de la polyproline I et II (d'après Bovey (104))

expérimental et en a conclu que ce noyau adopte deux conformations préférentielles également peuplées, l'une ayant le C γ exo et l'autre le C γ endo par rapport au cycle plan formé par les quatre autres atomes, conformations préférentielles adoptées aussi par les petits peptides contenant de la proline.

L'influence des sels, en particulier du chlorure de calcium, sur la conformation de la polyproline en solution aqueuse a été étudiée par RMN du proton (104) et les résultats obtenus sont présentés sur la figure 33. On observe d'une part un élargissement des raies, ce qui amène à conclure que le changement de conformation n'est pas dû à une augmentation du nombre de valeurs permises pour l'angle Ψ (il y aurait alors l'effet inverse dû à une flexibilité plus grande du squelette)

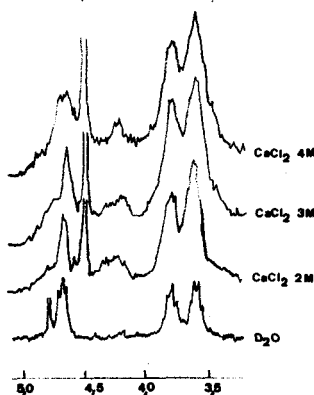


Figure 33 - Spectre RMN du proton de la polyproline II en fonction de la concentration en CaCl_2 (d'après Bovey (104))

D'autre part, au fur et à mesure que la concentration en chlorure de calcium augmente, le pic α trans s'élargit et il apparaît un pic α cis : le changement de conformation se fait donc par isomérisation cis-trans autour des liaisons peptidiques. D'après Bovey et coll., à de faibles concentrations en sel le polymère est formé de séquences trans ainsi que de séquences désordonnées contenant des liaisons cis et trans ; par contre, à de fortes concentrations en sel, le polymère est sous forme désordonnée comportant des liaisons cis ou trans distribuées au hasard dans la chaîne. Cette interprétation est assez discutée et Bovey et coll. ont utilisé la RMN du carbone-13 pour essayer de résoudre ce problème conformationnel.

3 - Résonance magnétique nucléaire du carbone-13

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que les glissements chimiques des carbones β et γ du noyau pyrrolidine sont de bonnes sondes pour

Attribution	Polyproline I	Polyproline II
C α	60,9	59,5
C β	31,8	28,9
C γ	23,2	25,5
C δ	48,6	48,6
Co	172,7	172,7

Les valeurs sont exprimées en ppm par rapport au TMS

Tableau 26 - Glissements chimiques de la polyproline en RMN du carbone-13 (d'après Bovey (149))

déterminer la configuration cis ou trans de la liaison peptidique X-Pro. Dans le tableau 26 sont reportées les valeurs pour la polyproline et l'on voit qu'effectivement les différences de glissements chimiques des carbones β et γ sont suffisantes pour être utilisées comme indicateurs de la configuration de la liaison peptidique.

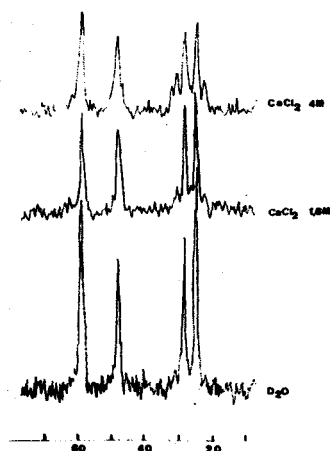


Figure 34 - Spectre RMN du carbone-13 de la polyproline II en fonction de la concentration en CaCl_2 (d'après Bovey (150))

L'influence du chlorure de calcium sur la conformation de la polyproline a été étudiée par Bovey et coll. en RMN du carbone-13 (150) et les spectres obtenus sont reproduits sur la figure 34 (le spectre final est similaire que l'on parte de polyproline I ou de polyproline II). Partant de la polyproline II, on voit que les intensités relatives des pics C β et C γ cis augmentent lorsque la concentration en chlorure de calcium augmente ; on observe également un élargissement des raies dû vraisemblablement à l'augmentation de la viscosité de la solution par addition de

sel. Ces résultats ont amené Bovey et coll. à confirmer leur hypothèse, à savoir que la polyproline adopte une conformation totalement désordonnée lorsqu'elle est dans l'eau contenant de fortes quantités de sel. Comme l'écrivent ces auteurs eux-mêmes, cette interprétation peut être discutée, car elle implique que les glissements chimiques des carbones correspondants à une séquence cis-trans' ou à une séquence trans-cis' coïncident exactement. Les différentes équipes qui se sont penchées sur le problème de la conformation de la polyproline en présence de sels n'ont jusqu'ici pas pu apporter de solution définitive et incontestée à cette question.

B - Dichroïsme circulaire de polypeptides contenant des résidus glycyle et prolyle

Nous proposons dans ce travail d'étudier la conformation des polypeptides séquentiels $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$ et $H-[Gly-(Pro)_4]_n-OH$, nous allons d'abord présenter les résultats publiés par d'autres auteurs sur des polypeptides séquentiels contenant des résidus glycyle et prolyle avant de présenter nos résultats.

1 - Études publiées antérieurement

Nous ne parlerons pas ici des résultats obtenus pour $H-[Gly-(Pro)_2]_n-OH$ qui a été beaucoup étudié en tant que modèle du collagène : nos polypeptides ne contenant pas un résidu glycyle tous les trois résidus, nous ne nous attendons pas à obtenir une structure voisine du collagène.

Par contre nous mentionnerons les études faites par Mandelkern et coll. sur $H-[Pro-Gly]_n-OH$ et $H-[Gly-Gly-Pro-Gly]_n-OH$ (151). Ils ont étudié ces polypeptides en dichroïsme circulaire dans plusieurs solvants (mélange 2 : 1 en volumes éthylène glycol-eau ; trifluoroéthanol) et en fonction de la température. Dans tous les cas, ces dérivés présentent un dichroïsme circulaire négatif avec un minimum situé vers 204 nm. Ces spectres ne peuvent être reconstitués à partir d'une seule courbe gaussienne négative ; il est nécessaire d'en utiliser au moins deux, dont l'une, négative, de forte intensité, centrée vers 200 nm. Pour la seconde gaussienne, Mandelkern et coll. sont arrivés à de bonnes simulations en utilisant soit une bande négative centrée aux alentours de 200 nm également et ayant une très grande largeur de bande, soit une bande positive décalée légèrement vers le rouge par rapport à la bande à 200 nm, soit une faible bande négative centrée à des longueurs d'onde correspondant à la bande positive nécessaire pour reconstituer les spectres dichroïques de $H-[Hyp-Gly]_n-OH$ et de $H-[Gly-Gly-Hyp-Gly]_n-OH$, ces copolypeptides ayant été étudiés simultanément par les mêmes auteurs. D'après cette étude de dichroïsme circulaire ainsi que des mesures de viscosité des polymères, Mandelkern et coll. concluent que $H-[Pro-Gly]_n-OH$ et $H-[Gly-Gly-Pro-Gly]_n-OH$ adoptent des structures statistiques en solution. Ces résultats ont été repris récemment par Sasisekharan

et coll. (152) qui, par calcul, ont montré que des conformations hélicoïdales étaient énergétiquement possibles pour ces polymères, ces structures étant stabilisées par des liaisons hydrogène intracaténaïres impliquant tous les groupements NH des squelettes polypeptidiques.

Quant au spectre dichroïque de la PRP, protéine pour laquelle nous avons synthétisé nos polypeptides en tant que modèles, il a été publié récemment par Aubert et coll. (5). A température ambiante en solution aqueuse, cette protéine présente un dichroïsme circulaire négatif. Par simulation, ces auteurs ont évalué que ce spectre correspondait à un mélange de plusieurs conformations, à savoir 64 % de structure en polyproline II, 29 % de coudes β et 7 % de structure désordonnée.

Au cours de ce même travail, Aubert et coll. ont également étudié l'influence du chlorure de calcium sur la conformation de la protéine et leurs résultats semblent prouver l'existence d'une structure en polyproline II dans la PRP.

2 - Étude de nos polymères

Les spectres dichroïques de nos polymères ont été enregistrés sur un dichrographe Jobin-Yvon R.J. Mark III. Nous avons travaillé à température ambiante en solution aqueuse avec une cuve d'épaisseur 0,01 cm. Les concentrations des solutions étaient de 0,254 g/l pour $H-[Gly-(Pro)_4]_n-OH$ et 0,99 g/l pour $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$.

De même que la PRP, nos polymères en solution aqueuse présentent un dichroïsme circulaire négatif. Sur la figure 35 sont représentés les spectres obtenus ainsi que celui de la PRP et celui de la polyproline II (PP II). Ces spectres sont assez voisins les uns des autres. Cependant, la bande positive située à 227 nm et caractéristique de la structure en polyproline II n'apparaît ni dans le spectre de la PRP, ni dans celui de nos polymères ; ceci nous suggère deux hypothèses : soit nos polymères contiennent une structure en polyproline II ainsi qu'une ou plusieurs autres structures présentant un dichroïsme négatif vers 220 - 230 nm ; soit nos polymères ne contiennent pas de structure en polyproline II. La résonance magnétique nucléaire nous sera d'une aide certaine pour résoudre cette ambiguïté. Une autre différence entre le spectre de la polyproline II et ceux de la PRP ou de nos polymères réside dans un déplacement vers le bleu des minima d'absorption : alors que le minimum est situé à 206 nm pour la polyproline, il est à 204 nm pour la PRP et il se situe vers 202 - 203 nm pour les polymères synthétiques. Ce déplacement est aisément explicable par l'existence d'autres conformations à côté d'une structure en polyproline II pour la PRP et les polypeptides.

Le chlorure de calcium étant connu comme un dérivé induisant un changement de conformation de la polyproline II (146, 147), Aubert et coll. (5) ont étudié l'influence de ce sel sur le spectre dichroïque de la PRP et nous avons fait de même (153) sur $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$ et $H-[Gly-(Pro)_4]_n-OH$. Les résultats obtenus

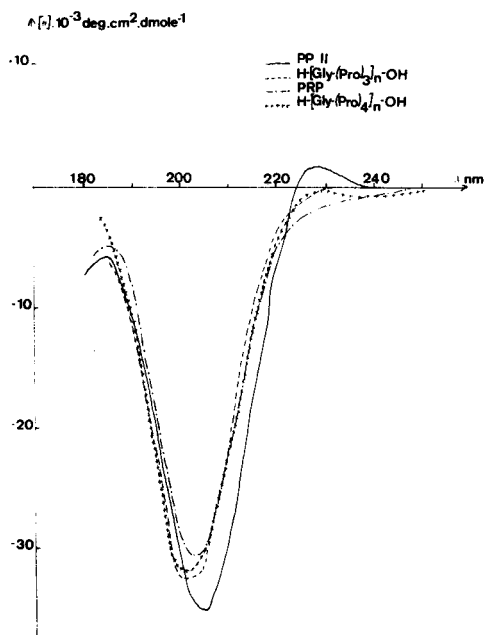


Figure 35 - Spectres dichroïques de la polyproline II, de la PRP et de nos polymères

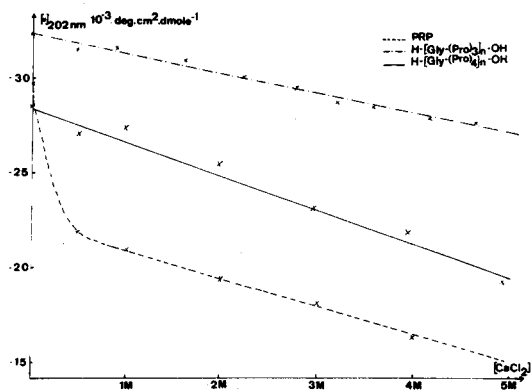


Figure 36 - Variation de l'ellipticité à 202 nm en fonction de la concentration en CaCl_2
Cas de la PRP et de nos polymères synthétiques



sont reportés sur la figure 36 sous forme de variation de l'ellipticité à 202 nm en fonction de la quantité de chlorure de calcium ajoutée. En effet à de fortes concentrations ce sel n'est pas suffisamment transparent pour permettre des mesures à des longueurs d'onde inférieures à 200 nm. Krimm et coll. (145) ayant montré que l'addition de ce sel à une solution aqueuse de polyproline conduit à un spectre dichroïque présentant un minimum à 205 ± 2 nm, le mode de représentation adopté figure 36 doit permettre de suivre l'évolution de la conformation en polyproline II. On voit que l'évolution de $[\theta]_{202}$ dans le cas de nos polymères est parallèle à ce qui avait été observé par Aubert et coll. dans le cas de la PRP, ce qui nous amène à conclure avec eux à l'existence d'une structure en polyproline II aussi bien dans $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ que dans $\text{H-[Gly-(Pro)}_4\text{]}_n\text{-OH}$. Il nous faut maintenant confirmer par d'autres techniques l'existence de cette conformation ainsi qu'essayer de déterminer quels autres types de structures peuvent être à l'origine du dichroïsme circulaire négatif observé pour nos polymères. C'est ce que nous avons tenté de faire par RMN du proton et du carbone-13.

C - Résonance magnétique nucléaire du proton de polypeptides contenant des résidus glycyle et prolyle

1 - Études publiées antérieurement

Torchia (154) a voulu étudier par RMN du proton à haut champ les polymères étudiés en dichroïsme circulaire par Mandelkern et coll. (151), à savoir $\text{H-[Pro-Gly]}_n\text{-OH}$ et $\text{H-[Gly-Gly-Pro-Gly]}_n\text{-OH}$. Il est arrivé à la même conclusion : ces polypeptides séquentiels adoptent une conformation désordonnée aussi bien dans l'eau que dans le diméthylsulfoxyde. Les spectres qu'il a obtenus présentent des raies dont la largeur est comparable à celle obtenue dans le cas d'oligopeptides, ce qui a conduit Torchia à dire que ces chaînes polypeptidiques sont très mobiles en solution aqueuse (mouvement par segments). D'autre part, il a mis en évidence des massifs de résonance des protons α correspondant respectivement aux formes cis et trans de la liaison X-Pro.

Un autre travail publié en 1973 a été consacré à un polypeptide séquentiel contenant de la glycine et de la proline, à savoir $\text{H-(Pro-Pro-Gly)}_n\text{-OH}$ (110). Bien que ce polymère soit un modèle du collagène, les résultats publiés dans cette étude sont intéressants pour nous, car les auteurs ont mis en évidence les changements se produisant dans le spectre RMN à haut champ en fonction de la longueur de chaîne. Alors que pour $n = 1$ on observe un doublet de doublets AB centré à 3,75 ppm pour les protons α du résidu glycyle ainsi que deux quartets centrés respectivement à 4,7 et 4,5 ppm pour les protons α des résidus prolyle, pour $n = 2$ les protons α des résidus glycyle résonnent sous forme de deux doublets de doublets AB centrés respectivement à 3,75 et 4,25 ppm tandis qu'on n'observe aucun

changement pour les résidus prolyle. Lorsque la chaîne s'allonge, dans un premier temps on n'observe plus qu'un seul doublet de doublets AB centré à 4,2 ppm pour les résidus glycyle ; puis, pour n supérieur à 10, le pic correspondant aux protons α de la glycine se déplace vers les hauts champs et est alors caché par le massif correspondant aux protons δ des résidus prolyle. Quant aux massifs dus aux protons α Pro, ils se simplifient également quand n augmente pour ne donner qu'un seul quartet centré à 4,8 ppm et correspondant à une forme trans X-Pro.

2 - Nos résultats

Les spectres ont été obtenus sur un appareil Cameca opérant à 250 MHz en transformée de Fourier. Toutes les mesures ont été faites dans D_2O , utilisant le DSS comme référence interne. Les concentrations des solutions étaient de 10 mg/ml et le pH a été ajusté au moyen de solutions diluées de DCl ou de NaOD.

a - PRP

Le spectre RMN obtenu pour cette protéine à son point isoionique est reproduit sur la figure 37, sa composition en acides aminés étant donnée dans le tableau 27. Un spectre de la polyproline II en solution dans D_2O a été enregistré dans les mêmes conditions, ce qui nous amène à faire les attributions indiquées figure 37 et repérées par le symbole PP. Les autres acides aminés existant en grande quantité dans la PRP sont la glycine et les acides aminés dicarboxyliques. Les résonances dues aux résidus glycyle sont vraisemblablement situées dans la zone des massifs des protons δ Pro. Les protons β et γ des résidus glutamyle résonnent en même temps que les protons β et γ des résidus prolyle. Les attributions reportées

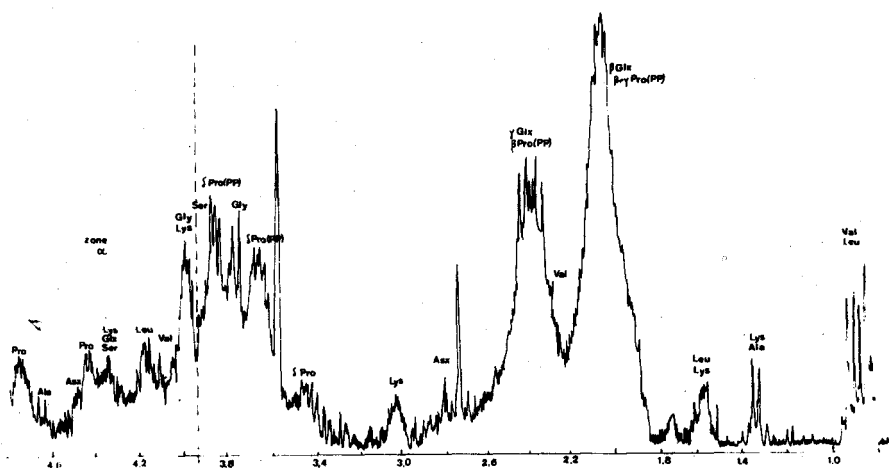


Figure 37 - Spectre en RMN du proton de la PRP à son point isoionique

Acide aminé	Nombre de résidus pour cent résidus	Acide aminé	Nombre de résidus pour cent résidus
Asx	9,50	Met	0
Thr	0,90	Ile	0,82
Ser	6,48	Leu	2,83
Glx	22,43	Tyr	0,53
Pro	26,55	Phe	0,83
Gly	18,37	Lys	3,59
Ala	2,77	His	0,47
Cys	0	Arg	1,17
Val	2,77		

Tableau 27 - Composition en acides aminés de la PRP (d'après Degand (155))

sur le spectre sont faites d'après les valeurs de glissements chimiques publiées par Wüthrich (156) pour les résidus d'acides aminés composants des protéines qui adoptent une structure désordonnée en solution aqueuse. Suivant ces données, nous voyons que le massif situé vers 3,5 ppm correspond à des résonances de protons δ de résidus prolyle, ce qui nous amène à penser que les résidus prolyle composant la PRP adoptent deux types de conformations, l'une en polyproline II, l'autre vraisemblablement désordonnée (104, 157).

S'il est vrai que la PRP contient entre autres une structure en polyproline II, nous devons voir des changements dans le spectre RMN en fonction de

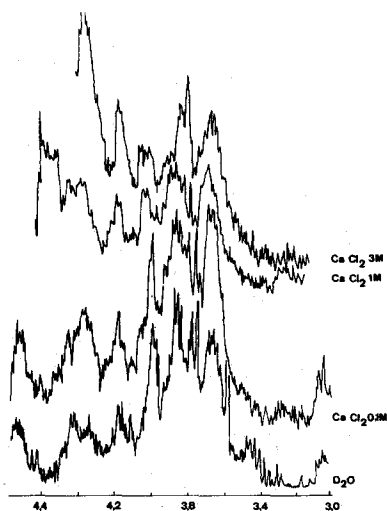


Figure 38 - Spectre RMN du proton de la PRP en fonction de la concentration en CaCl_2

l'addition progressive de chlorure de calcium à la solution (fig. 38). L'addition d'une très faible quantité de CaCl_2 provoque déjà une modification importante du spectre au niveau des protons α avec l'apparition d'un pic vers 4,4 ppm, pic dont l'intensité augmente avec la concentration en chlorure de calcium ; la position de ce pic nous permet de l'attribuer à des résidus prolyle impliqués dans des liaisons X-Pro cis ; si cette hypothèse est exacte, il doit y avoir disparition simultanée d'un pic situé à 4,7 ppm (liaisons X-Pro trans) ; malheureusement cette région n'est pas accessible sur le spectre à cause de la présence d'un pic HDO assez intense. D'autre part, quand la concentration en sel est encore augmentée, on observe une modification des spectres dans la zone 3,6 - 4,0 ppm et en particulier un élargissement des pics comparable à ce qui a été observé dans le cas de la polyproline II (104, fig. 33). Il semblerait donc que la PRP contienne effectivement une structure en polyproline II à côté d'autres conformations difficiles à préciser.

Une autre manière de voir si la PRP adopte une structure secondaire est de comparer le spectre expérimental avec un spectre simulé selon les données de Mac Donald et Phillips (157). Ces auteurs ont rassemblé les valeurs de glissements chimiques, largeurs de bandes et hauteurs de pics pour les protons correspondant à un résidu d'acide aminé adoptant une structure désordonnée dans D_2O ; ils ont omis les protons liés aux carbones α ainsi que ceux situés en position β dans la sérine et la thréonine. Connaissant la composition de la PRP (tableau 27), nous avons pu simuler le spectre qu'elle présenterait si elle était sous forme totalement désordonnée (fig. 39 a et b). Nous voyons que ces spectres ont des allures assez voisines. Deux différences sont à noter : d'une part l'allure des pics situés vers 450 et 500 Hz (2,04 et 2,27 ppm) (si Glx = Glu) ou vers 460 et 515 Hz (2,09 et 2,34 ppm) (si Glx = Gln) est légèrement différente dans le cas du spectre simulé par rapport au spectre expérimental, cette différence pouvant être attribuée à des variations de glissements chimiques pour les protons β et γ Pro ou pour les protons β Glx ;

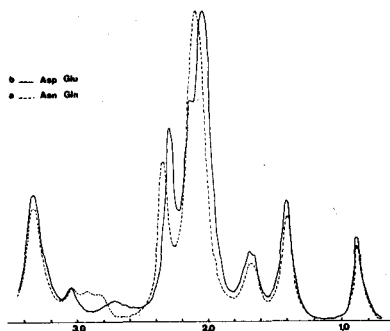


Figure 39 a et b - Spectre simulé de la PRP (selon Mac Donald et Phillips (157))

d'autre part, le pic caractéristique des δ Pro sous forme désordonnée est plus intense et déplacé vers les hauts champs dans le cas du spectre calculé. Toutes ces différences se situent dans des zones relatives aux résidus prolyle, ce qui nous amène à penser qu'une partie de ces résidus est impliquée dans une structure secondaire déterminée.

Ces résultats semblent donc confirmer les conclusions tirées par Aubert et coll. (5) à partir de leur étude en dichroïsme circulaire de la PRP et nous amènent à penser qu'effectivement cette protéine comporte un assez fort pourcentage de structure en polyproline II.

b - $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$

Le spectre obtenu en solution aqueuse est représenté sur la figure 40. Concentrons tout d'abord notre attention sur la zone des protons α . Une grande partie (85 %) des résonances correspondant aux résidus glycyle sont sous forme de doublet de doublets AB centré à 4,08 ppm. Ce massif correspond à une liaison Gly-Pro trans (153, 154) et permet de penser que les résidus glycyle se trouvent dans un environnement bien particulier. La constante de couplage 2J a pour valeur absolue 17,0 Hz ce qui, si l'on se rapporte à la carte établie par Barfield et coll. (111, fig. 16), nous donne une indication quant à la valeur des angles Φ , Ψ possibles pour ces résidus glycyle : on peut avoir, à titre indicatif, les couples de valeurs suivants (-70° , 160°) ou (-80° , 155°), valeurs assez proches de celles observées dans la polyproline II ($\Phi = -77,2^\circ$, $\Psi = 145,9^\circ$ d'après Madison (131)). Cependant la surface du massif correspondant à la liaison Gly-Pro trans est inférieure à la valeur attendue dans le cas où tous les résidus glycyle seraient représentés par ce doublet de doublets (surface normalisée par rapport à la surface des résonances correspondant aux protons β et γ des résidus prolyle). Il en résulte qu'une faible fraction des protons α Gly résonne à une fréquence voisine de la fréquence de résonance des

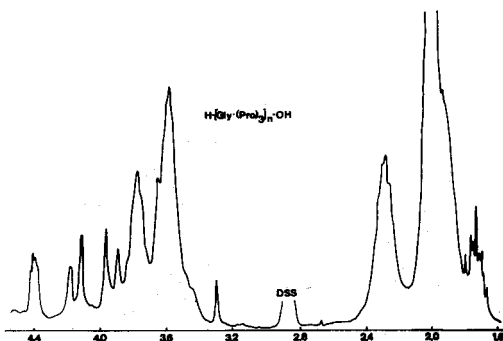


Figure 40 - Spectre RMN du proton de $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$ en solution dans D_2O

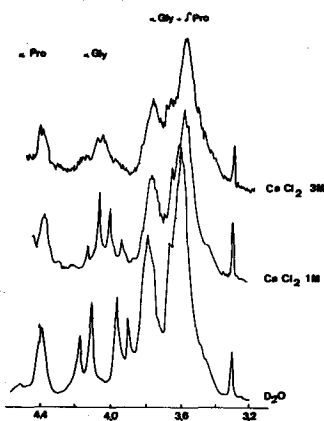


Figure 41 - Spectre RMN du proton de $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$ en fonction de la concentration en $CaCl_2$ (zones αH_2 et δH_2)

protons δ des résidus prolyle et le massif (ou le pic) correspondant est caché.

Considérons maintenant les résidus prolyle : seul un quartet centré à 4,40 ppm est visible et correspond à une forme X-Pro cis (104). Ici aussi la surface de ce massif est inférieure à la valeur attendue dans le cas où tous les résidus prolyle seraient représentés par ce quartet. Le pic HDO cache donc vraisemblablement un quartet X-Pro trans correspondant à un tiers des résidus prolyle. Cependant, le massif correspondant aux résonances des protons δ Pro se présente sous forme de deux bandes assez larges, ce qui rappelle le spectre de la polyproline II et nous amène à penser que $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$ contient un pourcentage assez élevé de forme polyproline II à côté d'autres conformations qu'il nous faudra préciser.

S'il est vrai que notre polymère adopte une conformation en polyproline II, l'addition de chlorure de calcium à la solution doit provoquer des changements importants dans le spectre RMN. Les spectres obtenus sont reportés sur la figure 41. Les différences majeures sont à observer dans la zone des protons α . En particulier le doublet de doublets AB correspondant à des résidus glycyle se rétrécit, la constante de couplage 2J ne variant pas. Il semble que cette modification du spectre soit en bon accord avec une transformation trans $\rightarrow$ structure désordonnée et il serait intéressant de pouvoir suivre cette transition au niveau des protons α correspondant aux résidus prolyle. Malheureusement, lorsque la concentration en $CaCl_2$ augmente, il devient impossible d'observer les résonances dues aux protons α Pro, car celles-ci sont trop proches du pic HDO. Par contre on voit que le massif

des protons δ Pro s'élargit ; en particulier la surface du pic δ situé à haut champ est supérieure à celle du pic δ situé à bas champ, ce qui indique la présence de liaisons cis X-Pro dans la solution (104). Ce que nous observons pour H-[Gly-(Pro)₃]_n-OH est analogue à ce qu'ont observé Torchia et Bovey (104) lors de l'addition de sels à une solution aqueuse de polyproléine, ce qui nous incite à penser qu'effectivement notre polymère contient un assez fort pourcentage de structure en polyproléine II, à côté d'autres conformations.

c - H-[Gly-(Pro)₄]_n-OH

Le spectre obtenu en solution aqueuse est représenté sur la figure 42. Ce spectre est assez similaire à celui obtenu dans le cas précédent. Une grande partie des résidus glycyle (75 %) sont sous forme de massif AB centré à 4,08 ppm. La constante de couplage 2J a pour valeur absolue 16,5 Hz ce qui, aux erreurs expérimentales près et en utilisant la carte établie par Barfield et coll. (111, fig. 16), permet de trouver des valeurs Φ et Ψ pour ces résidus glycyle assez proches de celles observées dans la polyproléine II ($\Phi = -77,2^\circ$, $\Psi = 145,9^\circ$ d'après Madison (131)). Comme dans le cas de H-[Gly-(Pro)₃]_n-OH, il est vraisemblable que les autres protons α Gly résonnent à plus haut champ et que le pic (ou le doublet de doublets AB) correspondant est masqué par le massif des protons δ des résidus prolyle.

En ce qui concerne les résonances des protons α Pro, nous sommes confrontée au même problème que précédemment, à savoir que la majorité de ces résonances sont perturbées par la proximité du massif HDO. Seul un quartet centré à 4,46 ppm est visible. Il est attribuable à une forme X-Pro cis (104), mais ne correspond qu'à un faible pourcentage des protons α Pro (11 % environ). Le massif des protons δ Pro se présente ici aussi sous forme de deux larges bandes, ce qui nous amène à penser que H-[Gly-(Pro)₄]_n-OH contient un fort pourcentage de forme polyproléine II à côté d'autres conformations.

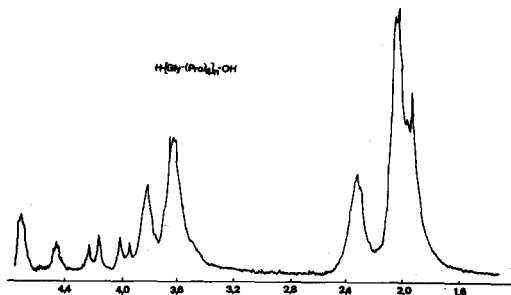


Figure 42 - Spectre RMN du proton de H-[Gly-(Pro)₄]_n-OH en solution dans D₂O

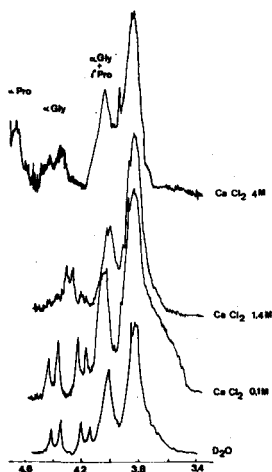


Figure 43 - Spectre RMN du proton de $H-[Gly-(Pro)_4]_n-OH$ en fonction de la concentration en $CaCl_2$ (zones CaH_2 et $C\delta H_2$)

Pour étayer cette hypothèse, nous avons étudié la variation du spectre en fonction de l'addition progressive de chlorure de calcium à la solution (fig. 43). Ici aussi les changements majeurs s'observent dans la zone des protons α . En particulier le doublet de doublets AB relatif aux résidus glycyle se rétrécit, la constante de couplage 2J restant constante. Simultanément, il y a déplacement à bas champ du massif α Pro, ce qui nous empêche d'étudier l'évolution de ces résonances avec l'augmentation de la teneur en sel de la solution. Le massif des protons δ des résidus prolyle s'élargit, ce qui nous amène à penser que, tout comme $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$, $H-[Gly-(Pro)_4]_n-OH$ contient effectivement un assez fort pourcentage de structure en polyproline II à côté d'autres conformations que nous allons essayer de préciser un peu.

D - Résonance magnétique nucléaire du carbone-13 de polypeptides contenant des résidus glycyle et prolyle

1 - Études publiées antérieurement

A notre connaissance, seuls Torchia et coll. (123) ont utilisé la RMN du carbone-13 pour étudier la conformation de copolypeptides séquentiels contenant des résidus glycyle et prolyle. Cette étude a été entreprise dans le but de déterminer l'influence de la flexibilité des cycles pyrrolidine sur la mobilité du squelette polypeptidique. Il s'agit donc essentiellement d'une étude dynamique. Néan-

Attribution	² H-[Pro-Gly] _n -OH (123)	^{1 2 4} H-[Gly-Gly-Pro-Gly] _n -OH (123)	PP I (149)	PP II (149)
γ cis	23,3	23,1	23,2	
γ trans	25,5	25,5		25,5
β trans	30,9	30,5		28,9
β cis	33,1	33,1	31,8	
δ	48,4	48,2	48,6	48,6
α	61,9	62,1	60,9	59,5
α Gly 2	43,1	43,0		
α Gly 1 et Gly 4		43,8		
Co Gly 2	170,5 t 170,9 c	170,6		
Co Gly 1 et Gly 4		173,1		
Co Pro	175,9	176,3	172,7	172,7

Les valeurs sont exprimées en ppm par rapport au TMS.

Mesure expérimentale par rapport à CS₂ (δ = 193,7 ppm par rapport au TMS)

Tableau 28 - Glissements chimiques de polypeptides contenant des résidus glycyle et prolyle en RMN du ¹³C (d'après Torchia (123) et Bovey (149))

moins, ce travail peut nous être d'une grande utilité dans l'interprétation de nos résultats, car Torchia et coll. ont étudié, entre autres polypeptides, la polyproline II, dont la conformation est bien connue, et H-[Gly-Gly-Pro-Gly]_n-OH ainsi que H-[Pro-Gly]_n-OH dont nous avons vu qu'ils semblent adopter une conformation désordonnée en solution (151, 154). Les valeurs de glissements chimiques qu'ils ont obtenues sont reportées dans le tableau 28 et sont comparées aux valeurs données par Bovey (149) pour la polyproline, que ce soit sous forme I ou sous forme II. Ces résultats nous seront utiles pour discuter les conformations probables de nos polymères en solution aqueuse.

2 - Nos résultats

Les manipulations ont été faites sur un spectromètre Perkin-Elmer opérant à 22,63 MHz et muni d'une transformée de Fourier. Nous avons utilisé le TMS en tant que référence externe. Les polymères sont dissous dans D₂O à une concentration de 40 mg/ml.

a - H-[Gly-(Pro)₃]_n-OH

Le spectre de ce polypeptide en solution aqueuse est représenté figure 44. Comparé à la figure obtenue dans le cas de H-Gly-(Pro)₃-OH (fig. 25), nous observons une très grande simplification due vraisemblablement au fait que le polymère adopte une conformation déterminée. A 0,3 ppm près, les glissements chimiques de certains pics correspondent à ceux observés par Bovey (149) dans le cas de la polyproline II, ce qui nous amène à penser qu'un fort pourcentage de H-[Gly-(Pro)₃]_n-OH adopte une conformation en polyproline II.

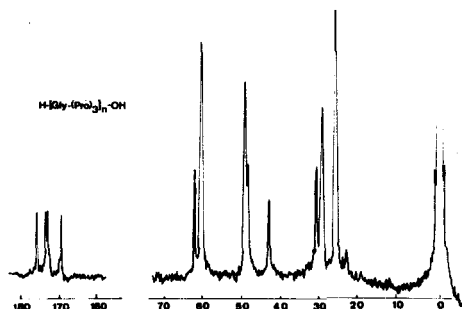


Figure 44 - Spectre RMN du carbone-13 de $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$ en solution dans D_2O

Pour confirmer ce résultat, nous avons étudié la variation du spectre en fonction de l'addition progressive de chlorure de calcium. Ce que nous observons est l'apparition de bandes caractéristiques de formes cis, apparition surtout sensible au niveau des carbones β et γ . Simultanément il y a élargissement des raies, ce qui peut avoir deux origines : d'une part, l'apparition d'une structure désordonnée pour le polymère, d'autre part l'augmentation de la viscosité de la solution. Ces observations qualitatives sont similaires à celles reportées par Bovey et coll. (150) lors d'une étude du même type sur la polyproline II. Les valeurs que nous avons obtenues pour les glissements chimiques pour les différentes solutions sont reportées dans le tableau 29. Nous voyons que, si l'addition de chlorure de calcium détruit effectivement la structure en polyproline II, il n'y a pas pour autant instauration d'une conformation en polyproline I. Il s'agit donc vraisemblablement d'une

Attribution	D_2O	$Ca Cl_2 0,5M$	$Ca Cl_2 1M$	$Ca Cl_2 2M$	$Ca Cl_2 4M$
γ	25,8	25,9	26,0	23,7	24,0
γ	29,3	29,4	29,5	29,8	30,0
β	30,6	30,7	30,8	31,0 et 31,2	31,2
α Gly	42,7	42,8	43,0	43,7	43,7
δ	48,2	48,5	48,6	49,0	
δ	48,9	49,0	49,2	49,3 et 49,5	49,9
α	59,9	60,0	60,2	60,6	61,2
α	61,6	61,7	62,0	62,3	62,5 et 63,7
CO Gly	169,7	169,8	169,9	170,2	170,4
CO Pro	173,0	173,1	173,2	173,4	
CO	173,5	173,6	173,7	173,9	
CO Pro	175,6	175,7	175,8	176,0	176,1

$H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$

Tableau 29 - Glissements chimiques en ^{13}C de $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$ en fonction de la concentration en $CaCl_2$

transition polyproline II $\rightarrow$ structure désordonnée, bien que les glissements chimiques observés pour $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ en milieu CaCl_2 concentré ne correspondent pas aux valeurs observées par Torchia et coll. pour $\text{H-[Pro-Gly]}_n\text{-OH}$ ni pour $\text{H-[Gly-Gly-Pro-Gly]}_n\text{-OH}$. Il est possible que, contrairement à ce qui avait été conclu par Mandelkern et coll. (151) d'après leur étude en dichroïsme circulaire dans des mélanges de solvants, ces polypeptides puissent adopter une conformation privilégiée. En effet, les mesures faites par Torchia et coll. le sont en milieu D_2O et une étude théorique publiée en 1978 (152) a mené à la conclusion que $\text{H-[Pro-Gly]}_n\text{-OH}$ et $\text{H-[Gly-Gly-Pro-Gly]}_n\text{-OH}$ peuvent adopter des conformations hélicoïdales stabilisées par des liaisons hydrogène intracaténaïres, liaisons impliquant tous les NH libres. On peut penser que ces polypeptides adoptent ce type de conformation dans D_2O ; dans ce cas, les valeurs de glissements chimiques observées par Torchia et coll. ne correspondent pas à une structure désordonnée.

D'autre part, l'application de la loi établie par Siemion et coll. (119) à notre polymère nous amène à assigner une configuration *trans*' pour les résidus prolyle impliqués dans la structure en polyproline II, tandis que la valeur de Ψ obtenue par application de cette relation est en accord avec une configuration *cis*' pour les résidus prolyle n'appartenant pas à la structure en polyproline II. Ce résultat semble exclure la présence de coudes β (tout au moins de coudes β du type II) comme une des conformations probables pour $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ à côté de la forme polyproline II. En effet, un tel coude β est caractérisé par $\Phi_2, \Psi_2, \Phi_3, \Psi_3$ ayant pour valeurs respectives $-60^\circ, 130^\circ, 80^\circ$ et 0° (158). La proline ayant un angle Φ de l'ordre de -65° à -75° selon la configuration prise par le noyau, elle devrait occuper la deuxième position dans le coude β , ce qui implique Ψ voisin de 130° , donc *trans*' ; à cette valeur de Ψ correspond $\Delta\delta = 3,25$ ppm soit $\delta = 29,05$ ppm pour le proton β Pro. Les bandes de résonance observées sur le spectre sont assez larges et il est possible que le pic β situé à 29,3 ppm corresponde non seulement à des résidus prolyle en conformation polyproline II, mais aussi à des résidus prolyle en conformation coude β . Ceci ne constitue cependant qu'une hypothèse, car la probabilité qu'une séquence Gly-Pro-Pro-Pro ou Pro-Pro-Gly-Pro ou encore Pro-Pro-Pro-Gly soit un coude β est faible. Il semble donc que $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ adopte une structure en polyproline II en grande partie, le reste de la molécule étant éventuellement constitué de coudes β en faible quantité ou adoptant plus vraisemblablement une structure désordonnée.

b - $\text{H-[Gly-(Pro)}_4\text{]}_n\text{-OH}$

Le spectre de ce polypeptide en solution aqueuse est représenté figure 45. Contrairement au cas précédent, ce spectre ressemble à celui du peptide correspondant (fig. 26). Cependant, les bandes obtenues sont plus larges que pour le peptide et ces constatations nous amènent à penser que le polypeptide étudié ici adopte un mélange de conformations lorsqu'il est en solution aqueuse. Un écart

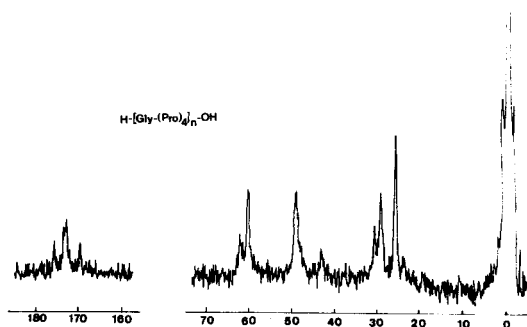


Figure 45 - Spectre RMN du carbone-13 de $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$ en solution dans D_2O

moyen de 0,5 ppm est observé entre les valeurs des glissements chimiques de certains pics et celles observées par Bovey (149) dans le cas de la polyproline II. Cet écart étant constant quel que soit le pic considéré, nous pensons qu'une structure en polyproline II est adoptée par une partie de la chaîne polypeptidique, mais que son environnement est différent, ce qui cause cette différence de glissements chimiques.

Pour confirmer ce résultat, nous avons étudié ici aussi la variation du spectre en fonction de l'addition progressive de chlorure de calcium. Ce que nous observons essentiellement est un élargissement des raies, élargissement très sensible surtout au niveau des résidus glycyle ; ce phénomène peut avoir deux origines : d'une part, une plus grande mobilité de la chaîne polypeptidique (apparition d'une structure inordonnée), d'autre part, l'augmentation de la viscosité de la solution. Simultanément, il y a apparition de bandes caractéristiques de formes cis, apparition surtout sensible au niveau des carbones β et γ . Si on calcule le pourcentage d'isomères cis à partir des hauteurs des pics γ cis et trans (ce qui n'est pas correct, car il faudrait pouvoir intégrer les surfaces des pics), on obtient 12 % pour le polymère en solution aqueuse et 32 % s'il est en présence de $CaCl_2$ 4 M (on avait 8 % et 25 % respectivement pour $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$). Ces observations sont similaires à celles reportées par Bovey et coll. (150) lors d'une étude du même type sur la polyproline II. Les valeurs que nous avons obtenues pour les glissements chimiques pour les différentes solutions sont reportées dans le tableau 30. Ici non plus l'addition de chlorure de calcium n'amène pas l'instauration d'une structure en polyproline I. De plus les valeurs de glissements chimiques ne varient pas autant que pour l'autre polymère synthétique, ce qui nous incite à penser que $H-[Gly-(Pro)_4]_n-OH$ adopte une structure plus voisine de la polyproline II que $H-[Gly-(Pro)_3]_n-OH$. En effet, l'évolution du spectre en fonction de l'addition de chlorure de calcium est similaire à ce qu'avaient observé Bovey et coll. (150, fig. 34) dans le cas de la polyproline II, à savoir pas ou peu de variation des positions des bandes, mais simplement apparition de pics correspondant à des liaisons Pro-Pro cis. Cette conformation n'est cependant pas la seule adoptée par le polypeptide synthétique, car les

Attribution	D ₂ O	CaCl ₂ 0,1M	CaCl ₂ 1M	CaCl ₂ 2M	CaCl ₂ 4M
γ	24,2			23,2	23,5
γ	26,0	26,1	25,9	26,1	26,4
β	29,5	29,4	29,4 et 29,3	29,6 et 29,7	29,8
β	30,8		30,9	30,7	
α Gly	43,2	42,8	43,3	42,6	43,2
δ	48,2				
δ	49,1	49,0	49,1	49,3	49,2
α	59,5	59,8			
α	60,1	60,0	60,0	60,2	60,1
α	61,9		61,8	61,9	62,2
CO Gly	169,8	169,8	169,7	169,8	170,2
CO Pro	173,1	173,2	173,1	173,2	173,0
CO	173,7	173,4	173,7	173,6	173,4
CO Pro	176,8	176,0	175,9	175,8	175,9

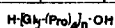


Tableau 30 - Glissements chimiques en ^{13}C de $H-[Gly-(Pro)_n]-OH$ en fonction de la concentration en $CaCl_2$ différents atomes du cycle prolyle donnent naissance à deux bandes de résonance (tableau 30). Il nous est cependant assez difficile de définir l'autre (ou les autres) conformation (s) en présence. Si nous ne pouvons pas exclure totalement la présence de coudes β , leur existence nous semble cependant assez improbable comme nous l'avons discuté dans le paragraphe précédent et nous pensons plutôt que $H-[Gly-(Pro)_n]-OH$ adopte, à côté d'une structure en polyproline II, une conformation désordonnée.

E - Conclusion

Avant d'essayer de déterminer les conformations les plus probables adoptées par les polymères synthétiques étudiés dans ce travail, nous résumerons le plus brièvement possible les travaux menés par Bennick sur des protéines assez voisines de celle prise pour modèle ici.

1 - Études publiées par Bennick

Plusieurs équipes dans le monde s'intéressent aux protéines riches en proline contenues dans la salive parotidienne humaine. Il semble que quatre protéines (ou glycoprotéines) aient pu être purifiées jusqu'ici et Bennick est le premier qui ait publié un début d'étude physico-chimique sur deux d'entre elles qu'il a appelé la protéine A (159) et la protéine C (160), protéines dont la composition en acides aminés est donnée dans le tableau 31. Il s'agit de deux phosphoprotéines assez proches l'une de l'autre semble-t-il. Leurs spectres dichroïques en solution aqueuse sont représentés sur la figure 46. La protéine A présente une bande négative à 267 nm ainsi qu'un faible épaulement à 260 nm, ces deux bandes étant attri-

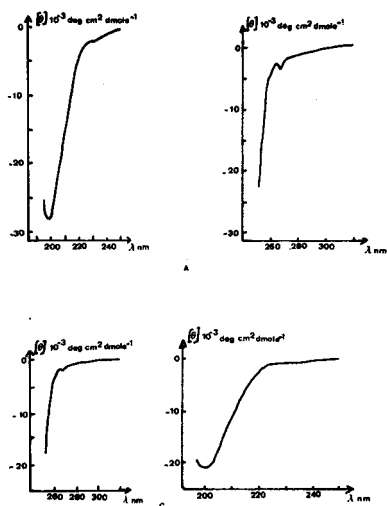


Figure 46 - Spectres dichroïques en solution aqueuse des protéines A et C (d'après Bennick (159, 160))

Acide aminé	Protéine A	Protéine C	Acide aminé	Protéine A	Protéine C
Asx	10,3	7,57	Met	0	0
Thr	0	0	Ile	1,6	1,03
Ser	4,3	3,78	Leu	3,0	2,01
Glx	27,2	27,4	Tyr	0	0
Pro	23,6	26,9	Phe	0,95	0,67
Gly	18,9	21,1	Lys	0,96	1,42
Ala	1,07	0,82	His	1,9	1,94
Cys	0	0	Arg	3,8	3,57
Val	2,5	1,74			

Les résultats sont exprimés en nombre de résidus pour cent résidus d'acides aminés.

Tableau 31 - Composition en acides aminés des protéines A et C (d'après Bennick (159, 160))

buables à des résidus phénylalanine ; le spectre présente encore un minimum à 198 nm d'ellipticité $[\theta] = -28\,000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmole}^{-1}$. Bennick en conclut que sa protéine en solution aqueuse n'adopte pas de conformation particulière, bien que la bande à 198 nm rappelle celle observée dans le cas d'une structure en polyproline II ou du type collagène ; cependant, le spectre obtenu ne présente pas de bande positive à 222 nm (présente dans le cas d'une structure du type collagène), ni à 227 nm (présente dans le cas d'une structure en polyproline II), ce qui peut justifier la conclusion de Bennick. Le spectre dichroïque de la protéine C présente quelques

analogies avec celui de la protéine A. L'épaulement à 260 nm a disparu et seule reste la bande à 267 nm, caractéristique des résidus phénylalanine ; cela est normal, car la protéine C ne contient qu'un Phe pour 152 résidus. Le minimum est situé ici à 200 nm et l'ellipticité a pour valeur $-21\,000 \text{ deg.cm}^2.\text{dmole}^{-1}$. Bennick en conclut que la protéine C n'adopte pas non plus de conformation particulière en solution aqueuse. Ces conclusions sont cependant discutables, car l'absence d'une bande positive vers 222 ou 227 nm ne suffit pas à prouver qu'une structure organisée n'existe pas. En effet, il se peut que d'autres structures apportent une contribution négative au spectre dichroïque dans ces régions. Pour notre part, nous pensons que ces deux protéines, aussi bien la protéine A que la protéine C, adoptent entre autres structures une conformation en polyproline II ; pour mettre en évidence cette structure, il aurait fallu que Bennick suive l'évolution de ses spectres dichroïques lors de l'addition de chlorure de calcium.

Cet auteur a également étudié la conformation des protéines A et C par RMN du proton. Les spectres qu'il a obtenus en travaillant en solution aqueuse et à haut champ (220 MHz) sont représentés sur les figures 47 et 48 ainsi que les spectres théoriques correspondants, calculés selon la méthode préconisée par Mac Donald et Phillips (157). Dans les deux cas, il y a une assez bonne concordance entre spectres enregistrés et calculés. Les différences se situent d'une part au niveau du massif ($\beta + \gamma$) Pro et β Glu (pic vers 445 Hz, soit 2,02 ppm), ceci pouvant être dû d'après Bennick à une variation des positions des résonances de ces différents atomes, d'autre part au niveau du massif δ Pro, protons pour lesquels aucun signal n'apparaît à 725 Hz (3,29 ppm) contrairement aux prédictions de Mac Donald et Phillips ; il semble que ces protons résonnent à 798 Hz (3,63 ppm) dans le cas de la protéine A et à 791 Hz (3,60 ppm) pour la protéine C. Or Deber et coll. (51) ont montré que ces protons résonnent à 705 et 741 Hz (3,20 et 3,27 ppm) pour la polyproline, que ce soit sous forme I ou sous forme II, et Kobayashi et coll. (110) ont

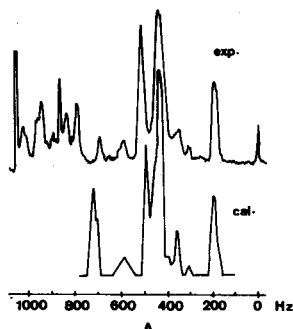


Figure 47 - Spectre RMN du proton de la protéine A (d'après Bennick (159))

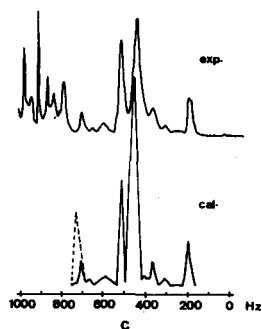


Figure 48 - Spectre RMN du proton de la protéine C (d'après Bennick (160))

montré que le spectre de $\text{H-(Pro-Pro-Gly)}_{10}\text{-OH}$, polymère adoptant une structure en triple hélice, est caractérisé par un pic à 850 Hz (3,86 ppm) correspondant aux résidus glycyle ainsi que deux pics à 700 et 780 Hz (3,18 et 3,55 ppm) attribuables aux protons δ des résidus prolyle. S'il est vrai que les spectres RMN des protéines A et C présentent des pics d'absorption dans ces régions, leurs courbes de dichroïsme circulaire ont amené Bennick à conclure que ces deux protéines adoptent des structures désordonnées en solution. A notre avis, cette étude est insuffisante pour pouvoir conclure que les protéines A et C adoptent une structure inordonnée en solution. Nous pensons au contraire que ces protéines existent sous forme d'un mélange de conformations, dont une structure en polyproline II. Pour le montrer, il aurait fallu que Bennick étudie la variation du spectre dichroïque et du spectre RMN en fonction de l'addition de chlorure de calcium, ce sel étant connu pour induire une transition polyproline $\rightarrow$ structure désordonnée (145).

2 - Études sur nos produits

a - $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$

La courbe de dichroïsme circulaire présentée par ce polymère en solution aqueuse ressemble beaucoup à celle obtenue par Aubert et coll. pour la PRP, ce qui nous amène à penser que ce polymère contient une structure en polyproline II à côté d'autres conformations. De même la variation de $[\theta]_{202}$ en fonction de la concentration en chlorure de calcium de la solution a une allure similaire à celle observée dans le cas de la PRP, ce qui est également en faveur d'une conformation en polyproline II. Mais si les courbes dichroïques de $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ et de la PRP ne présentent pas de bande positive à 227 nm, par contre leurs minima respectifs ne sont pas situés rigoureusement à la même longueur d'onde (204 nm pour la protéine, 202 nm pour le polymère synthétique) ; aussi n'est-il pas improbable que les conformations de ces molécules ne soient pas tout à fait identiques.

L'étude par RMN du proton de $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ est aussi en faveur de l'existence d'une conformation en polyproline II ; mais le spectre obtenu ne nous donne aucune indication quant aux autres conformations présentes pour cette molécule en solution aqueuse.

C'est l'étude par RMN du carbone-13 qui nous donne les renseignements les plus précis. En effet, le spectre obtenu et son évolution lors de l'addition de chlorure de calcium à la solution nous permettent d'affirmer que ce polymère synthétique contient un fort pourcentage de structure en polyproline II (80 à 85 %). Il se peut que cette molécule contienne un faible pourcentage de coudes β quoique ceux-ci n'aient pas pu être mis en évidence expérimentalement et que la probabilité d'existence d'une telle structure dans le polypeptide soit faible. Il est vraisemblable que le reste de la molécule adopte une structure désordonnée en solution aqueuse.

b - $\text{H-[Gly-(Pro)}_4\text{]}_n\text{-OH}$

Le peptide $\text{H-Gly-(Pro)}_4\text{-OH}$ présentant déjà une structure ordonnée du type polyproline II, on pourrait s'attendre à ce que le polymère en solution aqueuse adopte le même type de conformation.

Or le spectre dichroïque obtenu ne présente pas de bande positive à 227 nm, mais il est assez voisin de celui observé dans le cas de $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ et de la PRP. De plus l'évolution de $[\theta]_{202}$ en fonction de la concentration en chlorure de calcium de la solution est similaire à celle observée pour ces deux autres dérivés, ce qui nous amène à penser que le polymère étudié adopte une structure en polyproline II, mais que d'autres conformations existent simultanément. Le minimum observé est situé à 202 nm comme pour $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$.

Le spectre obtenu en RMN du proton est tout à fait similaire à celui obtenu pour l'autre polymère synthétique et son évolution en fonction de l'addition progressive de chlorure de calcium à la solution entraîne aussi la coalescence du doublet de doublets AB des protons α Gly, ce qui nous amène à conclure à la destruction d'une structure ordonnée par l'addition de sels. Il est vraisemblable, vu l'évolution des pics β des résidus prolyle, que cette structure ordonnée est du type polyproline II.

Comme dans le cas précédent, c'est l'étude par RMN du carbone-13 qui nous donne les renseignements les plus précis. Les valeurs des glissements chimiques observées pour le polymère en solution aqueuse sont ici aussi en faveur d'une conformation en polyproline II, bien que l'évolution du spectre en fonction de l'addition de chlorure de calcium soit différente de celle observée dans le cas précédent. Il nous semble que ce polymère adopte une structure beaucoup plus proche

de celle de la polyproline II que $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$. Cette conformation n'est pas la seule existant et elle est peut-être en équilibre avec un très faible pourcentage de coudes β (ce qui paraît cependant assez improbable théoriquement et que nous n'avons pu mettre en évidence expérimentalement). Il est par contre très vraisemblable que le reste de la molécule adopte une structure désordonnée en solution aqueuse.

c - PRP

Cette protéine, isolée par Degand et coll. (155) a une composition légèrement différente de celles des protéines A et C isolées et étudiées par Bennick (159, 160), ces différences étant surtout sensibles au niveau des acides aminés basiques.

Le spectre dichroïque de la PRP, publié par Aubert et coll. (5), est différent de ceux obtenus par Bennick. En effet, si toutes ces courbes présentent un dichroïsme négatif dans la région 180 - 250 nm, le minimum est situé à 204 nm pour la PRP, alors qu'il se trouve à 198 nm pour la protéine A et à 200 nm pour la protéine C. Cette étude avait amené Aubert et coll. à conclure à un mélange de structures pour la PRP en solution aqueuse, dont une forme en polyproline II. En effet, le fait de ne pas observer de bande positive à 227 nm n'exclut pas la possibilité que la protéine étudiée adopte une conformation en polyproline II à côté d'autres conformations (161). C'est ainsi qu'Aubert et coll. avaient conclu que le spectre obtenu pour la PRP correspondait à 64 % de structure en polyproline II, 29 % de coudes β et 7 % de structure désordonnée.

Pour notre part, nous avons étudié cette protéine par RMN du proton, espérant mettre en évidence par cette technique la présence d'une forme polyproline II. Le spectre obtenu ainsi que sa variation en fonction de la concentration en chlorure de calcium de la solution semblent être en faveur de l'existence d'une structure ordonnée du type polyproline II pour la PRP, d'autres résidus prolyle adoptant une conformation différente si l'on en juge par l'existence du massif à 3,5 ppm attribué à des protons δ des résidus prolyle. Malheureusement la RMN du proton ne nous permet pas de préciser quelle(s) conformation(s) peuvent adopter ces résidus et nous ne disposons pas de suffisamment de matériau pour mener à bien une étude en carbone-13 de cette protéine.

Si l'on compare notre spectre RMN avec ceux publiés par Bennick pour les protéines A et C, nous constatons que ces spectres ont des allures totalement différentes, ce qui nous amène à penser que les protéines étudiées, bien que de compositions relativement proches, sont en fait très différentes. Récemment Bennick et coll. ont publié la séquence de ces protéines A et C (162), séquence dans laquelle on ne trouve pas de motifs Gly-(Pro)_3 ou Gly-(Pro)_4 . D'autre part cette

séquence ne comprend pas non plus d'enchaînements du type -Gly-Asn-Gln-Ser-, alors que Degand et coll. (3) ont montré qu'il y avait glycosylation de leur protéine au niveau de l'asparagine appartenant à cette séquence. Nos résultats ne sont donc pas en contradiction avec ceux de Bennick, puisque les protéines étudiées semblent différentes. Par contre ils confirment les conclusions tirées par Aubert et coll. à l'issue de leur étude en dichroïsme circulaire. Ces auteurs avaient proposé l'existence d'une conformation en polyproline II, structure qui semble être adoptée par la PRP d'après les résultats de RMN et qui est vraisemblablement due à des enchaînements du type Gly-(Pro)_n où n = 3 ou 4. Ils avaient proposé également l'existence de coudes β ; ceux-ci n'ont pu être mis en évidence dans notre étude à cause de la complexité du spectre obtenu, mais nous pensons que cette structure existe et est adoptée entre autres par des séquences -Gly-Asn-Gln-Ser-. Enfin Aubert et coll. avaient proposé l'existence d'une structure désordonnée adoptée par le reste de la molécule et nos résultats de RMN semblent le confirmer (massif δ Pro situé à 3,5 ppm, qui est une position donnée par Mac Donald et Phillips (157) dans le cas où les résidus prolyle adoptent une structure inordonnée en solution aqueuse).

Le travail présenté ici n'est qu'un volet d'une collaboration beaucoup plus large entre médecins, physico-chimistes et chimistes. De plus en plus en effet, on s'aperçoit que la fonction biologique d'une protéine ou d'une glycoprotéine est liée de façon très étroite à sa structure et des études conformationnelles permettent d'éclairer sous un jour nouveau le rôle de telle ou telle substance. Mais les protéines sont en général des molécules très complexes ; aussi préfère-t-on synthétiser et étudier des polymères modèles ayant une séquence en acides aminés proche de celle de la protéine naturelle. C'est ainsi que pour la PRP, nous avons étudié $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ et $\text{H-[Gly-(Pro)}_4\text{]}_n\text{-OH}$. Il semble que ces substances synthétiques adoptent des conformations assez voisines, mais que ce ne soit pas d'excellents modèles pour la protéine naturelle. En particulier il semblerait que, alors que d'après Aubert et coll. (5) la PRP contient 29 % de coudes β à côté de 64 % de structure en polyproline II, le reste de la molécule étant sous forme désordonnée, les polymères étudiés dans ce travail adoptent essentiellement des structures polyproline II et désordonnée et peut-être un très faible pourcentage de coudes β . Ce résultat n'est pas trop troublant pour deux raisons. D'une part, l'existence de conformation en polyproline II dans le cas des polypeptides synthétiques était attendue. En effet l'étude physico-chimique des peptides linéaires isolés au cours de ce travail nous a permis de mettre en évidence une structure proche de celle de la polyproline II pour le dérivé $\text{H-Gly-(Pro)}_4\text{-OH}$ en solution aqueuse. Aussi est-il logique que le polymère correspondant adopte une structure en polyproline II. D'autre part, le fait que nous n'ayons pas pu mettre en évidence l'existence de coudes β pour $\text{H-[Gly-(Pro)}_3\text{]}_n\text{-OH}$ ni pour $\text{H-[Gly-(Pro)}_4\text{]}_n\text{-OH}$ tend à confirmer la théorie car, si l'on se réfère à la méthode de Chou et Fasman de prédiction de la structure secondaire d'une chaîne polypeptidique à partir de sa structure primaire (163), on voit que des enchaînements du type Gly-(Pro)_n n'ont qu'une faible probabilité d'adopter une conformation en coudes β ; il est peut-être possible que nos polypeptides synthétiques en contiennent, mais en si faible quantité que nous n'ayons pas pu les mettre en évidence expérimentalement. Par contre, pour la PRP, Degand et coll. (3) ont montré que cette protéine est glycosylée sur le résidu asparagine appartenant à la séquence -Gly-Asn-Gln-Ser- , séquence qui a de grandes chances d'être en coude β . Dans une étape ultérieure, il pourrait donc être intéressant de synthétiser et d'étudier la conformation d'une substance telle que : $\text{H-[(Gly-(Pro)}_3\text{)]}_x\text{-Gly-Asn-Gln-Ser]}_n\text{-OH}$, substance qui devrait, selon toute probabilité, être un meilleur modèle pour la PRP que les dérivés étudiés ici. Une fois ce modèle trouvé, on pourrait alors envisager une étude biologique de façon à voir le rôle que joue cette protéine ou la glycoprotéine apparentée dans la salive. En effet,

ce rôle est encore mal connu. Les auteurs qui se sont penchés sur l'étude de protéines isolées de la salive parotidienne humaine semblent d'accord pour dire que ces molécules ont la capacité de participer à des échanges impliquant le calcium dans la cavité buccale. Il leur semble vraisemblable également qu'elles sont nécessaires dans les processus de minéralisation de l'émail. Mais quel est leur rôle exact ? Pourquoi les chercheurs ont-ils pu isoler des protéines et des glycoprotéines de compositions en acides aminés identiques ? Ces questions restent encore très ouvertes à l'heure actuelle. Si l'on s'en tient aux propriétés chimiques de ces molécules, un fait marquant est leur richesse exceptionnelle en proline. Il est vraisemblable que cet acide aminé est nécessaire pour que la protéine adopte une conformation déterminée assez stable lors de variations de pH ou de force ionique, variations qui peuvent être assez importantes dans la cavité buccale. Beaucoup reste à faire donc dans ce domaine surtout que cette protéine n'est qu'un des multiples composants de la salive.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BENNICK, A. et CONNELL, G.E. (1971) *Biochem. J.* **123**, 455 - 464
- (2) OPPENHEIM, F.G., HAY, D.I. et FRANZBLAU, C. (1971) *Biochemistry* **10**, 4233 - 4238
- (3) DEGAND, P., BOERSMA, A., ROUSSEL, P., RICHET, C. et BISERTE, G. (1975) *FEBS Letters* **54**, 189 - 192
- (4) HAY, D.I. (1973) *Arch. Oral Biol.* **18**, 1517 - 1530
- (5) AUBERT, J.P., BOERSMA, A., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H., DEGAND, P. et BISERTE, G. (1975) *FEBS Letters* **56**, 263 - 267
- (6) BERGMANN, M. et ZERVAS, L. (1932) *Ber. Deut. Chem. Ges.* **65 B**, 1192 - 1201
- (7) SCHOENHEIMER, R. (1926) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **154**, 203
- (8) WEYGAND, F. et CSENDES, E. (1952) *Angew. Chem.* **64**, 136
- (9) Mc KAY, F.C. et ALBERTSON, N.F. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4686 - 4690
- (10) SIEBER, P. et ISELIN, B. (1968) *Helv. Chim. Acta* **51**, 614 - 621, 622 - 632
- (11) ERICKSON, B.W. et MERRIFIELD, R.B. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 3757 - 3763
- (12) GREENSTEIN, J.P. et WINITZ, M. dans « *Chemistry of the Amino Acids* », Vol. II, (Wiley, New York, N.Y., 1961), 924 - 943
- (13) MILLER, H.K. et WAELSCH, H. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1092 - 1093
- (14) ROESKE, R. *Chem. Ind. (London)* **1959**, 1121 - 1122 ; (1963) *J. Org. Chem.* **28**, 1251 - 1253
- (15) HOFMANN, K., MAGEE, M.Z. et LINDENMANN, A. (1950) *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2814 - 2815
- (16) CURTIUS, T. (1902) *Ber. Deut. Chem. Ges.* **35**, 3226
- (17) SIEBER, P., RINKER, B., BRUGGER, M., KAMBER, B. et RITTEL, W. (1970) *Helv. Chim. Acta* **53**, 2135 - 2150
- (18) WIELAND, T. et BERNHARD, H. (1951) *Justus Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 - 194
- (19) ANDERSON, G.W., ZIMMERMAN, J.E. et CALLAHAN, F.M. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5012 - 5017
- (20) IWAKURA, Y., UNO, K., OYA, M. et KATAKAI, R. (1970) *Biopolymers* **9**, 1419 - 1427
- (21) KAMBER, B. (1973) *Helv. Chim. Acta* **56**, 1370 - 1381
- (22) SHEEHAN, J.C. et HESS, G.P. (1955) *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1067 - 1068
- (23) WEYGAND, F., HOFFMANN, D. et WUENSCH, E. (1966) *Z. Naturforsch.* **21 b**, 426 - 428
- (24) KOENIG, W. et GEIGER, R. (1970) *Chem. Ber.* **103**, 788 - 798
- (25) BODANSZKY, M. (1955) *Nature* **175**, 685
- (26) ANDERSON, G.W., ZIMMERMAN, J.E. et CALLAHAN, F.M. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3039
- (27) PLESS, J. et BOISSONNAS, R.A. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**, 1609
- (28) KUPRYSZEWSKI, G. et FORMELA, M. (1961) *Rocz. Chem.* **35**, 1533 - 1536
- (29) BODANSZKY, M., KONDO, M., LIN, C.Y. et SIGLER, G.F. (1974) *J. Org. Chem.* **39**, 444 - 447
- (30) TAKEUCHI, Y. et YAMADA, S.I. (1974) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **22**, 841 - 848
- (31) ITOH, M., NOSMA, H., NOTAMI, J., HAGIWARA, D. et TAKAI, K. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 3089 - 3093
- (32) CASTRO, B., DORMOY, J.R., EVIN, G. et SELVE, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1219 - 1222
- (33) MERRIFIELD, R.B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149 - 2154
- (34) MUTTER, M., UHMANN, R. et BAYER, E. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 901 - 915
- (35) GOEHRING, W. et JUNG, G. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1975**, 1765 - 1775 ; 1776 - 1780 ; 1781 - 1789
- (36) MUTTER, M., MUTTER, H., UHMANN, R. et BAYER, E. (1976) *Biopolymers* **15**, 917 - 927
- (37) TJOENG, F.S., STAINES, W., ST-PIERRE, S. et HODGES, R.S. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **490**, 489 - 496
- (38) BAYER, E. et MUTTER, M. (1974) *Chem. Ber.* **107**, 1344 - 1352
- (39) TJOENG, F.S., TONG, E.K. et HODGES, R.S. (1978) *J. Org. Chem.* **43**, 4190 - 4194
- (40) MEIENHOFER, J. *Chemtech.* **1973**, 242 - 254
- (41) WEYGAND, F., PROX, A., SCHMIDTHAMMER, L. et KOENIG, W. (1963) *Angew. Chem.* **75**, 282 - 287
- (42) GOODMAN, M. et GLASER, C. dans « *Peptides : Chemistry and Biochemistry* », (B. Weinstein ed., Marcel Dekker inc., pub., New York, 1970), 267 - 335
- (43) WUENSCH, E. dans « *Methoden der organischen Chemie* », (E. Wünsch ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1974), **15** (1), 28 - 45

- (44) RAHN, W., ECKSTEIN, H. et KOENIG, W.A. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **357**, 1223 - 1227
- (45) WILLIAMS, A.W. et YOUNG, G.T. J. Chem. Soc. (London), Perkin I, **1972**, 1194 - 1200
- (46) BENOITON, N.L., KURODA, K. et CHEN, F.M.F. 15th European Peptide Symposium (1978), sous presse
- (47) GOODMAN, M. et STUEBEN, K.C. (1962) J. Org. Chem. **27**, 3409 - 3416
- (48) WILLIAMS, A.W. et YOUNG, G.T. J. Chem. Soc. (London) **1964**, 3701 - 3708
- (49) CARTER, H.E. et STEVENS, C.M. (1940) J. Biol. Chem. **133**, 117 - 128
- (50) ROTHE, M., THEYSOHN, R. et STEFFEN, K.D. Tetrahedron Lett. **1970**, 4063 - 4066
- (51) DEBER, C.M., BOVEY, F.A., CARVER, J.P. et BLOUT, E.R. (1970) J. Am. Chem. Soc. **92**, 6191 - 6198
- (52) STEWART, J.M. et YOUNG, J.D. dans «Solid Phase Peptide Synthesis», (Freeman and Co, San Francisco, 1969), 30
- (53) SAVRDA, J. (1977) J. Org. Chem. **42**, 3199 - 3200
- (54) FISCHER, E. (1906) Chem. Ber. **39**, 2893
- (55) JOHNSON, B.J. (1974) J. Pharm. Sci. **63**, 313 - 327
- (56) GOREN, H.J. CRC Crit. Rev. Biochem. **1974**, 197 - 225
- (57) SUTOH, K. et NODA, H. (1974) Biopolymers **13**, 2385 - 2390
- (58) NISSEN, D., GILON, C. et GOODMAN, M. Die makrom. Chemie, Suppl. **1**, **1975**, 23 - 53
- (59) SAKARELLOS-DAITSIOTIS, M., GILON, C., SAKARELLOS, C. et GOODMAN, M. (1976) J. Am. Chem. Soc. **98**, 7105 - 7107
- (60) HARDY, P.M., RYDON, H.N. et THOMSON, R.C. J. Chem. Soc. (London), Perkin I, **1972**, 5 - 12
- (61) STEWART, F.H.C. (1966) Aust. J. Chem. **19**, 2373 - 2380
- (62) BRACK, A. et SPACH, G. Bull. Soc. Chim. Fr. **1971**, 4481 - 4489
- (63) RAPAKA, R.S., BHATNAGAR, R.S. et NITECKI, D.E. (1976) Biopolymers **15**, 317 - 324
- (64) RAPAKA, R.S., BHATNAGAR, R.S. et NITECKI, D.E. (1976) Biopolymers **15**, 1585 - 1590
- (65) KOVACS, J., DAVIS, E.J., JOHNSON, R.H., CORTEGIANO, H. et ROBERTS, J. dans «Chemistry and Biology of Peptides», (J. Meienhofer ed., Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich., 1972), 359 - 364
- (66) SAKARELLOS-DAITSIOTIS, M., GILON, C., SAKARELLOS, C. et GOODMAN, M. (1977) Biopolymers **16**, 2507 - 2520
- (67) KENDREW, J.C. et coll. (1970) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Eur. J. Biochem. **17**, 193 - 201
- (68) RAMACHANDRAN, G.N. et SASISEKHARAN, V. dans «Advances in Protein Chemistry», (C.B. Anfinsen ed., Academic Press Publ., New York, N.Y., 1968) **23**, 283 - 438
- (69) COREY, R.B. et PAULING, L. (1953) Proc. Roy. Soc. London **B 141**, 10 - 20
- (70) DEBER, C.M., BOVEY, F.A., CARVER, J.P. et BLOUT, E.R. dans «Peptides 1969», (E. Scoffone ed., North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1971), 189 - 199
- (71) LA PLANCHE, L.A. et ROGERS, M.T. (1964) J. Am. Chem. Soc. **86**, 337 - 341
- (72) WUETHRICH, K. et GRATHWOHL, Ch. (1974) FEBS Letters **43**, 337 - 340
- (73) WINKLER, F.K. et DUNITZ, J.D. (1971) J. Mol. Biol. **59**, 169 - 182
- (74) RAMACHANDRAN, G.N. dans «Peptides, Polypeptides and Proteins», (E.R. Blout, F.A. Bovey, M. Goodman, N. Lotan ed., John Wiley and Sons Pub., New York, 1974), 14 - 34
- (75) ZIMMERMAN, S.S. et SCHERAGA, H.A. (1976) Macromolecules **9**, 408 - 416
- (76) OKABAYASHI, H., ISEMURA, T. et SAKAKIBARA, S. (1968) Biopolymers **6**, 323 - 330
- (77) ROTHE, M., THEYSOHN, R., STEFFEN, K.D., KOSTRZEWA, M. et ZAMANI, M. dans «Peptides 1969», (E. Scoffone ed., North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1971), 179 - 188
- (78) ROTHE, M., ROTT, M. et MAZANEK, J. dans «Peptides 1976», (A. Loffet ed., Editions de l'Université de Bruxelles, Bruxelles, 1976), 309 - 318
- (79) NIELSEN, E.B. et SCHELLMAN, J.A. (1967) J. Phys. Chem. **71**, 2297 - 2304
- (80) ROSENFELD, V.L. (1928) Z. Phys. **52**, 161 - 174
- (81) CONDON, E.V., ALTAR, W. et EYRING, H. (1937) J. Chem. Phys. **5**, 753 - 775
- (82) KIRKWOOD, J.G. (1937) J. Chem. Phys. **5**, 479 - 491
- (83) KAUFMANN, W.J., WALTER, J.E. et EYRING, H. (1940) Chem. Rev. **26**, 339 - 407
- (84) PYSH, E.S. (1966) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **56**, 825 - 832
- (85) RONISH, E.W. et KRIMM, S. (1974) Biopolymers **13**, 1635 - 1651

- (86) MADISON, V. et SCHELLMAN, J.A. (1970) *Biopolymers* **9**, 511 - 567
- (87) WUETHRICH, K. dans «NMR in Biological Research : Peptides and Proteins», North-Holland Pub. Comp., Amsterdam, Oxford, 1976
- (88) TAKEDA, M. et JARDETZKY, O. (1957) *J. Chem. Phys.* **26**, 1346
- (89) SHEINBLATT, M. et RAHAMIM, Y. (1976) *Biopolymers* **15**, 1643 - 1653
- (90) ANTEUNIS, M. et GELAN, J. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 6502 - 6504
- (91) KARPLUS, M. (1959) *J. Chem. Phys.* **30**, 11 - 15
- (92) BYSTROV, V.F., PORTNOVA, S.L., TSETLIN, V.I., IVANOV, V.T. et OVCHINNIKOV, Yu. A. (1969) *Tetrahedron* **25**, 493 - 515
- (93) LAUTERBUR, P.C. (1970) *Appl. Spectrosc.* **24**, 450 - 452
- (94) POPL, J.A., SCHNEIDER, W.G. et BERNSTEIN, H.J. dans «High Resolution Nuclear Magnetic Resonance», (Mc Graw-Hill Book Co, New York, 1959)
- (95) SHEINBLATT, M. et GUTOWSKY, H.S. (1964) *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 4814 - 4820
- (96) MORLINO, V.J. et MARTIN, R.B. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 3107 - 3111
- (97) NAKAMURA, A. et JARDETZKY, O. (1967) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **58**, 2212 - 2219
- (98) KAINOSHO, M., AJISAKA, K., KAMISAKU, M. et MURAI, A. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **64**, 425 - 432
- (99) ANTEUNIS, M.J., BECU, C., LALA, A.K., VERHEGGE, G. et NARAYAN-LALA, K. (1977) *Bull. Soc. Chim. Belg.* **86**, 161 - 186
- (100) POGLIANI, L., ELLENBERGER, M. et VALAT, J. (1975) *Org. Magn. Res.* **7**, 61 - 71
- (101) ELLENBERGER, M. et POGLIANI, L. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **58**, 613 - 623
- (102) POGLIANI, L., ELLENBERGER, M., VALAT, J. et BELLOCQ, A.M. (1975) *Int. J. Peptide Protein Res.* **7**, 345 - 360
- (103) RAMACHANDRAN, G.N., LAKSHMINARAYANAN, A.V., BALASUBRAMANIAN, R. et TEGONI, G. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* **221**, 165 - 181
- (104) TORCHIA, D.A. et BOVEY, F.A. (1971) *Macromolecules* **4**, 246 - 251
- (105) WU, C.C., KOMOROSKI, R.A. et MANDELKERN, L. (1975) *Macromolecules* **8**, 635 - 637
- (106) OKABAYASHI, H. et ISEMURA, T. (1970) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **43**, 359 - 361
- (107) ROTHE, M. et ROTT, H. (1976) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **15**, 770 - 771
- (108) DORMAN, D.E. et BOVEY, F.A. (1973) *J. Org. Chem.* **38**, 2379 - 2383
- (109) FERMANDJIAN, S., TRAN-DINH, S., SAVRDA, J., SALA, E., MERMET-BOUVIER, R. BRICAS, E. et FROMAGEOT, P. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **399**, 313 - 338
- (110) KOBAYASHI, Y. et KYOGOKU, Y. (1973) *J. Mol. Biol.* **81**, 337 - 347
- (111) BARFIELD, M., HRUBY, V.J. et MERALDI, J.P. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 1308 - 1314
- (112) TRAN-DINH, S. et FERMANDJIAN, S. (1973) *J. Phys., Suppl. C.* **34**, 45 - 48
- (113) DORMAN, D.E. et BOVEY, F.A. (1973) *J. Org. Chem.* **38**, 1719 - 1722
- (114) TORCHIA, D.A., LYERLA, J.R., Jr et DEBER, C.M. (1974) *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 5009 - 5011
- (115) COMBRISON, S. et ROQUES, B.P. (1976) *Tetrahedron* **32**, 1507 - 1516
- (116) GIBBONS, W.A., SOGN, J.A., STERN, A., CRAIG, L.C. et JOHNSON, L.F. (1970) *Nature* **227**, 840 - 842
- (117) CHRISTL, M. et ROBERTS, J.D. (1972) *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 4565 - 4572
- (118) ROQUES, B.P., COMBRISON, S. et WASYLISHEN, R. (1976) *Tetrahedron* **32**, 1517 - 1521
- (119) SIEMION, I.Z., WIELAND, T. et POOK, K.H. (1975) *Angew. Chem.* **87**, 712 - 713
- (120) SMITH, I.C.P., DESLAURIERS, R. et SCHAUMBURG, K. dans «Peptides : Chemistry, Structure and Biology», (R. Walter and J. Meienhofer ed., Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich., 1972), 97 - 111
- (121) DESLAURIERS, R., SMITH, I.C.P. et WALTER, R. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 7006 - 7010
- (122) DESLAURIERS, R., GARRIGOU-LAGRANGE, C., BELLOCQ, A.M. et SMITH, I.C.P. (1973) *FEBS Letters* **31**, 59 - 66
- (123) TORCHIA, D.A. et LYERLA, J.R., Jr (1974) *Biopolymers* **13**, 97 - 114
- (124) FREEMAN, R. et HILL, H.D.W. (1971) *J. Chem. Phys.* **54**, 3367 - 3377
- (125) EVANS, C.A. et RABENSTEIN, D.L. (1974) *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 7312 - 7317
- (126) CANN, J.R., STEWART, J.M., LONDON, R.E. et MATWIYOFF, N.A. (1976) *Biochemistry* **15**, 498 - 504
- (127) LONDON, R.E., MATWIYOFF, N.A., STEWART, J.M. et CANN, J.R. (1978) *Biochemistry* **17**, 2277 - 2283

- (128) THOMAS, W.A. et WILLIAMS, M.K. J. Chem. Soc., Chem. Comm. **1972**, 994
- (129) LONDON, R.E. (1978) J. Am. Chem. Soc. **100**, 2678 - 2685
- (130) VENKATACHALAM, C.M., PRICE, B.J. et KRIMM, S. (1975) Biopolymers **14**, 1121 - 1132
- (131) MADISON, V. (1977) Biopolymers **16**, 2671 - 2692
- (132) BALASUBRAMANIAN, R., LAKSHMINARAYANAN, A.V., SABESAN, M.N., TEGONI, G. VENKATESAN, K. et RAMACHANDRAN, G.N. (1971) Int. J. Peptide Protein Res. **3**, 25 - 33
- (133) DETAR, D.F. et LUTHRA, N.P. (1977) J. Am. Chem. Soc. **99**, 1232 - 1244
- (134) SCHIMMEL, P.R. et FLORY, P.J. (1968) J. Mol. Biol. **34**, 105 - 120
- (135) STIMSON, E.R., ZIMMERMAN, S.S. et SCHERAGA, H.A. (1977) Macromolecules **10**, 1049 - 1060
- (136) TONELLI, A.E. (1974) J. Mol. Biol. **86**, 627 - 635
- (137) TONELLI, A.E. (1970) J. Am. Chem. Soc. **92**, 6187 - 6190
- (138) TANAKA, S. et SCHERAGA, H.A. (1974) Macromolecules **7**, 698 - 705
- (139) PEASE, L.G. et WATSON, C. (1978) J. Am. Chem. Soc. **100**, 1279 - 1286
- (140) MADISON, V., ATREYI, M., DEBER, C.M. et BLOUT, E.R. (1974) J. Am. Chem. Soc. **96**, 6725 - 6734
- (141) BLANCHARD, S. (1977) J. Mol. Struct. **38**, 63 - 76
- (142) YOUNG, M.A. et PYSH, E.S. (1975) J. Am. Chem. Soc. **97**, 5100 - 5103
- (143) BOVEY, F.A. et HOOD, F.P. (1967) Biopolymers **5**, 325 - 326
- (144) TIMASHEFF, S.N., SUSI, H., TOWNEND, R., STEVENS, L., GORBUNOFF, M.J. et KUMOSINSKI, T.F. dans «Conformation of Biopolymers», (G.N. Ramachandran ed., Academic Press, New York, N.Y., 1967), 173 - 196
- (145) TIFFANY, M.L. et KRIMM, S. (1968) Biopolymers **6**, 1767 - 1770
- (146) LO, J.T. et MATTICE, W.L. (1976) Biopolymers **15**, 15 - 19
- (147) MATTICE, W.L. et MANDELKERN, L. (1970) Biochemistry **9**, 1049 - 1058
- (148) TORCHIA, D.A. (1971) Macromolecules **4**, 440 - 442
- (149) BOVEY, F.A. dans «Chemistry and Biology of Peptides», (J. Meienhofer ed., Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich., 1972), 3 - 28
- (150) DORMAN, D.E., TORCHIA, D.A. et BOVEY, F.A. (1973) Macromolecules **6**, 80 - 82
- (151) MATTICE, W.L. et MANDELKERN, L. (1971) Biochemistry **10**, 1926 - 1933
- (152) BALAJI, V.N. et SASISEKHARAN, V. (1978) Curr. Sci. **47**, 401 - 404
- (153) HELBECQUE, N. et LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1978) Int. J. Peptide Protein Res. **11**, 353 - 362
- (154) TORCHIA, D.A. (1972) Biochemistry **11**, 1462 - 1468
- (155) DEGAND, P., AUBERT, J.P., BOERSMA, A., RICHET, C., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. et BISERTE, G. (1976) FEBS Letters **63**, 137 - 140
- (156) WUETHRICH, K. dans «NMR in Biological Research : Peptides and Proteins», (North-Holland Pub. Comp., Amsterdam, Oxford, 1976), 46 - 47
- (157) Mc DONALD, C.C. et PHILLIPS, W.D. (1969) J. Am. Chem. Soc. **91**, 1513 - 1521
- (158) VENKATACHALAM, C.M. (1968) Biopolymers **6**, 1425 - 1436
- (159) BENNICK, A. (1975) Biochem. J. **145**, 557 - 567
- (160) BENNICK, A. (1977) Biochem. J. **163**, 229 - 239
- (161) KANAYA, S. et FUJIMOTO, D. (1973) J. Mol. Biol. **81**, 415 - 418
- (162) BENNICK, A., WONG, R. et CANNON, M. dans «Calcium-Binding Proteins and Calcium Function», (North-Holland Pub. Co., New York, 1977), 391 - 400
- (163) CHOU, P.Y. et FASMAN, G.D. (1977) J. Mol. Biol. **115**, 135 - 175

