

50 376  
1 980  
106

N° d'ordre: 492

50376  
1980  
106

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

**DOCTORAT ES SCIENCES**

par

Bernard HECQUET

**CONTRIBUTION A L'ETUDE THEORIQUE  
DES PROPRIETES DES PEPTIDES :  
REACTIVITE ET FLUORESCENCE  
DE PETITS PEPTIDES**



Soutenue le 30 septembre 1980 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :	Président :	M. J. LHOMME
		M. G. LAUSTRIAT
	Rapporteurs :	M. C. LOUCHEUX
		M. S. PREMILAT
	Examineurs :	M. M. PTAK
		M. J. LEFEBVRE

SCD LILLE 1



D 030 199984 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 Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme 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, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale

M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LHOMME Jean	Chimie
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	CHAPOTON Alain	Electronique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme	CORSIN Paule	Sciences de la Terre
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	COURBIS Bernard	Sciences Economiques
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	CRAMPON Norbert	Sciences de la Terre
M.	CROSNIER Yves	Electronique
Mme	DACHARRY Montique	Géographie
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale

M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DUBRULLE Alain	Physique
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FONTAINE Hubert	Physique
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Mathématiques
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEMAIRE Jean	Physique
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquée
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RICHARD Alain	Biologie

- |                        |   |
|------------------------|---|
| M. RIETSCH François    | Chimie                                      |
| M. ROGALSKI Marc       | Analyse                                     |
| M. ROUSSEAU Jean-Paul  | Physiologie Animale                         |
| M. ROY Jean-Claude     | Psychophysiologie                           |
| M. SALAMA Pierre       | Sciences Economiques                        |
| Mme SCHWARZBACH Yvette | Mathématiques                               |
| M. SCHAMPS Joël        | Physique                                    |
| M. SIMON Michel        | Sociologie                                  |
| M. SLIWA Henri         | Chimie Organique                            |
| M. SOMME Jean          | Géographie                                  |
| Mlle SPIK Geneviève    | Biochimie                                   |
| M. STERBOUL François   | Informatique                                |
| M. TAILLIEZ Roger      | Biologie                                    |
| M. THERY Pierre        | Electronique, Electrotechnique, Automatique |
| M. TOULOTTE Jean-Marc  | Automatique                                 |
| M. VANDORPE Bernard    | Chimie Minérale                             |
| M. VILETTE Michel      | Résistance des Matériaux                    |
| M. WALLART Francis     | Chimie                                      |
| M. WATERLOT Michel     | Géologie Générale                           |
| M. WERNER Georges      | Informatique Fondamentale Appliquée         |
| Mme ZINN-JUSTIN Nicole | Algèbre                                     |

Monsieur C. LOUCHEUX, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, a bien voulu m'accueillir dans son Laboratoire, me confier le sujet de cette thèse et en permettre la réalisation. Je tiens à le remercier et à lui exprimer ma reconnaissance pour l'intérêt qu'il a toujours porté à ce travail.

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.

Monsieur S. PREMILAT, Professeur à l'Université de Nancy, a bien voulu, pendant toute la réalisation de la partie théorique de cette thèse, me prodiguer critiques et conseils. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Monsieur G. LAUSTRIAT, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg m'a accueilli dans son Laboratoire, a porté un grand intérêt à ce travail et m'a fait l'honneur de bien vouloir le juger. Qu'il veuille accepter mes remerciements respectueux.

Monsieur M. PTAK, Professeur à l'Université d'Orléans, a bien voulu me faire l'honneur de faire partie de ce jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes remerciements respectueux.

Je tiens à remercier Monsieur J. LEFEBVRE, Professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Lille, de l'honneur qu'il me fait en voulant bien juger ce travail.

Je tiens également à remercier M. BATAILLE dont l'amicale collaboration, depuis des années, a beaucoup favorisé la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse.

Que Madame B. LUX, Monsieur D. GERARD, Professeur à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, et Monsieur B. MAIGRET veuillent bien accepter mes remerciements amicaux pour l'aide qu'ils m'ont apportée et les fructueuses discussions qu'ils m'ont permis d'avoir.

Enfin je remercie Mademoiselle OLIVIER et Madame SAINLEGER pour la réalisation pratique de cette thèse ainsi que Monsieur Jean-Marie BERNARD et mes camarades de Laboratoire.

P L A N

	pages
INTRODUCTION	1 à 2
GENERALITES SUR LES ACIDES AMINES ET LES PEPTIDES	3 à 6
PREMIERE PARTIE :	7 à 50
Contribution à l'utilisation du rendement quantique de fluorescence pour l'étude conformationnelle de petits peptides	
- CHAPITRE I :	9
Etude du rendement quantique de petits peptides modèles contenant un ou plusieurs résidus tyrosyles.	
- CHAPITRE II :	29
Modèle pour l'étude de la relation entre le ren- dement quantique et la conformation des peptides	
DEUXIEME PARTIE :	51 à 134
Contribution à l'étude théorique de la réactivité des peptides	
- CHAPITRE I :	55
Détermination de l'accessibilité d'une fonction portée par un peptide	
- CHAPITRE II :	71
Calcul du coefficient de diffusion d'un peptide	
- CHAPITRE III :	91
Application de la théorie de la diffusion à la réactivité des peptides	

	pages
TROISIEME PARTIE :	135 à 173
Application des modèles	
- CHAPITRE I :	139
Application des modèles à l'évaluation de la réactivité de la Met-Enkephaline	
- CHAPITRE II :	149
Application des modèles à la détermination de la conformation des peptides en solution	
CONCLUSION	175 à 178
ANNEXE	179 à 195
Synthèse des peptides modèles	
BIBLIOGRAPHIE	197 à 207

## INTRODUCTION

Depuis quelques années les peptides ont pris une grande importance dans le domaine de la biologie.

A cette famille de composés appartiennent certaines hormones et des neurotransmetteurs qui présentent une activité considérable. Ils sont synthétisés, en particulier, au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse.

La découverte des enképhalines (5 acides aminés) possédant des propriétés analgésiques équivalentes à la morphine a encore augmenté leur intérêt. De nombreuses molécules de peptide ont été synthétisées par voie chimique dans l'espoir d'obtenir un nouveau type de médicament présentant peu d'effets secondaires.

Parallèlement des études physico-chimiques et théoriques ont été réalisées pour connaître leur conformation, dans le but de comprendre le mécanisme de leur action.

La résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie infra-rouge et Raman, le dichroïsme circulaire et, à un degré moindre, la spectrofluorimétrie ont été employés pour la détermination de leurs structures secondaires dans différents solvants.

L'usage du calcul numérique par ordinateur a permis la recherche de structures théoriquement stables et la mise en évidence d'un certain nombre d'analogies entre molécules très différentes chimiquement mais d'effet biologique identique.

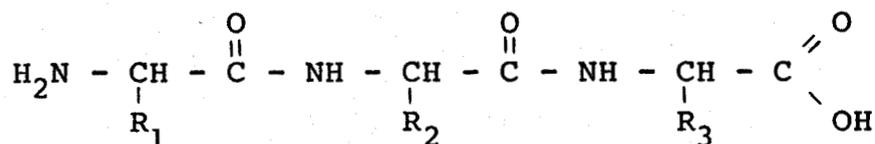
Une équipe a été constituée au Laboratoire de Chimie Macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE pour synthétiser et étudier des peptides "modèles". C'est dans ce cadre qu'a été réalisé ce travail dont le but était double.

- envisager l'utilisation du rendement quantique de fluorescence pour la détermination de la conformation des peptides, puis tenter de rendre compte, par un modèle théorique, de la réactivité chimique des peptides avec application à l'extinction de fluorescence.

L'ensemble a une finalité biologique, mais la grande complexité des mécanismes mis en jeu dans la matière vivante exige préalablement d'étudier des cas plus simples, en espérant que l'expérience acquise permettra, ultérieurement, d'aborder d'autres phénomènes.

GENERALITES SUR LES ACIDES AMINES ET LES PEPTIDES

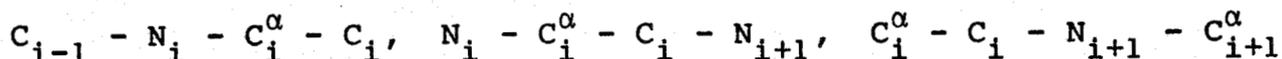
L'enchaînement des acides aminés est identique dans les peptides et dans les protéines. La formule générale, dans l'exemple d'un peptide possédant trois acides aminés, est :



La structure primaire du peptide dépend de la nature des substituants  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$ ,  $\text{R}_3$ . La structure secondaire est l'arrangement spatial des atomes de la molécule. Elle est complètement définie par un ensemble de liaisons interatomiques, d'angles de valence, et d'angles diédraux  $\phi_i$ ,  $\psi_i$ ,  $\omega_i$  et  $\chi_i$ .

Soit  $\text{C}_i$  le carbone du groupement carbonyle de l'acide aminé  $i$  et  $\text{C}_i^\alpha$  l'atome de carbone portant le groupement  $\text{R}_i$ .

Les angles  $\phi_i$ ,  $\psi_i$  et  $\omega_i$  sont les angles dièdres des deux plans définis respectivement par les liaisons :



Les angles  $\chi_i$  définissent l'orientation des chaînes latérales.

Les conventions IUPAC (G1) précisent que ces angles doivent être positifs quand ils sont orientés vers la droite. Ils sont égaux à zéro pour la conformation éclipsée (conformation cis).

L'angle  $\omega$  correspondant à la liaison peptidique trans est donc égal à  $180^\circ$ .

Tous les angles sont exprimés par une valeur comprise entre  $-180^\circ$  et  $+180^\circ$ .

Remarque :

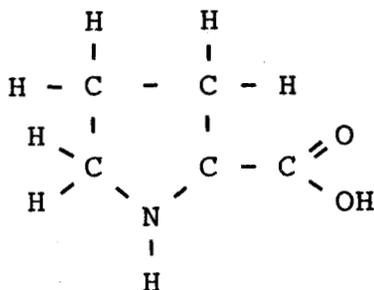
Les conventions IUPAC datent de 1970. Dans les anciennes conventions l'angle correspondant à une forme éclipsée est égal à  $180^\circ$ . On passe de l'ancienne à la nouvelle convention en ajoutant ou retranchant  $180^\circ$ .

### Acides aminés utilisés

Nous avons étudié principalement des peptides contenant la glycine, la proline et la tyrosine.

La glycine ( $\text{H}_2\text{N} - \text{CH}_2 - \text{C} \begin{matrix} \text{=O} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{matrix}$ ) ne possédant pas de chaîne latérale, est définie uniquement par ses angles  $\phi$  et  $\psi$ .

La proline est un acide aminé particulier (c'est, en fait, un imino acide):



Le cycle interdit la libre rotation autour de la liaison  $\text{N} - \text{C}^\alpha$  et l'angle  $\phi$  sera considéré comme fixe ( $-60^\circ$ ).

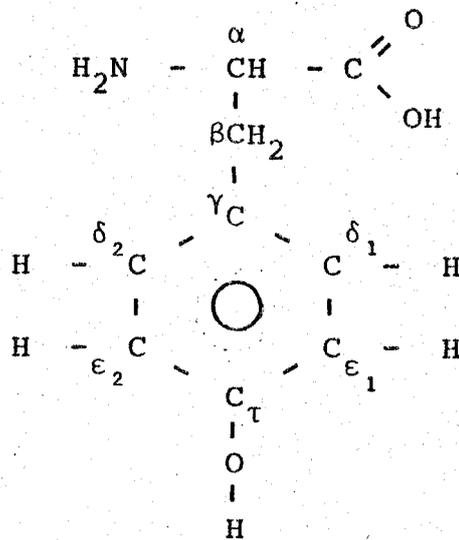
Dans les composés X-Pro la liaison peptidique peut être cis (G11 - G12) avec  $\omega = 0$ . La proportion des deux formes cis et trans varie suivant les peptides et le solvant; dans la majorité des cas la forme trans reste prépondérante.

La tyrosine possède trois angles  $\chi$  :

$\chi_1$  : angle du dièdre défini par :  $\text{N} - \text{C}^\alpha - \text{C}^\beta - \text{C}^\gamma$

$\chi_2$  : angle du dièdre défini par :  $\text{C}^\alpha - \text{C}^\beta - \text{C}^\gamma - \text{C}^{\delta_1}$

$\chi_3$  : angle du dièdre défini par :  $\text{C}^{\epsilon_1} - \text{C}^\tau - \text{O} - \text{H}$



### Structure des petits peptides

Dans les petits peptides il y a trop peu d'acides aminés pour que la structure secondaire puisse s'organiser en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$ . La structure organisée existant est le coude ou le repliement. Elle se caractérise par le rapprochement des atomes C <sup>$\alpha$</sup>  des acides aminés  $i$  et  $i+3$  pour le coude  $\beta$  (G2-G3) et  $i$  et  $i+2$  pour le coude  $\gamma$  (G4-G5-G6).

Les structures coudes se retrouvent également dans les protéines et plus particulièrement dans les protéines globulaires (G7 à G10). Très souvent les "coudes" se situent à l'extérieur de la protéine et favorisent le repliement de la chaîne protéique vers l'intérieur.

Dans les petits peptides les forces qui peuvent favoriser la forme repliée sont des liaisons hydrogène intramoléculaires ou des interactions électrostatiques entre les extrémités chargées.

Les liaisons hydrogène s'établissent généralement entre le groupement carbonyle de l'acide aminé  $i$  et l'hydrogène lié à l'azote de l'acide aminé  $i+3$  (pour un coude  $\beta$ ).

Les angles  $\phi_{i+1}$ ,  $\psi_{i+1}$ ,  $\phi_{i+2}$ ,  $\psi_{i+2}$  ont alors des valeurs déterminées qui ont permis de distinguer différents types de coudes (G2-G3) par exemple :

type I (- 60°, - 30°, - 90°, 0°)

type II (- 60°, 120°, 80°, 0°)

type III (- 60°, - 30°, - 60°, -30°)

Dans les milieux ionisants et dans ceux où la molécule de solvant peut former des liaisons hydrogène avec les fonctions de la molécule de peptide, la contribution de l'interaction électrostatique des charges terminales peut être importante (cas de l'eau).

Dans ces conditions le critère le plus général pour déterminer une forme coude est la distance entre les carbonés  $\alpha$  du résidu  $i$  et  $i+3$  (ou  $i$  et  $i+2$ ). Par exemple pour un coude  $\beta$  cette distance doit être inférieure à 5,7 Å.

Dans toutes les études que nous avons entreprises nous avons cherché des propriétés générales de la forme coude, quel que soit son mode de stabilisation. Nous avons utilisé le méthanol et surtout l'eau comme solvant et notre postulat de départ est que dans ces deux milieux, même sous forme repliée, les atomes de la molécule de peptide possèdent un degré de liberté non négligeable. Dès lors, c'est un ensemble de structures possibles que nous avons traité et non une structure rigide.

PREMIERE PARTIE

CONTRIBUTION A L'UTILISATION DU RENDEMENT QUANTIQUE  
DE FLUORESCENCE POUR L'ETUDE CONFORMATIONNELLE  
DE PETITS PEPTIDES

PREMIERE PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA  
DE LA FLUORESCENCE POUR L'ETUDE COMPARATIVE  
DE PETITES ETIQUETTES

Les techniques fluorimétriques sont de plus en plus utilisées dans les études biochimiques et biologiques. Elles permettent, suivant le type de paramètre observé (rendement quantique, durée de vie, taux de polarisation...) d'obtenir des informations sur la structure, la mobilité ou l'environnement des molécules portant un groupement fluorophore.

Parmi ces techniques la mesure du rendement quantique est la plus simple. Comme elle n'exige qu'une très faible quantité de produits, elle présente un grand intérêt pratique.

Les études sur le rendement quantique des protéines et des polypeptides sont nombreuses. Pour les oligopeptides c'est surtout la relation structure primaire - rendement quantique dans différents milieux qui a été étudiée.

Un peptide comportant moins de huit acides aminés peut, comme il a été noté, avoir deux types de structure secondaire : une structure "étendue statistique" et une structure repliée (coude  $\beta$ , coude  $\gamma$ , etc.). Peu de travaux ont été réalisés pour savoir si une ou plusieurs mesures de rendement quantique (dans des conditions différentes) permettraient, a priori, de distinguer l'existence d'une de ces deux formes. Nous avons donc synthétisé un certain nombre de petits peptides contenant de la tyrosine. Dans un premier temps nous avons mesuré leur rendement quantique dans différents solvants et à différents pH.

Ensuite nous avons cherché un modèle théorique qui puisse rendre compte d'éventuelles variations de rendement quantique en fonction de la conformation moléculaire. Nous avons, enfin, comparé résultats expérimentaux et théoriques.



## C H A P I T R E I

### ETUDE DU RENDEMENT QUANTIQUE DE PEPTIDES MODELES CONTENANT UN OU PLUSIEURS RESIDUS TYROSYLES

#### I - FACTEURS DETERMINANT LE RENDEMENT QUANTIQUE D'UN PEPTIDE CONTENANT DE LA TYROSINE

##### A - Généralités sur le rendement quantique

L'excitation du noyau phénol d'une tyrosine par un rayonnement de fréquence  $\nu = 275 \text{ nm}$  entraîne le passage d'un électron  $\pi$  de l'état fondamental au premier état excité singulet  $S_1$  ou, plus exactement, à l'un des niveaux vibrationnels de  $S_1$  (Fig. 1). Cette transition s'effectue avec absorption d'une énergie  $h\nu$ .

Très rapidement (en un temps variant de  $10^{-13}$  à  $10^{-11}$  s) des reconversions d'énergie intramoléculaires ramènent cet électron sur le niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité  $S_1$ . Il reste quelques nanosecondes à ce niveau d'énergie.

Le retour à l'état fondamental peut se faire de différentes façons :

- par émission d'un photon de fréquence  $\nu' < \nu$  qui ramène la molécule sur l'un des niveaux vibrationnels de l'état fondamental : c'est le phénomène de fluorescence

- par transferts d'énergie non radiatifs, intramoléculaires ou intermoléculaires

- par conversion singulet - triplet suivie de l'émission d'un photon de phosphorescence.

A: absorption

D: desactivation non radiative

F: fluorescence

P: phosphorescence

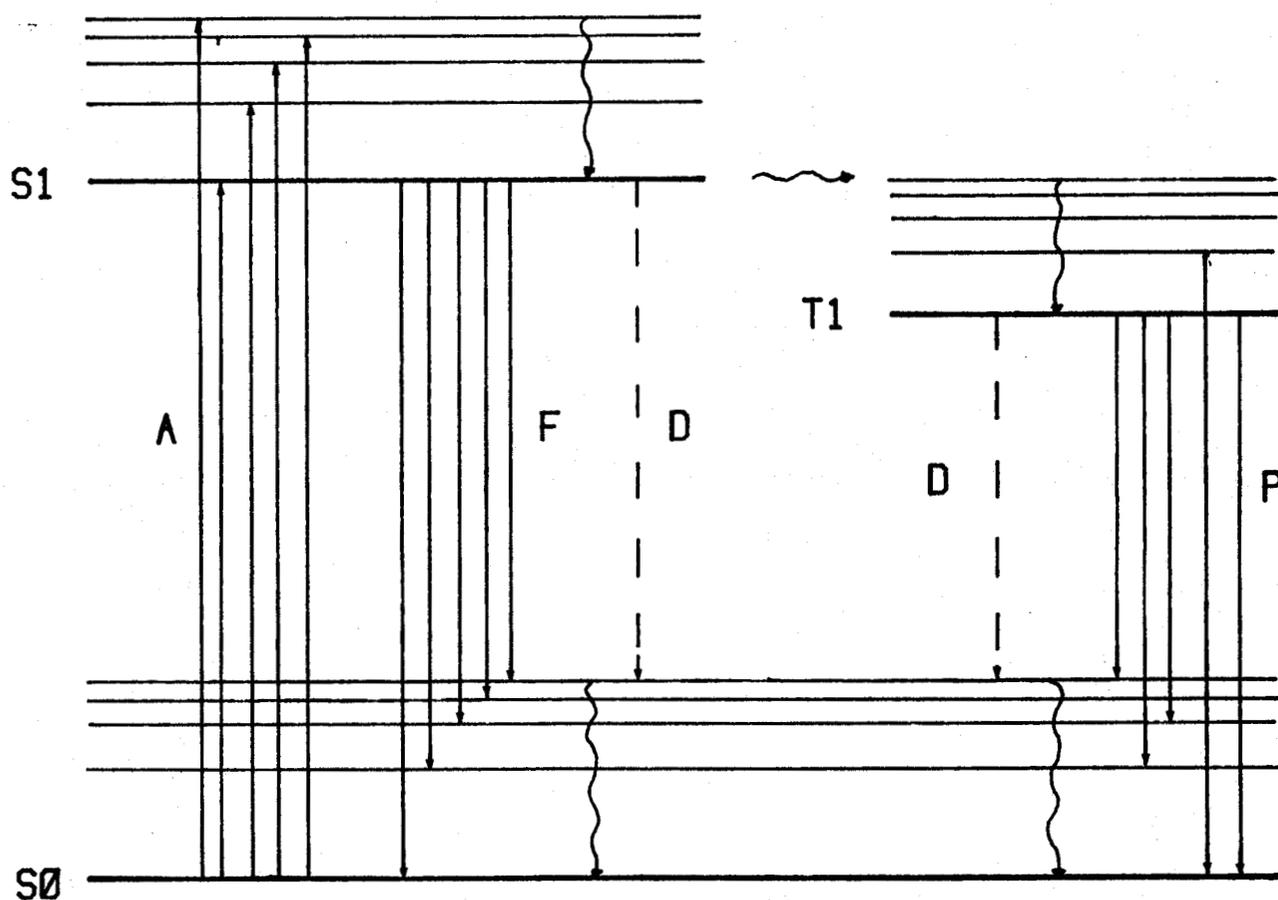
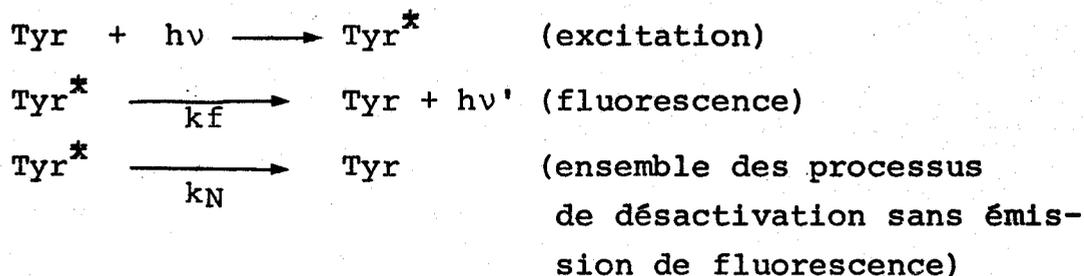


FIG 1: DIAGRAMME DES PREMIERS NIVEAUX ENERGETIQUES D'UNE MOLECULE



Schématiquement :



Soit un ensemble de molécules  $N_0$  et  $N_1$  le nombre de molécules dans l'état  $S_1$  au temps  $t$  après l'excitation, si les phénomènes sont du premier ordre :

$$-\frac{dN_1}{dt} = (k_f + k_N) N_1$$

soit :

$$N_1 = (N_1)_{t=0} e^{-(k_f+k_N)t}$$

Par définition le rendement quantique est le rapport du nombre de photons émis par fluorescence au nombre de photons absorbés. Ce rapport est égal à la fraction de molécules excitées qui reviennent à l'état fondamental par émission de fluorescence soit :

$$Q = \frac{\int_0^t k_f N_1 dt}{(N_1)_{t=0}} = \frac{k_f}{k_f + k_N}$$

La durée de vie est définie comme le temps nécessaire pour que le nombre de molécules dans l'état  $S_1$  soit égal à  $\frac{1}{e}$  de sa valeur initiale. On voit donc que :

$$\tau = \frac{1}{k_f + k_N}$$

Si  $\tau_0$  est la durée de vie en l'absence de désactivation non radiative :

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f} \quad \text{et} \quad Q = \frac{\tau}{\tau_0}$$

### Remarque

- L'ensemble des électrons ne retombant pas sur le même état vibrationnel du niveau fondamental, la lumière de fluorescence n'est pas monochromatique et présente un spectre caractéristique du composé étudié, le maximum étant situé à 303 nm pour la tyrosine.

La suite du paragraphe envisage les différents paramètres susceptibles de modifier le rendement quantique de la tyrosine libre et engagée dans un peptide.

### B - Influence du solvant

Lorsqu'une molécule est mise en solution dans un solvant des énergies d'interaction soluté-solvant apparaissent, pouvant modifier les niveaux électroniques de la molécule à l'état fondamental ou excité. Cette modification entraîne généralement un glissement et une déformation des spectres d'absorption ou d'émission. Il y a modification de la valeur de  $k_f$  et donc du rendement quantique.

Pour la tyrosine, l'eau et les solvants organiques n'ont pratiquement aucune influence sur les spectres (F1). Comme, très probablement, les interactions électroniques existent, on peut en conclure que la modification des états fondamentaux et excités est la même, c'est-à-dire que la géométrie et le moment dipolaire de ces états sont très proches.

Le  $k_f$  n'est pas modifié par les solvants mais on mesure des rendements quantiques très différents pour les mêmes composés : ce sont donc les processus intermoléculaires et intramoléculaires (liés à la conformation) de désactivation non radiative qui dépendent des caractéristiques de solvant (moment dipolaire etc.).

### C - Influence de l'ionisation sur le rendement quantique de la tyrosine

La mesure d'un rendement quantique absolu est très complexe et les résultats obtenus pour la tyrosine dans l'eau, sous forme de zwitterion, différent selon les auteurs :

0,09	pour BORRENSEN	(F2)
0,12	pour FEITELSON	(F3)
0,14	pour CHEN	(F4)
0,21	pour TEALE	(F5)

La valeur 0,14 est la plus employée, mais nous exprimerons les rendements quantiques en valeur relative par rapport au rendement quantique de la tyrosine (zwitterion) arbitrairement fixé à 1.

### 1 - Influence de l'ionisation de l'hydroxyle phénolique

La formation d'un ion phénate fait disparaître la fluorescence que l'acide-amino soit libre ou engagé dans un peptide (F6, F7). La dissociation ayant lieu vers  $\text{pH} = 10$ , il est impossible d'effectuer des études fluorimétriques à un  $\text{pH}$  supérieur.

Quand l'hydrogène du groupement hydroxyle est impliqué dans une liaison de type hydrogène, le rendement quantique est abaissé par renforcement du caractère négatif de l'oxygène (formation d'un pseudo-phénate).

### 2 - Influence de l'ionisation de la fonction terminale

L'étude du rendement quantique en fonction du  $\text{pH}$  montre que la protonation de la fonction acide de la tyrosine diminue fortement la fluorescence (F6, F7). Toutefois, à des  $\text{pH}$  inférieurs à 2 où le groupement acide n'est pas dissocié, il existe une fluorescence résiduelle faible. Ceci est également observé quand la tyrosine est en position C terminale d'un peptide. Le mécanisme de désactivation semble être déterminé par la présence d'une double liaison  $\text{C} = \text{O}$  et sera envisagé en même temps que l'effet de la liaison peptidique.

### 3 - Influence de l'ionisation de la fonction amine terminale

Dans l'intervalle de  $\text{pH}$  où on peut mesurer la fluorescence de la tyrosine, la fonction amine est protonée. L'influence de la déprotonation est difficile à évaluer, le  $\text{pK}$  de

la fonction amine étant très voisin de celui de la fonction hydroxyle. COWGILL (F8) a montré que cette dissociation avait peu d'influence sur le rendement quantique de la O méthyl-tyrosine.

Pour les peptides contenant la tyrosine la fonction amine protonée abaisse la fluorescence.

## B - Influence de la liaison peptidique

La diminution du rendement quantique de la tyrosine appartenant à un peptide ou à une protéine est bien connue (F6, F10, F11). Par contre, le mécanisme de cette extinction est encore mal élucidé (F12). On peut dégager des travaux sur les petits peptides quelques hypothèses :

### 1 - Transfert de proton

Le proton de l'hydroxyle du phénol à l'état excité serait transféré sur le groupement C = O plus ou moins polarisé d'une liaison peptidique de la molécule. Il se formerait alors l'ion phénate qui n'est pas fluorescent.

Ce type de mécanisme rend compte des effets inhibiteurs observés par FEITELSON (F3) quand sont présents dans le milieu des composés possédant une fonction carbonyle (diméthylformamide, diméthylacétamide).

Par contre COWGILL (F13) a observé des valeurs analogues de rendement quantique pour des peptides comportant un résidu tyrosyl ou un résidu O méthyl-tyrosine.

Remarque :

Récemment GAUDUCHON et WAHL (F12, F14) ont repris une hypothèse de transfert de proton pour expliquer le rendement quantique bas de Tyr-Gly-Gly sous forme de zwitterion. Mais, dans ce cas, le proton n'est plus transféré vers le carbonyle peptidique mais vers le groupement ionisé carboxylate terminal; ce transfert étant rendu possible par la conformation repliée du peptide.

## 2 - Transfert de charge

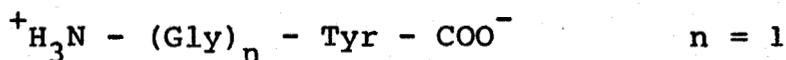
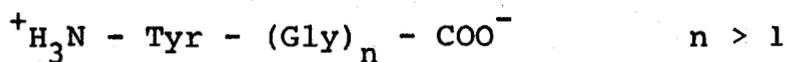
TOURNON et EL-BAYOUMI (F15, F16, F17) ont montré qu'un transfert de charge entre un noyau aromatique et des groupements amides, esters ou carboxyles protonés, était possible et qu'il devait se traduire par une diminution importante du rendement quantique. Comme précédemment ce type de transfert implique la proximité des groupements mis en jeu.

## 3 - Augmentation du couplage vibrationnel

COWGILL (F13) a proposé d'expliquer l'effet d'extinction de la fluorescence en considérant que le groupement carbonyle peptidique dans l'eau pouvait augmenter un couplage vibrationnel intramoléculaire entre le plus bas niveau de l'état singulet et l'état fondamental du chromophore aromatique en favorisant une désactivation non radiative. Il n'a donné aucune justification expérimentale. Dans un tel mécanisme le recouvrement partiel des orbitales du noyau aromatique et du carbonyle est nécessaire, les fonctions doivent être proches.

## 4 - Effet du groupement amine protoné

Nous avons vu que la déprotonation du groupement amine semblait avoir peu d'influence sur le rendement quantique de la tyrosine. Elle accroît par contre le rendement quantique des peptides suivants (F9) :



L'extinction due à la proximité de  $\text{NH}_3^+$  est confirmée par l'augmentation du rendement quantique quand on remplace Gly par Ala ou Leu dans le deuxième composé précité (F18).

GOWGILL en conclut (F13) que le groupement amine protoné n'aurait aucun effet quand il est isolé mais viendrait

renforcer l'effet inhibiteur du groupement peptidique voisin par effet direct sur le phénol ou par effet électronique à travers la chaîne carbonée.

GAUDUCHON (F14) a montré que cette hypothèse permettait d'expliquer d'une manière cohérente un certain nombre de résultats expérimentaux.

### C - Conclusion

Sans choisir entre les différents mécanismes proposés on peut dégager un certain nombre de paramètres pouvant influencer sur le rendement quantique :

- la distance entre le groupement hydroxyle du phénol d'une part, les groupements carbonyles des liaisons peptidiques et le groupement carboxyle terminal d'autre part

- la distance entre le groupement phényl et les groupements carbonyles peptidiques

- la distance entre le groupement phényl et le groupement amine terminal.

L'ensemble de ces distances dépend de la conformation de la molécule de peptide et le but du modèle de calcul sera la recherche par la relation "distance - conformation" de la relation "rendement quantique - conformation".

## II - RENDEMENT QUANTIQUE DES PEPTIDES ETUDIES

### A - Partie expérimentale

Les mesures ont été effectuées sur un appareil FICA 55 MK II qui est un spectrofluorimètre "différentiel-absolu" à double monochromateur.

L'appareil est équipé d'une lampe au Xénon et d'un système de correction des spectres d'émission.

Les échantillons ont été préparés par dilutions successives d'une solution mère dans des solvants distillés ne présentant aucune fluorescence résiduelle. Afin d'éviter l'effet de filtre interne tous les échantillons avaient une densité optique inférieure à 0,1, à la longueur d'onde d'émission maximum.

La cellule de mesure étant thermostatée (20°C) les solutions ont été placées dans l'appareil quelque temps avant la mesure, en l'absence de toute radiation. L'enregistrement du spectre de fluorescence a été réalisé assez rapidement de façon à éviter toute dégradation photochimique. La longueur d'onde excitatrice est de 275 nm et les spectres d'émission ont été enregistrés de 270 à 350 nm.

L'expression complète du rendement quantique mesuré est :

$$Q = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} \frac{\partial N_e}{\partial \lambda} d\lambda}{k I_0 10^{-\epsilon \lambda_e C l}}$$

$\lambda_e$  : longueur d'onde excitatrice  
 $C$  : concentration  
 $l$  : largeur de la cuve

où l'intégrale représente les quanta émis sur tout le spectre,  $I_0 e^{-\epsilon \lambda_e C l}$  l'intensité absorbée et  $k$  un facteur tenant compte de la géométrie de l'appareil qui ne capte qu'une fraction des quanta. En reliant le nombre de quanta à l'intensité observée :

$$N_e = k_\lambda I \quad I : \text{intensité observée en valeur arbitraire}$$

$$Q = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} k'_\lambda \left( \frac{\partial I}{\partial \lambda} \right) d\lambda}{k I_0 10^{-\epsilon \lambda_e C l}}$$

Si on mesure le rendement quantique des différents composés par rapport au rendement quantique de la tyrosine on obtient :

$$\frac{Q_x}{Q_{Tyr}} = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} k'_\lambda \left( \frac{\partial I_\lambda}{\partial \lambda} \right) d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} k'_\lambda \left( \frac{\partial I_{Tyr}}{\partial \lambda} \right) d\lambda} \cdot \frac{10^{-\epsilon \lambda_e C_{Tyr} l}}{10^{-\epsilon \lambda_e C_x l}}$$

Soit :

$$\frac{Q \ x}{Q \ Tyr} = \frac{S \ x}{S \ Tyr} \cdot \frac{DO \ Tyr}{DO \ x}$$

avec :

S : aire sous le spectre d'émission

DO : densité optique à la longueur d'onde d'excitation.

Ayant constaté que le rapport des aires était pratiquement égal au rapport des hauteurs (h) des spectres à la longueur d'onde d'émission maximum on peut écrire :

$$\frac{Q \ x}{Q \ Tyr} = \frac{h \ x}{h \ Tyr} \cdot \frac{DO \ Tyr}{DO \ x}$$

Nous avons vu précédemment que nous avons choisi de travailler en valeur absolue, c'est-à-dire que nous fixons arbitrairement  $Q = 1$  pour la tyrosine dans l'eau. Dans ces conditions :

$$Q \ x = \frac{h \ x}{h \ Tyr} \cdot \frac{DO \ Tyr}{DO \ x}$$

En conséquence chaque mesure fluorimétrique a été suivie par une mesure de densité optique à la longueur d'onde excitatrice.

La concentration des solutions est de l'ordre de 3 à  $4 \cdot 10^{-5}$  mole/l. Pour les études en fonction du pH nous avons utilisé des tampons lysine 0,02 M - KCl 0,1 M ajustés au pH désiré par NaOH ou HCl.

## B - Résultats

Les composés étudiés sont la tyrosine et les peptides modèles synthétisés (voir Annexe I et fig. 2).

Tyr - Pro - Gly - Gly    tBoc - Tyr - Pro - Gly - Gly - Me

Gly - Pro - Tyr - Gly    tBoc - Gly - Pro - Tyr - Gly - Me

Gly - Pro - Gly - Tyr    tBoc - Gly - Por - Gly - Tyr - Me

(tBoc tertibutylcarbonyl)    (Me : méthyl)

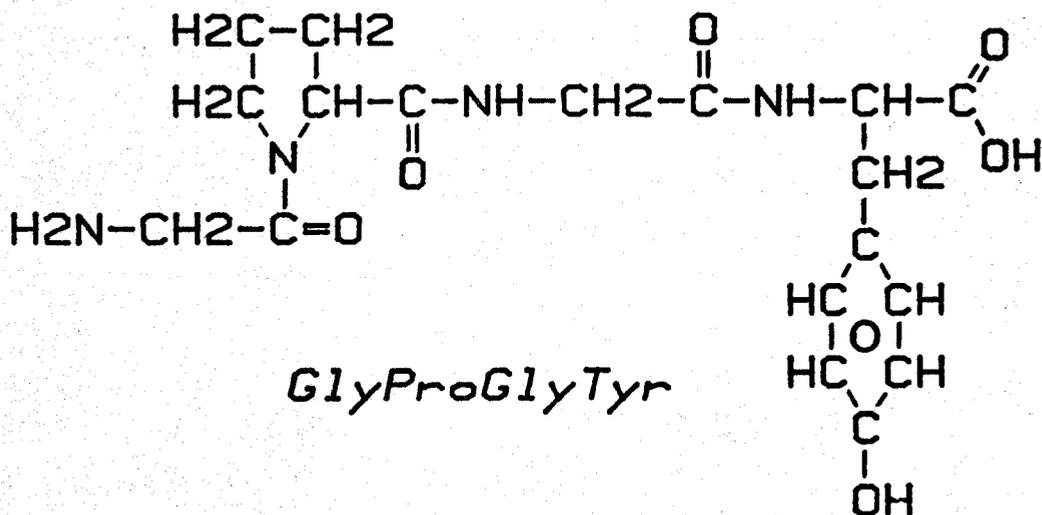
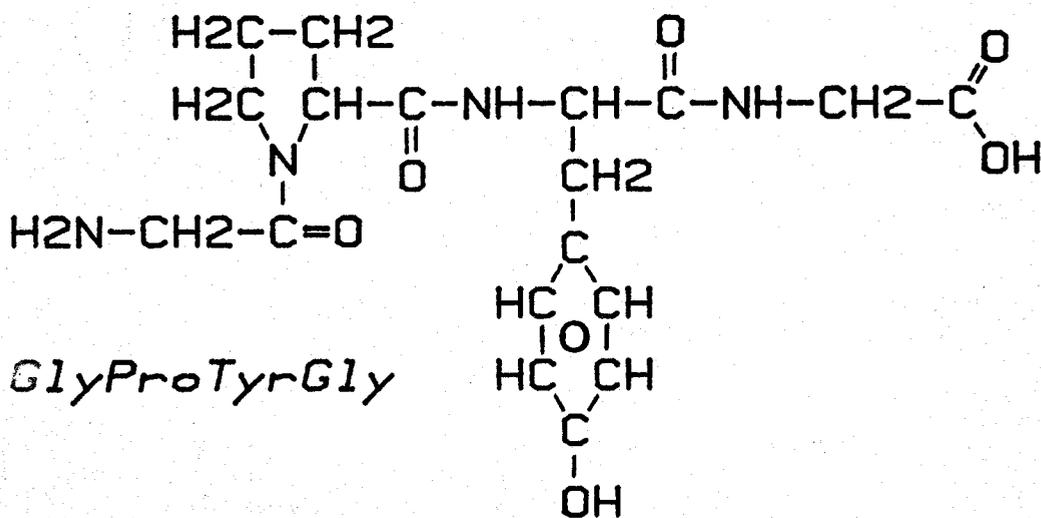
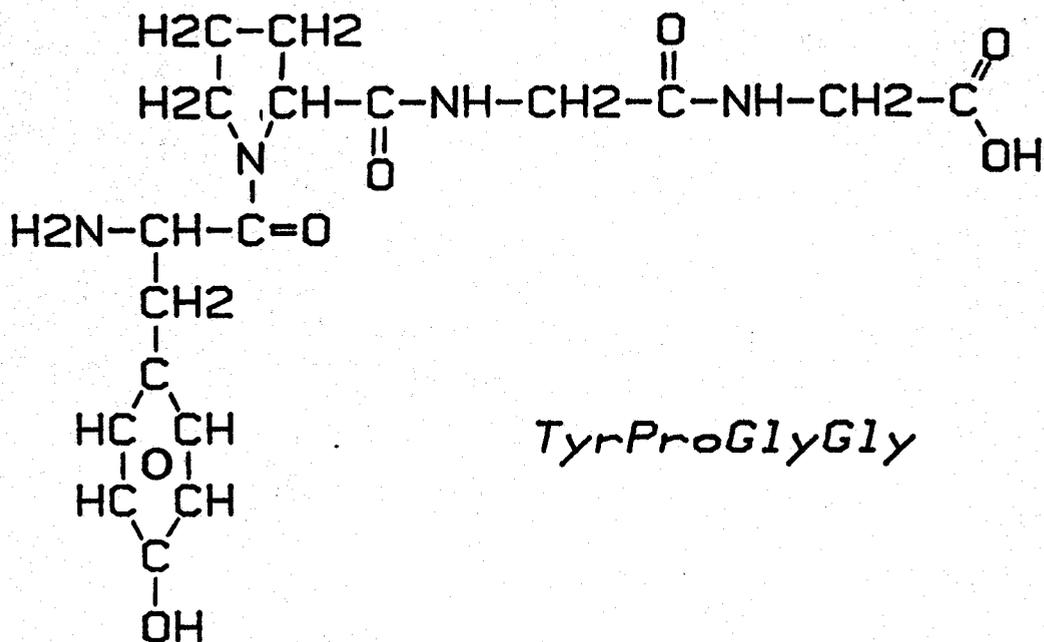
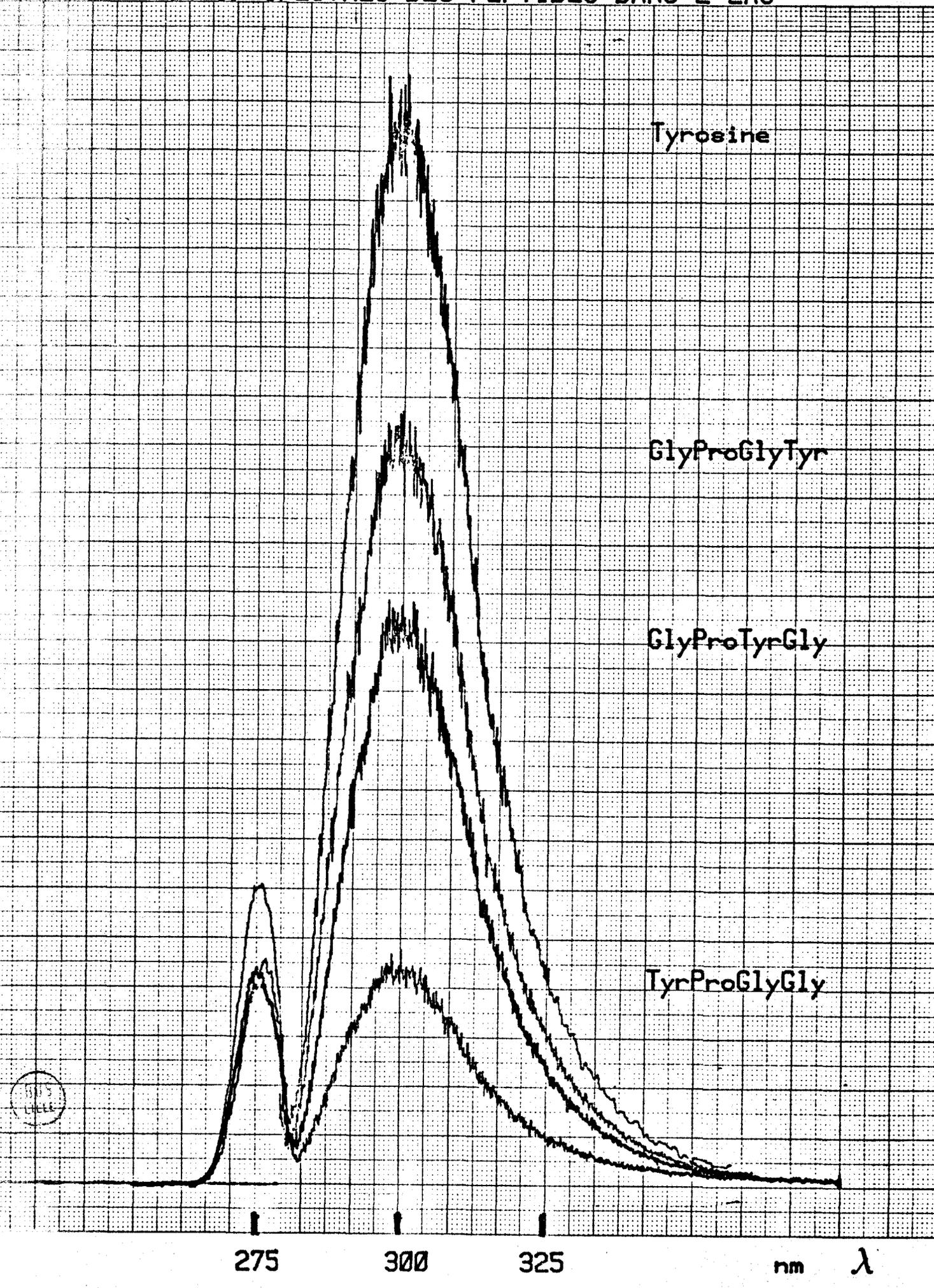


FIG 2: FORMULES DES PEPTIDES

FIG 3: SPECTRES DES PEPTIDES DANS L'EAU



275

300

325

nm  $\lambda$

La figure 3 montre les spectres obtenus dans l'eau. Il y a très peu de différence de forme entre les spectres quand on change de solvant.

Les tableaux 1 et 2 résument les résultats des mesures dans les différents solvants.

Remarque :

Les peptides protégés ne sont pas solubles dans l'eau.

solvant	Tyr-Pro-Gly-Gly (YPPG)	Gly-Pro-Tyr-Gly (GPYG)	Gly-Pro-Gly-Tyr (GPGY)	tBoc-Tyr-Pro-Gly-Gly-Me	tBoc-Gly-Pro-Tyr-Gly-Me	tBoc-Gly-Pro-Gly-Tyr-Me
eau	305	302	303			
méthanol	304	303	303	301	306	304
dioxanne				299	299	300

TABLEAU 1

*Longueur d'onde maximum d'émission  
des différents composés (en nm)*

solvant	Tyr-Pro-Gly-Gly (YPPG)	Gly-Pro-Tyr-Gly (GPYG)	Gly-Pro-Gly-Tyr (GPGY)	tBoc-Tyr-Pro-Gly-Gly-Me	tBoc-Gly-Pro-Tyr-Gly-Me	tBoc-Gly-Pro-Gly-Tyr-Me
eau	0,17	0,54	0,62			
méthanol	0,28	0,69	0,75	0,65	1,09	0,52
dioxanne				1,55	1,81	1,76

TABLEAU 2

*Rendements quantiques relatifs des différents composés*

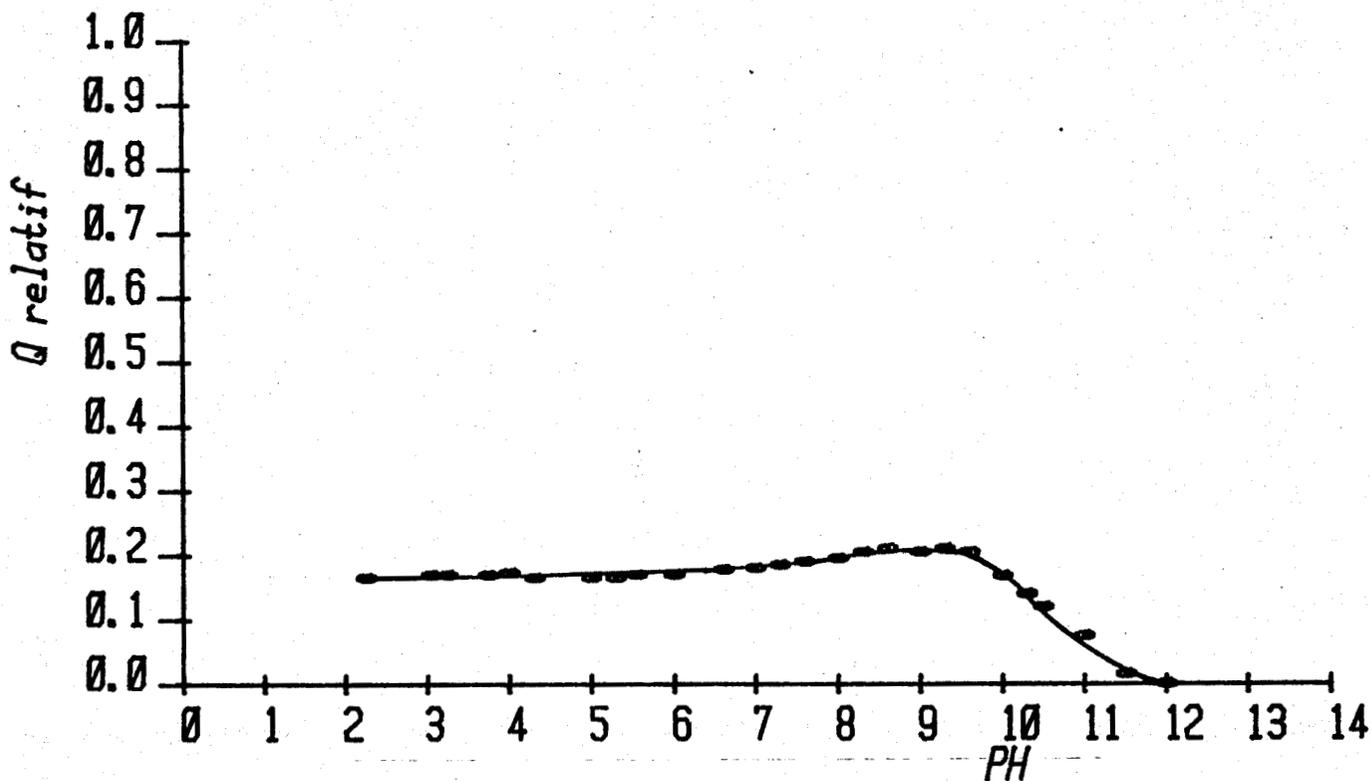


FIG 4:  $Q_r=f(PH)$  pour TyrProGlyGly

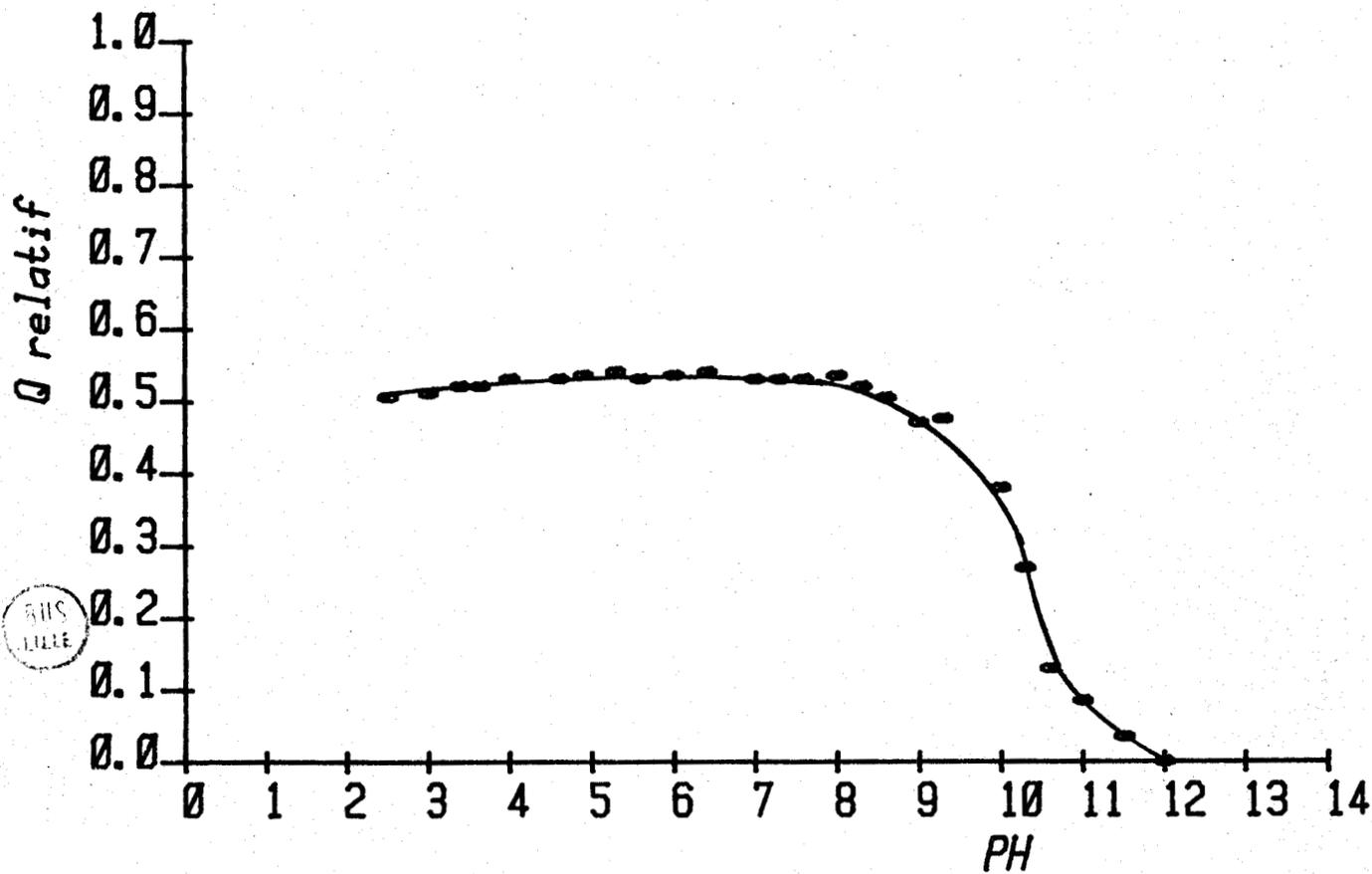


FIG 5:  $Q_r=f(PH)$  pour GlyProTyrGly

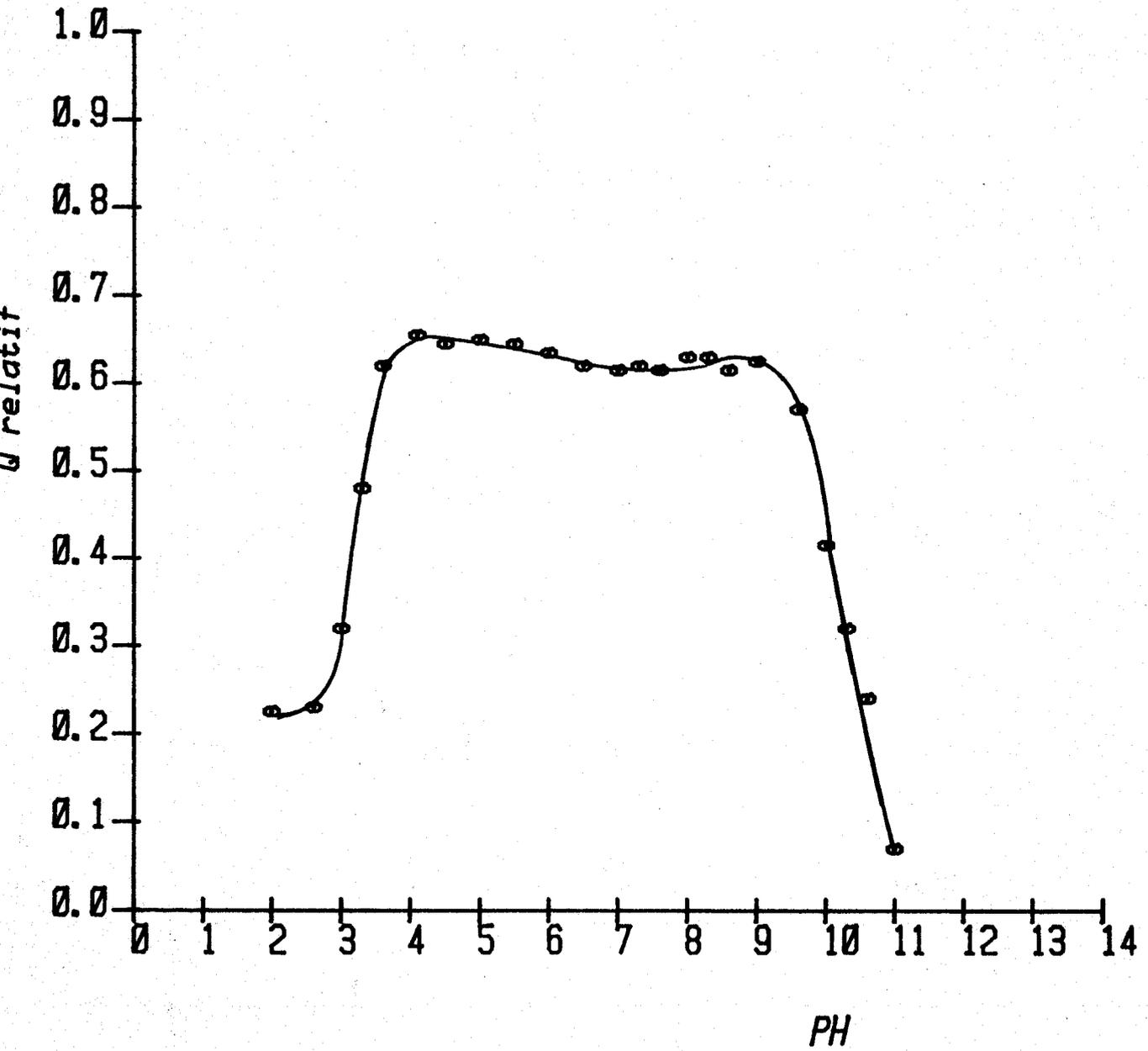


FIG 6:  $Q_r=f(PH)$  pour GlyProGlyTyr



Les figures 4, 5 et 6 représentent l'évolution du rendement quantique en fonction du pH des mêmes composés dans l'eau.

### C - Discussion

On constate tout d'abord que les longueurs d'onde d'émission maximum sont, comme prévues, très voisines. Quel que soit le peptide les perturbations des niveaux électroniques fondamentaux et excités sont identiques.

#### 1 - Milieu dioxanne

Le rendement quantique de tous les composés est augmenté dans le dioxanne. Ce phénomène a été constaté également par EDELHOCH (F10) dans les dicétopiperazines de la tyrosine. Il l'explique par une influence directe du solvant sur les phénomènes d'extinction de fluorescence et par un changement de conformation des composés dans le dioxanne.

D'après les résultats d'EDELHOCH sur la tyrosinamide on peut évaluer que l'effet direct du dioxanne sur la fluorescence (sans changement de conformation) multiplie le rendement quantique environ par 3. Cet ordre de grandeur est observé dans nos mesures.

On peut remarquer également que les différences relatives de rendement quantique sont beaucoup plus faibles dans le dioxanne. Les effets de structures primaire et secondaire sont peu importants, de ce fait les études fluorimétriques dans ce milieu présentent peu d'intérêt.

#### 2 - Milieu méthanol

Le méthanol permet d'utiliser tous les dérivés de la tyrosine, protégés ou non. Malheureusement il existe très peu d'études fluorimétriques dans ce milieu. La constante diélectrique étant inférieure à celle de l'eau on peut supposer que les effets d'extinction intramoléculaires sont moins importants ce qui expliquerait l'augmentation des valeurs de rendement quantique.

Pour les peptides libres les résultats relatifs sont comparables à ceux de l'eau et seront interprétés avec les mêmes critères.

Si les fonctions amines et carboxyliques sont protégées on constate une forte augmentation de la fluorescence quand la tyrosine est en position N terminale. Lorsque les peptides sont en solution aqueuse on sait que la présence d'un groupement  $^+NH_3$  augmente fortement l'extinction. Dans le méthanol la fonction  $NH_2$  peut être protonée, mais le taux de protonation est plus faible que dans l'eau et il est normal que le rendement quantique de YPGG soit alors supérieur. D'autre part la présence d'un groupement tBoc supprime la possibilité de former  $^+NH_3$ , ce qui expliquerait le rendement quantique élevé de tBoc YPGGMe.

Quand la tyrosine est en position C terminale le rendement quantique diminue en présence de l'ester. L'effet d'extinction des esters (dans l'eau) est équivalent à celui des amides et des acides protonés. On peut donc trouver dans le méthanol un phénomène analogue.

La fluorescence élevée de tBoc GPYG Me est moins facile à interpréter. Les extrémités étant relativement éloignées leur influence doit être faible d'autant que l'extrémité la plus proche est une fonction ester qui devrait diminuer le rendement quantique. Seule une augmentation de la distance entre le phénol et le groupement carbonyle des liaisons peptidiques semble pouvoir rendre compte des résultats expérimentaux. Ceci implique une différence de structure secondaire entre le peptide libre et le peptide protégé.

## 2 - Milieu aqueux

GPGY est le plus fluorescent des trois composés, l'ion carboxylate étant peu "extincteur". Quand on baisse le pH on protone la fonction acide et on observe bien une diminution du rendement quantique.

On peut également remarquer la disparition de la fluorescence lors de la dissociation de l'hydroxyle du phénol,

vers pH 10. On notera, à ce sujet, un comportement identique pour les trois peptides.

YPGG est peu fluorescent, le groupement  $^+NH_3$  est proche de la tyrosine et son effet est important. La légère augmentation vers pH 9 pourrait correspondre au début de la déprotonation tandis qu'en milieu acide aucune différence n'est observée.

Logiquement GPYG présente un rendement quantique intermédiaire avec une faible diminution vers pH 3 - 4 qui pourrait traduire l'influence du groupement C terminal.

On remarque que les résultats obtenus peuvent s'expliquer par les seuls effets de structure primaire. Or, c'est bien la relation conformation - rendement quantique qui présente le plus d'intérêt.

Comme dans toutes les méthodes physico-chimiques l'observation d'un changement de fluorescence lorsque le peptide est en milieu dénaturant serait une preuve de l'existence préalable d'une structure organisée.

Encore faut-il savoir si un changement de conformation dans les petits peptides entraîne systématiquement une modification importante du rendement quantique. C'est dans ce but que nous avons recherché un modèle quantitatif qui essaie de rendre compte de la fluorescence de nos composés.

## C H A P I T R E    I I

### MODELE POUR L'ETUDE DE LA RELATION ENTRE LE RENDEMENT QUANTIQUE ET LA CONFORMATION DES PEPTIDES

La structure organisée la plus probable pour un petit peptide est la structure repliée ou coude. Nous avons postulé que dans l'eau cette structure pouvait ne pas être complètement rigide et nous avons constaté que le critère le plus simple qui la caractérise est la distance entre les carbones  $\alpha$  des résidus 1 et 4 (inférieure à 5,7 Å)

Si toutes les structures repliées ont un rendement quantique inférieur (ou supérieur) à celui correspondant à la structure statistique, la fluorescence est une technique applicable. Si les moyennes des rendements quantiques des deux formes ne sont pas significativement différentes 2 cas peuvent se présenter :

- il n'y a aucune variation engendrée par la dénaturation et on ne peut conclure

- il y a variation du rendement quantique par dénaturation et il existe une structure probablement rigide.

#### I - PRINCIPE DU MODELE

Un grand nombre de conformations sont générées à partir d'angles  $\phi$ ,  $\psi$  et  $\chi$  aléatoires. Pour chaque conformation les coordonnées de chaque atome du peptide sont calculées ainsi que les coordonnées des points suivants :

- Centre du noyau phénolique
- Localisation de la charge négative considérée comme le barycentre de l'atome de carbone et des deux atomes d'oxygène de la fonction carboxylique
- localisation analogue de la charge positive.

A partir des coordonnées correspondantes sont évaluées les distances pouvant régir le rendement quantique (voir chapitre précédent) :

$d_{O, A_1}$	}	distances entre le groupement hydroxyle du phénol et les fonctions carbonyles des premiers, deuxièmes et troisièmes acides aminés
$d_{O, A_2}$		
$d_{O, A_3}$		
$d_{O^-}$		distance entre le groupement hydroxyle du phénol et la charge négative
$d_{P, A_1}$	}	distances entre le centre du noyau phénol et les fonctions carbonyles des premiers, deuxièmes et troisièmes acides aminés
$d_{P, A_2}$		
$d_{P, A_3}$		
$d_{P, +}$	}	distances entre le centre du noyau phénol et les charges positives et négatives
$d_{P, -}$		
$d_{+, -}$		distance entre les deux charges

Les résultats sont regroupés dans deux ensembles I et II selon que la distance entre les carbones  $\alpha$  des résidus 1 et 4 est inférieure ou supérieure à 5,7 Å. La moyenne des valeurs de l'ensemble I correspond à l'ensemble des structures repliées. La moyenne de la somme des valeurs des ensembles I et II correspond à l'ensemble des structures statistiques.

De plus on calcule les valeurs pour une forme coude rigide définie par les angles  $\phi$ ,  $\psi$  des résidus 2 et 3 ( $\beta$  turn).

Pour les structures moyennes les résultats partiels sont contrôlés toutes les 500 structures et le calcul est arrêté quand on n'observe plus de différences significatives dans chaque ensemble.

## II - DESCRIPTION DE L'ALGORITHME

Le calcul étant effectué sur un ordinateur HP 9825 A nous avons dû tenir compte de la capacité de la mémoire relativement faible (24 K) pour le choix des méthodes.

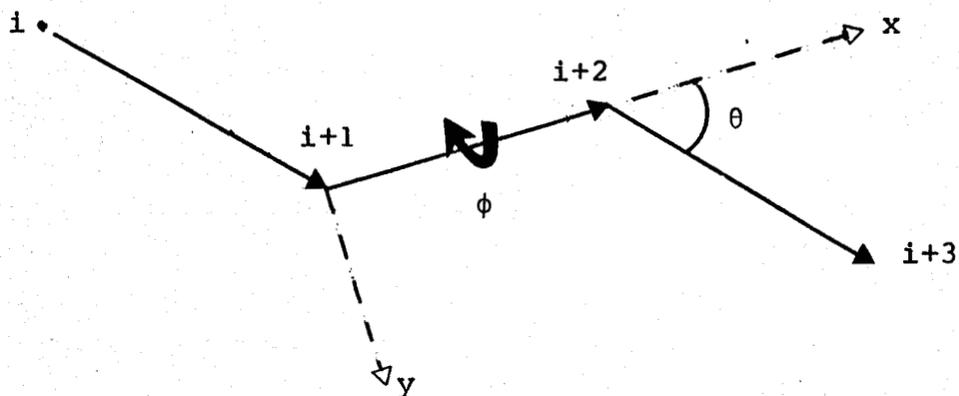
### A - Calcul des coordonnées

Il s'agit de calculer à partir des caractéristiques géométriques (distances interatomiques, angles de valence, angles de torsion) les coordonnées des atomes d'une molécule.

Toutes les méthodes sont basées sur celles de FLORY (F19) utilisant une représentation topologique de la molécule en arbre et définissant un atome à partir des trois précédents. Ce qui caractérise les différents types de calcul c'est la description de l'arbre et son mode de balayage systématique (F20).

Nous avons réalisé un programme à partir de la méthode la plus simple pour l'utilisateur, directement dérivée des calculs de FLORY et qui permettait de tenir compte des limitations de notre ordinateur.

Considérons quatre atomes liés possédant des angles de valence et des liaisons interatomiques fixes :



Supposons que l'on connaisse les coordonnées de  $i+2$  dans un système cartésien à 3 dimensions ayant pour origine  $i+1$ , dont l'axe  $Ox$  est confondu avec la liaison  $i+1 - i+2$ , dont l'axe  $Oy$  est dans le plan défini par  $i, i+1$  et  $i+2$  (son sens étant choisi pour obtenir une projection positive dans le sens  $i - i+1$ ) et dont l'axe  $Oz$  est dans une position conforme à un repère droit.

Si C+3 est défini dans un deuxième système équivalent centré en i+2, la matrice de changement de base du deuxième système dans le premier peut s'écrire :

$$T_{2,3} = \begin{vmatrix} \cos \theta & \sin \theta & 0 \\ \sin \theta \cos \phi & -\cos \theta \cos \phi & \sin \phi \\ \sin \theta \sin \phi & -\cos \theta \sin \phi & -\cos \phi \end{vmatrix}$$

$\theta$  : supplément de l'angle de valence i+1, i+2, i+3

$\phi$  : angle du dièdre défini par les trois liaisons i - i+1, i+1 - i+2, i+2 - i+3.

Les coordonnées du vecteur  $\vec{I}_{2-3}$  joignant i+2 et i+3 sont, dans le système de référence de i+3. :

$$\begin{vmatrix} r_{i+3} \\ 0 \\ 0 \end{vmatrix} \quad r_{i+3} : \text{distance interatomique } i+2 - i+3$$

Dans le système de i+2 les coordonnées de ce vecteur deviennent :

$$T_{2,3} \cdot \begin{vmatrix} r_{i+3} \\ 0 \\ 0 \end{vmatrix} = \begin{vmatrix} \cos \theta \cdot r_{i+3} \\ \sin \theta \cdot \cos \phi \cdot r_{i+3} \\ \sin \theta \cdot \sin \phi \cdot r_{i+3} \end{vmatrix}$$

Si on connaît  $T_{1,2}$ , matrice de passage du système de référence de i+1 au système i+2 les coordonnées de  $\vec{I}_{1,2}$  dans le système i+1 seront de la même manière :

$$T_{1,2} \cdot \begin{vmatrix} r_{i+2} \\ 0 \\ 0 \end{vmatrix}$$

et celles de  $I_{2,3}$

$$T_{1,2} \cdot T_{2,3} \cdot \begin{vmatrix} r_{i+3} \\ 0 \\ 0 \end{vmatrix}$$

Finalement les coordonnées du point  $i+3$  dans le système de référence de  $i+1$  seront la somme des coordonnées des vecteurs qui ont permis de l'atteindre :  $\vec{I}_{1,2} + \vec{I}_{2,3}$ .

Par récurrence on peut calculer ainsi les coordonnées de n'importe quel atome d'une chaîne dans un système situé à une extrémité, si on connaît l'ensemble des  $\phi$  et  $\theta$ .  
Pour un atome  $n$  :

$$x_n = \sum_{i=2}^n \langle T_{1,i} \rangle_{1,1} \cdot r_i$$

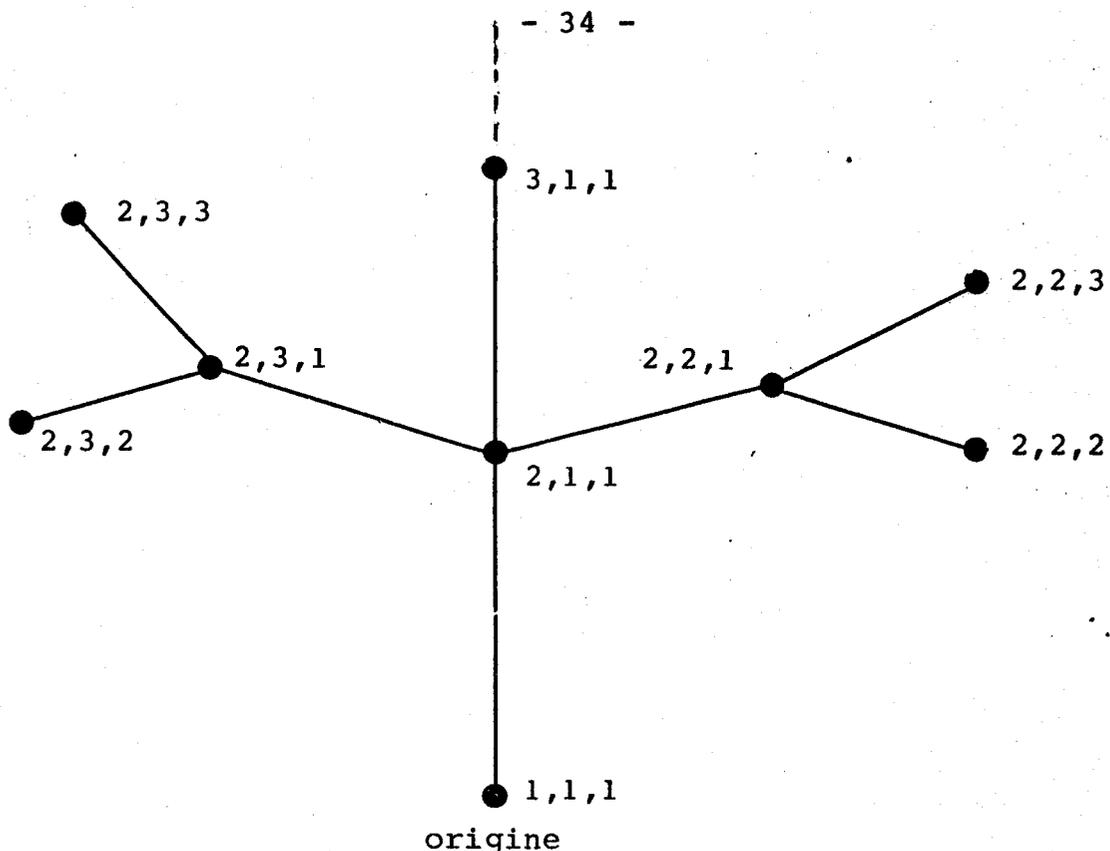
$$y_n = \sum_{i=2}^n \langle T_{1,i} \rangle_{2,1} \cdot r_i \quad r_i : \text{distance interatomique}$$

$$z_n = \sum_{i=2}^n \langle T_{1,i} \rangle_{3,1} \cdot r_i$$

avec :  $\langle T_{1,i} \rangle_{a,b}$  élément  $a, b$  de la matrice

$$T_{1,i} = T_1 \cdot T_2 \cdot \dots \cdot T_i$$

Quand la chaîne est ramifiée il faut déterminer le chemin qui a permis d'atteindre l'atome à partir de l'origine des coordonnées. On utilise, pour cela, un "indicateur" systématique.



Cet "indiciage" permet de trouver automatiquement l'atome précédent dans la description.

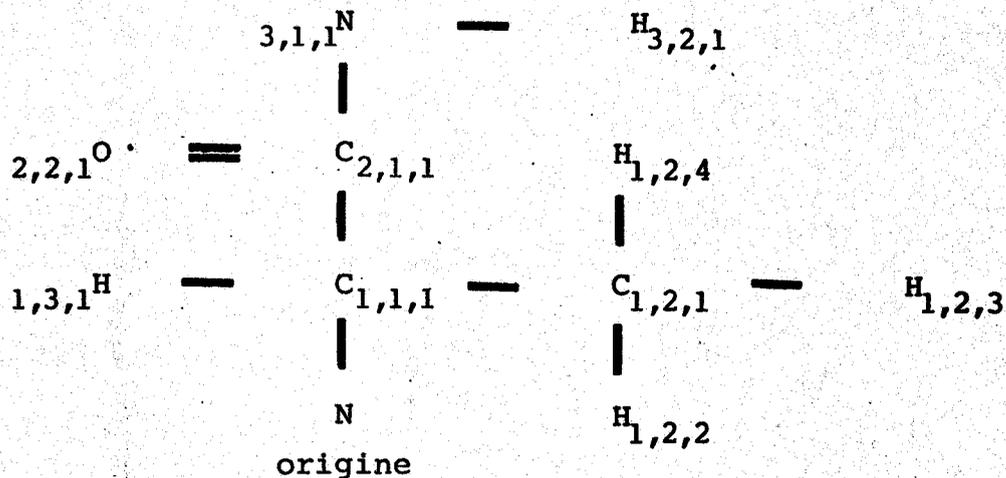
Les atomes de la chaîne principale (ou tronc) sont précédés par l'atome de premier indice inférieur.

Les atomes correspondant à une première ramification (ou branche) sont précédés par l'atome de la chaîne principale ayant le même indice et les deux autres égaux à 1 ( $x, 1, 1$ ).

Les atomes correspondant à une deuxième ramification sont précédés par l'atome ayant les 2 premiers indices identiques et le troisième égal à 1 ( $x, y, 1$ ).

Ce type "d'indiciage" se prête particulièrement bien à un balayage systématique par boucle avec incrémentation des indices dès que le taux de ramification maximum est atteint.

Pour un peptide on pourra indiquer tous les atomes de cette manière. Par exemple, pour le résidu alanyle :



Si  $x, y, z$  représentent les indices d'un atome celui-ci est complètement défini par la distance interatomique avec l'atome précédent  $R(x,y,z)$ , l'angle de valence de ce même atome  $B(x,y,z)$  et par l'angle du dièdre formé par les trois liaisons précédentes  $C(x,y,z)$ .

L'angle du dièdre peut être suivant les conventions habituelles de description des conformations peptidiques :

- $\phi, \phi+120, \phi-120$  pour les atomes précédés d'un carbone  $\alpha$
- $\psi, \psi+180$  pour les atomes précédés du carbone de la liaison peptidique
- 0 ou 180 pour les atomes précédés par l'azote de la liaison peptidique
- $\chi_1, \chi_1+120, \chi_1-120$  pour les atomes précédés d'un carbone C  $\beta$ .

etc.

Remarque :

Par convention  $B(1,1,1) = 57^\circ$  et  $C(1,1,1) = 0$

A partir de toutes ces données on applique les formules précédemment exposées pour obtenir les coordonnées de chaque atome.

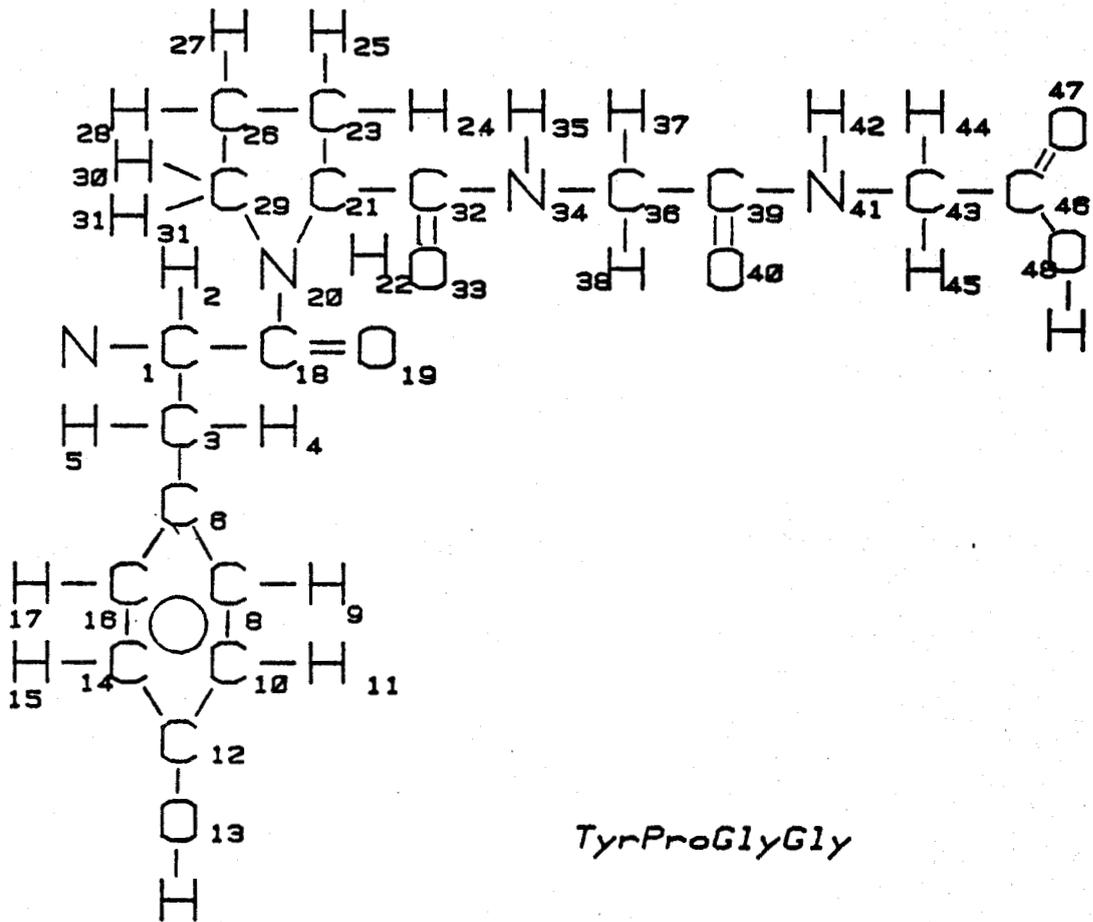
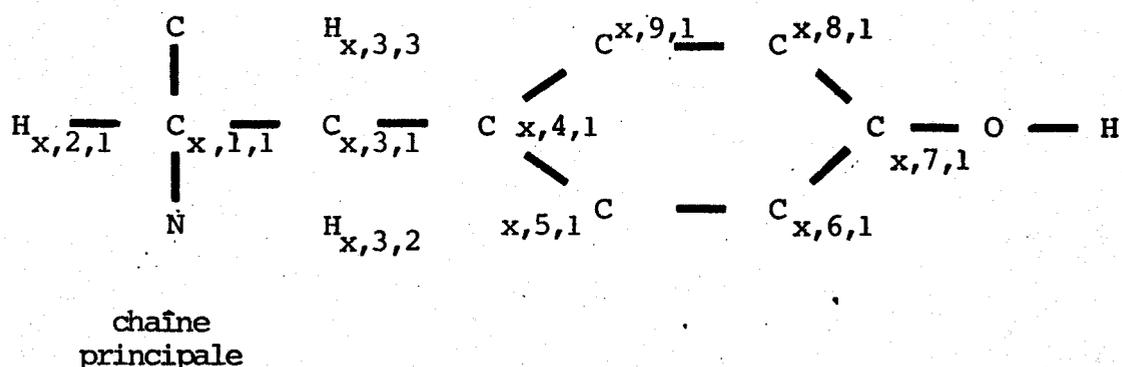


FIG 7: INDICAGE DES  
ATOMES



Le résidu tyrosyle pose un problème pratique. La valence du carbone étant égale à quatre on peut remarquer que chaque indice ne peut dépasser la valeur 3 sauf pour le premier qui correspond à la chaîne principale. Toute ramification doit se traduire par l'addition d'un nouvel indice. On est donc amené, pour définir l'oxygène de l'hydroxyle phénolique de la tyrosine, à utiliser 8 indices. L'ensemble des indices étant tabulés on doit utiliser une matrice à 8 dimensions occupant une grande place mémoire tout en étant pratiquement vide. La taille de notre ordinateur ne le permet pas et pour utiliser la même méthode représentation nous avons transformé provisoirement, dans le cas d'un nombre important de ramifications, la chaîne latérale en chaîne principale ce qui permet "l'indiçage" suivant :



Dans le balayage systématique des atomes, le mode reconnaissance de l'atome précédent est, alors, modifié dès que le deuxième indice est supérieur à 4. Inversement, après avoir atteint l'indice 9, le balayage normal reprend.

"L'indiçage" des atomes est indispensable pour le calcul des coordonnées mais devient peu pratique ensuite. Il est donc remplacé par un nombre correspondant à l'ordre des atomes rencontrés lors du balayage. Un exemple est donné pour le peptide Tyr Pro Gly Gly (fig. 7).

## B - Détermination des conformations permises

Chaque molécule dans une conformation donnée possède une énergie qui est la somme d'un certain nombre de contributions. Le calcul de cette énergie a fait l'objet de nombreuses études : par des méthodes quantiques (F21 à F25) ou par des méthodes semi-empiriques (F26 à F33).

Dans les méthodes semi-empiriques les contributions à l'énergie totale sont :

- l'énergie non liante qui peut être calculée par le potentiel de LENNARD-JONES (F26).

$$U_N = \sum_{i=1}^{n-3} \sum_{j'}^n F \cdot \frac{A}{(r_{ij})^{12}} - \frac{C}{(r_{ij})^6}$$

A, C : constantes déterminées expérimentalement pour chaque couple d'atomes

F : constante de valeur 0,5 pour une interaction 1 - 4, de valeur 1 pour tous les autres types d'interaction

$r_{ij}$  : distance entre les atomes d'indices i et j

$j'$  : indice de l'atome en interaction 1 - 4 avec l'atome d'indice i.

- l'énergie électrostatique (F27)

$$U_E = \sum_{i=1}^{n-3} \sum_{j'}^n 332 \cdot \frac{q_i q_j}{D r_{i,j}}$$

$q_i, q_j$  : charges partielles des atomes i et j

D : constante diélectrique du milieu

- l'énergie des liaisons hydrogène (F28) :

$$U_H = \frac{E}{(r_{H-i})^{12}} - \frac{F}{(r_{H-i})^{10}}$$

E, F : constantes déterminées expérimentalement

$r_{H-i}$  : distance entre l'hydrogène et l'oxygène

- l'énergie de torsion (F27) :

$$U_T = (U_O/r) (1 \pm \cos n\theta)$$

$U_O$  : barrière de potentiel s'opposant à la rotation

n : nombre de barrières rencontrées lors d'une rotation totale

Si on cherche les conformations permises et non les plus stables, on doit éliminer celles dont le potentiel est très élevé.

On peut remarquer que l'énergie des liaisons hydrogène est stabilisatrice et n'est donc pas un critère d'élimination.

Les potentiels de torsion ne sont généralement pas très élevés (la liaison peptidique est considérée comme bloquée), et l'énergie électrostatique est soit faible, si les atomes ne sont pas chargés, soit stabilisatrice, dans nos modèles, puisque nous considérons que seules les extrémités peuvent être ionisées (en pratique nous travaillons à des pH inférieurs à 9 et l'hydroxyle phénolique n'est pas dissocié).

Par contre l'énergie non liante croît très rapidement vers l'infini quand  $r_{ij}$  tend vers de petites valeurs, et cette énergie peut être prise comme critère principal des conformations interdites.

Le potentiel de LENNARD-JONES peut être relié directement à un effet stérique. Son minimum correspond (F29, F30) à la distance de contact de VAN DER WAALS et il est alors remplaçable, avec une bonne approximation, par un modèle de sphères dures (F31).

Ce modèle est du type tout ou rien. Si la distance entre deux atomes du peptide (non voisins dans la structure primaire) est inférieure à la distance de VAN DER WAALS caractéristique de ce couple d'atomes, la conformation est stériquement interdite.

Nous avons utilisé ce dernier modèle qui a l'avantage de n'exiger qu'un nombre restreint de valeurs de référence (distances de VAN DER WAALS) et convenait tout à fait à notre ordinateur. Pour une conformation donnée toutes les distances interatomiques des couples d'atomes non voisins ont donc été calculées. Si une seule d'entre elles est inférieure à la distance de VAN DER WAALS correspondante, la conformation est impossible.

### C - Génération aléatoire des angles

Lorsqu'on cherche à déterminer une énergie minimum le problème du balayage de l'espace des angles est très important. Il est généralement résolu soit en partant de valeurs supposées voisines de ce minimum, soit en utilisant une méthode statistique du type MONTE CARLO (F32).

Nous recherchons des distances moyennes entre différents points d'un peptide suivant le type de conformation. La variation des valeurs obtenues en fonction du nombre de conformations utilisées représente un critère de validité de l'échantillon, si on utilise une méthode statistique. C'est pourquoi nous avons généré d'une manière aléatoire tous les angles définissant la conformation. Ensuite, en appliquant le modèle de sphère dure, cette conformation a été éliminée ou conservée. Dans le cas favorable l'ensemble des distances, faisant l'objet de cette étude, ont été calculées et introduites

dans l'ensemble correspondant à la conformation statistique ou repliée. Des moyennes de ces distances ont été effectuées régulièrement et le calcul a été arrêté dès que ces moyennes restaient pratiquement constantes.

Pour obtenir des angles de manière aléatoire nous avons utilisé la fonction nombre aléatoire du calculateur. Mais pour éviter un trop grand nombre d'essais infructueux nous n'avons transformé ce nombre qu'en angles compatibles avec les valeurs de  $\phi$  et  $\psi$  correspondant à des structures possibles des acides aminés respectifs (F33).

Pour les angles  $\chi_1$  de la tyrosine le choix aléatoire se fait entre les trois valeurs de rotamères -  $60^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $180^\circ$ . L'angle  $\chi_2$  est fixé à  $90^\circ$  (F34, F35).

### III - RESULTATS

Les résultats sont résumés dans les tableaux 3, 4 et 5.

Les valeurs des distances sont exprimées en angströms. Le pourcentage des formes repliées est calculé à partir du rapport nombre de structures repliées trouvé sur nombre total de structures générées.

Environ 4000 structures ont été nécessaires pour obtenir des valeurs pratiquement invariantes; la précision effectivement obtenue est de l'ordre de la deuxième décimale.

#### Remarque relative aux tableaux

- La nomenclature des distances est donnée dans le paragraphe "Principe du modèle"

- La forme repliée correspond à une distance entre les carbones  $\alpha$  du premier et du quatrième acide aminé inférieure à  $5,7 \text{ \AA}$  sans qu'il y ait obligatoirement une liaison hydrogène stabilisatrice

- La conformation "coude  $\beta$ " correspond à des angles  $\phi$ ,  $\psi$  (des deuxième et troisième acides aminés) fixes.

Pourcentage de formes repliées 11 %

	Conformation "statistique"	Conformation "repliée"	Conformation "coude $\beta$ "
$d_{P,A_1}$	4,43	4,66	5,08
$d_{P,A_2}$	6,71	7,59	7,62
$d_{P,A_3}$	8,37	8,02	8,52
$d_{P,+}$	4,51	4,36	4,29
$d_{P,-}$	9,98	7	6,82
$d_{O,-}$	11,32	8,92	9,13
$d_{O,A_1}$	6,85	7,01	7,62
$d_{O,A_2}$	8,63	9,66	10,43
$d_{O,A_3}$	9,91	9,97	10,05
$d_{+,-}$	9,99	7,01	6,8

TABLEAU 3

*Distances dans le peptide*

*Tyr - Pro - Gly - Gly*



Pourcentage de formes repliées : 16 %

	Conformation "statistique"	Conformation "repliée"	Conformation "coude $\beta$ "
$d_{P,A_1}$	6,22	6,81	6,6
$d_{P,A_2}$	5,31	5,19	5,8
$d_{P,A_3}$	4,47	4,48	4,43
$d_{P,+}$	8,5	8,42	7,65
$d_{P,-}$	6,9	7,38	7,4
$d_{O,-}$	8,5	9,11	9,12
$d_{O,A_1}$	8,04	8,65	8,44
$d_{O,A_2}$	7,34	7,19	7,8
$d_{O,A_3}$	6,56	6,62	6,53
$d_{+,-}$	9,07	6,32	6,27

TABLEAU 4

*Distances dans le peptide*

*Gly - Pro - Tyr - Gly*



Pourcentage de formes repliées : 12 %

	Conformation "statistique"	Conformation "repliée"	Conformation "coude $\beta$ "
$d_{P,A_1}$	8,03	6,59	5,55
$d_{P,A_2}$	7,35	7,74	7,22
$d_{P,A_3}$	5,28	5,24	5,05
$d_{P,+}$	10,01	7,28	6,97
$d_{P,-}$	4,54	4,47	4,57
$d_{O,-}$	6,64	6,54	6,67
$d_{O,A_1}$	9,62	8,58	7,72
$d_{O,A_2}$	9,03	9,56	9,19
$d_{O,A_3}$	7,33	7,28	7,09
$d_{+,-}$	9,33	5,97	6

TABLEAU 5

*Distances dans le peptide  
Gly - Pro - Gly - Tyr*



A - Peptide Tyr - Pro - Gly - Gly

Considérons tout d'abord les effets qui doivent être prépondérants : la distance du noyau phénol à la plus proche fonction carbonyle d'une liaison peptidique et la distance de ce noyau à la charge positive ( $d_{p,A_1}$  et  $d_{p,+}$ ). On peut remarquer que la variation de ces distances en fonction de la conformation n'excède pas 15 %.

Il en est pratiquement de même pour toutes les autres distances sauf  $d_{p,-}$ ,  $d_{O,-}$ , et  $d_{+,-}$ . La distance  $d_{p,-}$  n'a pas une importance primordiale pour le rendement quantique du peptide sous forme de zwitterion. Tout au plus pourrait-elle expliquer l'influence de la protonation du carbonyle sur le rendement quantique quand le pH diminue. La variation de la distance  $d_{O,-}$  pourrait entraîner un transfert du proton de l'hydroxyle (du phénol) dans une seule des conformations. Mais, dans le meilleur des cas (forme repliée) cette distance reste grande (8,92 Å) et le transfert semble très peu probable.

La distance entre les charges extrêmes varie beaucoup. Elle ne peut pas avoir une influence directe sur le rendement quantique, mais la proximité relative d'une charge négative peut perturber l'énergie de la charge positive, qui servait à favoriser l'extinction par action indirecte. Dans ce cas l'extinction de fluorescence serait moins importante dans les formes repliées que dans les formes statistiques. Mais on peut remarquer que la fonction carbonyle de la tyrosine a une probabilité plus grande de former une liaison hydrogène dans la forme repliée. L'existence d'une liaison hydrogène favorise le transfert de charge entre le noyau phényle excité et le groupement carbonyle, c'est-à-dire favorise l'extinction. L'effet de la charge positive et de la liaison hydrogène sont antagonistes dans la forme repliée et on peut difficilement prévoir, théoriquement, une différence de rendement quantique entre les formes repliées et statistiques de ce peptide.

B - Peptide Gly - Pro - Tyr - Gly

On peut remarquer qu'aucune des distances ne varie de plus de 10 % en fonction de la conformation, à l'exception de la distance  $d_{+,-}$ .

Le noyau phénol de la tyrosine étant plus proche de la charge négative que de la charge positive on peut penser que la modification de la distance  $d_{+,-}$  n'aura aucune influence sur le rendement quantique. Pour ce peptide on retrouve l'impossibilité de distinguer théoriquement une forme repliée d'une forme statistique par la mesure du rendement quantique.

C - Peptide Gly - Pro - Gly - Tyr

Le repliement de la chaîne entraîne un rapprochement du centre du noyau phénolique et de la fonction carbonyle de la glycine située du côté N - terminal. Parallèlement le centre du noyau phénolique est plus proche de la charge positive quand le peptide est sous forme repliée. La fonction carbonyle ayant une probabilité plus grande de former une liaison hydrogène dans la forme repliée, tous les arguments sont en faveur d'une diminution du rendement quantique quand la conformation est repliée. Mais il faut remarquer que les différences sont beaucoup plus nettes dans le cas du coude  $\beta$  que dans le cas de la forme "statistiquement repliée".

D'autre part, si l'augmentation de l'extinction par la charge positive implique un effet électronique transmis par la chaîne peptidique, l'effet de la charge positive sur le dernier acide aminé est négligeable quelle que soit la distance qui les sépare dans l'espace.

IV - CONCLUSIONS

Le modèle que nous avons réalisé a permis d'étudier théoriquement une propriété fluorimétrique donnée (le rendement quantique) de trois peptides particuliers dans

un solvant donné, l'eau. Avant de tirer des conclusions et d'essayer de les généraliser, on peut remarquer que ce modèle est basé sur l'hypothèse fondamentale que, dans l'eau, les conformations des peptides ne doivent pas être rigides du fait des multiples interactions eau - peptide qui peuvent s'ajouter aux interactions intramoléculaires du peptide. On constate que si l'on choisit des conformations rigides particulières des différentes formes repliées ou statistiques on peut obtenir des résultats totalement différents de ceux indiqués précédemment. Le relatif degré de liberté de chaque atome tend à diminuer la différence des valeurs que l'on obtient pour les formes extrêmes des deux types de conformation. Pour d'autres solvants que l'eau il est donc probable que les conclusions soient très différentes.

Dans le cas de Tyr - Pro - Gly - Gly et Gly - Pro - Tyr - Gly les résultats montrent qu'il est très difficile de prévoir, a priori, une différence de rendement quantique entre les formes statistiques et repliées. Si on confronte ces résultats théoriques aux résultats expérimentaux deux cas peuvent se produire :

- si des essais de dénaturation du peptide ne provoquent aucune variation du rendement quantique on ne peut conclure ni à l'existence d'une structure organisée repliée ni à l'existence d'une structure purement statistique.

- si les essais de dénaturation provoquent une variation du rendement quantique la structure organisée doit être tout à fait rigide puisqu'elle doit correspondre à une valeur singulière de l'ensemble des angles des dièdres.

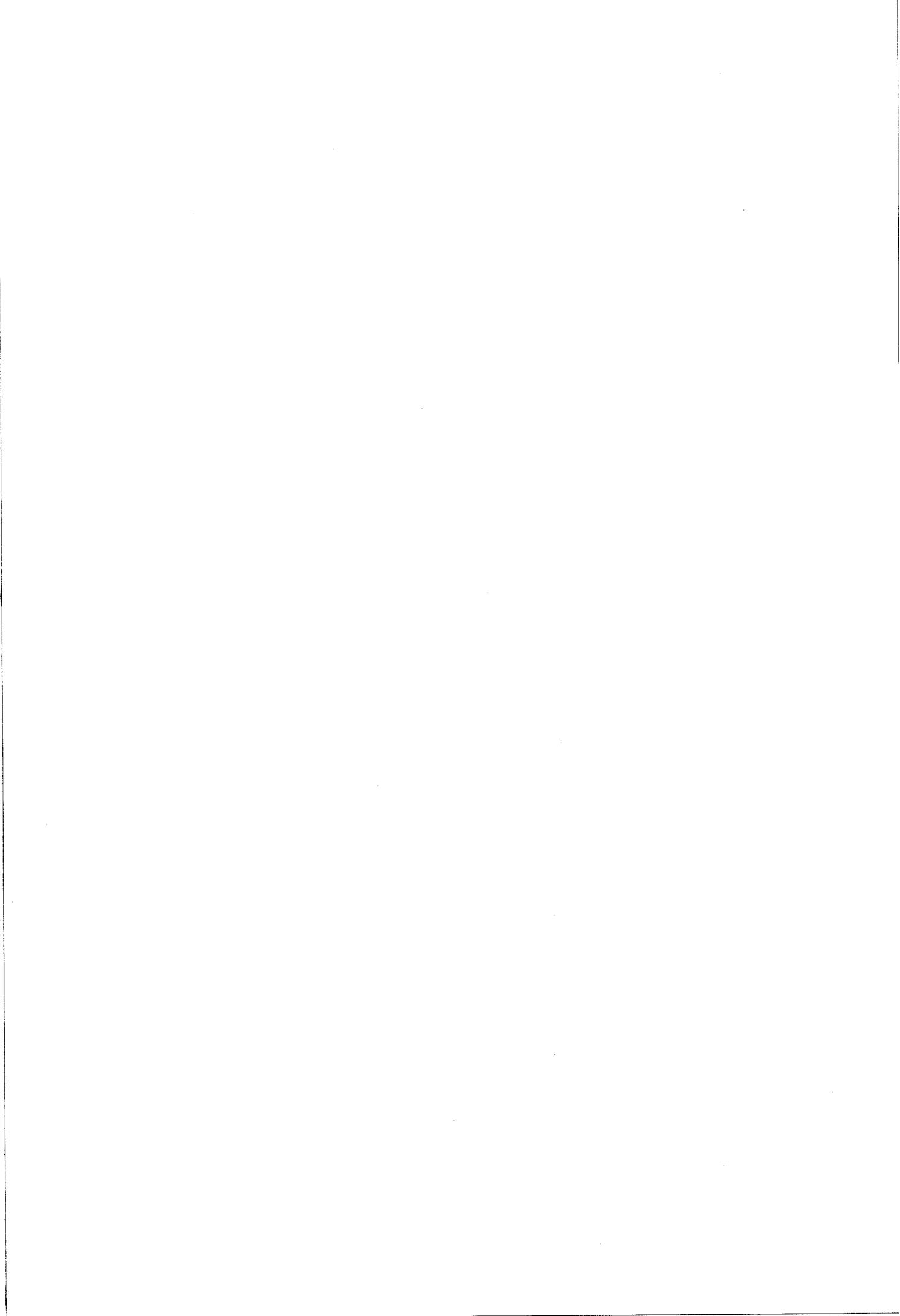
Pour le peptide Gly - Pro - Gly - Tyr l'existence d'une forme repliée devrait se traduire par une augmentation du rendement quantique lors de la dénaturation. Cette augmentation devrait être importante dans le cas de l'existence d'une forme repliée du type "coude  $\beta$ ".

Nous n'avons jamais pu faire varier le rendement quantique relatif de l'un des trois peptides par différents essais de dénaturation. Mais il faut remarquer que la dénaturation des petits peptides dans l'eau pose un certain nombre de problèmes. Si on utilise le chlorure de guanidine comme agent dénaturant on admet implicitement que c'est une liaison hydrogène qui stabilise la forme repliée. Or, on considère généralement que la liaison hydrogène n'est pas une condition nécessaire pour l'existence d'une forme repliée. Si on utilise des concentrations croissantes en ions on ne provoquera une dénaturation du peptide que si les forces électrostatiques sont prépondérantes pour stabiliser une conformation particulière. Or, il est possible que, dans un milieu comme l'eau, aucune des contributions soit prépondérante; dans ce cas, la réalisation pratique de la dénaturation est très difficile.

En résumé pour Tyr - Pro - Gly - Gly et Gly - Pro - Tyr - Gly nous ne pouvons tirer aucune conclusion sur les conformations par l'étude du rendement quantique. Pour Gly - Pro - Gly - Tyr la conformation statistique semble la plus cohérente avec les résultats obtenus. Etant donné la valeur élevée du rendement quantique de ce peptide il est très peu probable que la forme "coude  $\beta$ " soit prépondérante mais il est impossible d'exclure totalement l'existence d'autres formes repliées.

L'ensemble des résultats tend à montrer la limitation du rendement quantique de fluorescence pour la détermination des structures organisées des petits peptides dans l'eau. Bien que cette conclusion ne soit pas en accord avec un certain nombre de travaux d'autres auteurs nous pensons, au vu des résultats, que les effets pouvant influencer sur le rendement quantique sont essentiellement dus à la structure primaire. Les effets dus à la conformation implique une certaine rigidité de la molécule qui ne peut apparaître qu'avec un nombre plus important d'acides aminés ou dans des solvants structurants.

Dans tous les cas un calcul analogue à celui exposé permet de mettre en évidence un certain nombre de paramètres avec plus de précision que les modèles moléculaires généralement employés. L'utilisation de cette méthode est envisagée pour l'étude du rendement quantique de peptides de plus grande taille.



DEUXIEME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE THEORIQUE  
DE LA REACTIVITE DES PEPTIDES

DEUXIEME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE THEORIQUE  
DE LA REACTIVITE DES PHENILES

La mesure du rendement quantique d'un peptide contenant un fluorophore est une méthode statique dont nous avons observé les limitations.

La valeur du rendement quantique d'un peptide dépend des désactivations intramoléculaires. Mais on peut provoquer une diminution de cette valeur en introduisant dans la solution certains composés appelés "extincteurs" de fluorescence (quencher). Le processus de désactivation est alors dû à des chocs intermoléculaires entre une molécule fluorescente et la molécule d'"extincteur". Cette méthode dynamique permet, dans les protéines, d'évaluer expérimentalement l'accessibilité de certains fluorophores mais elle est très peu employée pour les petits peptides. Nous avons donc cherché une relation entre l'extinction de fluorescence et la conformation des peptides.

Du fait des petites dimensions de la molécule peptidique les variations de comportement dynamique ne sont pas très importantes et il a fallu les quantifier, calculer des valeurs théoriques. Constatant la grande analogie entre la réaction chimique et l'extinction de fluorescence il nous a semblé plus commode de traiter ce dernier phénomène comme un cas particulier de la réactivité des peptides.

Les composés étant, dans les études fluorimétriques comme dans les processus biologiques, en faible concentration nous avons considéré que les facteurs limitants dépendant de la conformation, qui gouvernent la réactivité, étaient l'accessibilité de la fonction active et le coefficient de diffusion de la molécule.

Les différents chapitres de cette partie exposent donc les modèles proposés pour relier les différents facteurs à la conformation, et l'introduction de l'accessibilité dans la théorie de la réactivité limitée par la diffusion.

Le chapitre I a été l'objet d'une collaboration avec le Professeur S. PREMILAT de l'Université de NANCY.



## C H A P I T R E I

### DETERMINATION DE L'ACCESSIBILITE D'UNE FONCTION PORTEE PAR UN PEPTIDE

#### I - INTRODUCTION

Soit un peptide P possédant une fonction F susceptible de réagir avec une molécule R. Si la fonction est isolée toute molécule R se dirigeant vers F a une probabilité de réagir qui ne dépend que de l'énergie des deux entités.

Si la réaction entre F et R a lieu quand la distance qui les sépare est égale à  $r_0$ , on peut définir une sphère de réactivité, sphère de rayon  $r_0$  centrée en un point O appelé centre de fonction. Le centre de fonction est, généralement, le point de rencontre des éléments de symétrie des orbitales moléculaires de la fonction considérée comme isolée.

Les atomes du peptide P situés à l'extérieur de la sphère de réactivité interdisent, dans certaines directions de l'espace, l'accès des molécules R à la sphère. Cet empêchement modifie la vitesse globale de la réaction et est lié à la structure primaire et à la conformation du peptide.

Le but de ce chapitre est la recherche d'un algorithme qui permette d'évaluer l'influence de la conformation d'un peptide sur l'accessibilité d'une fonction pour une réaction donnée.

#### II - LES MODELES D'ACCESSIBILITE STATIQUES

Le problème de l'accessibilité a déjà été traité, non pas pour déterminer une réactivité, mais pour évaluer certains paramètres thermodynamiques liés à la surface de contact entre un peptide (ou une protéine) et son solvant (A1 - A6).

Toutes les méthodes employées sont, plus ou moins, l'application du modèle de LEE et RICHARDS.

Dans ce modèle les molécules de solvant sont assimilées à des sphères pouvant rouler sur d'autres sphères représentant les atomes de la molécule de peptide. Le programme conçu par LEE et RICHARDS mesure ainsi la surface de contact entre le solvant et le peptide. L'exposition du peptide au solvant (accessibilité statique) est définie par le rapport :

$$\frac{\text{Surface de contact avec le solvant}}{\text{Surface totale du peptide}}$$

Si cette méthode rend bien compte des phénomènes d'interaction solvant-soluté, elle est moins adaptée à l'étude de la réactivité d'une fonction particulière pour les raisons suivantes :

LEE et RICHARDS utilisent, pour leur calcul, une suite d'atomes pris individuellement et non des fonctions susceptibles de réagir, possédant leur propre centre de symétrie et une sphère de réactivité déterminée.

D'autre part, les méthodes de calcul théorique des vitesses de réaction généralement utilisées concernent des entités réactionnelles en concentration faible diffusant l'une vers l'autre. Les trajectoires relatives du réactif et de la fonction peuvent, statistiquement, être considérées comme des droites au voisinage de la sphère de réactivité. Dans ces conditions, des atomes appartenant à la molécule de peptide peuvent couper certaines trajectoires, diminuant ainsi le nombre de rencontres efficaces. Ce type d'empêchement stérique peut être prédominant et n'est pas pris en compte par le modèle de LEE et RICHARDS.

Nous avons donc essayé d'établir un algorithme différent utilisable pour l'étude de la réactivité.

### III - MODELE D'ACCESSIBILITE DYNAMIQUE PROPOSE

#### A - Principe

Comme nous l'avons déjà signalé si une réaction bimoléculaire est uniquement gouvernée par la diffusion (absence de toute force entre les deux réactifs) on peut considérer les trajectoires statistiques des molécules R vers une molécule P comme des demi-droites convergeant vers cette molécule.

La fonction F, réactive, étant liée à la molécule P on peut considérer de la même façon que les trajectoires des molécules R susceptibles de réagir sont des demi-droites convergeant vers le centre de réactivité de F. Si  $n_T$  est le nombre total des trajectoires permettant d'atteindre F et n le nombre des trajectoires effectivement permises (en tenant compte de l'encombrement stérique des atomes du peptide) l'accessibilité dynamique peut se définir par le rapport :  $\frac{n}{n_T}$ .

Le nombre des trajectoires étant théoriquement infini le problème sera d'en choisir un nombre discret et de relier le nombre de trajectoires coupées à la conformation du peptide.

#### B - Choix des trajectoires

Soit un faisceau de demi-droites passant par le centre de fonction O. Ce faisceau peut représenter l'ensemble des trajectoires permettant d'atteindre la sphère de réactivité.

Si le système cartésien de référence est centré en O chacune des demi-droites peut être définie par deux de ses coordonnées polaires F et Q (Fig. 8) et par les équations :

$$x = R \cos Q \sin F \quad 0 \leq R < + \infty$$

$$y = R \sin Q \sin F \quad \text{avec} \quad 0 \leq Q < 2 \pi$$

$$z = R \cos F \quad 0 \leq F \leq \pi$$

Pour choisir un nombre discret de trajectoires considérons A un entier tel que  $P = 180/N$  soit également entier.

FIG 8:

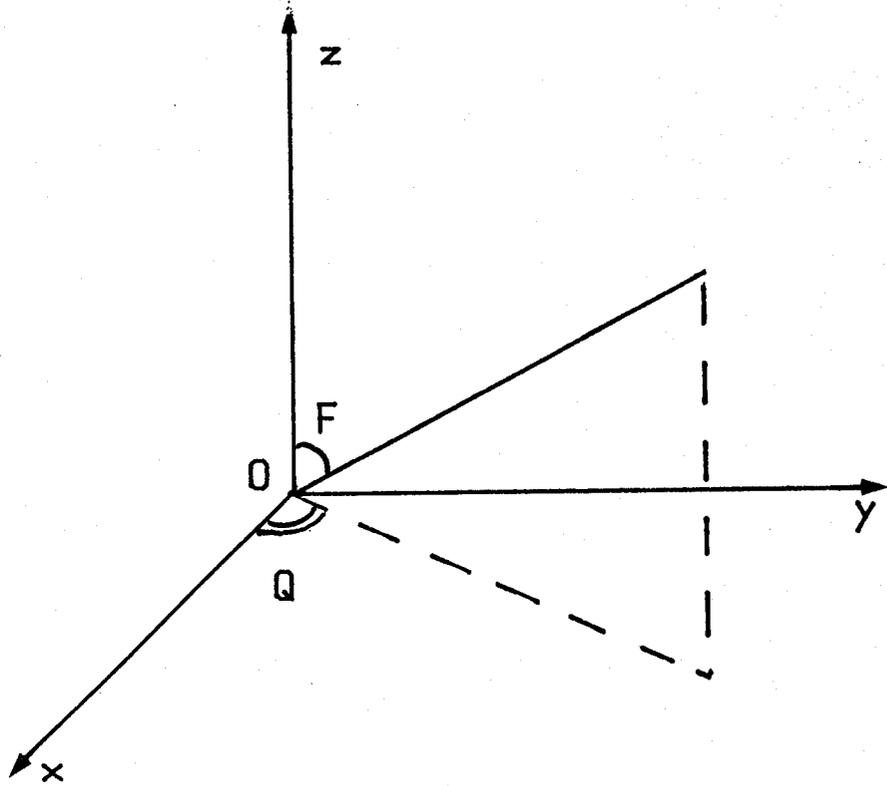
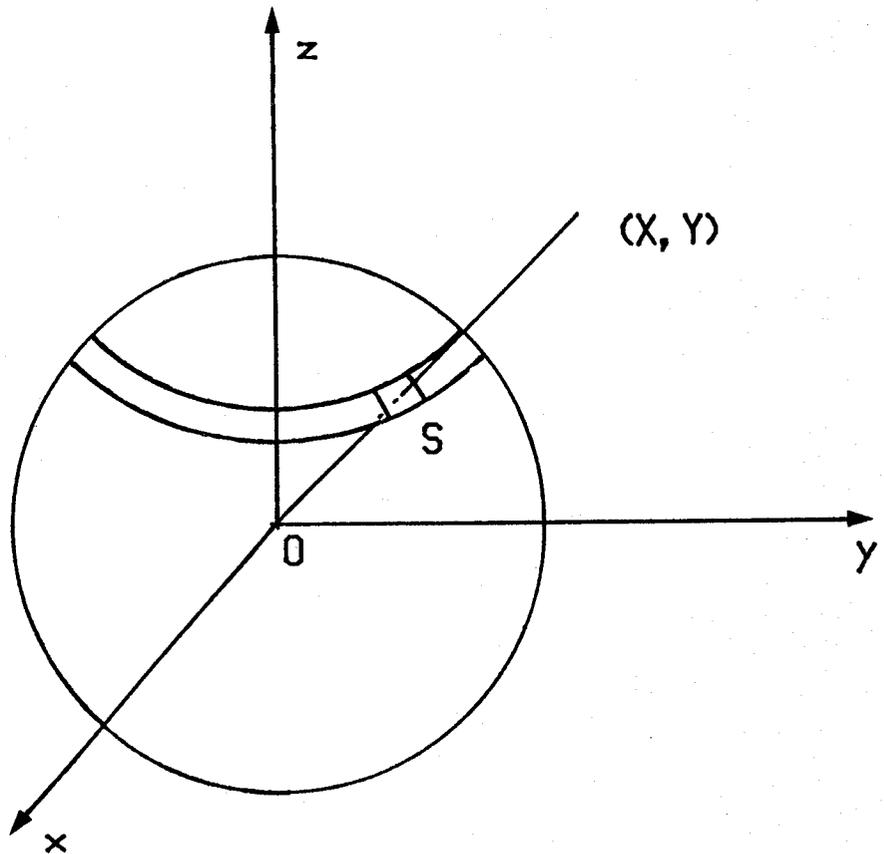


FIG 9:



Soit un couple de nombres  $X, Y$  (entiers) tels que  $1 \leq X < N$  et  $0 \leq Y \leq 2N-1$  ; on peut faire correspondre à ce couple la demi-droite d'équation :

$$x = R \cos YP \sin XP$$

$$y = R \sin YP \sin XP \quad \text{avec } 0 \leq R < + \infty$$

$$z = R \cos XP$$

L'ensemble des demi-droites correspondant à tous les couples représentera l'ensemble discret des trajectoires, nous y ajouterons les deux demi-droites confondues avec l'axe Oz d'équation :

$$\begin{array}{ll} x = 0 & x = 0 \\ y = 0 & \text{et} \quad y = 0 \\ z = R & z = -R \end{array}$$

En tout  $2N(N-1) + 2$  trajectoires sont ainsi définies.

L'avantage de cette description est double : le nombre de trajectoires, qui ne dépend que de  $N$ , est aisément choisi et, surtout, chaque trajectoire peut être repérée par un élément de matrice rectangulaire qui se prête bien à un balayage systématique.

Si la fonction était isolée dans l'espace, chaque trajectoire devrait avoir une probabilité égale d'être suivie par une molécule  $R$ . Ce qui revient à dire que les trajectoires doivent être réparties d'une manière uniforme dans tout l'espace.

On peut voir que ce n'est pas le cas de notre ensemble et il faut attribuer à chaque trajectoire un poids statistique : probabilité pour qu'une molécule de réactif la suive.

Soit une trajectoire coupant une sphère de réactivité de rayon  $r_0$ . On peut considérer que l'intersection de la demi-droite et de la sphère est le centre d'un élément de surface  $S[X, Y]$  (Fig. 9). Un réactif de rayon très petit par rapport à  $r_0$  et se dirigeant vers 0 a une probabilité d'atteindre la sphère en  $S[X, Y]$  égale à :

$$p = \frac{S[X,Y]}{4 \pi r_0^2}$$

Cette probabilité représentera le poids statistique de la trajectoire X, Y.

La surface  $S[X,Y]$  est une fraction de la couronne définie par les rayons d'angles polaires :

$$F_1 = XP + \frac{P}{2}; \quad F_2 = XP - \frac{P}{2}$$

la surface de la couronne peut s'exprimer :

$$S_C = 2 \pi r_0^2 \left[ \cos \left( XP - \frac{P}{2} \right) - \cos \left( XP + \frac{P}{2} \right) \right]$$

Il existe dans cette couronne 2 N surfaces élémentaires ( $0 \leq Y \leq 2N-1$ ) d'où :

$$S[X,Y] = \frac{S_C}{2N} = \frac{\pi}{N} r_0^2 \left[ \cos \left( XP - \frac{P}{2} \right) - \cos \left( XP + \frac{P}{2} \right) \right]$$

Remarque :

Les surfaces correspondant aux trajectoires polaires sont égales aux surfaces des calottes :

$$S_p = 2 \pi r_0^2 \left( 1 - \cos \frac{P}{2} \right)$$

Le poids statistique d'une trajectoire est alors égal

$$\begin{aligned} \text{à :} \quad p &= \frac{S[X,Y]}{4 \pi r_0^2} = \frac{1}{4N} \left[ \cos \left( XP - \frac{P}{2} \right) - \cos \left( XP + \frac{P}{2} \right) \right] = H[X,Y] \end{aligned}$$

avec pour une trajectoire polaire :

$$p' = \frac{1}{2N} \left( 1 - \cos \frac{P}{2} \right) = H_0$$

L'ensemble des trajectoires est enfin représenté par une matrice  $H[X,Y]$  dont chaque élément correspond au poids statistique de sa trajectoire, plus les deux poids statistiques des trajectoires polaires.

C - Calcul de "l'accessibilité dynamique"

L'accessibilité dynamique d'une fonction portée par un peptide sera définie comme :

$$C = \sum_X \sum_Y H[X, Y] + (a+b)H_0$$

les éléments correspondant à des trajectoires interdites étant annulés (a ou b sont égaux à 0 ou 1).

Quand toutes les trajectoires sont possibles l'accessibilité est donc égale à 1 sinon elle est exprimée par un nombre inférieur à 1.

D - Détermination des trajectoires coupées :

1 - Changement de base

Pour simplifier le problème de la détermination des trajectoires coupées il convient d'exprimer les coordonnées des atomes du peptide dans le système où sont définies les trajectoires c'est-à-dire dans un repère orthonormé d'origine 0 (centre de fonction).

Généralement, le calcul des coordonnées atomiques d'un peptide se fait dans un repère d'origine C différent de 0. Il faut, alors, exprimer les coordonnées dans la base centrée en 0.

Soit  $x', y', z'$  les coordonnées cartésiennes du centre d'un atome dans le système centré en C et  $x, y, z$  les coordonnées du même atome dans le système centré en 0.

$$x' = x'_0 + a_1^1 x + a_2^1 y + a_3^1 z$$

$$y' = y'_0 + a_1^2 x + a_2^2 y + a_3^2 z$$

$$z' = z'_0 + a_1^3 x + a_2^3 y + a_3^3 z$$

$x'_0, y'_0, z'_0$  sont les coordonnées de O dans le système d'origine C. Les constantes  $a_j^i$  sont les éléments de la matrice de changement de base c'est-à-dire les coordonnées des vecteurs de la base O dans le système d'origine C.

Considérant la symétrie de la sphère de réactivité on peut remarquer que l'accessibilité est, en principe, indépendante de la direction des axes du repère cartésien centré en O, ce qui nous permet de choisir le système le plus commode pour le calcul.

Soit A l'atome d'indice immédiatement inférieur à celui du centre de fonction dans la description des atomes. A sera, par convention, situé sur l'axe Ox. On en déduit immédiatement que :

$$a_1^1 = \frac{X}{\sqrt{X^2 + Y^2 + Z^2}} \quad X = x_A - x_0$$

$$a_1^2 = \frac{Y}{\sqrt{X^2 + Y^2 + Z^2}} \quad Y = y_A - y_0$$

$$a_1^3 = \frac{Z}{\sqrt{X^2 + Y^2 + Z^2}} \quad Z = z_A - z_0$$

Le deuxième vecteur de la base doit être orthogonal au premier et possède un degré de liberté, pour simplifier l'expression du produit scalaire, nous fixerons arbitrairement  $a_2^1 = 0$  ce qui entraîne :

$$a_2^1 = 0 \quad a_2^2 = \frac{Z}{\sqrt{Y^2 + Z^2}} \quad a_2^3 = -\frac{Y}{\sqrt{Y^2 + Z^2}}$$

Le troisième vecteur est alors totalement défini :

$$a_3^1 = -\frac{Y^2 + Z^2}{\sqrt{(Y^2 + Z^2)^2 + X^2 Y^2 + X^2 Z^2}}$$

$$a_3^2 = \frac{XY}{\sqrt{(Y^2+Z^2)^2 + X^2Y^2 + X^2Z^2}}$$

$$a_3^3 = \frac{XZ}{\sqrt{(Y^2+Z^2)^2 + X^2Y^2 + X^2Z^2}}$$

Les deux bases étant orthonormées le déterminant de la matrice de changement de base est égal à 1 et les nouvelles coordonnées sont définies par :

$$x = \det \begin{vmatrix} (x' - x_0) & a_2^1 & a_3^1 \\ (y' - y_0) & a_2^2 & a_3^2 \\ (z' - z_0) & a_2^3 & a_3^3 \end{vmatrix} \quad y = \det \begin{vmatrix} a_1^1 & (x' - x_0) & a_3^1 \\ a_1^2 & (y' - y_0) & a_3^2 \\ a_1^3 & (z' - z_0) & a_3^3 \end{vmatrix}$$

$$z = \det \begin{vmatrix} a_1^1 & a_2^1 & (x' - x_0) \\ a_1^2 & a_2^2 & (y' - y_0) \\ a_1^3 & a_2^3 & (z' - z_0) \end{vmatrix}$$

Les coordonnées utilisées seront désormais celles de la nouvelle base.

## 2 - Détermination de la distance d'un atome à une trajectoire

Soit  $x_I, y_I, z_I$  les coordonnées du centre I d'un atome. Calculons la distance d de ce point à une trajectoire définie par le couple d'entiers X, Y.

Soit T un point de la trajectoire, la distance entre I et T est exprimée par :

$$d_{I-T} = \left\{ (x_T - x_I)^2 + (y_T - y_I)^2 + (z_T - z_I)^2 \right\}^{1/2}$$

soit :

$$d_{I-T} = \left\{ (R \cos YP \sin XP - x_I)^2 + (R \sin YP \sin XP - y_I)^2 + (R \cos XP - z_I)^2 \right\}^{1/2}$$

la distance de I à la trajectoire est donc égale à :

$$D = \min \left\{ f(R)^{1/2} \right\}$$

avec :

$$f(R) = (R \cos YP \sin XP - x_I)^2 + (R \sin YP \sin XP - y_I)^2 + (R \cos XP - z_I)^2$$

$$D^2 = \min \left\{ f(R) \right\}$$

$$\min \left\{ f(R) \right\} = f(R_0) \quad \text{avec } R_0 \text{ solution de l'équation :}$$

$$\frac{df(R)}{dR} = 0$$

soit :

$$R_0 = \frac{(\cos YP \sin XP)x_I + (\sin YP \sin XP)y_I + (\cos XP)z_I}{(\cos YP \sin XP)^2 + (\sin YP \sin XP)^2 + (\cos XP)^2}$$

finalement :

$$D = \sqrt{f(R_0)}$$

Remarques :

- la distance aux trajectoires polaires est égale à :

$$D_0 = \sqrt{x_I^2 + y_I^2}$$

- Par définition  $R_0$  doit être positif. Sinon la valeur calculée correspond à la distance à la demi-droite de même direction mais de sens contraire.

atome  
du  
peptide

reactif

sphere de reactivité

(a)

O

— : trajectoires  
permises

- - - : trajectoires  
interdites

reactif

(b)

atome  
du  
peptide

O

sphere de reactivité



FIG 10: INFLUENCE DU REACTIF  
SUR L'ACCESSIBILITE

### 3 - Détermination des trajectoires coupées

Pour qu'un atome coupe une trajectoire il faut que la distance D du centre de cet atome à la trajectoire soit inférieure à son rayon de VAN DER WAALS.

La détermination des trajectoires coupées s'effectuera de la façon suivante :

Pour chaque atome du peptide situé à l'extérieur de la sphère de réactivité on calculera la distance entre le centre de cet atome et les différentes trajectoires en parcourant la matrice dans les deux directions. Si la distance est inférieure à son rayon de VAN DER WAALS  $H[X,Y]$  prendra la valeur 0.

Remarque :

Pour accélérer le calcul, le balayage de la matrice aura pour origine l'élément le plus proche des coordonnées polaires du centre de l'atome et s'arrêtera dès que, dans une direction, les éléments  $H[X,Y]$  ne s'annulent plus.

### E - Influence de la dimension du réactif

Les calculs précédents ont été effectués sans tenir compte du réactif ou en considérant un réactif très petit par rapport aux atomes du peptide, ce qui n'est jamais le cas.

Quand un réactif n'est plus assimilable à son centre il convient de redéfinir précisément la notion de sphère de réactivité, c'est-à-dire la distance à laquelle se produit la réaction. Dans notre cas ce sera la distance critique entre les deux centres des fonctions participant à la réaction.

Considérons, tout d'abord, un réactif sphérique assimilé à une fonction (c'est le cas d'un ion monoatomique minéral, par exemple). A l'extérieur de la sphère de réactivité les trajectoires interdites par un atome du peptide sont celles situées à une distance inférieure non plus au rayon de VAN DER WAALS de l'atome mais à la somme des rayons de VAN DER WALLS de l'atome et du réactif (Fig. 10a). Dans ce cas on constate

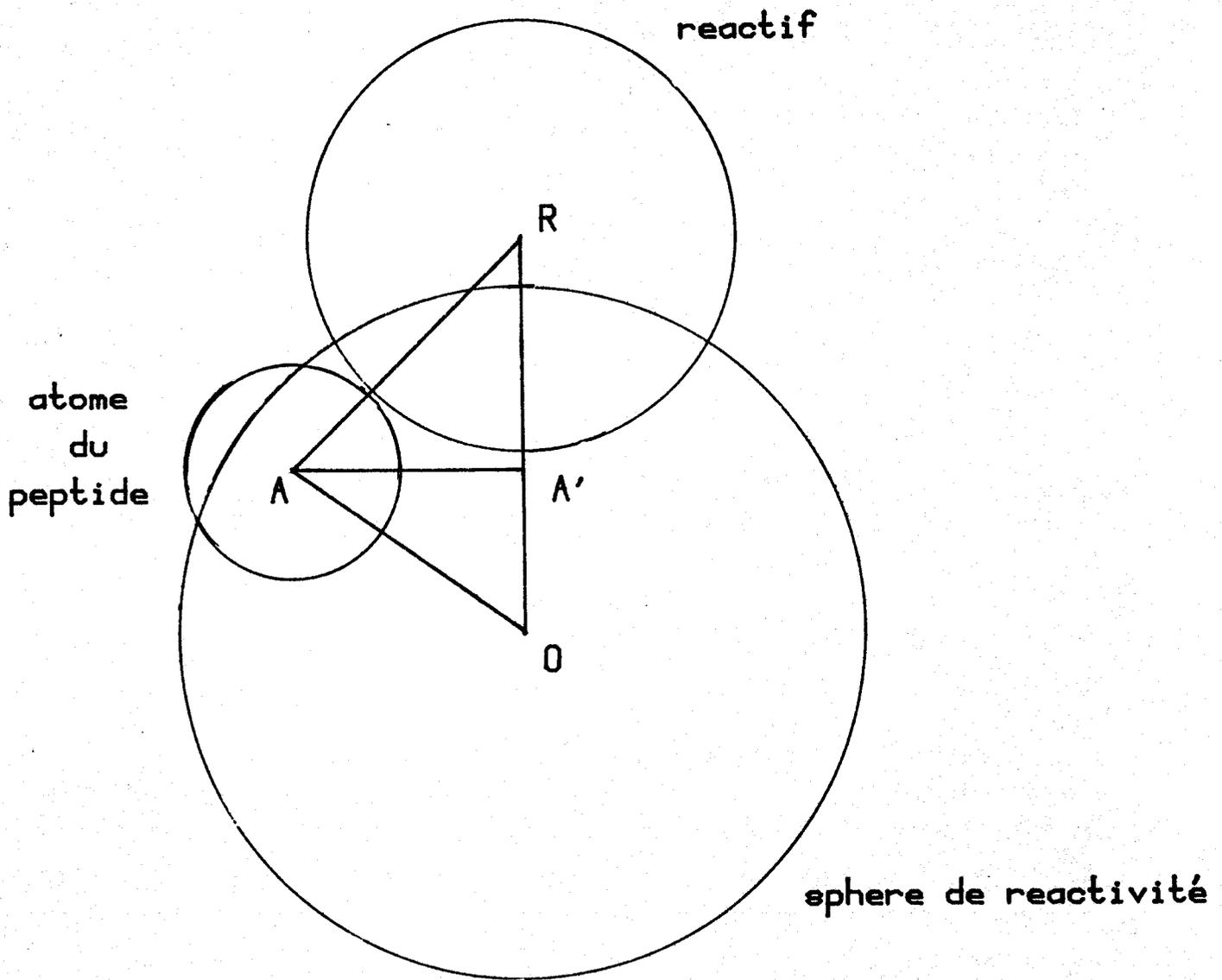


FIG 11: ENCOMBREMENT STERIQUE  
DANS LA SPHERE DE REACTIVITE

(Fig. 10 b) également que des atomes à l'intérieur de la sphère de réactivité interdisent certaines trajectoires qu'il convient de déterminer.

Soit un atome du peptide centré en A à l'intérieur de la sphère de réactivité de centre O, et un réactif assimilé à une sphère de centre R (Fig. 11). Toutes les trajectoires situées à une distance de A inférieure à AA' sont interdites (A' est la projection de A sur OR). Calculons AA' en fonction des paramètres connus :

$$AA'^2 = AR^2 - RA'^2 = d_{AR}^2 - RA'^2$$

$$AA'^2 = AO^2 - A'O^2 = d_{AO}^2 - A'O^2$$

et :  $RA' + A'O = OR = r$

ce qui permet d'obtenir :

$$AA' = \left\{ d_{AO}^2 - \left[ \frac{r^2 + d_{AO}^2 - d_{AR}^2}{2r} \right]^2 \right\}^{1/2}$$

Les distances  $d_{AO}$  et  $d_{AR}$  étant calculables à partir des coordonnées atomiques d'une part, des rayons de VAN DER WAALS d'autre part, pour les atomes à l'intérieur de la sphère de réactivité il suffira de remplacer dans le calcul précédent le rayon de VAN DER WAALS par AA'.

Si le réactif comporte un nombre important d'atomes le problème est différent car l'accessibilité de la fonction réactive est à prendre en compte, et nous ne l'avons, pour l'instant, pas traitée.

### III - COMPARAISON DES MODELES

Pour comparer l'accessibilité statique et l'accessibilité dynamique nous avons étudié le même peptide que LEE et RICHARDS : Gly - Ala - Gly.

Dans le but d'évaluer l'effet des variations de conformation de la chaîne principale sur l'accessibilité des atomes ces auteurs utilisèrent neuf groupes d'angles diédraux et déterminèrent l'accessibilité, dans chaque cas, des atomes C $\beta$ , C et O du résidu alanyl.

Le tableau 6 montre leurs résultats ainsi que les valeurs de l'accessibilité dynamique que nous avons déterminées en considérant le solvant comme un réactif, les rayons des atomes étant identiques (le facteur C a été multiplié par 100 pour faciliter les comparaisons).

ANGLES		CARBONE C $\beta$		FONCTION C = O			
$\phi$	$\psi$	METHODE DE LEE ET RICHARDS	Cx100	METHODE DE LEE ET RICHARDS			Cx100
				C	O	valeur moyenne	
-140	135	47,9	34,6	4,9	34,2	19,55	12,8
-120	160	47	37,2	4,4	34,1	19,25	12,7
-100	135	49,8	40,8	1,8	31,7	16,75	10,3
- 70	150	47,9	40,9	0,2	26,1	13,15	4,8
-120	80	48,4	30,7	4,2	31,7	17,95	8,2
-100	0	51	37,2	3,4	35	19,2	10,7
- 50	-26	51,4	39,5	1,3	30,3	15,8	4,3
- 57	-48	51,8	41,7	1,6	30	15,8	9
57	48	43,8	36,2	5,1	23,9	14,5	4,2

TABLEAU 6

Accessibilités dans le peptide Gly - Ala - Gly

On peut constater que l'accord n'est pas très bon pour l'atome C $\beta$  mais devient nettement meilleur pour le groupement fonctionnel C = O.

Ce résultat peut s'expliquer en remarquant que le facteur C n'a aucun sens pour un atome isolé. On peut voir, en effet, les atomes voisins prendre, dans ce cas, une trop grande importance dans l'évaluation de l'encombrement.

L'accessibilité du groupement fonctionnel C = O déterminée par notre méthode est toujours plus petite que la moyenne de l'accessibilité statique de C et de O. L'effet de la conformation est plus important mais varie dans le même sens que dans le modèle de LEE et RICHARDS. Dans notre calcul des atomes situés assez loin du centre de fonction sont pris en compte et diminuent l'accessibilité, expliquant les différences observées.

Le facteur accessibilité C est l'expression d'un rapport de surface. Il peut être considéré comme une surface de choc efficace normalisée pour un certain type de réaction. Ce concept est différent de celui de l'exposition d'une molécule à un solvant comme le résultat des calculs le démontre.

L'"accessibilité dynamique" est très sensible aux changements de conformation et présente, de ce fait, un grand intérêt pour l'évaluation des vitesses de réaction. Il est important de remarquer que sa validité est limitée aux réactions entre deux réactifs dont l'un, au moins, est en concentration faible.

Liée à une fonction chimique l'accessibilité dynamique permet des comparaisons entre peptides. Si un peptide possède plusieurs fonctions identiques leur accessibilité peut être comparée.

Il faut toutefois noter que l'addition des accessibilités d'un même peptide n'a qu'une valeur indicative.

## C H A P I T R E    I I

### CALCUL DU COEFFICIENT DE DIFFUSION D'UN PEPTIDE

#### I - INTRODUCTION

Il existe trois théories principales pour calculer un coefficient de diffusion : la théorie hydrodynamique, la théorie moléculaire de microfriction et la théorie dite "des trous". Ces théories ne sont pas totalement indépendantes et doivent être adaptées au cas étudié.

Bien qu'il soit difficile de les résumer rapidement nous en rappellerons les hypothèses de base.

#### a - Théorie "des trous"

Cette théorie est due à EYRING (D1). EYRING considère que les molécules se déplacent dans un solvant en occupant les trous qui peuvent se former entre les molécules de solvant. L'énergie nécessaire au mouvement moléculaire est égale à la somme de l'énergie nécessaire à la formation d'un trou et de l'énergie nécessaire au déplacement de la molécule dans le trou. Quand les molécules de soluté sont plus grosses que les molécules de solvant, EYRING ne considère que le mouvement des molécules de solvant, le soluté se déplaçant "à contre courant". Le développement de cette théorie conduit à une expression simplifiée du coefficient de diffusion (D2) :

$$D = kT/a\pi r\eta$$

k : constante de BOLTZMAN

T : température absolue

r : rayon moléculaire

$\eta$  : viscosité

a : constante égale à 0,5 pour le solvant et supérieure à 1 pour le soluté.

La détermination de la constante  $a$  dépend des paramètres moléculaires (D3) et n'est pas aisée. De ce fait les résultats théoriques ont des valeurs supérieures à celles obtenues par des méthodes expérimentales; c'est pourquoi nous n'avons pas utilisé cette méthode.

b - Théorie hydrodynamique

EINSTEIN (D4) et SUTHERLAND (D5) ont démontré que le coefficient de diffusion d'une molécule dans une solution infiniment diluée (extrapolation à la concentration nulle) peut être calculé par la relation :

$$D_o = kT/f \quad (1)$$

$k$  : constante de BOLTZMAN

$T$  : température

$f$  : coefficient de frottement (appelé aussi  $\xi$ )

La valeur de  $f$  n'étant généralement pas connue STOKES (D6) montra que dans le cas idéal d'une particule sphérique de rayon  $r$  se déplaçant dans un milieu continu de viscosité  $\eta$  :

$$f_o = 6\pi\eta r$$

Le domaine d'application de cette équation est très limité puisque les molécules de soluté doivent être sphériques et de rayon très supérieur à celui des molécules de solvant; faute de quoi la continuité du milieu n'est plus respectée.

PERRIN (D7) modifia l'équation de STOKES pour l'appliquer à des molécules de forme ellipsoïde de révolution (oblate ou prolata) et obtint les relations suivantes :

$$f_e = 12 \pi\eta/S$$

avec :

$$S = (2/\sqrt{a^2-b^2}) \text{ Log} \left[ (a + \sqrt{a^2-b^2})/b \right]$$

pour un ellipsoïde prolata ( $a > b = c$ )

et

$$S = (2/\sqrt{b^2-a^2}) \text{ arctg}(\sqrt{b^2-a^2}/a)$$

pour un ellipsoïde oblate ( $b > a = c$ )

$a, b, c$  sont les trois axes de l'ellipsoïde.

Enfin ELWORTHY établit (D8) les relations pour la forme la plus complexe qui ait été traitée à notre connaissance, l'ellipsoïde dont les 3 axes sont différents :

$$f_e = 12 \pi \eta / S$$

avec

$$S = (2/a\sqrt{1-c^2/a^2}) F(\theta, \phi)$$

$$\theta = \arcsin \left[ \sqrt{(a^2-b^2)/(a^2-c^2)} \right]$$

$$\phi = \arcsin (\sqrt{1-c^2/a^2})$$

$F(\theta, \phi)$  est la fonction elliptique tabulée par DALE (D9), par exemple.

Ces différentes modifications ne tenant compte que de la forme de la molécule de soluté, il faut faire appel à la théorie moléculaire de la microfriction pour évaluer l'influence des tailles relatives des molécules de soluté et de solvant sur le coefficient de diffusion.

### c - Théorie moléculaire de la microfriction

Lorsqu'on considère que le milieu n'est plus continu on doit prendre en considération, pour l'étude de la diffusion, deux facteurs nouveaux : l'épaisseur finie des couches de solvant autour de la molécule de soluté, et l'existence éventuelle de trous dans le solvant. WIRTZ et GIERER (D10, D11) développèrent, pour ce faire, la théorie moléculaire de la microfriction.

Dans cette théorie le coefficient de friction de STOKES (valable pour les molécules sphériques) est multiplié par un facteur correctif k :

$$k = \left[ (1,5 r_2/r_1) + 1/(1+ r_2/r_1) \right]^{-1}$$

$r_1$  : rayon du soluté

$r_2$  : rayon du solvant

Ce facteur tend vers 1 quand le rayon du soluté devient très supérieur au rayon du solvant. Dans le cas où les deux rayons sont du même ordre de grandeur l'expression peut se réduire à :

$$k = 0,19 + 0,31 r_1/r_2$$

Le coefficient de GIERER et WIRTZ a donné lieu à un certain nombre de vérifications expérimentales satisfaisantes (D12, D13), nous l'utiliserons donc et serons amenés à revenir sur sa signification physique.

## II - MODELES PROPOSES

Le calcul théorique exact du coefficient de diffusion pour une molécule de peptide semble pratiquement irréalisable. En effet, la taille de ces molécules est intermédiaire entre celle des petites molécules organiques et celle des grandes molécules biochimiques, ce qui ne permet aucune simplification importante. Nous devons donc utiliser un modèle aussi précis que possible tenant compte d'une part de la forme de la molécule, d'autre part de l'influence du solvant.

### A - Influence de la forme de la molécule

Quand on observe un modèle moléculaire on constate qu'il est impossible d'assimiler une molécule de peptide à une sphère, voire à un ellipsoïde de révolution.

La forme la plus complexe qui ait donné lieu à l'établissement de formules de coefficient de diffusion étant l'ellipsoïde dont les trois axes sont différents, le premier problème a été d'assimiler la forme d'une molécule à l'ellipsoïde le plus proche.

### 1 - Modèle semi-graphique

Le principe de ce modèle est d'évaluer à partir d'une représentation graphique de la molécule les trois axes d'un ellipsoïde enveloppe.

Afin de simplifier cette détermination nous avons d'abord cherché un grand axe dans la molécule puis représenté graphiquement la projection de tous les atomes dans un plan perpendiculaire à cet axe.

#### - Recherche du grand axe

L'ensemble des distances interatomiques dans la molécule est calculé à partir des coordonnées de chaque atome établies précédemment. Soit  $d_{\max}$  la valeur maximum de cet ensemble. Si  $At_o$  et  $At_m$  sont les atomes correspondants, le grand axe de la molécule sera :

$$a = d_{\max} + r_{At_o} + r_{At_m}$$

$r$  : rayon de VAN DER WAALS

#### - Changement de base des coordonnées

Par une méthode analogue à celle citée dans le paragraphe concernant l'accessibilité, on effectue un changement de base en prenant pour nouvelle origine l'atome  $At_o$  et pour axe Ox le grand axe  $a$ .

#### - Projection des atomes de la molécule dans le plan yOz du nouveau système

On représente, à partir des centres des atomes repérés par leurs coordonnées  $x$  et  $y$ , les surfaces des

cercles engendrés par un rayon égal à leur rayon de VAN DER WAALS.

Plusieurs méthodes sont utilisables dont le traçage direct et la représentation ponctuelle.

Nous avons choisi la deuxième solution car elle traduit mieux la densité des atomes dans l'espace et permet une meilleure utilisation du graphe.

Soit  $y_N$  et  $z_N$  les deux ensembles de coordonnées atomiques et  $P$  un pas défini en fonction de la capacité mémoire du calculateur utilisé. On peut définir une matrice  $O$  de dimension  $O[y_N, z_N]$ .

avec :

$$Y_N = \text{ent} \left\{ \frac{\max(y_N) - \min(y_N) + 2 r_{\max}}{P} \right\}$$

$$Z_N = \text{ent} \left\{ \frac{\max(z_N) - \min(z_N) + 2 r_{\max}}{P} \right\}$$

ent ( ) : entier le plus proche

max ( ) : élément maximum de l'ensemble

$r_{\max}$  : rayon de VAN DER WAALS maximum de l'ensemble des atomes.

La matrice est nulle au départ. Elle représente l'espace discontinu dans lequel peut être figurée la projection de tous les atomes.

Soit un atome  $I$  de coordonnées  $(y_I, z_I)$ . On attribue la valeur 1 à l'élément de matrice  $O[y_I, z_I]$  défini par :

$$Y_I = \text{ent} \left\{ \frac{y_I - \min(y_N) + 2}{P} \right\}$$

$$Z_I = \text{ent} \left\{ \frac{z_I - \min(z_N) + 2}{P} \right\}$$

Cet élément représente le centre de l'atome  $I$  dans l'espace défini par la matrice.

A partir de  $O[Y_I, Z_I]$  la représentation de la projection de l'atome I se fait en attribuant la valeur 1 aux éléments de matrice rencontrés lors du balayage systématique de :

$$Y_I' = \text{ent}(Y_I - \frac{r_I}{P}) \quad \text{à} \quad Y_I'' = \text{ent}(Y_I + \frac{r_I}{P})$$

et pour chaque valeur de Y de :

$$\begin{aligned} & Z_I' = \text{ent} \left\{ Z_I - (r_I^2 - |Y_I - Y|^2)^{1/2} \right\} \\ \text{à} & Z_I'' = \text{ent} \left\{ Z_I + (r_I^2 - |Y_I - Y|^2)^{1/2} \right\} \end{aligned}$$

Le balayage dans chaque sens se fait avec un pas P et  $(r_I^2 - |Y_I - Y|^2)^{1/2}$  représente la valeur de la projection sur l'axe Oz du rayon de VAN DER WAALS  $r_I$ .

Ces opérations sont répétées pour tous les atomes de la molécule de peptide. Enfin on fait correspondre aux bornes de la table traçante les bornes de la matrice et chaque élément égal à 1 est représenté par un signe conventionnel. Un exemple est donné dans la figure 12.

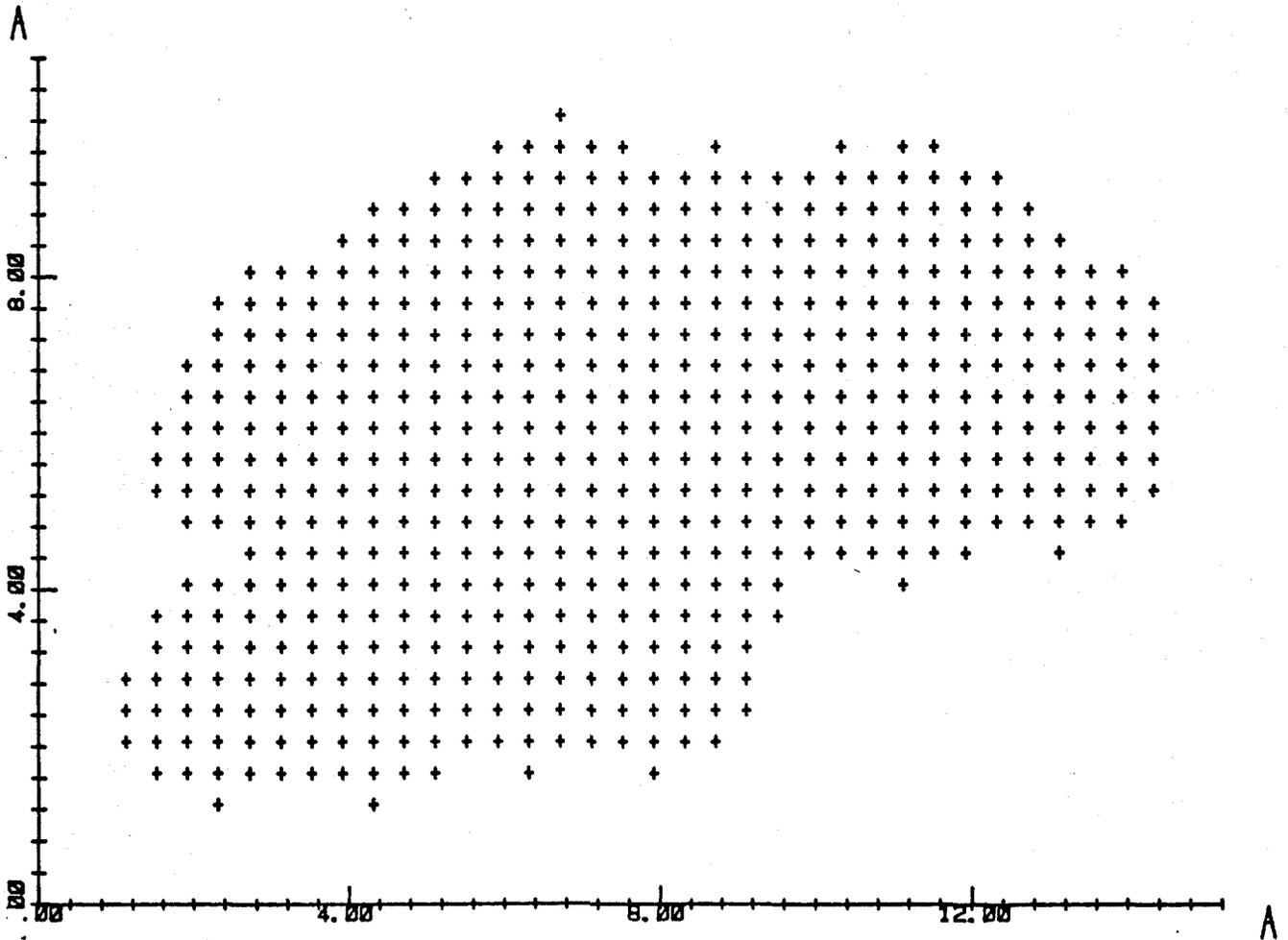
Pour obtenir une représentation de la densité de projection des atomes il suffit d'effectuer le balayage suivant un pas 2 P ou 3 P. Les zones qui correspondent à la projection d'un seul atome sont alors moins denses que les autres.

Cette méthode est facilement applicable quand on ne considère qu'un nombre restreint de conformations. Dès que ce nombre croît la méthode devient extrêmement longue.

Or les peptides sont des molécules flexibles qui peuvent subir des déformations importantes. Pour rendre compte de l'influence des déformations sur le coefficient de diffusion il faut envisager l'aspect statistique du problème.

A un temps t on peut déterminer par le calcul l'ensemble des conformations possibles de la molécule. A

FIG 12: PROJECTION DE LA MET ENKEPHALINE



chaque conformation correspond un poids statistique, une forme et un coefficient de diffusion. Le coefficient de diffusion "macroscopique" accessible par l'expérience est égal à la moyenne des coefficients de chaque conformation pondérés par leurs poids statistiques. Il faut donc calculer un grand nombre de coefficients de diffusion, c'est-à-dire utiliser une méthode entièrement numérique.

## 2 - Modèle "numérique"

Ce modèle reprend les deux premières parties du modèle semi-graphique : la détermination du grand axe de la molécule et le changement de coordonnées.

Soit  $(y, z)$  l'ensemble des points projections des atomes du peptide dans le plan  $yOz$ . Si on connaît les points extérieurs de cette projection et s'ils appartiennent à une ellipse ils vérifient l'équation :

$$ax^2 + by^2 + 2 cxy + 2 dx + 2 ey + f = 0 \quad (2)$$

que l'on peut mettre sous la forme :

$$\frac{a}{f} x^2 + \frac{b}{f} y^2 + \frac{2c}{f} xy + \frac{2d}{f} x + \frac{2e}{f} y + 1 = 0 \quad (3)$$

Supposons que l'on connaisse un grand nombre de points extérieurs de la projection, on peut former un système surabondant d'équations linéaires d'inconnues :

$$\frac{a}{f}, \frac{b}{f}, \frac{c}{f}, \frac{d}{f}, \frac{e}{f}.$$

Si la méthode numérique de résolution du système surabondant est du type moindre-carrés, on obtiendra les valeurs moyennes des inconnues, c'est-à-dire l'équation d'une ellipse qui sera vraisemblablement proche de la forme de la molécule.

Les demi-axes de cette ellipse peuvent être calculés en écrivant les discriminants des formes quadratiques :

$$\Delta' = \begin{vmatrix} \frac{a}{f} & \frac{c}{f} & \frac{d}{f} \\ \frac{c}{f} & \frac{b}{f} & \frac{e}{f} \\ \frac{d}{f} & \frac{e}{f} & 1 \end{vmatrix} \quad z' = \begin{vmatrix} \frac{a}{f} & \frac{c}{f} \\ \frac{c}{f} & \frac{b}{f} \end{vmatrix}$$

Ce qui permet d'écrire l'équation de l'ellipse dans un repère ayant pour origine son centre :

$$\frac{a}{f} x'^2 + \frac{b}{f} y'^2 + \frac{2c}{f} x'y' + \frac{\Delta'}{\delta'} = 0$$

Si  $\Delta$  et  $\delta$  sont les discriminants de l'équation (2) on démontre facilement (en remplaçant 1 par  $\frac{f}{f}$  dans  $\Delta'$ ) que

$$\frac{\Delta'}{\delta'} = \frac{\Delta}{f\delta} .$$

Les valeurs propres de  $\Delta'$  sont alors :

$$s'_1 = \frac{1}{f} \left[ \frac{a + b + \sqrt{(a-b)^2 + 4c^2}}{2} \right] = \frac{s_1}{f}$$

$$s'_2 = \frac{1}{f} \left[ \frac{a + b - \sqrt{(a-b)^2 + 4c^2}}{2} \right] = \frac{s_2}{f}$$

Les demi-axes de l'ellipse :

$$A_1 = \sqrt{-\frac{\Delta'}{s'_1 \delta'}} = \sqrt{-\frac{\Delta}{s_1 \delta}}$$

$$A_2 = \sqrt{-\frac{\Delta'}{s'_2 \delta'}} = \sqrt{-\frac{\Delta}{s_2 \delta}}$$

On peut remarquer que le résultat pour l'équation (3) est le même que celui pour l'équation (1). Or l'équation (3) est la seule utilisable puisque le deuxième membre du système surdéterminé est alors connu (= - 1).

Pratiquement le calcul se fait en trois étapes :

a) Changement de coordonnées :

Il est nécessaire car le premier changement de coordonnées a placé l'origine sur un point extérieur ce qui annule  $f$  créant un système homogène difficile à traiter numériquement. On doit donc ajouter une valeur arbitraire à toutes les coordonnées  $y$ .

b) Détermination des points extérieurs :

Les points extérieurs seront déterminés en balayant le plan  $yOz$  par une droite parallèle à l'axe  $Oy$ . Soit une telle droite d'équation :  $z = Z$ .

Soit la projection d'un atome I centré en  $y_I, z_I$  et de rayon de VAN DER WAALS  $r_I$ . L'équation du cercle correspondant est :

$$y^2 + z^2 - 2 y_I y - 2 z_I z + k = 0$$

avec :

$$k = y_I^2 + z_I^2 - r_I^2$$

Les intersections du cercle et de la droite peuvent être calculées par l'équation :

$$y^2 + Z^2 - 2 y_I y - 2 z_I Z + k = 0$$

soit :

$$y = y_I \pm \sqrt{y_I^2 - (Z^2 - z_I Z + k)}$$

Ces intersections existent si :

$$y_I^2 - (Z^2 - z_I Z + k) > 0$$

En répétant le calcul pour toutes les projections des atomes on obtient un ensemble de points d'intersection. Les deux valeurs limites seront prises comme abscisses des points extérieurs d'ordonnée Z.

On recherche les atomes d'ordonnées limites  $z_{\max}$ ,  $z_{\min}$  et le calcul est effectué entre  $z_{\max} + r_{\max}$  et  $z_{\min} - r_{\min}$  avec un pas choisi préalablement ( $r_{\max}$  et  $r_{\min}$  sont les rayons de VAN DER WAALS des atomes correspondants).

c) Résolution du système surdéterminé :

Cette résolution est effectuée par un programme existant dans la bibliothèque du calculateur utilisé. Le principe du calcul est le suivant :

Soit  $M_A X = M_B$  l'équation matricielle où  $M_A$  est la matrice des valeurs  $(x^2, y^2, 2xy, 2x, 2y)$ , X la matrice colonne solution  $(\frac{a}{f}, \frac{b}{f}, \frac{c}{f}, \frac{d}{f}, \frac{e}{f})$  et  $M_B$  la matrice second membre (égale à -1 dans notre cas). En multipliant les deux membres par la matrice transformée de  $M_A$  on obtient :

$$M_A^T M_A X = M_A^T M_B$$

qui est un système linéaire résolu par la méthode d'élimination de GAUSS.

Ce type de résolution a valeur de moindre carré du fait de la multiplication des matrices qui transforme les variables en la somme de leurs carrés.

Remarque :

Dans certains cas le système des points extérieurs obtenus peut être suffisamment incohérent pour donner des valeurs non significatives. Dans ce cas on recherche dans le plan yOz une distance interatomique maximum qui permettra de définir un axe b de la même manière que le grand axe a. L'axe c est alors déterminé dans la direction perpendiculaire à l'axe b dans le plan yOz.

d) Calcul du coefficient de frottement

Dans le calcul d'ELWORTHY (D8) le coefficient de frottement s'exprime par :

$$f = 12 \pi \eta / S$$

la valeur de S peut être calculée par deux méthodes.

La première consiste à utiliser l'équation de base qui a permis à ELWORTHY d'établir ses relations soit :

$$S = \int_0^{\infty} \frac{ds}{\sqrt{(a^2+s)(b^2+s)(c^2+s)}}$$

La deuxième consiste à appliquer les relations d'ELWORTHY :

$$S = (2 / a \sqrt{1 - c^2/a^2}) F(\theta, \phi)$$

avec :

$$\theta = \arcsin \left[ \sqrt{(a^2 - b^2) / (a^2 - c^2)} \right]$$

$$\phi = \arcsin \left( \sqrt{1 - c^2/a^2} \right)$$

où F( $\theta, \phi$ ) n'est autre que l'intégrale elliptique :

$$\int_0^{\theta} \frac{dx}{\sqrt{1 - \sin^2 \phi \sin^2 x}}$$

Dans la première méthode on doit effectuer une intégration sur l'infini (qui est remplacé dans le calculateur par un nombre très grand), dans la seconde l'intégration est limitée à un intervalle borné. Pour des raisons de rapidité de calcul nous avons choisi la deuxième méthode avec intégration par la méthode de SIMPSON.

Ainsi peut-on obtenir à partir des demi-axes la valeur du coefficient de frottement f.

## B - Influence de la taille du solvant

GIERER et WIRTZ (D11) ont introduit un coefficient correctif pour tenir compte de la taille relative des molécules de soluté et de solvant :

$$k = \left[ (1,5 r_1/r_2) + 1 / (1 + r_1/r_2) \right]^{-1}$$

$r_1$  : rayon des molécules de solvant

$r_2$  : rayon des molécules de soluté

Les molécules étant, dans cette relation, considérées comme sphériques il est nécessaire d'examiner les principes qui ont permis d'établir cette formule pour voir les conditions d'application à notre cas.

Dans un milieu continu la vitesse d'une particule sphérique est égale à :

$$v = \frac{F}{f} = \frac{F}{6 \pi \eta r_2}$$

$r_2$  : rayon de la molécule de soluté

$F$  : force qui provoque le mouvement

Cette relation est le résultat de l'intégration :

$$v = \int_{r_2}^{\infty} \frac{F}{6 \pi \eta} \frac{dx}{x^2}$$

où  $x$  est la distance entre le centre de la molécule de soluté et une molécule de solvant assimilée à son centre.

Si les molécules de solvant sont de taille non négligeable on considère qu'elles forment des couches successives de molécules autour du soluté, couches dont l'épaisseur ( $\Delta x$ ) est égale à  $2 r_1$  ( $r_1$  : rayon de la molécule de solvant).

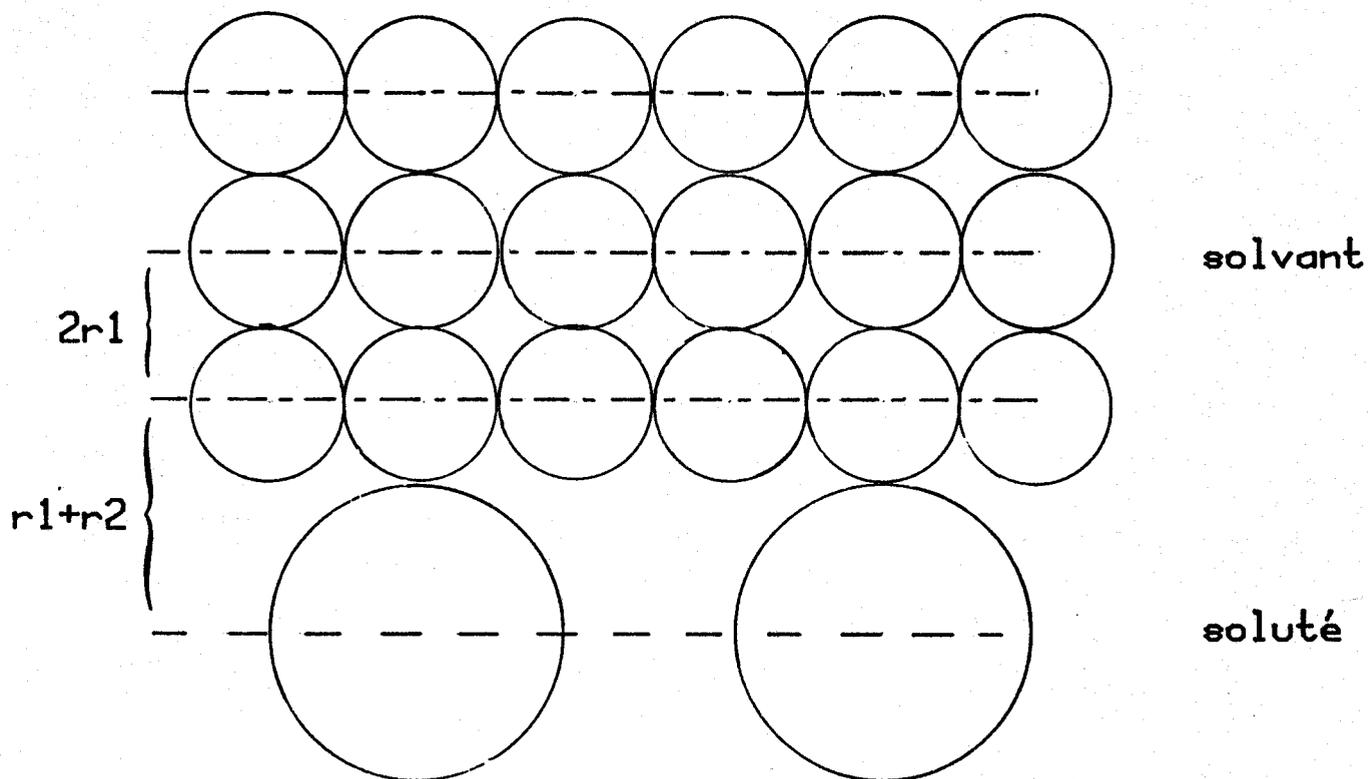


FIG 13: DISTANCE ENTRE LES ATOMES DE SOLUTE ET DE SOLVANT

L'intégrale devient une somme :

$$v = \sum_{i=0}^{\infty} \frac{F}{6 \pi \eta} \frac{\Delta x}{x_i^2}$$

avec  $x_i = r_2 + (2i - 1)r_1$  (voir Fig. 13)

Dans notre cas les molécules ne sont pas sphériques et nous avons déjà appliqué la correction d'ELWORTHY.

Le coefficient de frottement s'écrit maintenant :

$$f = 12 \pi \eta / S = 6 \pi \eta a \sqrt{1 - c^2/a^2} / F(\theta, \phi) = 6 \pi \eta r_2'$$

On peut voir que  $r_2'$  est homologue à un rayon de sphère équivalente et que l'on peut écrire, par analogie avec le calcul précédent :

$$x_i = r_2' + (2i - 1)r_1$$

Si les molécules de solvant ne sont pas sphériques un raisonnement analogue permet d'écrire :

$$x_i = r_2' + (2i - 1)r_1'$$

avec :

$$r_1' = a' \sqrt{1 - c'^2/a'^2} / F(\theta', \phi')$$

$a', c'$  : demi-axes de l'ellipsoïde du solvant.

Le calcul de GIERER et WIRTZ peut alors être poursuivi et on obtiendra :

$$k' = \left[ (1,5 r_1'/r_2') + 1 / (1 + r_1'/r_2') \right]^{-1}$$

Remarques :

Si on ne veut pas effectuer un calcul complet on peut faire l'approximation suivante. L'épaisseur d'une

couche  $\Delta x$  dépend de l'orientation des molécules de solvant. Si la diffusion n'est pas trop rapide la perturbation sur la rotation de la molécule sera négligeable. La rotation pourra être considérée comme statistique et l'épaisseur moyenne d'une couche de solvant exprimée par :

$$\Delta x = 2 r_1' = \frac{2}{3}(a' + b' + c')$$

Pratiquement la correction de GIERER et WIRTZ n'est utile que pour des études physicochimiques de petites molécules, ou de molécules de taille moyenne (10 à 20 Å) dans des solvants lourds. Le rapport de taille d'une molécule d'eau et d'une molécule de tétrapeptide, par exemple, est suffisamment petit pour que la correction soit négligeable.

### III - TEST DU MODELE

On a constaté dans les relations d'ELWORTHY que la grandeur  $2/S$  correspond au rayon d'une sphère présentant un coefficient de diffusion équivalent à celui de l'ellipsoïde.

Nous avons testé le modèle sur un certain nombre de molécules étudiées par GORREL et DUBOIS (D13). Les valeurs des rayons moléculaires calculées par différentes méthodes et la valeur de  $2/S$  que nous avons obtenue sont indiquées dans le tableau 7.

	Méthode de LEBAS	Méthode de GORREL	$2/S$
Acétone	2,4	2,5	2,2
Naphtalène	3,1	3,1	3,2
Biphényl	3,3	3,4	3
Phénanthrène	3,4	3,5	3,6
Chrysène	3,6	3,7	3,9

TABLEAU 7

*Valeurs des rayons moléculaires (en Å) obtenues par différentes méthodes*

Remarques :

La méthode de LEBAS consiste à additionner des incréments moléculaires proportionnels au volume de chaque atome (D14, D15). Si  $s$  est la somme de ces incréments :

$$r = \left[ \frac{3s}{4\pi} \right]^{1/3}$$

GORREL utilise la même valeur de  $s$  mais considère que les atomes sphériques sont empilés suivant un mode cubique :

$$r = \frac{1}{2} (s)^{1/3}$$

On constate que les résultats sont du même ordre de grandeur mais varient d'un composé à l'autre.

Si on calcule les coefficients de diffusion des mêmes molécules dans l'hexadécane on obtient les valeurs indiquées dans le tableau 8.

	Valeurs expérimentales de GORREL (cm <sup>2</sup> /sec).10 <sup>6</sup>	Valeurs théoriques de GORREL (cm <sup>2</sup> /sec).10 <sup>6</sup>	Valeurs de notre modèle (cm <sup>2</sup> /sec).10 <sup>6</sup>
Acétone	13,2	11,9	14,2
Naphtalène	7,3	8,5	6,8
Biphényl	7,1	7,6	7,7
Phénanthrène	6,9	7,2	6
Chrysène	7,5	6,3	7,2

TABLEAU 8

*Valeurs des coefficients de diffusion obtenues dans l'hexadécane par différentes méthodes*

On remarque que, sur des modèles ne pouvant présenter des conformations différentes, les deux méthodes semblent à peu près équivalentes.

L'avantage de notre modèle est qu'il peut tenir compte de la structure secondaire (conformation) des molécules (peptides) ce qui ne serait pas le cas d'une application des méthodes décrites par GORREL.



## CHAPITRE III

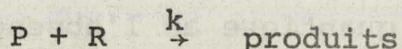
### APPLICATION DE LA THEORIE DE LA DIFFUSION

#### A LA REACTIVITE DES PEPTIDES

#### I - INTRODUCTION

Nous avons considéré dans les chapitres précédents que la vitesse de réaction des peptides en faible concentration était limitée par la diffusion des réactifs et nous avons relié deux facteurs pouvant modifier cette vitesse (accessibilité et coefficient de diffusion) à la conformation. Il s'agit, maintenant, d'utiliser ces données pour évaluer la réactivité des molécules.

Les réactions que nous envisageons sont bimoléculaires élémentaires :



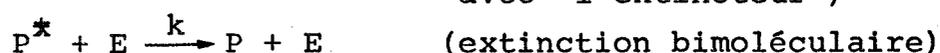
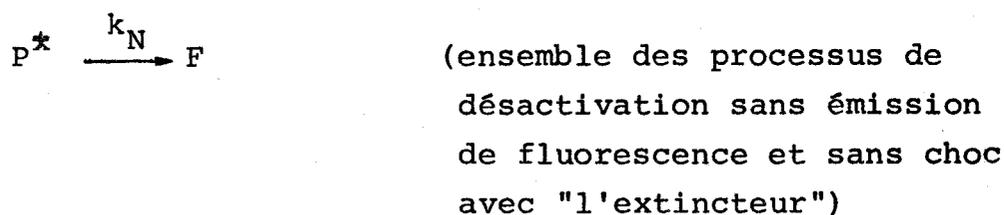
et l'expression de leur vitesse est :

$$\frac{d[x]}{dt} = k [P] [R] \quad k : \text{constante de vitesse}$$

L'évaluation de la réactivité est, en fait, le calcul théorique de  $k$  qui peut être comparé à des valeurs expérimentales. Si, pour deux conformations les valeurs théoriques de  $k$  sont significativement différentes et si l'une correspond à la valeur expérimentale, on considèrera que l'on a un argument en faveur de l'existence de cette conformation.

Outre la réaction chimique, avec disparition des produits initiaux, il existe un autre type de phénomène régi par la diffusion des réactifs : l'extinction de fluorescence (quenching) par chocs intermoléculaires entre un fluorophore et un "extincteur" (quencher) spécifique.

Les équations de ce type de réaction peuvent s'écrire :



Quand on travaille en illumination constante l'un des réactifs (E) ne disparaît pas tandis que l'autre est régénéré, mais il y a modification de la fluorescence (rendement quantique et durée de vie).

Si  $Q_0$  est le rendement quantique en l'absence d'extincteur,  $Q$  le rendement en présence d'une concentration  $[E]$ ,  $\tau_0$  et  $\tau$  les durées de vie correspondant :

$$Q_0 = \frac{k_f}{k_f + k_N} = k_f \tau_0$$

$$Q = \frac{k_f}{k_f + k_N + k[E]}$$

soit :

$$\frac{Q_0}{Q} = 1 + K_{SV}[E] \quad \text{loi de STERN-VOLMER (T11)}$$

avec :

$$K_{SV} = k\tau_0$$

$k$  peut être calculé comme une constante de réaction classique avec, comme nous le verrons, des contraintes supplémentaires.

Quand on calcule théoriquement la valeur absolue d'une grandeur physique (comme la constante de vitesse) plusieurs types d'erreur peuvent se produire :

- des erreurs d'approximation (ou simplifications) dans les hypothèses de base

- des erreurs numériques dans l'évaluation de certaines grandeurs non connues expérimentalement.

Si, au lieu de calculer une valeur absolue, on calcule une valeur relative de la grandeur physique, par rapport à une référence convenablement choisie, on peut diminuer les deux types d'erreur par l'utilisation d'un raisonnement analogique et la disparition d'un certain nombre de constantes communes aux deux systèmes.

Les méthodes expérimentales utilisent ce genre de démarche quand elles se servent d'observations sur la variation d'une propriété en fonction des conditions où elle est mesurée.

Il semble donc plus facile d'étudier une réactivité relative dans le cas des peptides, d'autant que ce sont finalement des comparaisons entre les réactivités de plusieurs conformations d'un même peptide qui sont intéressantes. De plus, il existe une référence insensible aux variations de conformation : l'acide aminé libre qui porte la fonction étudiée.

Dans ce chapitre sera envisagée la réactivité relative des fonctions portées par un acide aminé (sur sa chaîne latérale généralement), selon qu'il est libre ou engagé dans un peptide. Selon l'environnement (la conformation) de cette fonction, seuls seront modifiés son accessibilité et le coefficient de diffusion de la molécule entière qui la porte; le rayon de la sphère de réactivité sera considéré comme constant pour un type de réaction.

Un rapport de constantes de vitesse sera établi dans plusieurs cas : réaction chimique ou d'extinction de fluorescence, par des chocs bimoléculaires totalement ou partiellement efficaces.

Enfin un autre facteur important sera introduit : l'effet électrostatique entre un réactif ionisé et les charges portées par les peptides.

## II - MODELE POUR UNE REACTION OU TOUS LES CHOCS SONT EFFICACES

La théorie de la vitesse d'une réaction limitée par la diffusion a été établie pour des cas idéaux où les réactifs sont assimilés à leur fonction réactive, où les milieux sont continus et où, généralement, la symétrie sphérique de tous les paramètres est de rigueur. Dès que l'on veut rendre compte d'une réaction réelle on ne peut tenir compte de tous les paramètres nouveaux qui apparaissent et il semble plus adéquat de parler de modèle que de théorie.

L'hypothèse de base de tous les modèles sera le maintien pour le calcul d'une pseudo symétrie sphérique. On considèrera qu'à une distance donnée du centre d'une molécule la concentration (ou la probabilité de présence) d'un réactif sera égale à la moyenne des concentrations sur une sphère de rayon égal à cette distance.

### A - Réaction chimique

#### 1 - Généralités

Les fondements de la théorie ont été établis par SMOLUCHOWSKI (T1) pour la cinétique de coagulation des colloïdes et ont été généralisés aux réactions bimoléculaires par SVESHNIKOFF (T2, T3).

La théorie est basée sur l'hypothèse qu'il existe, autour d'une molécule réactive (un peptide P par exemple), un gradient de concentration des molécules de l'autre espèce (R). Ce gradient obéit à la seconde loi de diffusion de FICK :

$$\frac{\partial C_R(x,y,z,t)}{\partial t} = D \nabla^2 C_R(x,y,z,t) \quad (1)$$

$C_R(x,y,z,t)$  : concentration de R au point  $x, y, z$  et au temps  $t$ .

$D$  : coefficient relatif de diffusion égal à la somme des coefficients de diffusion des deux réactifs  $D_P + D_R$

$\nabla^2$  : opérateur Laplacien

SMOLUCHOWSKI a transformé cette équation en coordonnées polaires dans le cas où la concentration en réactif R avait une symétrie sphérique autour de la molécule P.

$C_R(x,y,z,t)$  est, alors, remplacé par  $C_R(r,t)$  où  $r$  est la distance entre les deux réactifs.

Si tous les chocs entre réactifs sont efficaces la réaction est totale et immédiate quand les deux réactifs sont distants de  $r_0$  (rayon de la sphère de réactivité). La condition limite de l'équation (1) s'écrit alors :

$$C_R(r_0, t) = 0 \quad (2)$$

et la solution est :

$$C_R(r, t) = C_{O,R} \left[ 1 - \frac{r_0}{r} \operatorname{erfc} \frac{r - r_0}{\sqrt{4Dt}} \right] \quad (3)$$

$C_{O,R}$  : concentration moyenne du réactif R dans la solution au temps  $t = 0$

la fonction  $\operatorname{erfc}$  est définie par :

$$\operatorname{erfc} x = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^\infty e^{-z^2} dz \quad (4)$$

La constante de vitesse de la réaction est proportionnelle au flux  $\phi$  des molécules de R à travers la sphère de réactivité.

$$\phi = 4 \pi r_0^2 N'D \left[ \frac{\partial C_R(r, t)}{\partial r} \right]_{r=r_0} \quad (5)$$

$N'$  : nombre de particules par millimole.

soit :

$$\phi = 4 \pi r_0 N' D C_{O,R} \left( 1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D t}} \right) \quad (6)$$

La constante de vitesse peut être exprimée par  $\phi/C_{O,R}$  soit :

$$k(t) = 4 \pi r_0 N' D \left( 1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D t}} \right) \quad (7)$$

On remarque que la constante de vitesse devient indépendante du temps, quand celui-ci est suffisamment grand pour rendre le facteur  $\frac{r_0}{\sqrt{\pi D t}}$  négligeable.

## 2 - Application aux peptides

La notion d'efficacité des chocs pour un cas idéal de réaction est uniquement liée à l'énergie relative des deux réactifs qui est, ou n'est pas, supérieure à l'énergie d'activation.

Dans un cas non idéal, comme celui des peptides, apparaît une cause supplémentaire d'inefficacité des chocs, l'encombrement stérique dépendant de l'accessibilité  $C$  de la fonction. Considérons le cas où tous les chocs possibles stériquement sont efficaces.

Le flux à travers la surface de la sphère de réactivité est toujours égal au produit de cette surface par le coefficient de diffusion et le gradient de concentration en  $r_0$ . Mais la surface de cette sphère, que les molécules peuvent traverser, est maintenant égale à la section efficace de choc définie dans le chapitre sur l'accessibilité soit :

$$S' = 4 \pi r_0^2 C \quad C : \text{accessibilité de la fonction}$$

En admettant que l'on peut appliquer les résultats trouvés précédemment pour l'équation de FICK on obtient :

$$k(t) = 4 \pi r_0 N' D \left( 1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D t}} \right) C \quad (8)$$

Il faut toutefois remarquer qu'une telle expression implique un certain nombre de conditions que l'on peut mettre en évidence comme suit.

Pour que l'équation (8) soit cohérente il faut que le nombre de molécules R disparues par unité de temps soit égal au flux .

Soit  $N_{Rd}$  le nombre de molécules R disparues au temps t.

$N_{Rd}$  = nombre de molécules R au temps 0  
 - nombre de molécules R au temps t.

$$N_{Rd} = C_{O,R} \int_{r_0}^{\infty} S_r dr - \int_{r_0}^{\infty} S_r C_R(r,t) dr$$

$S_r$  : surface de la sphère de rayon r d'après (3).

$$N_{Rd} = C_{O,R} \int_{r_0}^{\infty} S_r dr - \int_{r_0}^{\infty} S_r C_{O,R} \left[ 1 - \frac{r_0}{r} \operatorname{erfc} \frac{r-r_0}{\sqrt{4Dt}} \right] dr$$

soit :

$$N_{Rd} = C_{O,R} \int_{r_0}^{\infty} S_r \frac{r_0}{r} \operatorname{erfc} \frac{r-r_0}{\sqrt{4Dt}} dr$$

et le nombre de molécules R qui disparaissent par unité de temps au temps est égal à :

$$\frac{dN_{Rd}}{dt} = \frac{\partial}{\partial t} \left[ C_{O,R} \int_{r_0}^{\infty} S_r \frac{r_0}{r} \operatorname{erfc} \frac{r-r_0}{\sqrt{4Dt}} dr \right] \quad (9)$$

A partir de l'équation (9) on ne peut retrouver

$$\frac{d N_{rd}}{dt} = 4 \pi r_0 N'D C_{O,R} \left[ 1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi Dt}} \right] C = \phi$$

que si l'on pose  $S_r = 4 \pi r^2 C$  sur tout l'espace intégré (de  $r = r_0$  à  $r = \infty$ ).

Physiquement la condition sur  $S_r$  signifie que tout l'espace de  $r_0$  à l'infini est encombré stériquement de la même façon que la sphère de réactivité. On obtient ce type de condition si on considère des trajectoires linéaires des molécules de réactif R vers P, en ne tenant pas compte dans tout l'espace des trajectoires interdites (Fig. 10). Cette condition est d'ailleurs cohérente avec la méthode de détermination du facteur C.

Peut-on justifier des trajectoires relatives des 2 réactifs statistiquement droites ? Le mouvement d'une molécule dans un solvant est du type brownien, le gradient de concentration, lors de la réaction, s'oppose ou s'ajoute à ce mouvement. L'importance relative des deux effets dépend de la grandeur du gradient. Plus il sera important plus les molécules de réactif auront un mouvement résultant linéaire. Pour que ce gradient soit important il faut que la réaction soit rapide, que les chocs soient efficaces, ce qui est notre hypothèse de départ.

Supposons, maintenant, un cas limite opposé : le peptide est très petit et ses atomes limitent la surface de la sphère de réactivité sans modifier la distribution des molécules de réactif dans son voisinage. De plus, les trajectoires peuvent ne pas être linéaires.

La résolution de l'équation (9) donne dans ce cas :

$$\frac{d N_{Rd}}{dt} = 4 \pi r_0 N'D C_{O,R} \left[ 1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi Dt}} \right]$$

qui est égal à  $\frac{\phi}{C}$  et non à  $\phi$ .

L'incohérence nous semble venir de la condition limite imposée lors de la résolution de l'équation de FICK. Si on admet que le voisinage de la fraction de surface non efficace de la sphère de réactivité n'est pas stériquement interdit, il existe des molécules R à une distance très proche de  $r_0$  ce qui entraîne une nouvelle condition limite :

$$C(r_0, t) = \left[ C_R(r, t) \right]_{r \rightarrow r_0} (1-C)$$

Quand l'accessibilité est totale  $C = 1$  et  $C_R(r_0, t) = 0$ ; quand elle est nulle la condition est triviale et, bien entendu, il n'y a pas de réaction.

Une nouvelle résolution de l'équation de FICK est nécessaire. Nous ne l'avons pas effectuée car nous verrons dans les paragraphes suivants que l'on peut traiter un cas plus général qui englobe celui-là.

Mais l'existence de deux types de comportement selon les hypothèses d'occupation de l'espace et de forme des trajectoires nous semble importante et nous en tiendrons compte par la suite dans la réalisation de modèles plus complexes.



### 3 - Evaluation du rapport des réactivités

Soit la même réaction sur la même fonction dans deux environnements I et II.

D'après (8) :

$$\frac{k_I(t)}{k_{II}(t)} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}} \frac{\left[ 1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D_I t}} \right]}{\left[ 1 + \frac{r_0}{\sqrt{\pi D_{II} t}} \right]} \quad (10)$$

Dans le cas de la réaction d'un peptide avec une molécule organique simple  $r_0$  est de l'ordre de 5 à 10 Å. Nous avons vu précédemment que le coefficient de diffusion d'un peptide était de l'ordre de  $10^{-6}$  cm/sec. Ceci entraîne que l'effet

de la partie dépendant du temps dans l'équation (10) n'est sensible que si  $t$  est inférieur à la milliseconde. Dans les réactions chimiques classiques on pourra donc considérer que le rapport des réactivités est égal à :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}} \quad (11)$$

Remarques :

- Pour des réactions suivies par des techniques rapides (Méthode des flux stoppés par exemple) il faudra prendre en compte l'ensemble de l'équation (10)

- Une augmentation de la valeur  $r_0$  entraîne une dépendance plus importante du temps.

## B - Extinction de fluorescence

### 1 - Généralités

Soit une molécule de peptide P portant une fonction susceptible d'être fluorescente. Au temps  $t = 0$  elle subit une excitation. Supposons qu'il existe dans le milieu des molécules d'un composé E extingueur de fluorescence, par collisions totalement efficaces une molécule de E peut faire disparaître complètement la fluorescence de la molécule P. Mais il faut que la diffusion de E vers P ait lieu dans un temps inférieur à la durée de vie de l'état excité du fluorophore. La durée de vie des composés étudiés étant de l'ordre de la nanoseconde, la partie qui dépend du temps dans l'équation (7) est loin d'être négligeable.

En reprenant le schéma du mécanisme de l'extinction de fluorescence décrit dans l'introduction :

$$\frac{d[P^*]}{dt} = - k_f [P^*] - k_N [P^*] - k(t) [E] [P^*] + F(t) [P]$$

où  $F(t)$  est la fonction d'apparition des molécules fluorescentes. Si  $F(t)$  est une fonction  $\delta(t)$  de DIRAC ( $\delta(t) = 1$  pour  $t = 0$ ,  $\delta(t) = 0$  pour  $t \neq 0$ ) on peut finalement écrire quand  $t$  est supérieur à 0 :

$$\frac{d[P^*]}{dt} = \left( -\frac{1}{\tau_0} - k(t) [E] \right) [P^*] \quad (12)$$

équation dont la résolution donnera une expression de  $[P^*] = f(t, [E])$ . Le rapport des rendements quantiques en présence et en l'absence d'extincteur est égal au rapport des expressions de  $[P^*]$  dans ces conditions.

Le calcul complet a été réalisé par SVESHNIKOFF et WAWILOW (T2) et ils obtiennent :

$$\frac{Q}{Q_0} = (1 + \tau_0 4 \pi r_0 N'D [E]) \delta \quad (13)$$

avec

$$\delta = \left[ 1 - 2 \alpha e^{\alpha^2} \left( \frac{\sqrt{\pi}}{2} \int_0^\alpha e^{-z^2} dz \right) \right]^{-1} \quad (14)$$

et

$$\alpha = 2 \left[ (N' \tau_0 r_0^3 [E]) / (\tau_0 + 1/4 \pi r_0 N'D [E]) \right]^{1/2} \quad (15)$$

Cette expression, qui n'est pas particulièrement pratique à utiliser, a été simplifiée par LA MER (T4) dans le cas où l'extinction était inférieure à 50 %. La loi de STERN-VOLMER retrouve, alors, sa forme initiale avec  $K_{SV} = k_0$  et

$$k(\tau_0) = 4 \pi r_0 N'D \left( 1 + \frac{r_0}{\sqrt{D \tau_0}} \right) \quad (16)$$

(Cette expression est valable dans le cas d'une illumination constante).

## 2 - Application aux peptides

Pour une réaction d'extinction de fluorescence le problème de l'encombrement de l'espace est plus simple que pour une réaction chimique. Les molécules d'extincteur ayant

un rôle actif sont celles situées tout près de la molécule de peptide. L'espace à considérer est restreint et dans cet espace la continuité de l'encombrement stérique est facilement acceptable.

L'expression de  $k(t)$  dans l'équation (12) est bien celle décrite dans l'équation (7).

SVESHNIKOFF et WAWILOW ont réalisé leur calcul original en introduisant un facteur  $p$  compris entre 0 et 1, probabilité énergétique de réaction d'une molécule E en  $r_0$ . Mathématiquement il est identique au facteur C mais nous verrons dans le paragraphe suivant qu'il est physiquement très différent et d'ailleurs criticable. Toutefois le développement mathématique réalisé est utilisable et en remplaçant  $p$  par C on obtient :

$$k(\tau_0) = 4 \pi r_0 N' D \left(1 + \frac{r_0}{\sqrt{D \tau_0}}\right) C \quad (17)$$

Le rapport de réactivité devient alors :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}} \cdot \frac{1 + \frac{r_0}{\sqrt{D_I \tau_{0I}}}}{1 + \frac{r_0}{\sqrt{D_{II} \tau_{0II}}}} \quad (18)$$

Deux nouveaux paramètres  $r_0$  et  $\tau_0$  apparaissent dans l'évaluation du rapport. La durée de vie du fluorophore doit donc être mesurée. Si les deux molécules comparées possèdent des structures primaires différentes cette mesure ne pose aucun problème. Mais si on compare les structures secondaires d'un même peptide on ne peut généralement obtenir les deux durées de vie. Dans ce cas on utilisera la valeur unique mesurée pour  $\tau_{0I}$  et  $\tau_{0II}$ . L'erreur introduite doit être faible puisque nous avons remarqué dans un chapitre précédent que le rendement quantique et la durée de vie dépendaient peu de la structure secondaire pour les peptides que nous étudions.

La valeur de  $r_0$  peut ne plus être la somme des rayons de VAN DER WAALS des deux entités réagissant, il faut alors calculer cette valeur sur une molécule simple portant la fonction envisagée.

Pour ce calcul l'accessibilité de la fonction doit être très voisine de 1, sinon il faut effectuer un calcul d'accessibilité, impliquant que l'on fixe le rayon de la sphère de réactivité et on se trouve devant un paradoxe.

Quand la valeur de  $r_0$  ne peut être calculée son évaluation doit être faite soigneusement et une évaluation de l'erreur sur le résultat du rapport trouvé est souhaitable.

### III - MODELE POUR UNE REACTION OU TOUS LES CHOCS NE SONT PAS EFFICACES

On pourrait penser que l'inefficacité des chocs due à un effet énergétique serait traitable de la même manière que l'effet stérique. Ce n'est malheureusement pas le cas.

SVESHNIKOFF a proposé de multiplier le flux qui traverse la sphère de réactivité par un facteur  $p$  : probabilité d'efficacité énergétique d'un choc bimoléculaire. Mais, comme l'ont fait remarquer COLLINS et KIMBALL (T5), cette solution n'est cohérente avec le hypothèses de départ.

Supposons une réaction sans effet d'encombrement stérique, le nombre de molécules de réactif disparues après un temps  $t$  est toujours égal à :

$$N_{Rd} = C_{O,R} \int_{r_0}^{\infty} S_r \frac{r_0}{r} \operatorname{erfc} \frac{r - r_0}{\sqrt{4Dt}} dr$$

Puisqu'il n'y a pas d'hypothèse d'occupation d'espace :  $S_r = 4 \pi r_0^2$  et

$$\frac{d N_{Rd}}{dt} = 4 \pi r_o N'D C_{O,R} \left( 1 + \frac{r_o}{\sqrt{\pi Dt}} \right)$$

Si on multiplie le flux  $\phi$  par  $p$  on voit d'après l'équation (6) que le nombre de molécules de réactif disparues par unité de temps n'est plus égal au flux. On retrouve une situation identique à celle d'un encombrement stérique strictement limité à la sphère de réactivité.

On peut tenter d'expliquer physiquement la différence des résultats pour un effet stérique (avec trajectoires linéaires) et pour un effet énergétique, en considérant les phénomènes élémentaires.

Supposons une molécule de réactif sur une trajectoire linéaire. Si cette molécule rencontre un obstacle (atome) avant d'atteindre la sphère de réactivité elle "rebondit" et repart sans avoir réagi. Ce faisant elle peut gêner l'arrivée d'une autre molécule se dirigeant vers le peptide mais, comme dans tous les cas cette molécule n'aurait pas réagi (elle est sur une trajectoire interdite) il n'y aura aucune modification du taux de réaction.

Par contre si la molécule arrive sur la sphère de réactivité et rebondit parce que son énergie n'est pas suffisante, elle peut empêcher l'arrivée de molécules qui, elles, seraient potentiellement actives. Or le calcul ne tient pas compte de cette éventualité.

C'est pourquoi il est nécessaire d'employer des concepts plus élaborés pour décrire la distribution des particules et la vitesse de réaction.

## A - Réaction Chimique

### 1 - Généralités

Les principaux travaux traitant du problème des réactions chimiques avec chocs inefficaces sont dus à COLLINS et KIMBALL (T5) YGUERABIDE (T6, T7) NOYES (T8). Ils ont été résumés par NEMZEK et WARE (T9) et BIRKS (T10).

La variation de la réactivité globale étant l'expression d'une modification des phénomènes élémentaires nous raisonnerons sur le mécanisme moléculaire de la réaction.

Soit un ensemble constitué de  $n_0$  paires de molécules P et R dans un volume V.

Soit  $n_p(t)$  le nombre de molécules P n'ayant pas réagi au temps t.

Soit  $P_p(t)$  la probabilité qu'une molécule P n'ait pas réagi au temps t :

$$P_p(t) = \frac{n_p(t)}{n_0} \quad (19)$$

La réaction a toujours lieu quand les molécules P et R sont distantes de  $r_0$  mais aucune hypothèse n'est faite, pour l'instant, sur le mode de réaction.

Supposons qu'au temps  $t = 0$  la distance qui sépare chaque paire de molécules soit égale à  $r'$  ( $r' > r_0$ ). On peut représenter toutes les molécules R dans un repère cartésien centré sur les molécules P. Dans ce cas les molécules R sont situées sur une sphère dont le centre est à l'origine et de rayon  $r'$ .

Au cours du temps on peut considérer que les molécules P demeurent immobiles et que les molécules R diffusent dans l'espace avec un coefficient de diffusion  $D = D_R + D_p$  (somme des coefficients de diffusion de chaque espèce).

L'état du système à l'instant t peut être décrit par une fonction densité  $\rho(r, r', t)$ . Cette fonction représente le nombre de molécules R, n'ayant pas réagi, par unité de volume, sur l'ensemble des points de coordonnée r (l'indice r' spécifie que toutes les molécules étaient à l'origine du temps sur la sphère de rayon  $r'$ ). On peut également définir une probabilité de trouver R en r :

$$p(r, r', t) = \frac{\rho(r, r', t)}{n_0} \quad (20)$$

Le nombre total de molécules R n'ayant pas réagi est l'intégrale sur l'ensemble du volume considéré de la fonction densité :

$$n_R(r', t) = \int \rho_R(r, r', t) dr \quad (21)$$

Comme il disparaît une molécule de P quand réagit une molécule de R, le nombre total de molécules de P n'ayant pas réagi peut également s'écrire :

$$n_P(r', t) = \int \rho_R(r, r', t) dr \quad (22)$$

La probabilité qu'une molécule P ou R ait réagi au temps t est (d'après (19) ) :

$$P_R(r', t) = P_P(r', t) = \int p(r, r', t) dr$$
$$P_R(r', t) = \int \frac{\rho_R(r, r', t)}{n_0} dr \quad (23)$$

La vitesse de la réaction à l'instant t peut être exprimée par :

$$v_t = - \frac{d P_R(r', t)}{dt} = - \frac{d P_P(r', t)}{dt} \quad (24)$$

soit d'après (23) :

$$v_t = - \frac{1}{n_0} \int \frac{\partial \rho_R(r, r', t)}{\partial t} dr \quad (25)$$

Remarques :

Cette définition de la vitesse n'est pas la seule possible. La vitesse instantanée peut être définie, non pas à partir du nombre initial de molécules R mais du nombre de molécules R à l'instant t.

Soit :

$$v_t^i = - \frac{1}{\int n(r',t)} \int \frac{\partial \rho(r,r',t)}{\partial t} dr \quad (26)$$

Ce qui revient à considérer une probabilité en  $r$  :

$$p_R^i = \frac{\rho(r,r',t)}{\int n(r',t)} \quad (27)$$

et une probabilité totale :

$$P_R^i = \iint \frac{\rho(r,r',t)}{n(r',t)} dr \quad (28)$$

On définit ainsi la probabilité "a posteriori" (T12) impliquant de savoir le nombre de molécules  $P$  qui ont réagi. Dans la théorie des probabilités les probabilités "a priori" et "a posteriori" sont reliées par le théorème de BAYES :

$$P_R(r,r',t) = p'(r,r',t) P_R(r',t) \quad (29)$$

La fonction densité étant équivalente à une concentration on peut lui appliquer la deuxième loi de FICK :

$$\frac{\partial P_R(r,r',t)}{\partial t} = D \nabla^2 \rho_R(r,r',t) \quad (30)$$

En combinant les équations (20) (24) et (25) on

obtient :

$$\frac{dP_R(r',t)}{dt} = \int_D \nabla^2 p_R(r,r',t) dr \quad (31)$$

et en appliquant le théorème de divergence :

$$\frac{d P_R(r', t)}{dt} = - \iint_{\text{surface}} D \vec{n} \cdot \vec{\nabla} P_R(r, r', t) ds \quad (32)$$

où  $\vec{n}$  est un vecteur unité perpendiculaire à la surface, dirigé vers l'infini.

Quand  $r' \rightarrow r_0$  l'intégrale est égale au flux :

$$\left( \iint_{\text{surface}} D \vec{n} \cdot \vec{\nabla} P_R(r, r', t) ds \right)_{r \rightarrow r_0} = \phi \quad (33)$$

Toutes ces équations sont générales, c'est-à-dire indépendantes de l'efficacité totale ou non des chocs intermoléculaires.

L'hypothèse de COLLINS et KIMBALL, pour tenir compte des chocs qui ne sont pas efficaces, consiste à relier la vitesse à la probabilité "a priori" de trouver une molécule R dans un volume compris entre une sphère de rayon  $r_0$  et une sphère de rayon  $r_0 + \Delta r_0$ . Cette hypothèse peut se traduire mathématiquement par :

$$v_t = - \frac{dP_r(r', t)}{dt} = K' \Delta r_0 \iint_{\text{surface}} P_R(r, r', t) ds \quad (34)$$

La constante  $K = K' \Delta r_0$  est équivalente à une vitesse.

## 2 - Application aux peptides

L'équation (34) est théoriquement valable pour une réaction sans encombrement stérique. Dans le cas où il y a restriction de l'espace nous proposons, comme précédemment, de distinguer plusieurs cas :

### a - Hypothèse d'un encombrement stérique continu dans l'espace

Dans ce cas la surface en  $r$  est égale, quel que soit  $r$  à  $4 \pi r^2 C$  (surface efficace définie comme précédemment), les équations (32) et (34) sont applicables avec la surface corrigée. Si on combine (32) et (34) on obtient :

$$D \vec{n} \cdot \vec{\nabla} p_R(r, r', t) = K p_R(r, r', t)$$

Sur la sphère de réactivité on peut alors écrire :

$$(D \vec{n} \cdot \vec{\nabla} p_R(r, r', t))_{r=r_0} = K(p_R(r, r', t))_{r=r_0} \quad (35)$$

soit sous une autre forme :

$$p_R(r_0, r', t) = \frac{D}{K} \left[ \frac{\partial p_R(r, r', t)}{\partial r} \right]_{r=r_0} \quad (36)$$

Cette relation est une condition limite indépendante du facteur C, de l'équation de FICK :

$$\frac{\partial p_R(r, r', t)}{\partial t} = D \nabla^2 p_R(r, r', t) \quad (37)$$

La solution de l'équation (37) est alors connue :

$$p_R(r, r', t) = 1 - \frac{r_0 - \beta}{r} \left[ \operatorname{erfc} \frac{r - r_0}{\sqrt{4Dt}} + \exp \left[ \frac{Dt}{\beta^2} + \frac{r - r_0}{\beta} \right] \operatorname{erfc} \left[ \frac{\sqrt{Dt}}{\beta} + \frac{r - r_0}{\sqrt{4Dt}} \right] \right] \quad (38)$$

avec :

$$\frac{1}{\beta} = \frac{K}{D} + \frac{1}{r_0} \quad (39)$$

En considérant le flux sur la surface de réactivité on obtient :

$$k(t) = 4 \pi N' D C \left[ r_0 - \beta + \frac{(r_0 - \beta)^2}{\beta} \exp \left( \frac{Dt}{\beta^2} \right) \operatorname{erfc} \frac{\sqrt{Dt}}{\beta} \right] \quad (40)$$

Remarques :

L'équation (40) est obtenue que l'on définisse la vitesse à partir d'une probabilité "a priori" (équation (25)) ou "a posteriori" (équation (26)), la différence étant au niveau de l'expression de cette vitesse.

COLLINS et KIMBALL ont montré que la relation équivalente à (40), dans le cas d'une réaction chimique ordinaire,

était généralisable au cas d'une seule molécule P en présence de plusieurs molécules R à condition que le nombre de molécules R ne soit pas trop important.

b - Hypothèse d'un encombrement stérique limité

Considérons le cas limite envisagé lors d'une réaction totalement efficace : un encombrement stérique limité à la surface de la sphère de réactivité. L'équation (32) est maintenant discontinue. En  $r_0$  la surface intégrée est égale à  $4\pi r_0^2 C$ , partout ailleurs elle est égale à  $4\pi r^2$ . Si on combine les équations (32) et (34) on obtient :

$$\iint_{S'} D \vec{n} \cdot \vec{\nabla} p_R(r, r', t) ds = K' \Delta r_0 \iint_S p_R(r, r', t) ds$$

Pour  $r = r_0$ ,  $S'$  est différent de  $S$ . Si on considère que  $\Delta r_0 \iint_S p(r_0, r', t) ds$  représente une probabilité de présence dans un volume suffisamment petit au voisinage de  $r_0$  pour que la surface des sphères entre  $r_0$  et  $r_0 + \Delta r_0$  soit assimilable à celle de rayon  $r_0$ , alors  $S' = S \cdot C$ .

Le théorème de la moyenne pour les intégrales doubles précise qu'il existe, pour une fonction continue  $f(u)$ , un point du domaine d'intégration vérifiant :

$$\iint_S f(u') ds = f(u') \cdot S$$

Comme la base de notre modèle est de considérer les fonctions  $p_R(r, r', t)$  continues et symétriques par rapport à l'origine des coordonnées, l'existence d'un seul point vérifiant le théorème entraîne la possibilité d'appliquer ce théorème à tous les points de la surface. On obtient, alors, la nouvelle condition limite :

$$p_R(r_0, r', t) = \left[ \frac{DC}{K} \cdot \frac{\partial p_R(r, r', t)}{\partial r} \right]_{r=r_0} \quad (41)$$

En poursuivant le calcul comme précédemment on trouve alors une expression identique à l'équation (40) mais avec :

$$\frac{1}{\beta} = \frac{K}{DC} + \frac{1}{r_0} \quad (42)$$

Dans l'expression de la constante de vitesse le facteur C n'intervient plus comme un simple terme multiplicatif.

c - Modèle pour un cas intermédiaire

Considérons le cas général d'un petit peptide avec un encombrement stérique se limitant au voisinage de la sphère de réactivité. Entre  $r_0$  et  $r_0 + \Delta r_0$  le facteur C (accessibilité calculée pour le rayon considéré) peut ne pas être constant. Dans ces conditions le calcul complet et rigoureux de l'expression  $K' \Delta r_0 \iint_{\text{surface}} p_R(r, r', t)$  est très complexe, d'autant plus que l'équation de FICK devrait être modifiée pour tenir compte du volume exclu de l'espace.

On peut toutefois obtenir une solution approchée en admettant que l'ensemble des restrictions peut être traduit par une condition limite, représentant physiquement la probabilité de présence moyenne entre  $r_0$  et  $r_0 + \Delta r_0$ . Cette probabilité moyenne peut être reliée à un facteur d'accessibilité moyenne  $C_M$  par :

$$\left[ p_{Rm}(r, r', t) \right]_{r_0 < r < r_0 + \Delta r_0} = C_M \left[ p_R(r, r', t) \right]_{r_0 < r < r_0 + \Delta r_0} \quad (43)$$

$C_M$  est calculé en effectuant la moyenne des valeurs des coefficients d'accessibilité pour des rayons de la sphère de réactivité compris entre  $r_0$  et  $r_0 + \Delta r_0$  (méthode exposée au paragraphe calcul de l'accessibilité).

On obtient alors l'équation (40) avec la constante généralisée :

$$\frac{1}{\beta} = \frac{KC_M}{DC} + \frac{1}{r_0} \quad (44)$$

On vérifie que si l'accessibilité est constante entre  $r_0$  et  $r_0 + \Delta r_0$  on retrouve l'équation (39) et que si elle est égale à 1 dans les mêmes conditions on retrouve l'équation (42).

Généralement  $\Delta r_0$  ne peut être calculée, on peut alors faire l'approximation suivante :

Si le peptide "déborde" peu de la sphère de réactivité, l'accessibilité en  $r_0$  est égale à C et en  $r_0 + \Delta r_0$  peut être considérée comme égale à 1; il en résulte la valeur approchée de  $C_M$  :

$$C_M = \frac{1 + C}{2} \quad \text{et} \quad \frac{1}{\beta} = \frac{K(1+C)}{2 DC} + \frac{1}{r_0}$$

#### d - Conclusions

On sait que l'expression asymptotique de  $\text{erfc } x$  est :

$$\text{erfc } x = \frac{1}{x\sqrt{\pi}} e^{-x^2} \left( 1 - \frac{1}{2x^2} + \frac{3}{4x^4} - \frac{15}{8x^6} + \dots \right)$$

Si dans la relation (40) on pose  $x = \frac{\sqrt{Dt}}{\beta}$  on peut effectuer des simplifications. WARE (T9) reprenant les calculs de NOYES (T8) a montré que même pour des temps de l'ordre de la nanoseconde on peut négliger les termes dépendant de  $x$  dans la série entre parenthèses. En conséquence :

$$\exp\left(\frac{Dt}{\beta^2}\right) \text{erfc} \frac{\sqrt{Dt}}{\beta} = \frac{\beta}{\sqrt{\pi Dt}}$$

et l'expression de la constante de vitesse peut finalement s'écrire :

$$k(t) = 4 \pi N' DC \quad r' \left( 1 + \frac{r'}{\sqrt{\pi Dt}} \right) \quad (45)$$

avec dans le cas général :

$$r' = \frac{r_0}{1 + \frac{DC}{K C_M r_0}} \quad (46)$$

Sous cette forme on voit bien l'analogie avec le résultat obtenu pour des chocs totalement efficaces (équation (8) ).

Quand la mesure des constantes de vitesse est faite à des temps suffisamment grands, le terme dépendant du temps s'annule et on peut exprimer plus simplement le rapport des réactivités.

Soient deux conformations (ou structures) I et II  
- hypothèse de l'encombrement stérique de l'espace :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}} \cdot \frac{r_O K + D_{II}}{r_O K + D_I} \quad (47)$$

Pour une réaction rapide (K grand) on peut négliger les coefficients de diffusion dans l'expression entre parenthèses et on retrouve un résultat connu :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}} \quad (48)$$

Dans le cas d'une réaction lente K peut être négligé et :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{C_I}{C_{II}} \quad (49)$$

Le rapport de réactivité ne dépend que de l'accessibilité des fonctions.

- hypothèse de l'encombrement limité à la sphère de réactivité :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}} \cdot \frac{r_O K + D_{II} C_{II}}{r_O K + D_I C_I} \quad (50)$$

Pour une réaction rapide on retrouve l'équation (48), mais pour une réaction lente :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = 1 \quad (51)$$

La réactivité d'un petit peptide dans ces conditions ne dépend pas de l'accessibilité (Il faut remarquer que le fait de négliger K vis-à-vis de DC implique que C ne soit pas trop petit).

Ce résultat a une influence directe sur l'interprétation des expériences de cinétique de réaction des peptides : si on trouve, pour une même réaction, des vitesses identiques pour des peptides différents il faut, avant de conclure à une analogie de structure, vérifier les caractéristiques des peptides étudiés et de la réaction employée.

- hypothèse d'un cas "général" pour les petits peptides

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}} \cdot \frac{C_{IM}}{C_{IIM}} \cdot \frac{r_0 K C_{IIM} + D_{II} C_{II}}{r_0 K C_{IM} + D_I C_I} \quad (52)$$

Pour une réaction rapide :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}} \quad (53)$$

Pour une réaction lente :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{C_{IM}}{C_{IIM}} \quad (54)$$

Le rapport des réactivités ne dépend que de l'encombrement stérique moyen dans le "volume de réactivité" (entre  $r_0$  et  $r_0 + \Delta r_0$ ).

Les relations (47) à (54) résument les résultats obtenus par notre modèle dans les cas rencontrés pour une réaction chimique classique uniquement régie par la diffusion de la molécule et l'accessibilité de la fonction.

B - Extinction de fluorescence

Si on reporte dans l'équation (12) la valeur de  $k(t)$  obtenue dans l'équation (45) on retrouve un résultat analogue à l'équation (17) soit :

$$k(\tau_0) = 4 \pi N' r' D \left( 1 + \frac{r'}{\sqrt{D \tau_0}} \right) \quad (55)$$

Les relations (47), (50) et (52) doivent donc être multipliées par un facteur :

$$F = \frac{1 + \frac{r'}{\sqrt{D_I \tau_{0I}}}}{1 + \frac{r'}{\sqrt{D_{II} \tau_{0II}}}} \quad (56)$$

avec dans le cas le plus général :

$$r' = \frac{r_0}{1 + \frac{DC}{K C_M r_0}}$$

Quelle que soit l'hypothèse sur l'encombrement stérique les simplifications du facteur F sont les mêmes :

- Pour une réaction rapide :

$$F = \frac{1 + \frac{r_0}{\sqrt{D_I \tau_{0I}}}}{1 + \frac{r_0}{\sqrt{D_{II} \tau_{0II}}}} \quad (57)$$

- Pour une réaction lente :

$$F = 1$$

En combinant les relations obtenues dans le cas de la réaction chimique et les corrections dues à la fluorescence on obtient l'ensemble des résultats résumés dans les tableaux 9, 10 et 11.

Remarque :

Le fait de considérer une réaction d'extinction avec un  $K$  très faible est souvent un paradoxe dans la pratique. Si la cinétique d'extinction est lente par rapport à la durée de vie de l'état excité elle n'a pas le temps d'être efficace et le rendement quantique n'est pas modifié.

#### IV - EFFETS ELECTROSTATIQUES

##### A - Généralités

L'étude des peptides se fait généralement à des pH voisins de leur point isoélectrique. Les fonctions amines terminales et carboxyles terminales peuvent donc porter des charges. L'influence de ces charges sur la diffusion des réactifs peut être négligée tant que ceux-ci ne sont pas ionisés.

Si le réactif est un ion sa probabilité de présence au voisinage du peptide ne sera pas identique du côté N terminal et C terminal.

Les différents travaux traitant de l'influence de l'effet électrostatique concernent généralement des recombinaisons d'ions, c'est-à-dire des potentiels coulombiens.

ONSAGER (T13, T14), MOZUMDER (T15, T16), MAGEE (T17) et récemment HONG et NOOLANDI (T18) ont envisagé le cas de la neutralisation de paires d'ions dans l'espace soumis soit à leur propre champ soit, en plus, à un champ extérieur.

DEBYE (T19), UMBERGER et LA MER (T4), MONTROLL (T20), WILEMSKI et FIXMAN (T21), HONG et NOOLANDI (T22) ont généralisé l'équation de SMOLUCHOWSKI et l'ont appliquée à la réaction chimique et à l'extinction de fluorescence d'ions (l'un des ions étant le fluorophore).

Les résultats de ces travaux sont résumés ci-après, dans le formalisme précédemment employé.

L'équation de SMOLUCHOWSKI avec deux ions portant une charge  $z_{e+}$  et  $z_{e-}$  peut s'écrire pour un mécanisme élémentaire :

$$\frac{\partial \rho_R(r, r', t)}{\partial t} = D \left[ \frac{\partial^2 \rho_R(r, r', t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \rho_R(r, r', t)}{\partial r} + \frac{z_{e+} z_{e-}}{\epsilon r^2 k_B T} \frac{\partial \rho_R(r, r', t)}{\partial r} \right] \quad (58)$$

$\epsilon$  : constante diélectrique du milieu

$k_B$  : constante de BOLTZMAN

$T$  : température absolue

Si on considère une réaction chimique avec chocs inefficaces on peut inclure la condition de disparition du réactif R par une fonction de DIRAC multipliée par une constante de réactivité  $K$  ( $\Delta r_0$  est alors considéré comme très petit). On obtient finalement l'équation à résoudre :

$$\frac{\partial \rho_R(r, r', t)}{\partial t} - D \left[ \frac{\partial^2 \rho_R(r, r', t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \rho_R(r, r', t)}{\partial r} + \frac{z_{e+} z_{e-}}{\epsilon r^2 k_B T} \frac{\partial \rho_R(r, r', t)}{\partial r} \right] + K \rho_R(r, r', t) \delta(r - r_0) = 0 \quad (59)$$

Des solutions approchées (MONTROLL (T20) ) ou exactes (HONG et NOOLANDI (T18, T22) ont été trouvées. Elles aboutissent à une expression de la constante de vitesse qui peut se mettre sous la forme :

$$k(t) = 4 \pi D A \left( 1 + \frac{A}{\sqrt{\pi D t}} \right) \quad (60)$$

avec :

$$A = \frac{z_{e^+} + z_{e^-}}{\epsilon k_B T \left[ 1 + \left( \frac{z_{e^+} + z_{e^-} - D}{K \epsilon k_B T r_0^2} - 1 \right) \exp\left(-\frac{z_{e^+} + z_{e^-}}{k_B T r_0}\right) \right]} \quad (61)$$

DEBYE (T19) a, d'autre part, calculé l'influence d'un potentiel quelconque sur la fréquence de collision entre deux particules. Il a montré que cette fréquence pouvait s'exprimer en l'absence de potentiel par :

$$v = \frac{1}{4} \left( 2 + \frac{d_1}{d_2} + \frac{d_2}{d_1} \right) \frac{8 k_B T}{3 \eta} n \quad (62)$$

avec :

$d_1$  et  $d_2$  : diamètres des particules considérées comme sphériques

$\eta$  : viscosité du milieu

$n$  : nombre de moles par ml.

S'il existe une énergie potentielle  $U$  dépendant de la distance  $r$  entre les centres des particules la fréquence devient :

$$v = \frac{\frac{1}{2} \left( \frac{1}{d_1} + \frac{1}{d_2} \right)}{\int_{d_1+d_2}^{\infty} e^{-U/k_B T} \frac{dr}{r^2}} \cdot \frac{8 k_B T}{3 \eta} n \quad (63)$$

HONG et NOOLANDI (T22) ont retrouvé un résultat analogue en résolvant l'équation (59) pour un potentiel généralisé mais seulement dans les conditions d'état stationnaire envisagées par DEBYE.

Ils n'ont pu résoudre exactement l'équation dans le domaine des temps courts mais, utilisant la méthode des "perturbations accordées" (matched perturbation) (T23) ils ont obtenu de nouveau l'équation (60) avec :

$$A^{-1} = \frac{D e^{\frac{U(r_0)}{k_B T}}}{K r_0^2} + \int_{r_0}^{\infty} e^{\frac{U(r)}{k_B T}} \frac{dr}{r^2} \quad (64)$$

où  $U(r)$  représente la fonction énergie potentielle.

Ce résultat n'est valable que si  $U(r)$  décroît (vers zéro) au moins aussi rapidement que  $\frac{1}{r}$  quand  $r \rightarrow \infty$ .

On peut remarquer qu'il existe toujours une deuxième condition implicite : la symétrie du potentiel est centrée sur l'ion.

Les relations de HONG et NOOLANDI représentent une généralisation de l'étude de DEBYE. Les auteurs ont étendu l'application à l'extinction de fluorescence. Dans ce cas la constante de vitesse de la réaction bimoléculaire s'écrit (pour une extinction à l'état stationnaire)

$$k(t) = 4 \pi AD \left( 1 + \frac{A}{\sqrt{D\tau_0}} \right) \quad (65)$$

A étant toujours défini par la relation (64)

## B - Application aux peptides

La résolution des équations de SMOLUCHOWSKI dans le cas où il existe un potentiel ayant une symétrie sphérique est, comme nous l'avons vu, complexe. Si on supprime cette symétrie la difficulté s'accroît et le calcul rigoureux n'a, à notre connaissance, jamais été réalisé.

Or, l'énergie potentielle résultant de l'effet électrostatique des 2 charges terminales d'un peptide doit

être représentée dans le système de référence centré sur la fonction réactive pour pouvoir utiliser l'équation de SMOLUCHOWSKI avec la pseudo symétrie de la fonction densité. Dans ce système le potentiel résultant n'a pas de symétrie sphérique. Nous avons donc cherché à établir un modèle en utilisant une solution approchée.

Le potentiel créé par l'ensemble des deux charges terminales du peptide est équivalent à un potentiel créé par un dipôle, c'est-à-dire qu'il décroît plus vite que  $\frac{1}{r}$  quand  $r$  tend vers l'infini.

Une des conditions de l'application des relations de HONG et NOOLANDI est vérifiée.

La seconde condition est la symétrie du potentiel, Le problème est donc de savoir si on peut utiliser une pseudo symétrie sphérique pour le potentiel comme on l'a fait pour la fonction densité.

L'expression (64) se divise en 2 parties. La première dépend du potentiel sur la sphère de réactivité : c'est la contribution du potentiel à la probabilité de présence du réactif en  $r_0$  que l'on pourrait appeler contribution statique. Elle représente la tendance, due au potentiel, à "retenir" un temps plus ou moins long ou à "repousser" le réactif qui arriverait à une distance  $r_0$ . On peut remarquer que ce terme s'annule quand  $K \rightarrow \infty$  puisque la réaction est immédiate. Quand on observe un grand nombre d'événements le potentiel moyen auquel est soumis un ion arrivant sur la sphère de réactivité peut s'écrire :

$$\bar{U}(r_0) = \frac{\sum_{i=1}^n U_i(r_0)}{n}$$

Le modèle que nous proposons consiste à considérer que l'on peut remplacer dans l'expression (64)  $U(r_0)$  par  $\bar{U}(r_0)$ .

La deuxième partie de cette équation est la contribution dynamique du potentiel. C'est la tendance à favoriser ou défavoriser l'arrivée d'ions sur la sphère de réactivité. On peut, d'une manière analogue à la contribution statique, considérer que  $U(r)$  peut être remplacé par  $\bar{U}(r)$  :

$$\bar{U}(r) = \frac{\sum_{i=1}^n U_i(r)}{n}$$

Mais il faut ajouter une condition supplémentaire qui était implicite pour un potentiel coulombien : la monotonie de la fonction  $\bar{U}(r)$ .

Supposons que  $\bar{U}(r)$  ne soit pas monotone et qu'il existe entre  $r_0$  et l'infini une barrière ou un puits de potentiel. Dans le premier cas l'expression de l'intégrale sera (par exemple) augmentée, dans le deuxième cas, elle sera diminuée. Mathématiquement on obtiendra deux résultats inverses. Physiquement le résultat sera pourtant le même. La barrière de potentiel empêchera une fraction du réactif d'atteindre la sphère de réactivité et le puits de potentiel retiendra une fraction de ce même réactif qui n'atteindra pas non plus la sphère de réactivité. Cette contradiction entre les résultats mathématiques et physiques montre qu'il est indispensable d'avoir une fonction monotone, ce qui est facilement vérifiable.

Si on admet l'utilisation de potentiels moyens on doit reprendre les calculs de HONG et NOOLANDI pour y introduire la notion d'accessibilité et on obtient :

$$k(t) = 4 \pi D A \left(1 + \frac{A}{\sqrt{\pi D t}}\right) C \quad (67)$$

avec :

$$A^{-1} = \frac{D C e^{\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{K C_M r_0^2} + \int_{r_0}^{\infty} e^{\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}} \frac{dr}{r^2} \quad (68)$$

Dans le cas de l'extinction de fluorescence :

$$k(\tau_0) = 4 \pi D A \left(1 + \frac{A}{\sqrt{D \tau_0}}\right) C \quad (69)$$

A étant toujours défini par l'équation (68).

Exprimons les rapports de réactivité pour deux environnements de la fonction réactive I et II :

Réaction chimique :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I A_I}{D_{II} C_{II} A_{II}} \left[ \frac{1 + A_I / \sqrt{\pi D_I t}}{1 + A_{II} / \sqrt{\pi D_{II} t}} \right] \quad (70)$$

Pour des temps suffisamment longs :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I A_I}{D_{II} C_{II} A_{II}} \quad (71)$$

- si la réaction est rapide :

$$A^{-1} = \int_{r_0}^{\infty} \frac{dr}{r^2} e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B t}} \quad (72)$$

- si la réaction est lente l'expression (71) se simplifie :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{C_{MI}}{C_{MII}} \cdot \frac{e^{-\frac{\bar{U}_{II}(r_0)}{k_B t}}}{e^{-\frac{\bar{U}_I(r_0)}{k_B T}}} \quad (73)$$

Extinction de fluorescence :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I A_I}{D_{II} C_{II} A_{II}} \left[ \frac{1 + A_I / \sqrt{D_I \tau_{OI}}}{1 + A_{II} / \sqrt{D_{II} \tau_{OII}}} \right] \quad (74)$$

- si la réaction est rapide on retrouve la condition (72)
- si la réaction est lente on retrouve la relation (73)

### C - Modèle pour le calcul du potentiel moyen pour un peptide

Considérons un peptide dont les extrémités (amine et carboxyle) terminales sont chargées. Pour calculer le potentiel moyen créé par ces charges à une distance  $r$  on considèrera un certain nombre de points situés à cette distance.

Avant de calculer en chaque point le potentiel résultant il convient de connaître si, en ce point, peut se trouver le centre d'un ion réactif (s'il n'y a pas encombrement stérique). On utilisera pour cela la matrice accessibilité définie dans un chapitre précédent.

On peut remarquer que la notion de trajectoire linéaire n'a plus de sens quand les extrémités du peptide sont chargées et qu'il convient de parler de probabilité de présence.

#### Hypothèse de l'occupation continue de l'espace

L'accessibilité d'une sphère ne varie pas en fonction de  $r$ . Les régions de l'espace non encombrées stériquement correspondent à l'ensemble des points situés sur les trajectoires linéaires utilisées pour les réactifs non chargés. Les ions centrés en ces points peuvent tous atteindre la sphère de réactivité puisqu'ils ne sont arrêtés par aucun obstacle, la déviation de leurs trajectoires pouvant, tout au plus, les faire "rebondir".

Dans ces conditions, quel que soit  $r$ , le calcul des potentiels résultant se fera pour tous les points situés sur les trajectoires permises déterminées lors de l'évaluation de l'accessibilité.

Hypothèse de l'encombrement stérique limité à la sphère de réactivité.

Le calcul en  $r_0$  se fait pour les points situés sur les trajectoires permises. Mais pour  $r > r_0$  le calcul se fait pour l'ensemble des trajectoires.

### Cas général

Pour calculer une accessibilité moyenne il est nécessaire de calculer un ensemble d'accessibilités. Pour chacune de ces accessibilités il faut établir une matrice qui servira également au balayage de l'espace pour l'établissement d'un potentiel moyen.

Considérons un point  $i$  à une distance  $r$  où la probabilité de présence d'un ion réactif n'est pas nulle. Ce point ne sera soumis au potentiel créé par une charge que si aucun atome du peptide ne fait écran entre la charge et lui.

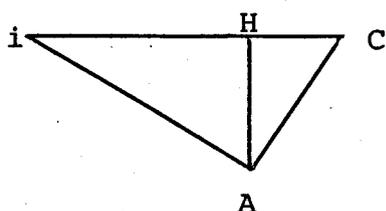
Si le point  $i$  est situé sur une direction  $X_i, Y_i$  de la matrice accessibilité :

$$x_i = r \cos Y_i \sin X_i$$

$$y_i = r \sin Y_i \sin X_i$$

$$z_i = r \cos X_i$$

Soient  $x_C, y_C$  et  $z_C$  les coordonnées de la charge et  $x_A, y_A, z_A$  les coordonnées d'un atome du peptide.



L'atome A ne fera pas écran si AH (segment reliant l'atome à sa projection sur la droite joignant  $i$  à  $C$ ) est supérieur au rayon de VAN DER WAALS de l'atome A.

Connaissant les coordonnées de  $i$ ,  $C$  et  $A$  on peut calculer :  $iA$ ,  $AC$ ,  $iC$  et on sait que :

$$AH = \frac{2\sqrt{u(u-AC)(u-iA)(u-iC)}}{iC}$$

avec :

$$u = \frac{iA + AC + iC}{2}$$

Si  $AH$  est inférieur au rayon de VAN DER WAALS de  $A$ , cet atome ne fera pas écran si  $H$  est à l'extérieur du segment  $iC$  soit :

$$iH > iC \quad \text{avec} \quad iH = \sqrt{iA^2 - AH^2}$$

ou

$$CH > iC \quad \text{avec} \quad CH = \sqrt{AC^2 - AH^2}$$

Supposons que le point  $i$  soit soumis au potentiel créé par  $C$  :

$$U_C = \frac{q_i q'}{4 \pi \epsilon iC} \quad (75)$$

On connaît  $q_i$  et la distance  $iC$ .  $\epsilon$  est la constante diélectrique du milieu.

Les réactions avec les ions se font généralement dans l'eau dont la constante diélectrique est égale à  $\epsilon_0 \cdot \epsilon_r$ .

$\epsilon_0$  : constante diélectrique du vide

$\epsilon_r$  : terme correctif

Au voisinage d'un ion il est bien connu que le terme  $\epsilon_r$  varie très fortement. La théorie permettant un calcul rigoureux n'est pas, à notre connaissance, parfaitement établie. On connaît, approximativement, la variation de  $\epsilon_r$  en fonction de la distance  $d$  à cet ion (T24); sa valeur devient constante dès que  $d$  est supérieur à 6 Å ou inférieur à 2 Å.

Dans notre cas on peut fréquemment rencontrer des points à des distances de l'ordre de 2 à 6 Å d'une charge.

Il est donc indispensable de tenir compte de la variation de  $\epsilon_r$ .

Pour cela nous avons utilisé la méthode des polynômes de TCHEBYCHEFF.

Soit la fonction  $\epsilon_r(d)$  définie numériquement par l'ensemble des valeurs  $\epsilon_r$  à une distance  $d$ . Le principe de la méthode est de limiter la représentation à la combinaison linéaire de  $n+1$  fonctions d'une base choisie a priori :

$$\epsilon_r(d) = a_0 u_0(d) + a_1 u_1(d) + \dots + a_n u_n(d) \quad (76)$$

où  $u_i(d)$  sont les fonctions de la base et  $a_i$  des coefficients qu'il faut déterminer.

Afin d'éviter les erreurs de troncature dues aux procédés de calcul on utilise généralement les bases "stables" des polynômes de TCHEBYCHEFF.

$$T_{k+1}(y) = 2y T_k(y) - T_{k-1}(y)$$

$$\text{avec } T_0 = 1 \quad \text{et} \quad T_1(y) = y$$

sur l'intervalle  $-1 \leq T_k(y) \leq 1$

La nécessité de n'utiliser les polynômes de TCHEBYCHEFF que sur l'intervalle  $-1, +1$  nous oblige à un changement de variable préalable :

$$y = \frac{2d - d_{\min} - d_{\max}}{d_{\max} - d_{\min}}$$

$d$  appartenant à l'intervalle  $d_{\min}, d_{\max}$  sur lequel est recherchée l'approximation.

On peut voir d'après (76) que pour  $n$  valeurs de  $d$  le problème revient à résoudre un système d'équations linéaires du type :

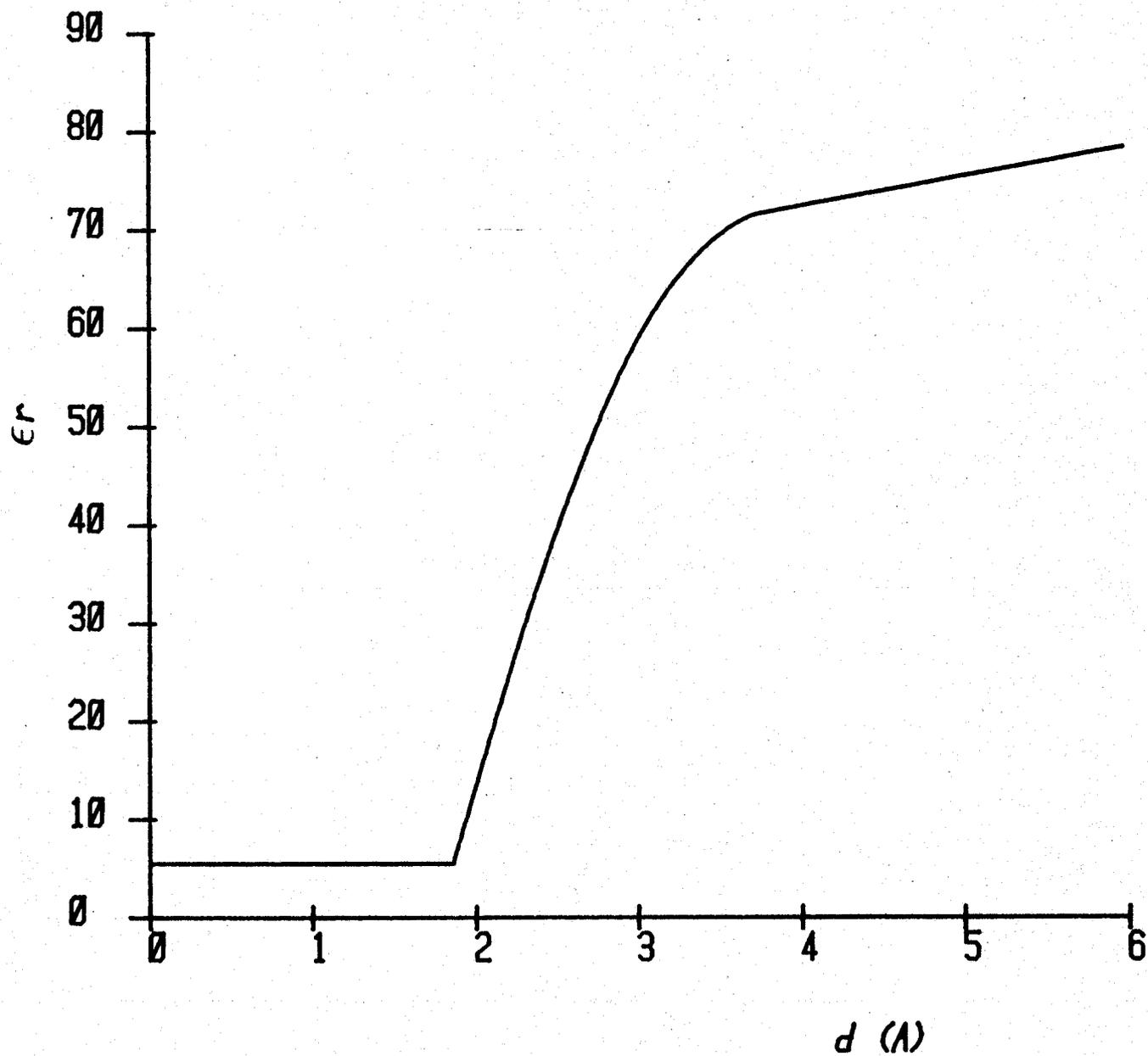


FIG 13': VARIATION DE  $\epsilon_r$  EN FONCTION DE LA DISTANCE



$$[\epsilon] = [V] [A] \quad (77)$$

[V] : matrice carrée des valeurs de  $u(d)$

[A] : matrice colonne des coefficients recherchés

[ $\epsilon$ ] : matrice colonne des valeurs de  $\epsilon_r$ .

La résolution de l'équation (77) se fait en multipliant les 2 membres par la matrice inverse de [V].

$$[V]^{-1} [\epsilon] = [V]^{-1} [V] [A] = [A]$$

La programmation de cette méthode, classique en analyse numérique, est simple et nous avons trouvé pour  $\epsilon_r$  entre 1,85 et 3,75 Å un polynôme de TCHEBYCHEFF d'ordre 5 avec les coefficients :

$$a_1 = 35, \quad a_2 = 57, \quad a_3 = -20, \quad a_4 = -1, \quad a_5 = 4$$

Entre 3,75 et 6 Å la variation de  $\epsilon_r$  peut être représentée par la fonction :

$$\epsilon_r(d) = 71,69 + 3,027 (d - 3,75)$$

$$\text{Pour } d > 6 \text{ \AA} \quad \epsilon_r = 78,5$$

$$\text{Pour } d < 1,85 \text{ \AA} \quad \epsilon_r = 5,5$$

L'ensemble des résultats est résumé dans la figure 13'. La courbe représente une approximation des valeurs de  $\epsilon_r$  suffisante pour notre calcul.

Dès lors connaissant toutes les valeurs de l'équation (75) on peut calculer les potentiels moyens à différentes valeurs de  $r$ .

On en déduit  $e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}$ . Quand il est nécessaire de calculer l'intégrale :

$$I = \int_{r_0}^{\infty} \frac{dr}{r^2} e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}$$

on utilise une méthode d'intégration tabulée :  
comme la fonction à intégrer tend rapidement vers 0 quand r croît, on fixe une limite r' où elle est considérée comme nulle. Les valeurs entre r<sub>0</sub> et r' sont tabulées et on applique la méthode d'intégration numérique à 5 points :

$$I = \frac{2h}{45} \left[ 7f(r) + 32f(r+h) + 12f(r+2h) + 32f(r+3h) + 7f(r+4h) \right]$$

h : intervalle entre 2 valeurs de r (cet intervalle doit être régulier)

f(x) : valeur de la fonction au point x

La valeur de l'intégrale I est la somme des V entre r<sub>0</sub> et r'.

Le test de la monotonie de la fonction se fait en comparant ses valeurs point à point.

A partir de toutes ces données les différentes équations établies peuvent être appliquées.

## V - CONCLUSION

A partir de la théorie de la diffusion nous avons établi un certain nombre de relations permettant de relier la réactivité d'une fonction à la variation de conformation du peptide qui la porte, par l'intermédiaire de l'accessibilité et du coefficient de diffusion.

Ces relations, regroupées dans les tableaux 9, 10, 11, 12 tendent à montrer que l'influence de la conformation sur la réactivité d'un peptide n'est pas la même pour une réaction rapide et pour une réaction lente, pour un peptide de petite dimension et pour un peptide de grande dimension. Il convient donc, avant d'interpréter des résultats de réactivité, d'examiner la nature du peptide et les conditions expérimentales.

$k_I/k_{II}$	Expression générale	Expression pour des temps de mesure suffisamment longs
réaction chimique	$\frac{D_I C_I \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{\pi D_I t}}\right)}{D_{II} C_{II} \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{\pi D_{II} t}}\right)}$	$\frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}}$
extinction de fluorescence	$\frac{D_I C_I \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	

D : coefficient de diffusion du peptide

C : accessibilité de la fonction

$r_o$  : rayon de la sphère de réactivité

$\tau_o$  : durée de vie du fluorophore en l'absence d'extincteur

TABLEAU 9

*Rapport des constantes de vitesse de la réaction d'une fonction dans deux structures peptidiques I et II*  
*Cas de réactions avec chocs bimoléculaires*  
*totalemt efficaces*



$k_I/k_{II}$	Expression générale	expression pour des temps de mesure suffisamment longs	Réaction rapide	Réaction lente
hypothèse de l'encombrement continu de l'espace	$\frac{D_I C_I (r_0 K + D_{II}) \left(1 + \frac{r_0}{\left(1 + \frac{D_I}{K r_0}\right) \sqrt{\pi D_I t}}\right)}{D_{II} C_{II} (r_0 K + D_I) \left(1 + \frac{r_0}{\left(1 + \frac{D_{II}}{K r_0}\right) \sqrt{\pi D_{II} t}}\right)}$	$\frac{D_I C_I (r_0 K + D_{II})}{D_{II} C_{II} (r_0 K + D_I)}$	$\frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}}$	$\frac{C_I}{C_{II}}$
hypothèse de l'encombrement stérique limité la sphère de réactivité	$\frac{D_I C_I (r_0 K + D_{II} C_{II}) \left(1 + \frac{r_0}{\left(1 + \frac{D_I C_I}{K r_0}\right) \sqrt{\pi D_I t}}\right)}{D_{II} C_{II} (r_0 K + D_I C_I) \left(1 + \frac{r_0}{\left(1 + \frac{D_{II} C_{II}}{K r_0}\right) \sqrt{\pi D_{II} t}}\right)}$	$\frac{D_I C_I (r_0 K + D_{II} C_{II})}{D_{II} C_{II} (r_0 K + D_I C_I)}$	$\frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}}$	1
cas général de l'encombrement stérique	$\frac{D_I C_I C_{IM} (r_0 K C_{IM} + D_{II} C_{II}) \left(1 + \frac{r_0}{\left(1 + \frac{D_I C_I}{K r_0 C_{IM}}\right) \sqrt{\pi D_I t}}\right)}{D_{II} C_{II} C_{IM} (r_0 K C_{IM} + D_I C_I) \left(1 + \frac{r_0}{\left(1 + \frac{D_{II} C_{II}}{K r_0 C_{IM}}\right) \sqrt{\pi D_{II} t}}\right)}$	$\frac{D_I C_I C_{IM} (r_0 K C_{IM} + D_{II} C_{II})}{D_{II} C_{II} C_{IM} (r_0 K C_{IM} + D_I C_I)}$	$\frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}}$	$\frac{C_{IM}}{C_{IIM}}$
cas d'un peptide de volume comparable à celui de la sphère de réactivité	$\frac{D_I C_I (1+C_I) (r_0 K (1+C_{II}) + 2D_{II} C_{II}) \left(1 + \frac{r_0}{\left(1 + \frac{D_I C_I}{K r_0 (1+C_I)}\right) \sqrt{\pi D_I t}}\right)}{D_{II} C_{II} (1+C_{II}) (r_0 K (1+C_I) + 2D_I C_I) \left(1 + \frac{r_0}{\left(1 + \frac{D_{II} C_{II}}{K r_0 (1+C_{II})}\right) \sqrt{\pi D_{II} t}}\right)}$	$\frac{D_I C_I (1+C_I) (r_0 K (1+C_{II}) + 2D_{II} C_{II})}{D_{II} C_{II} (1+C_{II}) (r_0 K (1+C_I) + 2D_I C_I)}$	$\frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}}$	$\frac{1+C_I}{1+C_{II}}$

K : constante équivalente à une constante de vitesse (déterminable expérimentalement)

$C_M$ : accessibilité moyenne au voisinage de la sphère de réactivité

TABLEAU 10

Rapport des constantes de vitesse, cas d'une réaction chimique avec possibilité de chocs non efficaces du point de vue énergétique.



$k_I/k_{II}$	Expression générale	Réaction rapide	Réact lent
hypothèse de l'encombrement continu de l'espace	$\frac{D_I C_I (r_o K + D_{II}) \left(1 + \frac{r_o}{\left(1 + \frac{D_I}{K r_o}\right) \sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} (r_o K + D_I) \left(1 + \frac{r_o}{\left(1 + \frac{D_{II}}{K r_o}\right) \sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	$\frac{D_I C_I \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	$\frac{C_I}{C_{II}}$
hypothèse de l'encombrement stérique limité à la sphère de réactivité	$\frac{D_I C_I (r_o K + D_{II} C_{II}) \left(1 + \frac{r_o}{\left(1 + \frac{D_I C_I}{K r_o}\right) \sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} (r_o K + D_I C_I) \left(1 + \frac{r_o}{\left(1 + \frac{D_{II} C_{II}}{K r_o}\right) \sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	$\frac{D_I C_I \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	1
Cas général de l'encombrement stérique	$\frac{D_I C_I C_{IM} (r_o K C_{IIM} + D_{II} C_{II}) \left(1 + \frac{r_o}{\left(1 + \frac{D_I C_I}{K r_o C_{IM}}\right) \sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} C_{IIM} (r_o K C_{IIM} + D_I C_I) \left(1 + \frac{r_o}{\left(1 + \frac{D_{II} C_{II}}{K r_o C_{IIM}}\right) \sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	$\frac{D_I C_I \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	$\frac{C_{IM}}{C_{IIN}}$
Cas d'un peptide de volume comparable à celui de la sphère de réactivité	$\frac{D_I C_I (1+C_I) (r_o K (1+C_{II}) + 2D_{II} C_{II}) \left(1 + \frac{r_o}{\left(1 + \frac{2C_I D_I}{K r_o (1+C_I)}\right) \sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} (1+C_{II}) (r_o K (1+C_I) + 2D_I C_I) \left(1 + \frac{r_o}{\left(1 + \frac{2D_{II} C_{II}}{K r_o (1+C_{II})}\right) \sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	$\frac{D_I C_I \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} \left(1 + \frac{r_o}{\sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$	$\frac{1+C_I}{1+C_{II}}$

$\tau_o$  : durée de vie du fluorophore en l'absence d'extincteur

TABLEAU 11

Rapport des constantes de vitesse, cas d'une réaction d'extinction de fluorescence avec possibilité de chocs non efficaces du point de vue énergétique



	Réaction chimique expression générale	Réaction chimique expression pour des temps de mesure suffisamment longs	Réaction d'extinction de fluorescence
$k_I / k_{II}$	$\frac{D_I C_I A_I \left(1 + \frac{A_I}{\sqrt{\pi D_I t}}\right)}{D_{II} C_{II} A_{II} \left(1 + \frac{A_{II}}{\sqrt{\pi D_{II} t}}\right)}$	$\frac{D_I C_I A_I}{D_{II} C_{II} A_{II}}$	$\frac{D_I C_I A_I \left(1 + \frac{A_I}{\sqrt{D_I \tau_{OI}}}\right)}{D_{II} C_{II} A_{II} \left(1 + \frac{A_{II}}{\sqrt{D_{II} \tau_{OII}}}\right)}$
$A^{-1}$	expression générale	réaction rapide	réaction lente
hypothèse de l'encombrement continu de l'espace	$\frac{D}{K} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{r_0^2} + \int_{r_0}^{\infty} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}}{r^2} dr$	$\int_{r_0}^{\infty} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}}{r^2} dr$	$\frac{D}{K} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{r_0^2}$
hypothèse de l'encombrement stérique limité à la sphère de réactivité	$\frac{DC}{K} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{r_0^2} + \int_{r_0}^{\infty} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}}{r^2} dr$	$\int_{r_0}^{\infty} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}}{r^2} dr$	$\frac{DC}{K} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{r_0^2}$
Cas général de l'encombrement stérique	$\frac{DC}{K C_M} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{r_0^2} + \int_{r_0}^{\infty} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}}{r^2} dr$	$\int_{r_0}^{\infty} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}}{r^2} dr$	$\frac{DC}{K C_M} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{r_0^2}$
Cas d'un peptide de volume com- parable à celui de la sphère de réactivité	$\frac{2DC}{K(1+C)} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{r_0^2} + \int_{r_0}^{\infty} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}}{r^2} dr$	$\int_{r_0}^{\infty} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}}{r^2} dr$	$\frac{2DC}{K(1+C)} \frac{e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}}}{r_0^2}$

$\bar{U}(r)$  : valeur moyenne de l'énergie potentielle à la distance  $r$

$k_B$  : constante de BOLTZMANN

$T$  : température absolue

TABLEAU 12

Rapport des constantes de vitesse pour des réactions  
entre un ion et un peptide chargé.



Remarques

- Dans certains cas la fonction  $\frac{Q_0}{Q} = f(E)$  n'est pas une droite (T25, T26).

L'équation de STERN VOLMER doit être modifiée et s'écrit :

$$\frac{Q_0}{Q} = (1 + K_{SV}[E]) e^{-V[E]} \quad (78)$$

où V est la constante statique d'extinction.

Dans les exemples pratiques que nous avons eu à traiter, nous n'avons pas observé ce phénomène et nous n'avons pas cherché l'influence de l'accessibilité dans un tel cas.

- Les résultats présentés dans les tableaux ne sont pas exhaustifs. Dans tous les cas les hypothèses d'encombrement sont identiques pour les environnements I et II du rapport. Si on veut comparer la réactivité de composés de dimension très différente, il suffit de se reporter aux paragraphes correspondants et de calculer le nouveau rapport.

**TROISIEME PARTIE**

**APPLICATION DES MODELES**

PROBATION PART II

APPLICATION FOR PROBATION

Dans la deuxième partie un certain nombre de modèles théoriques ont été élaborés. Afin d'illustrer leur éventuel intérêt deux exemples d'application sont l'objet de cette troisième partie.

La première application consiste à évaluer la réactivité potentielle de deux conformations stables de la Met-Enkephaline, déterminées par le calcul.

La seconde application est l'utilisation des modèles pour la détermination de la conformation des petits peptides à partir des résultats expérimentaux d'extinction de fluorescence.



## C H A P I T R E I

### APPLICATION DES MODELES A L'EVALUATION DE LA REACTIVITE DE LA MET-ENKEPHALINE

La Met-Enkephaline (fig. 14) est un peptide endogène que l'on trouve dans le cerveau des mammifères. Il présente la particularité d'avoir un effet physiologique analogue à celui de la morphine.

Cet intérêt biologique important explique qu'un certain nombre de travaux physico-chimiques aient été réalisés, notamment par Résonance Magnétique Nucléaire, pour étudier sa conformation.

Parallèlement des modèles conformationnels obtenus par le calcul théorique (M1-M6) ont été proposés ainsi que des comparaisons de structure et de forme avec la molécule de morphine (M7 - M9).

Mais, à notre connaissance, peu de travaux théoriques ont eu pour objet direct d'évaluer l'influence de la conformation sur une réactivité éventuelle de la molécule.

#### I - PRINCIPE DU CALCUL

PREMILAT et MAIGRET (M6) ont trouvé par le calcul deux conformations très différentes de la Met-Enkephaline correspondant à des minima d'énergie. L'une d'entre elles est une forme étendue, l'autre est une forme repliée ou "coude" (Tableau 13). Nous avons cherché à évaluer la réactivité de ces deux formes.

La comparaison des réactivités n'a de sens que si l'on connaît le type de réaction et les fonctions impliquées. Afin d'obtenir les résultats les plus généraux possibles nous avons admis les hypothèses suivantes.



Résidu		Conformation "coude"	Conformation "étendue"
Tyr	$\phi$	- 159,9	- 59,7
	$\chi_1$	- 120	- 120
	$\chi_2$	- 120	120
	$\chi_3$	0	- 120
	$\psi$	140,9	120,8
Gly	$\phi$	120,8	- 79,7
	$\psi$	- 59,7	100,7
Gly	$\phi$	- 119,8	60,6
	$\psi$	- 79,7	180
Phe	$\phi$	- 119,8	- 159,9
	$\chi_1$	- 120	- 120
	$\chi_2$	120	- 90
	$\psi$	140,9	120,8
Met	$\phi$	80,6	- 159,9
	$\psi$	40,6	140,9

TABLEAU 13

*Angles diédraux de deux conformations stables  
de la Met enkephaline*



Dans notre calcul la Met-enkephaline est supposée réagir ou interagir soit par les fonctions phénol (de la tyrosine), benzène (de la phényl alanine) et sulfure (de la méthionine) car nous avons constaté que les autres fonctions (carbonyles) étaient très peu accessibles, les acides aminés possédant de longues chaînes latérales.

L'autre réactif est représenté par une sphère dont le rayon est variable. Quand celui-ci est extrêmement grand on peut considérer que le peptide "réagit" avec une fonction portée par un plan ou avec un interface plan. L'influence de la taille du réactif peut, ainsi, être étudiée.

Le calcul a été effectué sur le calculateur Hewlett-Packard 9825 A. Les coordonnées des différents atomes ont été déterminés par l'algorithme décrit dans le chapitre II de la première partie. L'accessibilité des fonctions a été calculée par le modèle décrit au chapitre I de la deuxième partie. Le coefficient de diffusion est évalué à partir d'un ellipsoïde dont les axes sont mesurés graphiquement (chapitre II, deuxième partie). Enfin, le rapport des réactivités a été calculé dans l'hypothèse des trajectoires linéaires pour une réaction avec chocs totalement efficaces :

$$\frac{k_I}{k_{II}} = \frac{D_I C_I}{D_{II} C_{II}}$$

Remarque :

Contrairement aux autres acides aminés la chaîne latérale de la méthionine a été considérée comme une sphère de rayon  $r = 2,32 \text{ \AA}$  (M9).

## II - RESULTATS

### A - Accessibilité des fonctions

#### 1 - Influence du nombre de trajectoires sur l'accessibilité

Lorsqu'on utilise le modèle de calcul de l'accessibilité on doit choisir, arbitrairement un certain nombre de trajectoires. Si ce nombre est trop faible, de grandes parties de l'espace sont ignorées, et le résultat obtenu peut être non significatif. Si on choisit un nombre trop grand le temps de calcul sera augmenté sans améliorer la précision.

Le tableau 14 montre les résultats de l'accessibilité pour 182, 762 et 1742 trajectoires. On peut constater que les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur et le nombre de 762 trajectoires a été retenu pour la suite des calculs.

#### 2 - Influence de la conformation

Le tableau 15 réunit les résultats de l'accessibilité en fonction de la conformation pour différents rayons de VAN DER WAALS du réactif.

Pour les trois résidus on constate que l'accessibilité diminue quand le rayon du réactif augmente mais ne varie pratiquement plus quand ce rayon est supérieur à 6 Å. On remarque également que l'accessibilité des fonctions latérales de la Tyrosine et de la Phénylalanine dépend de la conformation tandis que l'accessibilité de la fonction latérale de la Met-enkephaline n'en dépend pratiquement pas.

C'est la fonction benzène de la Phénylalanine qui présente la plus grande variation d'accessibilité en fonction de la conformation et des dimensions du réactif : l'accessibilité est dix fois plus grande dans la forme repliée que dans la forme étendue quand le rayon du réactif est supérieur ou égal à 6 Å. La fonction phénol de la Tyrosine est également

chaîne latérale du résidu	rayon de Van der Waals du réactif (Å)	Conformation "coudée"			Conformation "étendue"		
		182 traj.	762 traj.	1742 traj.	182 traj.	762 traj.	1742 traj.
Tyr	0	0,851	0,852	0,860	0,776	0,764	0,768
	1,4	0,734	0,734	0,731	0,487	0,493	0,493
	>>10	0,201	0,201	0,199	0,063	0,056	0,061
Phe	0	0,86	0,867	0,871	0,718	0,736	0,741
	1,4	0,717	0,721	0,724	0,533	0,518	0,519
	>>10	0,208	0,209	0,204	0,082	0,021	0,018
Met	0	0,758	0,771	0,770	0,747	0,775	0,765
	1,4	0,411	0,416	0,415	0,405	0,391	0,388
	>>10	0,116	0,121	0,124	0,133	0,131	0,130

TABLEAU 14

*Influence du nombre de trajectoires sur le calcul des accessibilités dans le Met-enkephaline*



chaîne latérale du résidu	rayon de Van der Waals	conformation "coude"	conformation "étendue" C	$r = \frac{C_{\text{coude}}}{C_{\text{étendue}}}$
Tyr	0	0,852	0,764	1,12
	1,4	0,734	0,493	1,49
	3	0,384	0,105	2,66
	6	0,237	0,068	3,49
	10	0,204	0,056	3,64
	>>10	0,201	0,056	3,59
Phe	0	0,867	0,736	1,18
	1,4	0,721	0,518	1,39
	3	0,437	0,199	2,2
	6	0,218	0,022	9,9
	10	0,215	0,021	10,24
	>>10	0,209	0,021	9,95
Met	0	0,771	0,775	0,99
	1,4	0,416	0,391	1,06
	3	0,223	0,230	0,97
	6	0,128	0,138	0,93
	10	0,121	0,131	0,92
	>>10	0,121	0,131	0,92

TABLEAU 15

*Influence de la conformation et du rayon de Van der Waals du réactif sur les accessibilités dans la Met-enkephaline*



plus accessible dans la conformation repliée que dans la conformation étendue, mais le rapport des accessibilités ne dépasse pas 3,6. Pour le résidu Méthionine le rapport des accessibilités est pratiquement constant et égal à 1 : il n'y a aucune différence notable entre les 2 conformations.

### 3 - Influence des angles $\chi$

La conformation de la tyrosine et de la phénylalanine est définie par des angles  $\phi$  et  $\psi$  qui correspondent à la chaîne principale du peptide mais, aussi, par des angles qui correspondent à l'orientation de la chaîne latérale.

Il existe une relation entre les angles  $\phi$  et  $\psi$  et les valeurs permises des angles  $\chi$ , mais il était intéressant de connaître si la variation de ces angles était plus importante que la variation de la forme même de la chaîne principale du peptide.

L'angle susceptible d'entraîner les plus grandes variations d'accessibilité est l'angle  $\chi_1$ . Nous avons fait varier systématiquement cet angle pour les deux résidus en maintenant constants les autres angles. Le tableau 16 montre que la variation des angles  $\chi_1$  modifie la valeur des accessibilités. Mais, dans tous les cas, l'accessibilité pour la conformation "coude" est supérieure à celle pour la conformation "étendue". Dans le cas envisagé c'est bien la forme de la chaîne principale qui est déterminante pour l'accessibilité des fonctions des résidus Tyrosine et Phénylalanine.

### B - Réactivité des fonctions

Le tableau 17 montre que le rapport des constantes de vitesse de réaction calculées est pratiquement identique au rapport des accessibilités des fonctions (tableau 15). Le coefficient de diffusion du peptide, qui intervient également dans le calcul des constantes de vitesse, a donc peu d'influence sur la réactivité de deux conformations, pourtant extrêmes, de la Met-enkephaline.

Angles		Conformation "coude"	Conformation "étendue"	Conformation "coude"	Conformation "étendue"
$\chi_1$ Tyr	$\chi_1$ Phe	Tyr	Tyr	Phe	Phe
- 120	- 120	0,201	0,056	0,209	0,021
- 120	0	0,208	0,115	0,175	0,077
- 120	120	0,208	0,1	0,159	0,105
0	- 120	0,226	0,152	0,218	0
120	- 120	0,228	0	0,218	0,05

TABLEAU 16

*Influence des angles  $\chi_1$  sur les accessibilités  
dans la Met enkephaline*

Rayon de Van der Waals du réactif k "coude" / k "étendue" pour	1,4 Å	3 Å	6 Å	10 Å	>>10
Tyr	1,7	2,6	3,4	3,4	3,1
Phe	1,6	2,2	9,6	9,6	8,8
Met	1,2	1	0,9	0,9	0,8

TABLEAU 17

*Influence de la conformation  
sur les constantes de vitesse*



### III - CONCLUSIONS

L'application de notre modèle montre qu'il peut exister une grande différence de réactivité entre la Met-enkephaline dans la conformation "coude" et la même molécule dans la conformation "étendue".

Le facteur déterminant de la réactivité, si la réaction est gouvernée par la diffusion des molécules, est l'accessibilité des fonctions. L'accessibilité des fonctions des chaînes latérales de la Tyrosine et de la Phénylalanine est beaucoup plus grande dans la forme "coude" que dans la forme "étendue". Si une réaction met en jeu l'une de ces deux fonctions la forme la plus active sera la forme coude. Si elle met en jeu les deux fonctions à la fois (réaction du type biochimique) l'activité de la forme "étendue" sera pratiquement négligeable par rapport à l'activité de la forme "coude". Par contre, une réaction sur la fonction de la chaîne latérale de la Méthionine est insensible à la conformation du peptide, probablement du fait de la position terminale de la Méthionine.

On peut voir, d'après cet exemple, plusieurs applications possibles du modèle.

Il peut servir à choisir, parmi un ensemble de conformations probables, celles qui seront les plus actives pour une réaction donnée. Inversement, il peut éventuellement permettre de prévoir le type de fonction impliquée dans une réaction de mécanisme inconnu si on peut déterminer les conformations actives.

Il peut également servir à introduire un nouveau critère pour la comparaison des molécules naturelles et de leurs analogues de synthèse. En plus de la forme de la molécule et de ses dimensions, il permet de comparer l'accessibilité des fonctions des analogues et, peut-être, d'affiner les critères gouvernant le choix des composés à synthétiser.

Mais dans tous les cas la collaboration de l'expérimentateur qui connaît le système étudié est indispensable pour appliquer correctement le modèle.

## C H A P I T R E    I I

### APPLICATION DES MODELES A LA DETERMINATION DE LA CONFORMATION DES PEPTIDES EN SOLUTION

Dans le paragraphe précédent les modèles ont servi à déterminer une réactivité connaissant la conformation d'un peptide. Il s'agit, maintenant, d'inverser le problème, c'est-à-dire d'essayer d'obtenir des informations sur la conformation d'un peptide en connaissant sa réactivité.

Malheureusement, si à une conformation correspond une réactivité, à une réactivité mesurée peuvent correspondre plusieurs conformations. Il est donc impossible, à partir de la réactivité de déduire une conformation précise. Mais, si un ensemble de conformations présente une réactivité théorique très différente d'un autre ensemble, on peut espérer connaître l'ensemble auquel appartient la conformation du peptide étudié.

Dans le cas des peptides que nous avons synthétisés (Tyr - Pro - Gly - Gly ; Gly - Pro - Tyr - Gly ; Gly - Pro - Gly - Tyr) deux types de conformations sont possibles : "coude" ou "étendue". Nous avons donc essayé d'évaluer théoriquement la réactivité des peptides dans ces deux types de conformations, pour des réactions particulières, puis nous avons comparé les résultats théoriques à des mesures expérimentales.

Pour pouvoir tirer des conclusions des études de réactivité il convient, tout d'abord, de bien choisir les réactions à étudier. Ces réactions doivent être les plus simples possibles et l'étape limitante doit être, impérativement, un choc bimoléculaire. De plus, les conditions expérimentales ne doivent pas perturber la conformation des peptides. Enfin, plus le nombre de paramètres, influant sur la réaction et dépendant de la conformation, est grand, plus les différences de réactivité risquent d'être importantes. De ce fait les réactions avec les molécules chargées sont particulièrement intéressantes.

L'extinction de la fluorescence de la tyrosine par des ions répond à tous ces critères. Elle est, généralement, réalisée dans l'eau, ce qui favorisera la comparaison avec les études de rendement quantique précédemment réalisées. Elle nécessite la mesure de la durée de vie moyenne de fluorescence, qui peut apporter des informations supplémentaires sur la conformation, et elle permet l'emploi de réactifs ( $\text{Cs}^+$ ,  $\text{I}^-$ ) assimilables à une sphère, suivant les hypothèses de nos modèles.

L'extinction de fluorescence de la tyrosine dans les protéines peut être réalisée par des ions positifs ( $\text{Cs}^+$ ) ou négatifs ( $\text{I}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) provenant de la dissociation de sels neutres dans l'eau. Afin de comparer les effets du potentiel électrostatique créé par les peptides sous sa forme zwitterionique sur des charges positives et négatives nous avons choisi d'étudier l'extinction par les ions  $\text{I}^-$  et  $\text{Cs}^+$ .

Contrairement au chapitre précédent, pour comparer les résultats théoriques et expérimentaux il ne suffit plus de savoir laquelle des deux conformations est la plus réactive, mais il faut exprimer les constantes de vitesse par rapport à une référence. L'acide aminé Tyrosine est une référence de choix. Sa taille est petite et le calcul des paramètres est rapide. Il ne pose pas de problème de conformation et les mesures d'extinction de fluorescence sont réalisées dans des conditions identiques pour cet acide aminé et les peptides étudiés.

## I - APPLICATION DES MODELES THEORIQUES

### A - Principes

Les quatre paramètres qui, selon les modèles réalisés, peuvent déterminer la vitesse de réaction théorique sont : l'accessibilité de la tyrosine, le coefficient de diffusion relatif du peptide et du réactif, le potentiel moyen créé par les charges portées par le peptide et la durée de vie de fluorescence de la tyrosine en l'absence d'extincteur.

Les trois premiers paramètres ont été calculés par les modèles correspondants, dans les deux ensembles de conformation "étendue" et "coude". Comme pour les études sur le rendement quantique, on a considéré que les conformations n'étaient pas rigides, c'est-à-dire que les atomes de la molécule de peptide possédaient un certain degré de liberté. Les conformations sont générées de manière aléatoire (chapitre II, première partie) et classées dans l'ensemble "coude" si la distance entre les carbones  $\alpha$  du premier et du quatrième acide aminé est inférieure à 5,7 Å. Dans le cas contraire, la conformation est classée dans l'ensemble "étendu". Une moyenne des valeurs des paramètres est ensuite effectuée dans chaque ensemble.

La durée de vie de l'état excité du noyau phénol des résidus tyrosyles a été obtenue expérimentalement. On ne peut pas connaître la durée de vie moyenne de chaque ensemble et on a utilisé dans tous les cas la valeur mesurée. Il est possible que cette approximation introduise une erreur dans le calcul mais, ayant constaté dans le chapitre II de la première partie que le rendement quantique des peptides étudiés dépendait peu de la conformation, on peut penser que cette erreur est minime.

## B - Résultats

### 1 - Accessibilité et coefficient de diffusion

Les coefficients de VAN DER WAALS déterminés dans les cristaux ont une valeur de 2,16 Å pour  $I^-$ , 1,69 Å pour  $Cs^+$  et 2,30 Å pour l'ion césium hydraté (S1). Pour simplifier le calcul nous avons utilisé un rayon identique pour les deux ions (2,2 Å). Conformément aux travaux de HOMER et ALLSOPP (S2) nous avons utilisé la valeur de 4 Å pour le rayon de fluorophore phénolique. Le rayon de la sphère de réactivité ( $r_0$ ) a donc été fixé à 6,2 Å dans les deux cas.

Le tableau 18 donne les résultats obtenus.

	Accessibilité	Coefficient de diffusion $10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$
Tyrosine	0,907	3,45
Tyr Pro Gly Gly conformation "étendue"	0,693	2,18
Tyr Pro Gly Gly conformation "coude"	0,669	2,54
Gly Pro Tyr Gly Conformation "étendue"	0,681	2,33
Gly Pro Tyr Gly Conformation "coude"	0,675	2,05
Gly Pro Gly Tyr Conformation "étendue"	0,669	2,32
Gly Pro Gly Tyr Conformation "coude"	0,676	2,38

TABLEAU 18

*Accessibilité et coefficient de diffusion théorique  
des peptides dans deux conformations*

On remarque, tout d'abord, que toutes les valeurs des accessibilités sont très voisines pour les peptides. Il n'y a pratiquement pas de différences entre les accessibilités des formes "coude" et étendue" d'un même peptide, et entre les accessibilités des différents peptides

Ainsi, on retrouve un phénomène déjà constaté lors de l'étude du rendement quantique. Quand on travaille sur des ensembles de conformations possibles les caractéristiques (ici l'accessibilité) des petits peptides tendent à prendre des valeurs moyennes qui ne permettent pas de distinguer les différents ensembles.

Les valeurs théoriques des coefficients de diffusion montrent qu'il n'y a pas de comportement systématique de la forme "coude" et de la forme "étendue". Pour le peptide Tyr Pro Gly Gly le coefficient est supérieur pour la conformation "coude", pour Gly Pro Tyr Gly c'est la conformation "étendue" qui est la plus mobile. Enfin, pour Gly Pro Gly Tyr, les résultats sont équivalents pour les deux formes.

On constate, également, que l'accessibilité du noyau phénol de la tyrosine n'est pas égale à 1, certains atomes de la molécule provoquant un encombrement stérique à l'extérieur de la sphère de réactivité. Cet encombrement est toutefois beaucoup plus faible que dans le cas des peptides. Enfin, étant donné la taille de la molécule la mobilité de la tyrosine est supérieure à celle des peptides.

## 2 - Potentieux moyens

Les figures 15 à 17 représentent les valeurs du potentiel créé par les charges terminales des peptides Tyr Pro Gly Gly, Gly Pro Tyr Gly et Gly Pro Gly Tyr. Ce potentiel est représenté en fonction de la distance  $r$  au peptide, les échelles étant les mêmes pour les trois figures.

On peut constater de grandes différences entre les peptides et entre les deux conformations d'un même peptide. Pour le peptide Tyr Pro Gly Gly (fig. 15) le potentiel de la forme "étendue" a une évolution en fonction de la distance, de la forme  $1/r^x$  ( $x > 1$ ). Le potentiel est positif sur la sphère de réactivité du noyau phénol, ce qui est normal puisque les points situés sur cette sphère sont plus proches de la charge positive N-terminale que de la charge négative C - terminale. Il en va très différemment du potentiel pour la conformation "coude". Il y a un rapprochement des extrémités du peptide et corrélativement le noyau phénol de la tyrosine subit les effets électrostatiques antagonistes des charges positives et négatives. Le potentiel moyen est, de ce fait, très faible et pratiquement constant

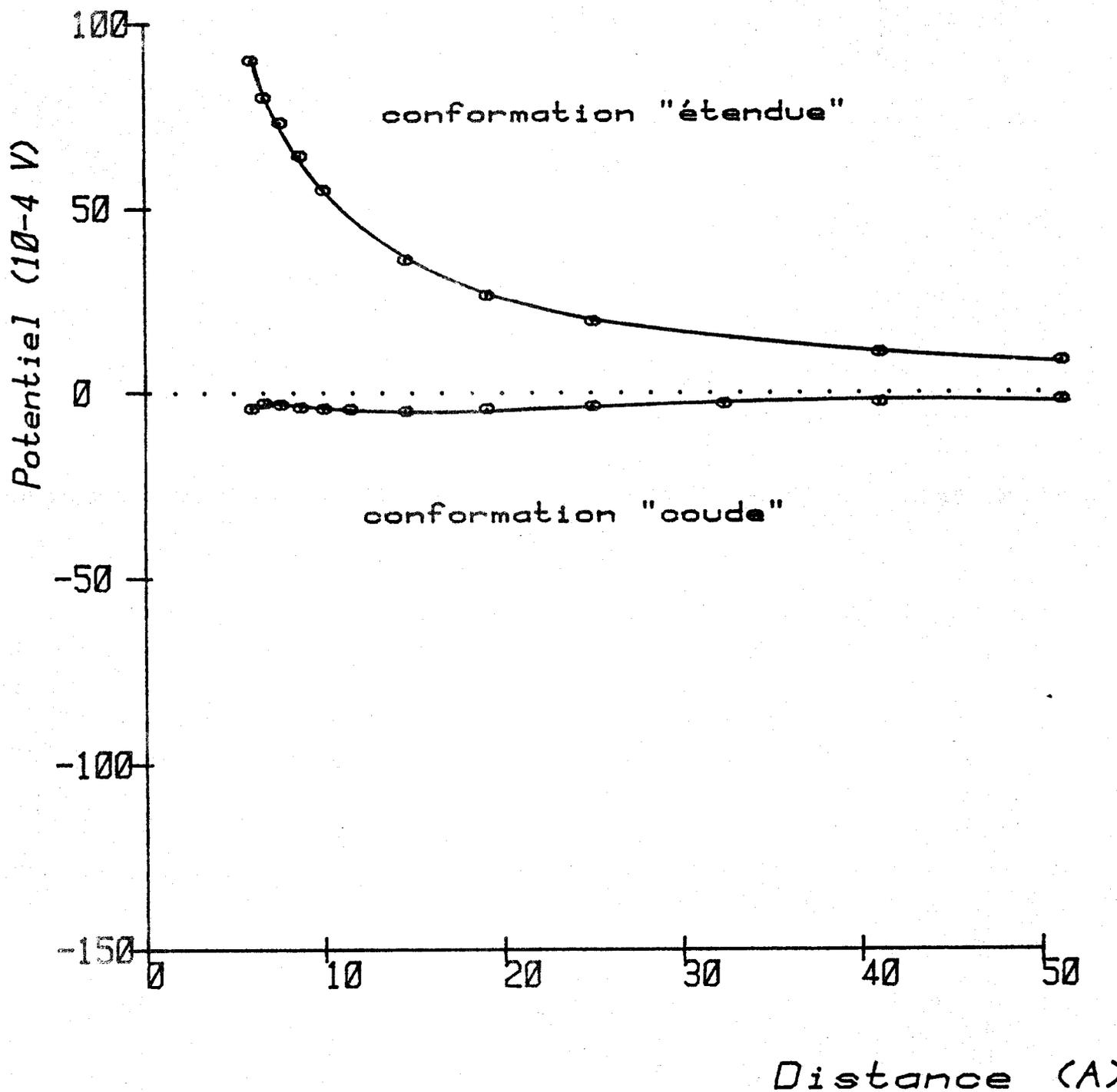


FIG 15: POTENTIEL AUTOUR DE TyrProGlyGly

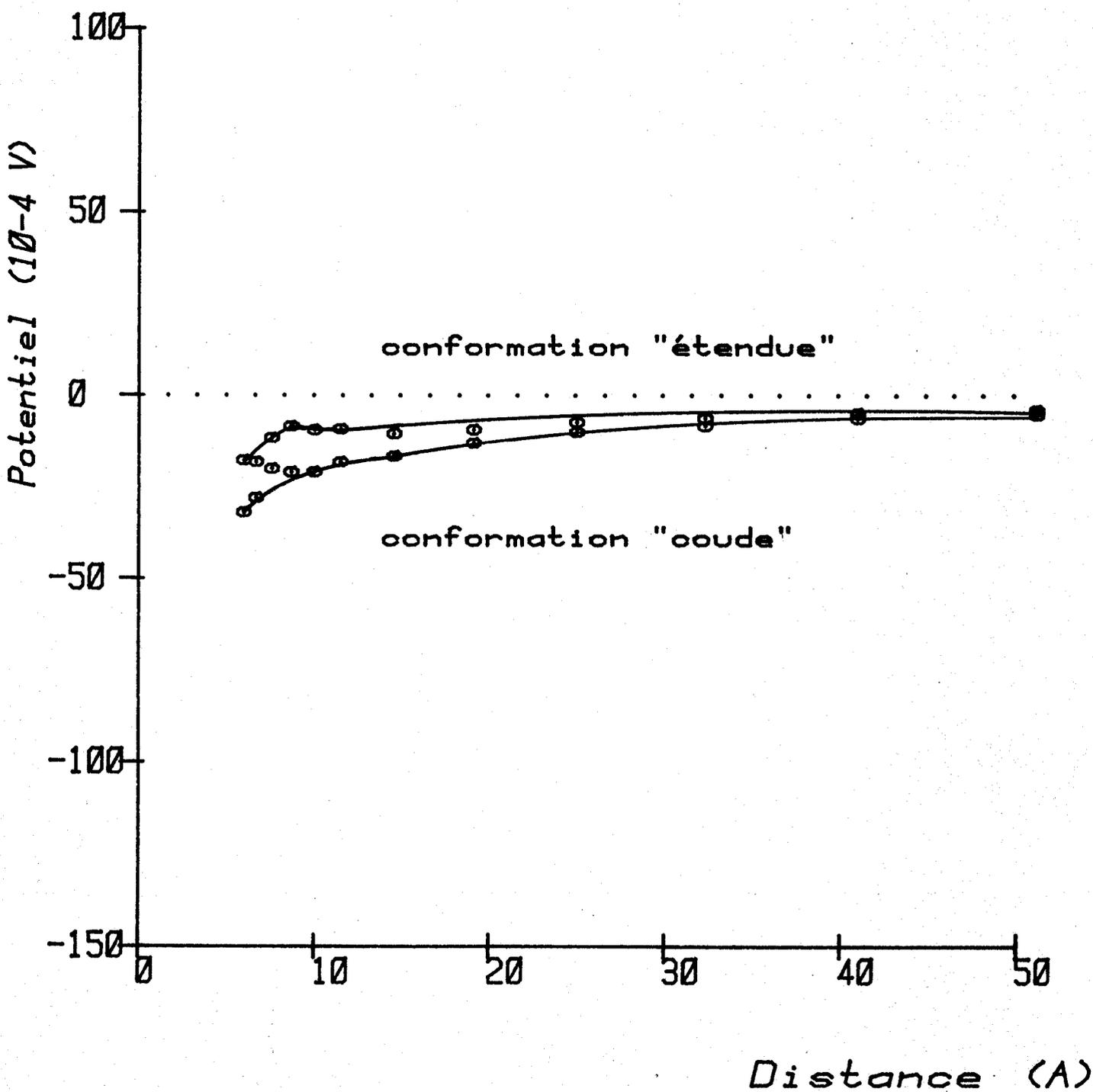


FIG 16: POTENTIEL AUTOUR DE GlyProTyrGly



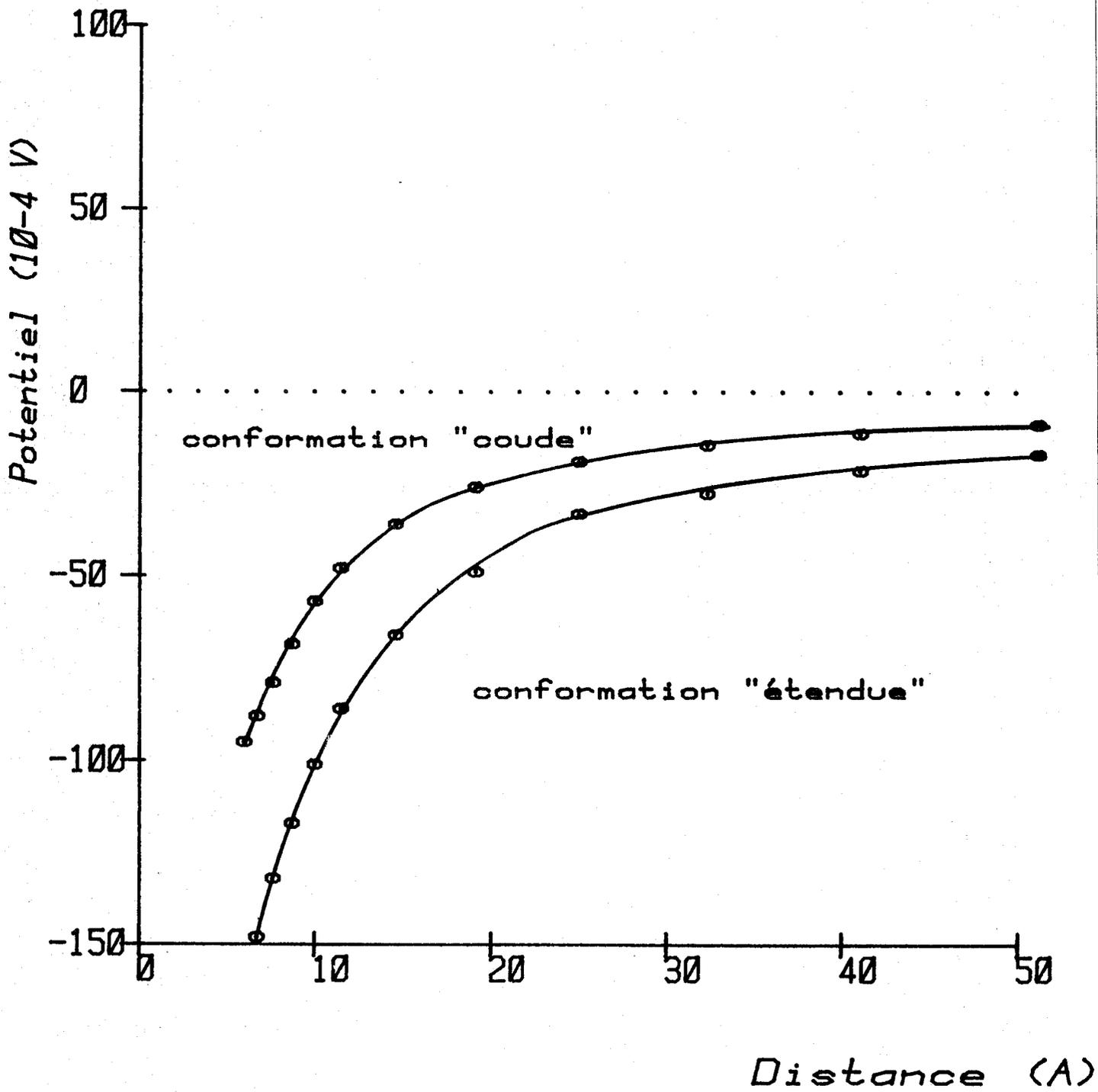


FIG 17: POTENTIEL AUTOUR DE GlyProGlyTyr

sur la sphère de réactivité. De plus la fonction potentielle n'est pas tout à fait monotone, ce qui posera le problème de l'application du modèle. Une telle différence entre les potentiels des deux conformations doit, toutefois, avoir une influence importante sur la réactivité.

Le noyau phénol de la tyrosine dans le peptide Gly Pro Tyr Gly (fig. 16) est plus proche du résidu C terminal que du résidu N terminal. Le potentiel moyen autour de la sphère de réactivité est donc négatif. Sa valeur est assez faible puisque la distance entre le phénol et les charges est plus grande que dans les peptides où le résidu tyrosyle est en position terminale. Il n'y a pas une grande différence la forme "coude" et la forme "étendue" car le repliement n'a pas une influence prépondérante sur la distance phénol - charges terminales. La variation du potentiel en fonction de la distance n'est pas monotone pour la conformation "étendue". On peut, compte tenu de ces observations, s'attendre à avoir de grandes difficultés pour exploiter les résultats expérimentaux d'extinction de fluorescence.

L'évolution du potentiel pour les deux conformations du peptide Gly Pro Gly Tyr (fig. 17) répond bien à une loi de type  $1/r^x$ . Le potentiel moyen sur la sphère de réactivité est négatif, du fait de la proximité de la charge portée par le groupement carboxyle. Le repliement, en rapprochant les deux charges terminales, diminue la valeur du potentiel de manière sensible dans la forme "coude". Toutes les conditions sont réunies pour appliquer le modèle et espérer en tirer des conclusions.

La figure 18 représente à une échelle très différente l'évolution du potentiel créé par l'acide aminé Tyrosine. On constate que ce potentiel est très faible et légèrement positif. Son influence sur la réactivité doit être minime.

A partir des valeurs de potentiels, le tableau 19 donne les deux grandeurs qui vont permettre la détermination de la constante de vitesse théorique : celle que nous avons appelé, dans le chapitre III, contributions statiques et dynamiques du potentiel.

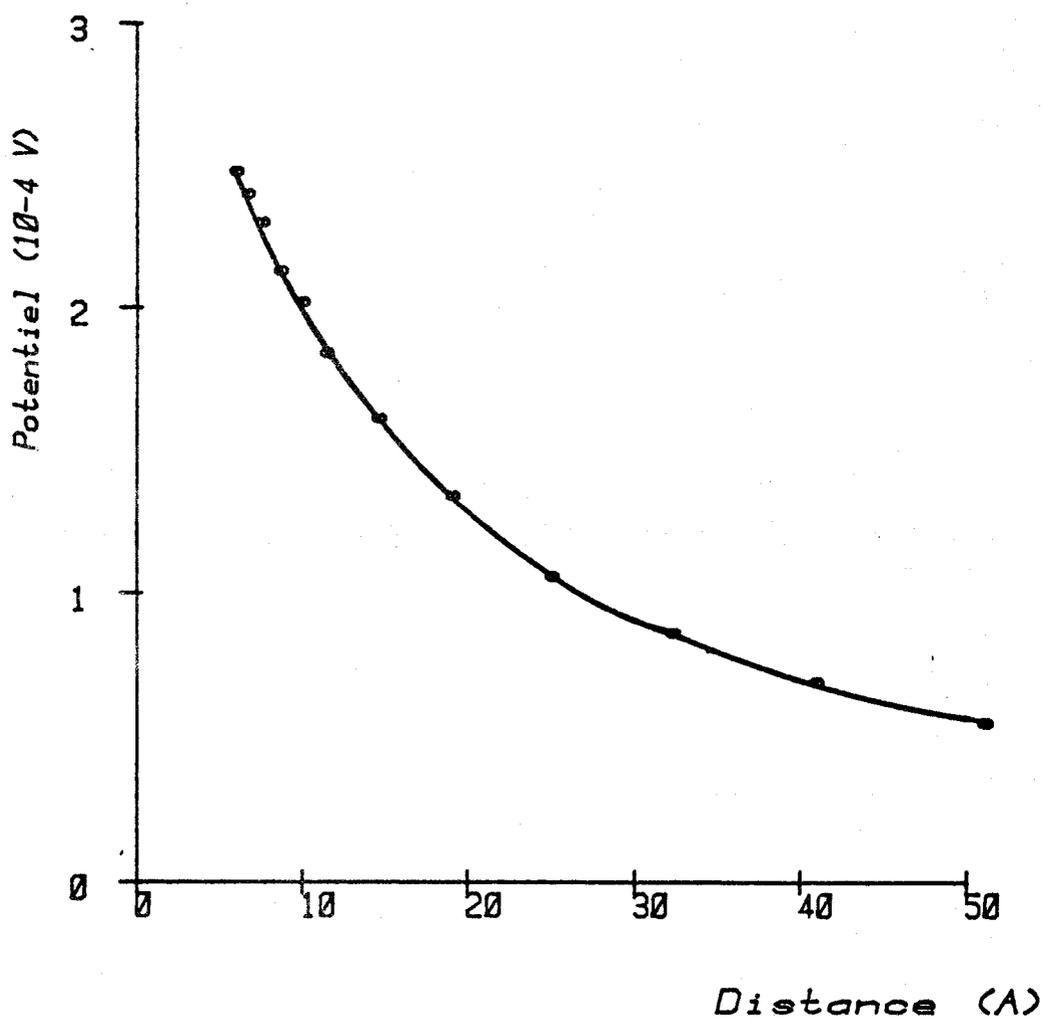


FIG 18: POTENTIEL AUTOUR DE Tyr



	$\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T} \cdot e^{-\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}} \cdot m^{-2} \cdot 10^{18}$		$\int_{r_0}^{\infty} \frac{\bar{U}(r)}{k_B T} \cdot e^{-\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}} \cdot dr \cdot m^{-1} \cdot 10^9$	
	Cs <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>	Cs <sup>+</sup>	I <sup>-</sup>
Tyr	2,81	2,75	1,48	1,46
Tyr Pro Gly Gly "étendu"	3,96	1,95	1,8	1,21
Gly Pro Gly Gly <sup>*</sup> "coude"	2,73	2,83	1,44	1,49
Gly Pro Tyr Gly <sup>*</sup> "étendu"	2,59	2,98	1,41	1,53
Gly Pro Tyr Gly "coude"	2,45	3,15	1,37	1,58
Gly Pro Gly Tyr "étendu"	1,46	5,27	1,04	2,15
Gly Pro Gly Tyr "coude"	1,91	4,04	1,2	1,82

\* Le modèle a été appliqué bien que le potentiel ne vérifie pas les hypothèses de base du calcul.

TABLEAU 19

Valeurs des contributions du potentiel  
à la constante de vitesse théorique



On constate que les valeurs obtenues ne sont significativement différentes que pour les deux conformations des peptides Tyr Pro Gly Gly et Gly Pro Gly Tyr. La contribution statique est beaucoup plus faible que la contribution dynamique mais elle doit être corrigée par le facteur  $\frac{CD}{C_M K}$  (voir chapitre III). On remarque que les rapports contribution forme "étendue" / contribution statique forme "coude" et contribution dynamique forme "étendue" / contribution dynamique forme "coude" sont assez semblables pour chaque peptide. On peut donc s'attendre à ce que le rapport des réactivités ne dépende pas d'une manière importante de la vitesse de réaction mais bien de la forme des fonctions potentielles.

### 3 - Valeurs théoriques des constantes de vitesse

La valeur théorique de la constante de vitesse d'extinction de fluorescence répond, selon notre modèle, à l'équation :

$$k = 4 \pi D C A \left( 1 + \frac{A}{\sqrt{D\tau_0}} \right)$$

avec dans le cas général :

$$A^{-1} = \frac{CD}{C_M K r_0^2} e^{\frac{\bar{U}(r_0)}{k_B T}} + \int_{r_0}^{\infty} \frac{dr}{r^2} e^{\frac{\bar{U}(r)}{k_B T}}$$

Tous les termes de ces relations ont été déterminés théoriquement à l'exception de la constante K. Le calcul de K a été réalisé à partir des résultats d'extinction de fluorescence sur la tyrosine libre (voir paragraphe suivant). Nous avons obtenu les valeurs indiquées dans le tableau 20.

Ces valeurs sont liées à l'application de notre modèle et serviront à obtenir des constantes relatives. On remarque peu de différences entre les trois hypothèses et nous avons choisi les valeurs moyennes 0,46 et 3,01 molécule<sup>-1</sup> sec<sup>-1</sup> pour l'extinction par Cs<sup>+</sup> et I<sup>-</sup>.

K m.molécule <sup>-1</sup> sec <sup>-1</sup>	trajectoires linéaires	encombrement limité à la sphère de réactivité	encombrement moyen autour de la sphère de réactivité
extinction par Cs <sup>+</sup>	0,48	0,44	0,46
extinction par I <sup>-</sup>	3,17	2,88	3,01

TABLEAU 20

*Valeur de la constante de vitesse K  
dans les différentes hypothèses de calcul*

Le tableau 21 donne les rapports  $k_{\text{peptide}}/k_{\text{Tyr}}$  des constantes de vitesse théorique pour les réactions d'extinction des trois peptides. On constate des différences entre les conformations d'un même peptide (sauf pour Gly Pro Tyr Gly) qui sont systématiques et ne dépendent pas de l'hypothèse de calcul.

Il reste à comparer ces valeurs avec les constantes de vitesse déterminées par l'expérience.

## II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

### A - Méthodes

Dans les expériences que nous avons réalisées (où on ne constate aucun effet transitoire) l'extinction de fluorescence répond à la loi de STERN-VOLMER (S3) :

$$\frac{Q_0}{Q} = 1 + K_{SV}[E]$$

$Q_0$  : rendement quantique en l'absence d'extincteur

$Q$  : rendement quantique en présence d'une concentration  $[E]$  d'extincteur.

		trajectoires linéaires	encombrement limité à la sphère de réactivité	encombrement moyen autour de la sphère de réactivité
Extinction par $I^-$	Tyr Pro Gly Gly "étendu"	1,08	1,23	1,16
	Tyr Pro Gly Gly <sup>*</sup> "coude"	0,75	0,88	0,82
	Gly Pro Tyr Gly <sup>*</sup> "étendu"	0,7	0,81	0,76
	Gly Pro Tyr Gly "coude"	0,65	0,75	0,71
	Gly Pro Gly Tyr "étendu"	0,4	0,47	0,44
	Gly Pro Gly Tyr "coude"	0,51	0,6	0,56
Extinction par $Cs^+$	Tyr Pro Gly Gly "étendu"	0,54	0,73	0,64
	Tyr Pro Gly Gly <sup>*</sup> "coude"	0,75	1,06	0,91
	Gly Pro Tyr Gly <sup>*</sup> "étendu"	0,8	1,09	0,95
	Gly Pro Tyr Gly "coude"	0,83	1,15	1
	Gly Pro Gly Tyr "étendu"	1,36	1,87	1,63
	Gly Pro Gly Tyr "coude"	1,05	1,44	1,25

\* Le modèle a été appliqué bien que le potentiel ne soit pas conforme aux hypothèses de calcul.

TABLEAU 21

Rapport des constantes de vitesse théoriques  
pour les réactions d'extinction



et :

$$K_{SV} = k \tau_0$$

k : constante de vitesse bimoléculaire

$\tau_0$  : durée de vie moyenne de l'état excité en l'absence d'extincteur

La détermination de la constante k, qui est l'objet de cette étude nécessite la mesure du rendement quantique des peptides en présence de quantités croissantes d'extincteur et la mesure de  $\tau_0$  pour les différents peptides.

### 1 - Mesure des durées de vie moyenne

Cette mesure a été effectuée dans le laboratoire du Professeur LAUSTRIAT à l'Université Louis Pasteur de STRASBOURG.

La durée de vie est déterminée par la technique du "photon-électron unique" (S4, S5, S6). Les groupements fluorophores contenus dans la solution à étudier sont excités par un éclair lumineux très bref ( $\approx 6$  ns). L'émission de fluorescence se poursuit pendant un temps très court après extinction de l'éclair. Elle est détectée après passage à travers un monochromateur sélectionnant la longueur d'onde choisie (305 nm pour la tyrosine). Le système de détection comprend un photomultiplicateur, un convertisseur temps-amplitude (couplé au générateur d'excitation) et un sélecteur d'amplitude multicanaux. Ce dispositif est conçu de manière que l'impulsion électrique délivrée par le photomultiplicateur soit due à l'émission par la cathode d'un seul photo-électron provenant de la lumière de fluorescence. Le sélecteur d'amplitude enregistre une grandeur qui correspond à l'intervalle de temps entre la fin de l'éclair et l'émission du photon capté. Après un grand nombre d'excitations lumineuses on obtient finalement sur le sélecteur un histogramme qui correspond à la probabilité d'émission d'un photon en fonction du temps :  $H(t)$ .

$$H(t) = r(t) * I(t)$$

où :

$r(t)$  est la fonction réponse du dispositif

$I(t)$  est la fonction déclin de fluorescence

et :

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau_0}$$

$\tau_0$  : durée de vie moyenne de fluorescence

Pour déterminer la fonction  $r(t)$  la solution étudiée est remplacée, dans l'appareil, par un miroir. Connaissant  $r(t)$  on peut calculer une série de courbes théoriques  $r(t) * e^{-t/\tau_0}$  pour différents  $\tau_0$ . La comparaison de ces courbes à la courbe expérimentale permet d'évaluer la durée de vie avec une précision de l'ordre de 0,3 ns.

## 2 - Mesure des rendements quantiques

La mesure des rendements quantiques en présence de concentrations croissantes d'extincteur a été effectuée par la méthode décrite au chapitre 1. La force ionique du milieu a été maintenue constante entre les différentes solutions par addition de chlorure de sodium. L'ensemble des produits utilisés étaient "supra pur" pour éviter toute fluorescence parasite. Les mélanges ont été effectués juste avant la mesure avec des solutions thermostatées.

### B - Résultats

Le tableau 22 indique les valeurs mesurées pour les différents peptides

	Tyr	Tyr Pro Gly Gly	Gly Pro Tyr Gly	Gly Pro Gly Tyr
durée de vie moyenne (ns)	3,4	1,4	1,8	2,4
durée de vie rendement quantique relatif (ns)	3,4	8,2	3,5	3,8

TABLEAU 22

*Durée de vie moyenne des peptides étudiés*

On peut remarquer que les durées de vie des états excités des peptides sont inférieurs à la durée de vie de la tyrosine, ce qui est normal étant donné le nombre plus grand de processus de désactivation.

Le rendement quantique est relié à la durée de vie par la relation :

$$\text{rendement quantique absolu} = \frac{\text{durée de vie moyenne}}{\text{durée de vie en absence de désactivation non radiative}}$$

De cette relation on déduit :

$$Q_r = \frac{\tau_o}{\tau_{\text{Tyr}}} \quad \text{et} \quad \tau_{\text{Tyr}} = \frac{\tau_o}{Q_r}$$

$Q_r$  : rendement quantique relatif à la tyrosine

$\tau_{\text{Tyr}}$  : durée de vie moyenne de la tyrosine

Le tableau 22 montre que, pour les peptides Gly Pro Tyr Gly et Gly Pro Gly Tyr les rapports  $\tau_o/Q_r$  sont à peu près égaux à la durée de vie de la Tyrosine. Il n'en est pas de même pour le peptide Tyr Pro Gly Gly.

On interprète la variation de ce rapport par l'existence d'un effet d'extinction statique (S7, S8). Cet effet n'est pas dû à des désactivations intramoléculaires par chocs (ou par proximité) mais, généralement, par l'existence d'un champ électrostatique qui modifie le niveau électronique excité du fluorophore. On peut donc penser que c'est la charge positive portée par le groupement N terminal qui provoque cet effet dans le peptide Tyr Pro Gly Gly.

Mais on a vu, dans le chapitre II que la distance entre la charge positive et le centre du noyau phénol ne dépendait pratiquement pas des conformations moyennes dans ce peptide. L'effet d'extinction statique n'apporte, donc, pas d'information complémentaire sur la conformation.

Les figures 19 à 26 représentent les courbes expérimentales d'extinction de fluorescence par  $\text{Cs}^+$  et  $\text{I}^-$ . Le tableau 23 donne les valeurs de la constante de STERN-VOLMER ( $K_{SV}$ ) et de la constante de réaction biomoléculaire ( $k$ ) dans les différents cas. Enfin le tableau 24 donne le rapport des constantes de vitesse expérimentales ( $k_{\text{peptide}}/k_{\text{Tyrosine}}$ ).

		Tyr	Tyr Pro Gly Gly	Gly Pro Tyr Gly	Gly Pro Gly Tyr
Extinction par $\text{Cs}^+$	$K_{SV} \text{ M}^{-1}$	3,4	1	2,1	2,8
	$k \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$	1	0,71	1,16	1,06
Extinction par $\text{I}^-$	$K_{SV} \text{ M}^{-1}$	12	3,4	5	4,2
	$k \text{ M}^{-1} \text{ ns}^{-1}$	3,5	2,43	2,8	1,75

TABLEAU 23

*Constantes de vitesse expérimentales  
pour les différents peptides*

$k/k_{\text{Tyr}}$	Tyr	Tyr Pro Gly Gly	Gly Pro Tyr Gly	Gly Pro Gly Tyr
Extinction par $\text{Cs}^+$	1	0,71	1,16	1,06
Extinction par $\text{I}^-$	1	0,69	0,8	0,5

TABLEAU 24

*Rapports des constantes de vitesse expérimentales  
pour les différents peptides*





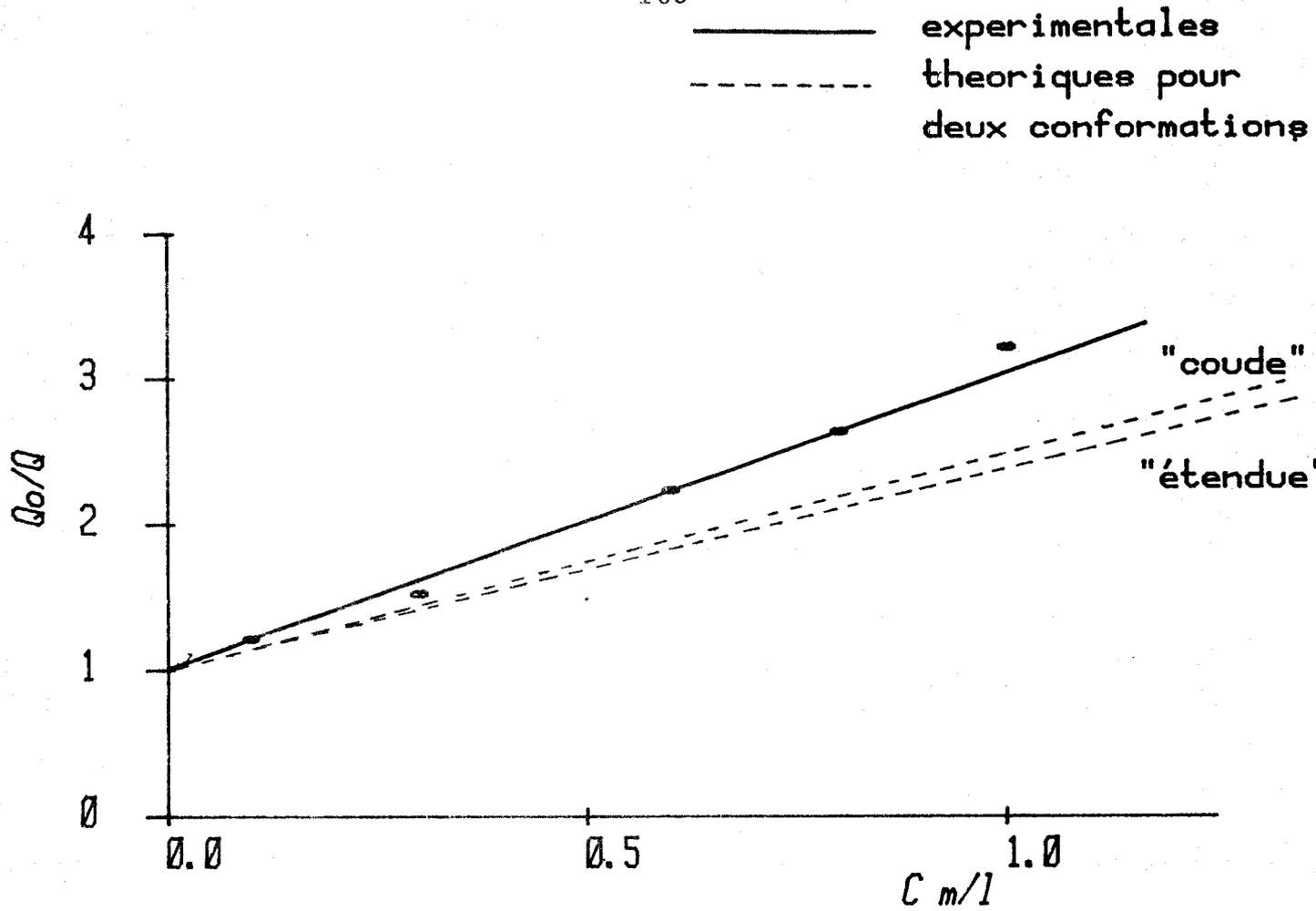


FIG 21: EXTINCTION PAR Cs+ DE GlyProTyrGly

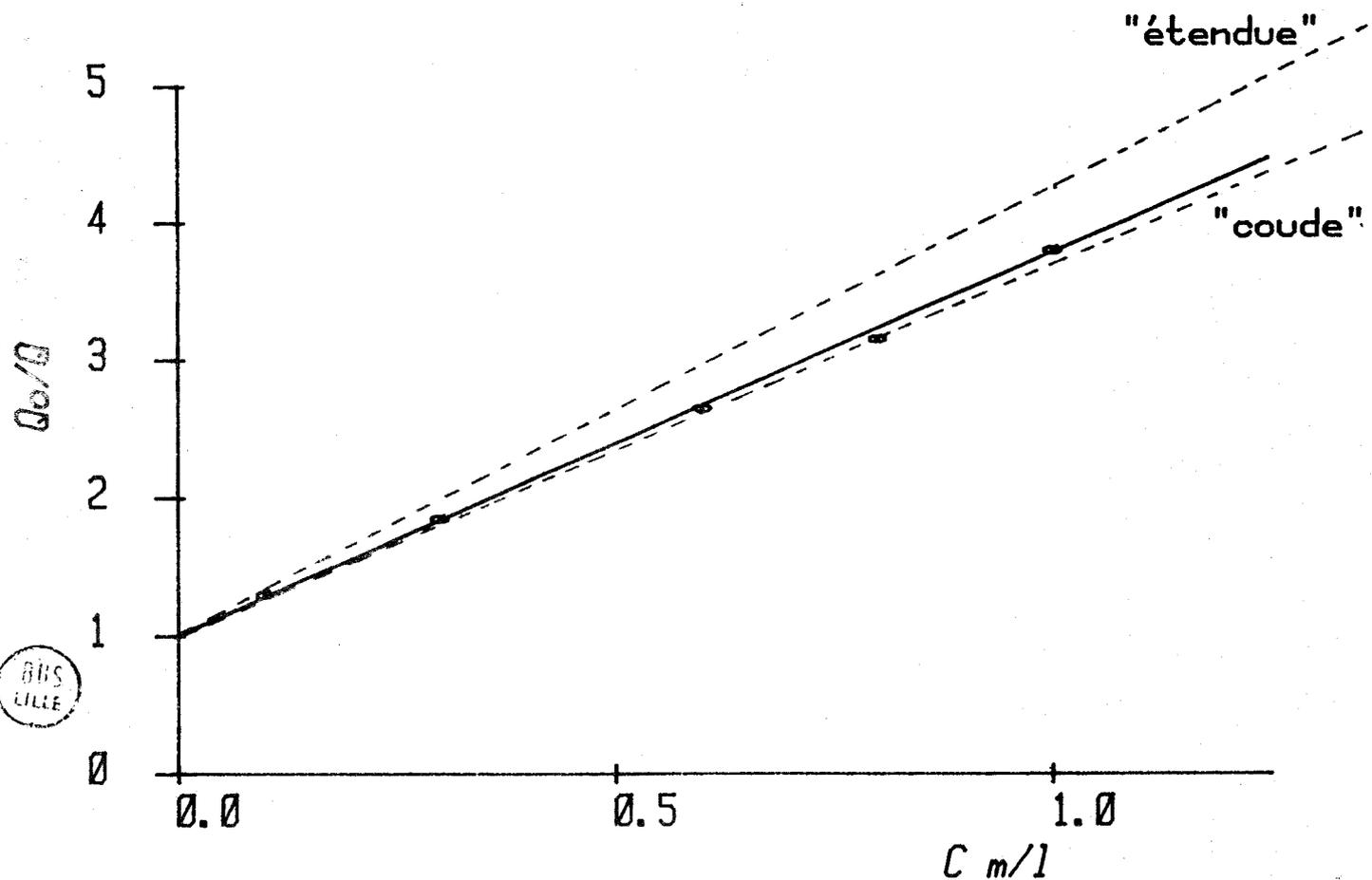


FIG 22: EXTINCTION PAR Cs+ DE GlyProGlyTyr



— expérimentales  
 - - - - - théoriques pour  
 deux conformations

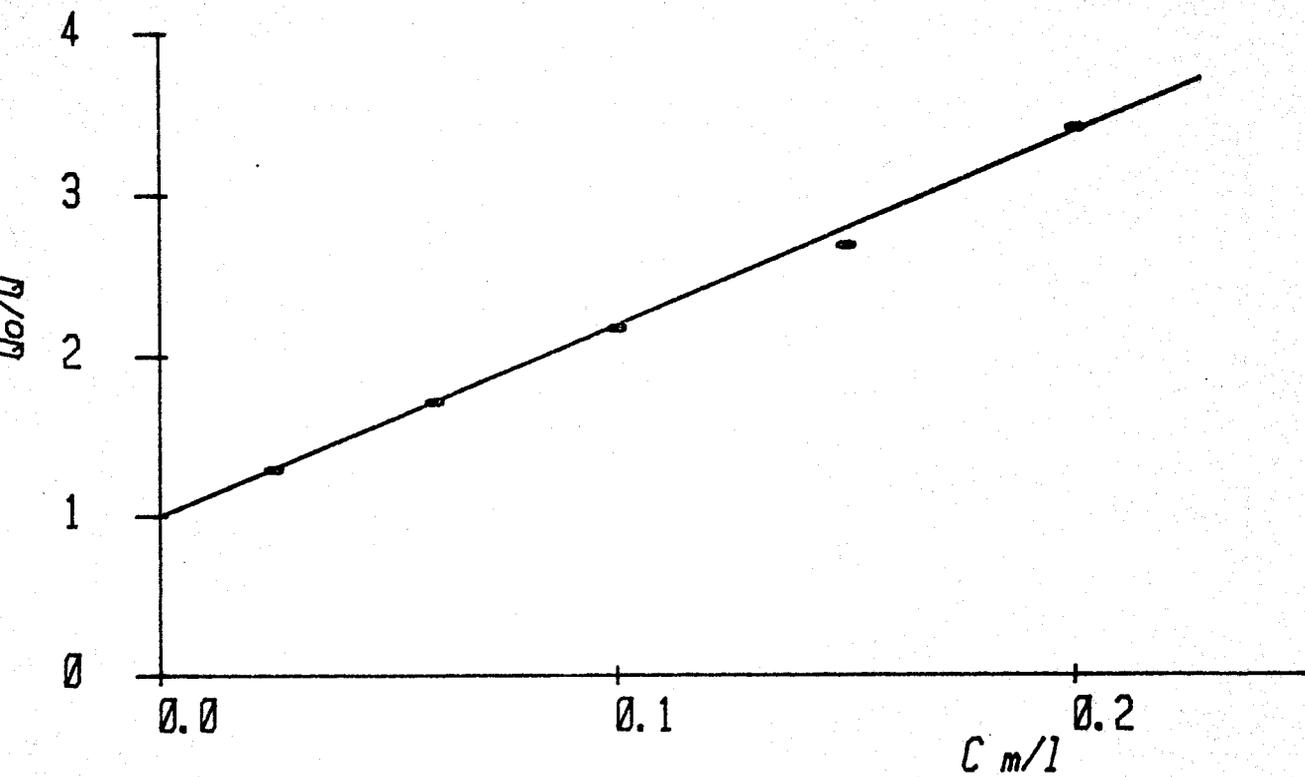


FIG 23: EXTINCTION PAR I- DE Tyr

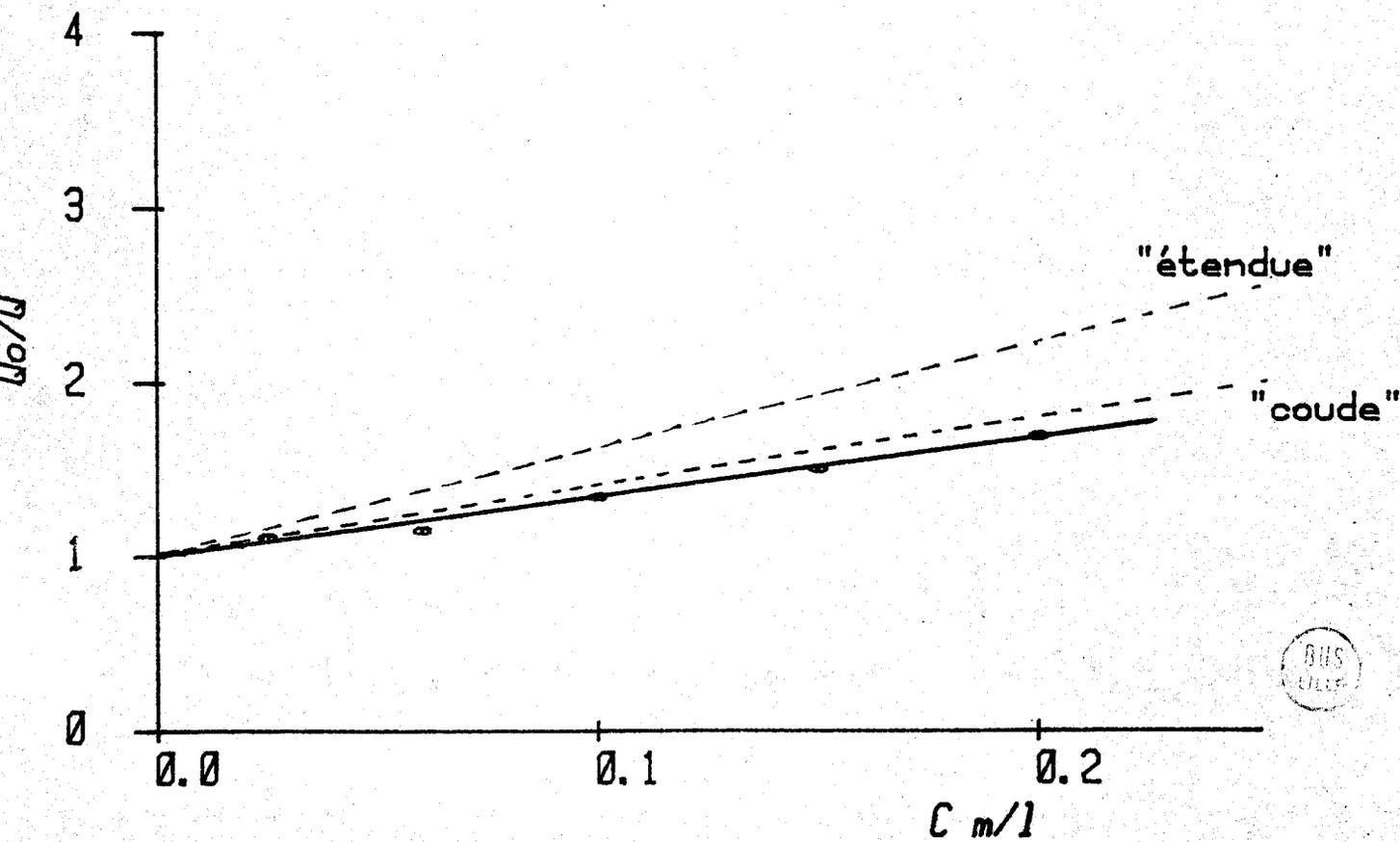


FIG 24: EXTINCTION PAR I- DE TyrProGlyGly



— expérimentales  
- - - théoriques pour  
deux conformations

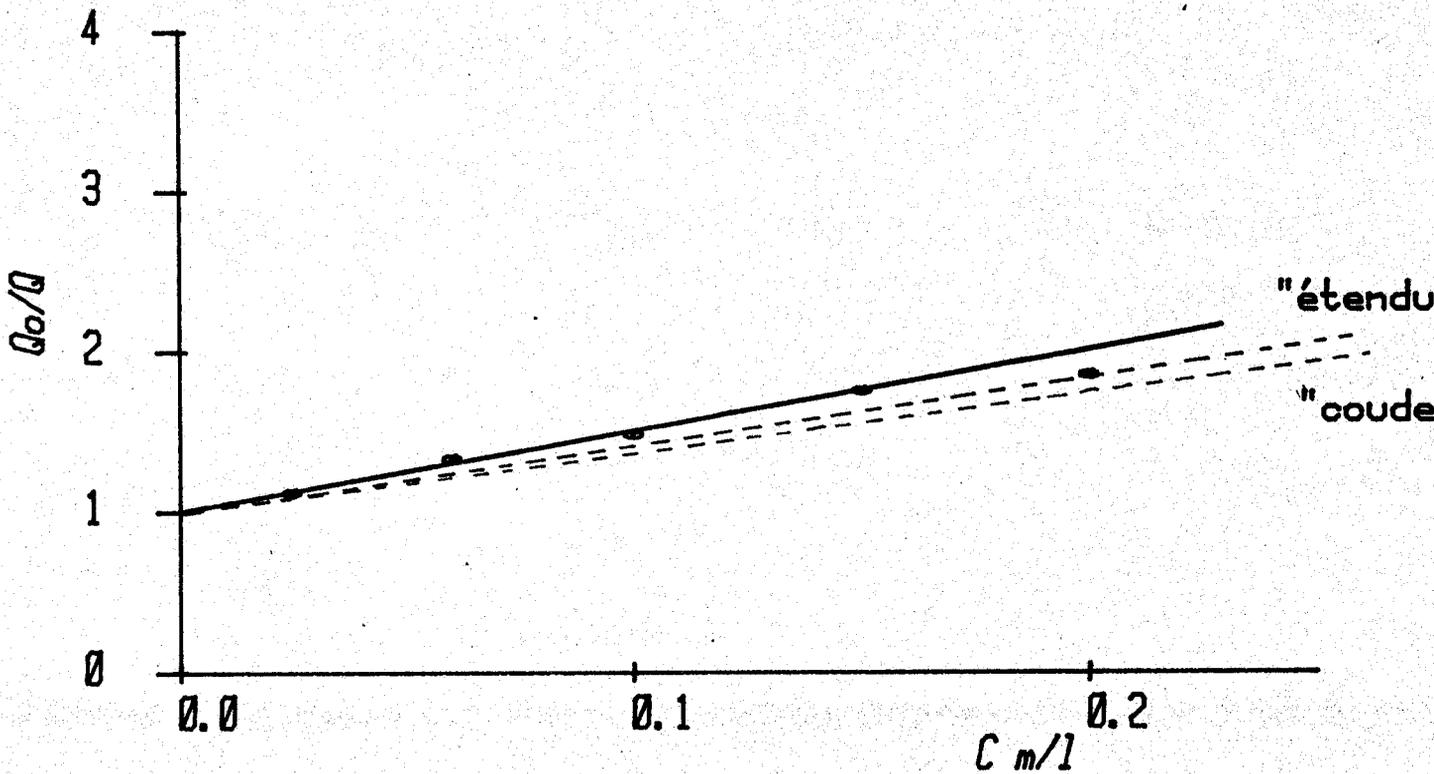


FIG 25: EXTINCTION PAR I- DE GlyProTyrGly

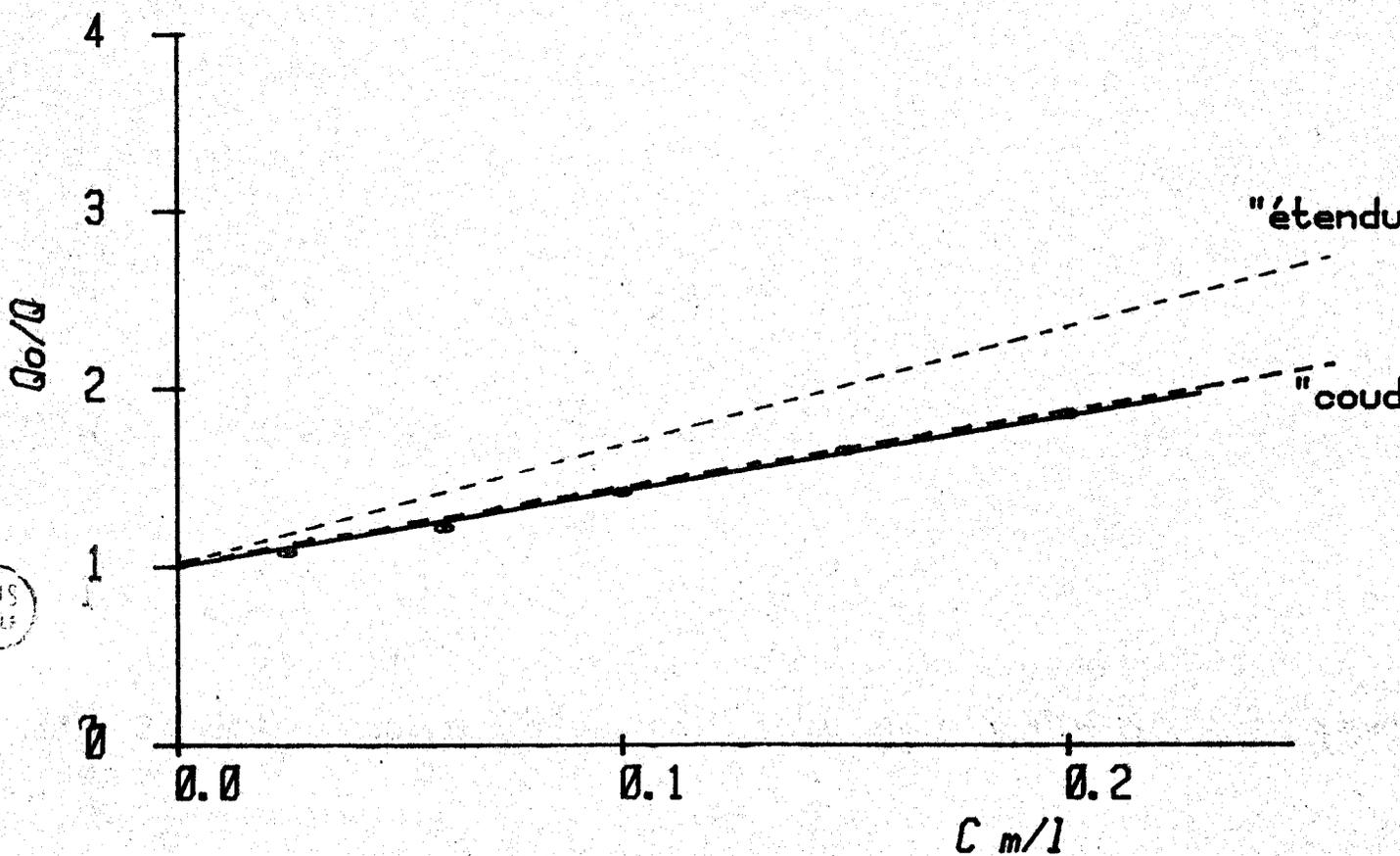


FIG 26: EXTINCTION PAR I- DE GlyProGlyTyr

On constate que les constantes diffèrent d'un peptide à l'autre mais que la vitesse de réaction de l'ion  $I^-$  est supérieure à celle de  $Cs^+$ . Les valeurs obtenues pour l'extinction de la Tyrosine sont d'ailleurs très proches de celles déterminées par d'autres auteurs.

Référence	S2	S9	S10	S11
Extinction par $Cs^+$ $K_{SV} M^{-1}$	3,6		2,8	3
Extinction par $I^-$ $K_{SV} M^{-1}$	14,4	10,6		15,5

L'examen du rapport  $k/k_{Tyr}$  ne permet aucune conclusion, sans l'application du modèle, pour les peptides Gly Pro Tyr Gly et Gly Pro Gly Tyr. On peut remarquer que les rapports de réactivités sont constants, pour Tyr Pro Gly Gly, que l'on utilise  $Cs^+$  ou  $I^-$ . Or le noyau phénol est plus proche de la charge positive N terminale. Pour atténuer l'effet de cette charge, qui devrait défavoriser l'extinction par  $Cs^+$ , on peut penser à la proximité de la charge négative C terminale, proximité ne pouvant s'expliquer que par l'existence d'une conformation repliée du peptide.

### III - DISCUSSION

Si on compare l'ensemble des résultats du tableau 21 et du tableau 24 on constate que ce sont les calculs avec l'hypothèse des trajectoires linéaires qui donnent les résultats théoriques les plus comparables aux résultats expérimentaux. Il semble, en effet, que les dimensions du peptide entraînent, dans certaines directions des occupations de l'espace suffisamment éloignées du centre de la fonction phénol

pour qu'on ne puisse pas considérer l'encombrement stérique comme strictement limité à la sphère de réactivité ou même tendant vers zéro dans son voisinage.

Afin de pouvoir mieux comparer résultats expérimentaux et théoriques nous avons représenté sur les figures 20, 21, 22, 24, 25, 26 les courbes correspondant aux calculs (dans l'hypothèse des trajectoires linéaires) à côté de celles correspondant à l'expérience.

On peut constater (fig. 20 et 24) pour le peptide Tyr Pro Gly Gly que la courbe expérimentale ne correspond pas du tout à la courbe théorique pour une conformation "étendue" mais est très proche de la courbe théorique pour une conformation "coude". Cette courbe théorique vient de l'application du modèle à un potentiel qui ne vérifie pas toutes les hypothèses de base du calcul (comme nous l'avons remarqué au paragraphe précédent). Mais les valeurs faibles des potentiels permettent d'avoir, malgré tout, une idée assez précise de la réactivité de la conformation coude.

Le calcul confirme les conclusions du paragraphe précédent : la mesure de l'extinction de fluorescence apporte un argument en faveur d'une conformation statistiquement repliée du peptide Tyr Pro Gly Gly dans l'eau.

Dans le cas de Gly Pro Gly Tyr le modèle est applicable dans les deux conformations sans restrictions et les résultats sont indiqués dans les figures 22 et 26. Pour l'extinction avec  $I^-$  et  $Cs^+$  les résultats expérimentaux et théoriques sont très proches si on considère que la conformation est également repliée.

Par contre, pour Gly Pro Tyr Gly les résultats théoriques sont très différents des résultats expérimentaux (Fig. 21 et 25). Les courbes théoriques pour les formes "coude" et "étendue" sont pratiquement identiques mais aucune des deux ne correspond à la courbe expérimentale. On peut proposer trois hypothèses pour expliquer ces différences.

La première est la non validité globale de la théorie qui remettrait en cause l'ensemble du travail. La seconde est l'impossibilité d'appliquer le modèle à cause de la forme des fonctions potentielles, contraire aux hypothèses de calcul. On voit sur la figure 16 que la variation du potentiel n'est pas une fonction en  $1/r^x$  ( $x > 1$ ) de la distance  $r$ . La troisième hypothèse est une bonne évaluation de l'effet du potentiel mais une mauvaise évaluation théorique de l'accessibilité. L'accessibilité réelle du noyau phénol serait supérieure à celle trouvée en considérant des ensembles de conformations. On serait en présence d'une valeur singulière donc d'une conformation assez rigide.

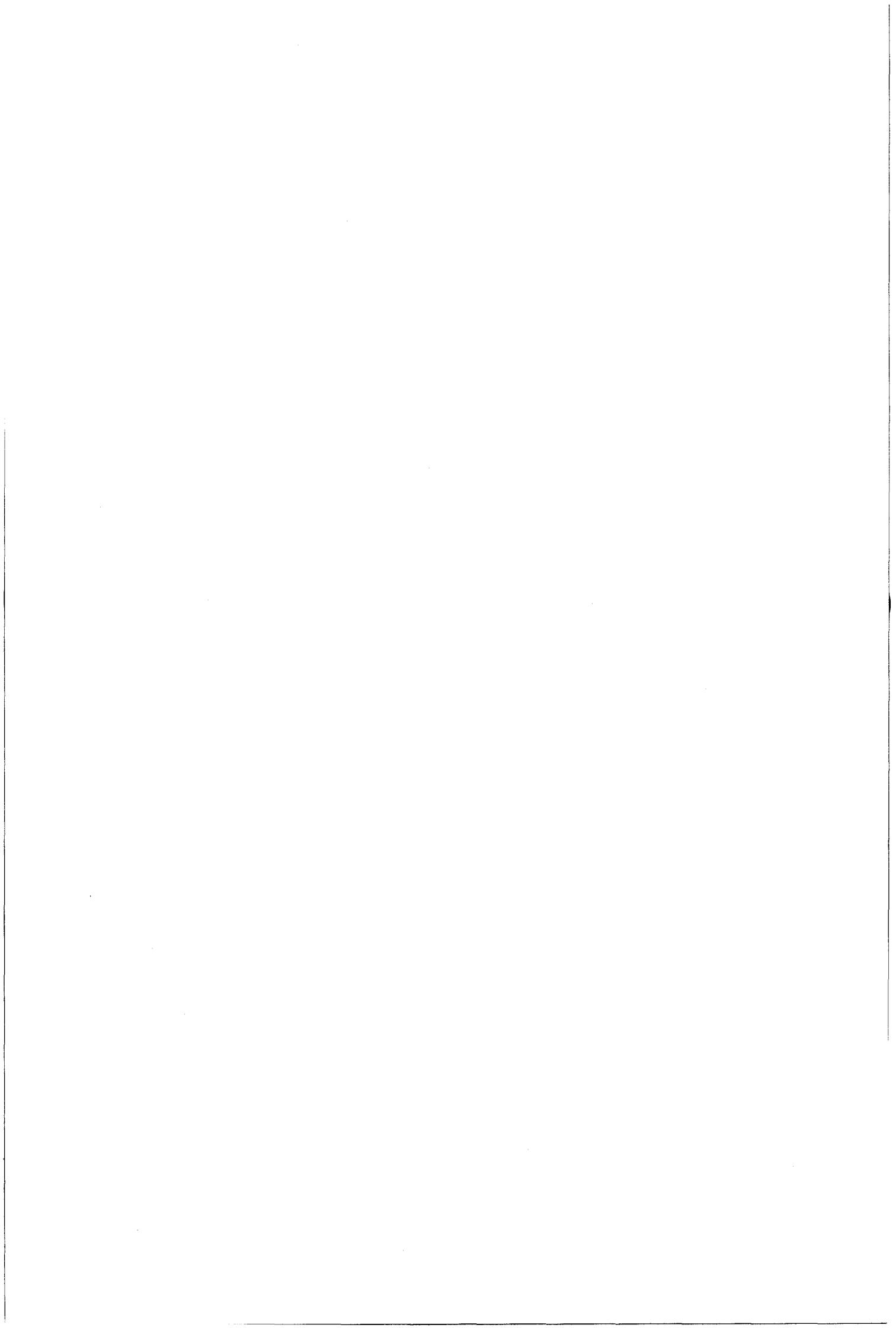
Il n'est pas possible de choisir formellement l'une des trois hypothèses. Mais on peut opposer aux deux premières la cohérence des résultats obtenus pour les autres peptides même quand le potentiel n'était pas parfaitement conforme aux hypothèses du calcul.

#### IV - CONCLUSION

La comparaison des réactivités expérimentales et théoriques a permis d'apporter des arguments en faveur de l'existence de certaines conformations des peptides Tyr Pro Gly Gly et Gly Pro Gly Tyr. Dans les deux cas un ensemble de conformations repliées mais non rigides semblent exister dans l'eau.

Dans le cas du peptide Gly Pro Tyr Gly aucune conclusion ne peut être avancée. L'hypothèse que nous retiendrons est l'existence d'une conformation organisée rigide que nous ne pouvons préciser. Seul l'apport d'autres techniques expérimentales permettront de l'élucider.

En résumé, les modèles théoriques peuvent dans certains cas et sous certaines conditions être utilisés à l'inverse de leur finalité initiale. Ils peuvent servir à rechercher des conformations à partir de réactivités si ces conformations ne sont pas rigides. Ils sont donc, dans ce sens, un élément complémentaire du rendement quantique qui semble ne pouvoir servir que pour la détermination de certaines structures rigides.



C O N C L U S I O N

FOR PUBLICATION

Dans la première partie du travail exposé l'application d'une technique de calcul conformationnel simplifiée a permis de mettre en évidence les limitations de la mesure du rendement quantique de fluorescence pour la détermination de la conformation de certains peptides dans l'eau. Dès que l'on admet une certaine flexibilité de la molécule peptidique, les paramètres déterminant les propriétés physiques prennent des valeurs moyennes qui ne permettent plus de distinguer les différentes conformations possibles.

Dans la deuxième partie, l'accessibilité d'une fonction réactive d'un peptide a été quantifiée. Cette accessibilité et le coefficient de diffusion théorique de la molécule de peptide ont été reliés à la conformation. Un certain nombre de relations ont, ensuite, été établies qui permettent, à partir des paramètres précédents, de calculer la réactivité théorique d'un peptide, dans une conformation donnée, pour un type de réaction. La réactivité est calculée dans l'hypothèse où l'étape limitante du mécanisme réactionnel est la diffusion relative des deux réactifs. Ces relations qui introduisent dans la théorie l'encombrement stérique ne nous semblent pas limitées à la réactivité des seuls peptides mais doivent pouvoir être appliquées à toutes les molécules organiques.

Dans la troisième partie deux types d'application des modèles élaborés ont été présentés : la détermination, à partir de la conformation, de la réactivité potentielle de la Met-Enkephaline, et, inversement, la détermination de la conformation de peptides à partir de leur réactivité. Dans cette dernière partie ont pu être mises en évidence l'apparente validité de la théorie dans certains cas et les limitations des modèles dans d'autres cas.

En résumé, ce travail a voulu contribuer à montrer l'intérêt que peut présenter la théorie et le calcul pour l'étude des phénomènes de chimie biologique. Malgré l'imperfection et la relative simplicité des exemples exposés nous pensons

que des modèles numériques pourront apporter de réelles informations pour la compréhension de mécanismes beaucoup plus compliqués, comme ceux rencontrés en biochimie. C'est dans ce type d'étude, qui nécessite une étroite collaboration entre expérimentaliste et théoricien, et dans le perfectionnement indispensable de nos modèles que nous voyons une suite logique à ce travail.

A N N E X E

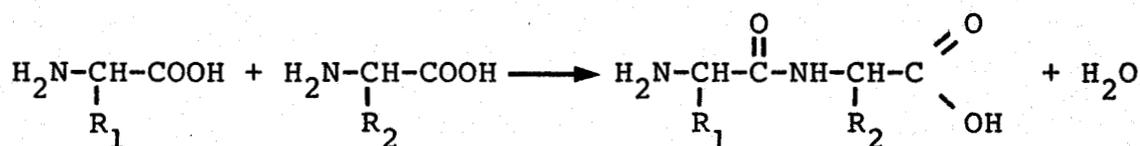
La synthèse des peptides présentée a été réalisée en collaboration avec Michel BATAILLE

SYNTHESE DES PEPTIDES MODELES

I - CHOIX D'UNE METHODE

A - PRINCIPE DE LA SYNTHESE PEPTIDIQUE

La synthèse peptidique consiste à former une liaison amide entre deux molécules d'acides aminés :

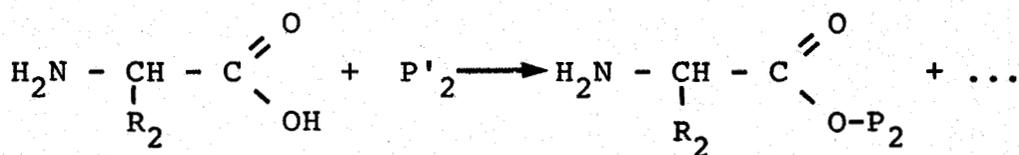
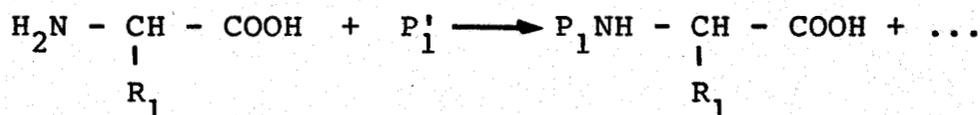


La réaction n'est pas spontanée et nécessite la présence d'un agent de couplage qui active généralement la fonction acide du premier acide aminé.

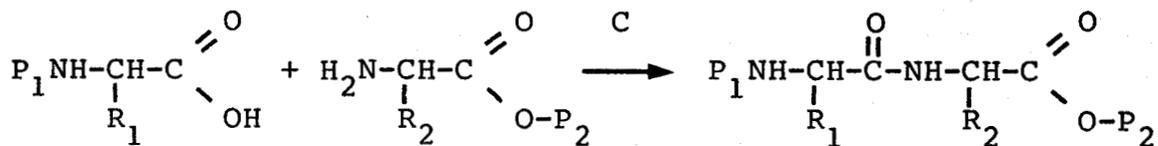
On remarque que la réaction peut donner un grand nombre d'autres produits :  $\text{A}_2-\text{A}_1$ ,  $\text{A}_2-\text{A}_2$  etc... Pour obtenir spécifiquement  $\text{A}_1-\text{A}_2$  il est donc impératif de "protéger" les fonctions ne devant pas réagir.

La synthèse de  $\text{A}_1-\text{A}_2$  se fait en trois étapes :

1 - Protection des fonctions ne devant pas réagir

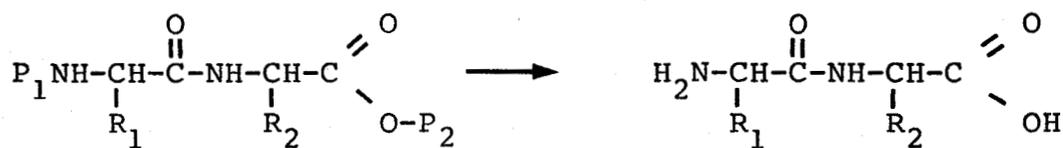


## 2 - Couplage



C : agent de couplage

## 3 - Déprotection



Pour ajouter un nouvel acide aminé une seule fonction est déprotégée avant d'effectuer un nouveau couplage.

En pratique la synthèse d'un peptide se fait toujours par allongement du côté N-terminal, la fonction acide étant protégée une fois pour toutes; c'est, d'ailleurs, la nature de cette protection qui détermine la méthode de synthèse.

Remarque :

Dans le cas où les chaînes latérales  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_2$  possèdent une fonction susceptible de réagir lors du couplage, celle-ci doit être également protégée.

## B - METHODES CLASSIQUES DE SYNTHESE

Les critères d'une bonne méthode de synthèse sont, d'une part, un bon rendement de la réaction de couplage et, d'autre part, une séparation facile du produit de couplage des réactifs en excès.

Plusieurs méthodes ont été développées. Dans tous les cas l'acide aminé N protégé participant au couplage est soluble dans le milieu réactionnel, il n'en va pas de même pour l'acide aminé C protégé.

### 1 - Synthèse en phase liquide

Le groupement protecteur de la fonction C terminale est une fonction organique (généralement un ester). Les acides aminés ou peptides ainsi protégés sont solubles dans le milieu réactionnel de couplage, ce qui favorise la cinétique de la réaction. Par contre, produit final et réactifs en excès sont dans le même milieu ce qui rend plus difficile leur séparation.

### 2 - Synthèse en "phase solide"

Développée par MERRIFIELD (P1), elle consiste à protéger la fonction du premier acide aminé par un groupement insoluble dans le milieu réactionnel. Ce groupement est un polymère permettant la fixation de plusieurs acides aminés (P2). Le polymère est réticulé et "gonfle" dans le solvant, la réaction de couplage ayant lieu dans les pores du gel ainsi formé. Dès que la chaîne peptidique atteint une certaine longueur le couplage devient difficile. Par contre, l'élimination des réactifs en excès est réalisée facilement par lavage du peptide-polymère insoluble.

### 3 - Synthèse en "phase liquide - solide"

Cette méthode a été introduite par BAYER et MUTTER (P3). Elle a pour but d'associer les avantages respectifs des deux méthodes précédentes.

Le groupement protecteur de la fonction C-terminale est toujours un polymère. Mais ce polymère (Polyéthylèneglycol) est choisi de manière à être soluble dans le milieu de couplage (dichlorométhane ou DMF) mais insoluble dans le solvant de lavage (éther éthylique).

## C - CHOIX DE LA METHODE

Nous avons testé les trois méthodes pour la synthèse du même produit : Gly-Pro-Gly-Tyr en utilisant le même réactif de couplage (DCCI, voir paragraphe suivant) et le même groupement protecteur de la fonction N-terminale (t Boc). Les quelques remarques suivantes justifient le choix final de la méthode en phase liquide pour la synthèse des trois peptides modèles.

1 - La méthode en phase "liquide-solide" paraissait, a priori, la plus séduisante mais elle présente dans notre cas trois inconvénients :

- La réaction qui permet de fixer le premier acide aminé sur le polymère (POEG 4000) est difficile (P4), plusieurs jours à 90°C, ce qui accroît fortement les risques de racémisation de la L-Tyrosine.

- Les polymères Tyr-POEG sont difficilement cristallisables dans les solvants de lavage classiques : ils forment des huiles et chaque opération de lavage entraîne une perte non négligeable du produit de couplage. Le rendement au terme de plusieurs opérations de couplage et de lavage devient ainsi relativement faible.

- Le contrôle du taux de couplage et de la pureté des produits intermédiaires est long.

En résumé cette méthode nécessite une grande habitude pour la production de quantités importantes de peptides et ne s'est pas révélée être la plus efficace.

2 - La synthèse en "phase solide" et la méthode précédente présentent un inconvénient commun : la difficulté pour contrôler les produits intermédiaires.

Elle nécessite une grande quantité de polymère pour l'obtention des centaines de milligrammes qu'exige une étude conformationnelle complète.

Enfin la séparation du peptide synthétisé et du polymère pose un problème spécifique pour les peptides contenant la tyrosine. Le réactif le plus commode pour effectuer cette coupure (HBr dans l'acide trifluoroacétique) entraîne une bromation du noyau phénolique de la Tyrosine (P2) et on est amené à utiliser l'acide fluorhydrique comme agent de coupure, ce qui exige l'utilisation d'un appareillage en Téflon.

Le grand attrait de la synthèse en "phase solide" est la possibilité d'automatisation qui libère l'opérateur de toutes les manipulations nécessitées par une synthèse classique. Mais ne disposant pas, au début de ce travail de "synthétiseur automatique" nous avons finalement opté pour la synthèse en phase liquide.

## II - SYNTHÈSE DES PEPTIDES MODELES EN PHASE LIQUIDE

### A - GROUPEMENTS PROTECTEURS

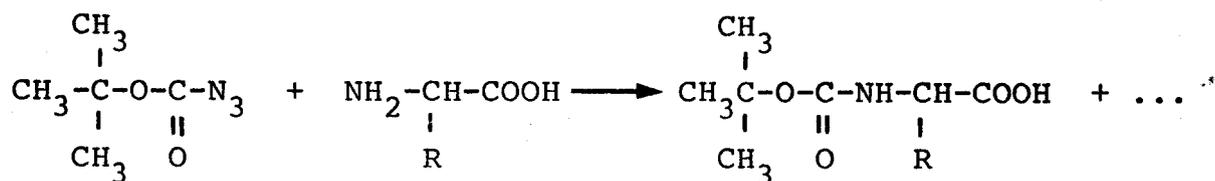
#### 1 - Fonction carboxyle

En général la fonction carboxyle est bloquée sous forme d'ester méthylique ou benzylique (P5, P6). Dans le cas d'un ester méthylique la fonction carboxyle est régénérée en fin de synthèse par saponification. Dans le cas de l'ester benzylique on utilise l'hydrogénation catalytique sur palladium. Cette méthode libérant également l'éther benzylique de la fonction phénol de la tyrosine (voir ci-dessous) nous avons choisi d'utiliser l'ester méthylique pour pouvoir réaliser indépendamment les deux déprotections.

L'estérification des acides aminés (P7) se fait dans l'alcool méthylique en présence d'un catalyseur acide.

#### 2 - Fonction amine

Parmi les nombreux groupements protecteurs existant (benzyloxycarbonyle, paratoluènesulfonyle, trifluoroacétyle, etc.) nous avons choisi l'un des plus courants le tertibutoxycarbonyle ou t Boc (P8) pour sa facilité d'utilisation et parce que la libération de la fonction amine n'entraîne pas de modification des autres groupements protecteurs.



t Boc



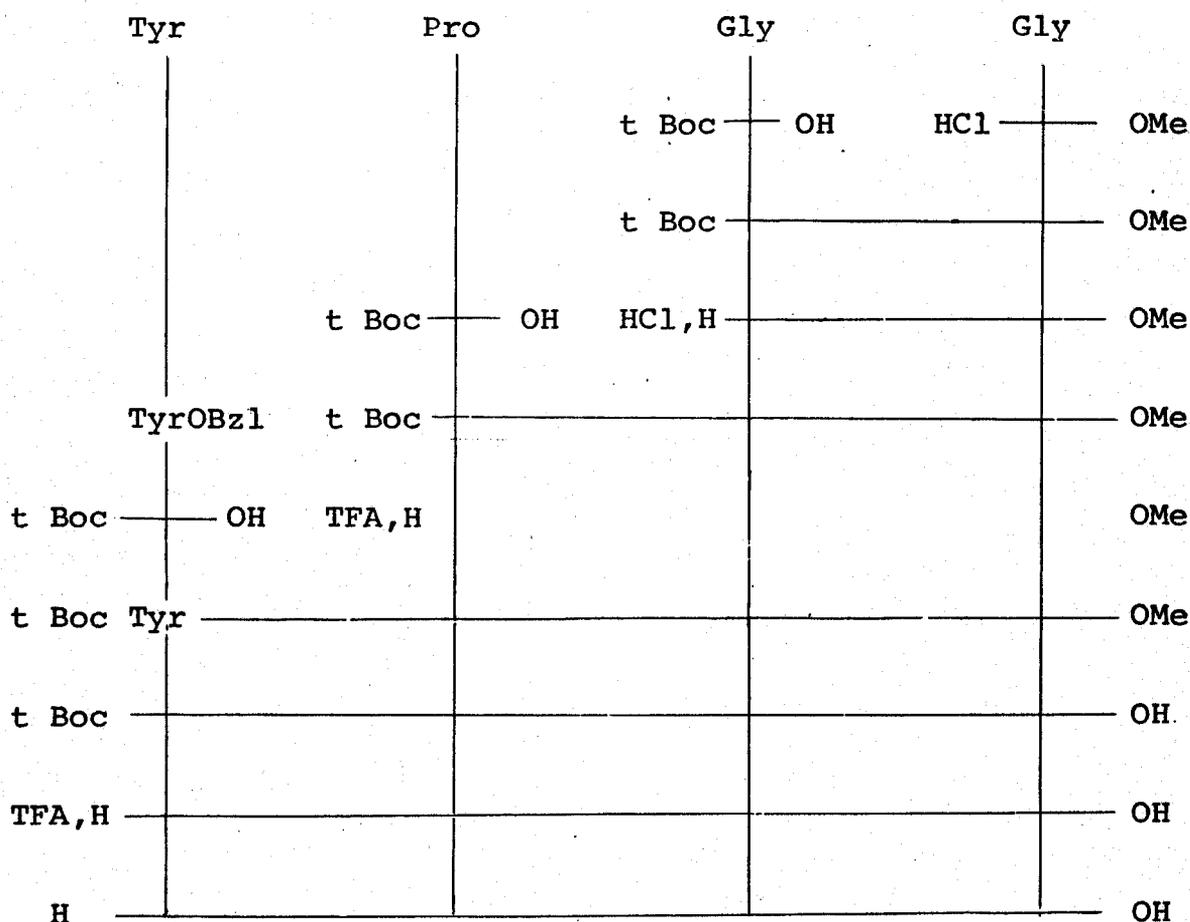


Le peptide purifié a été analysé par chromatographie sur papier (éluant : Butanol<sub>1</sub> 35 % - Pyridine 35 % - H<sub>2</sub>O 30 %) et rhéoelectrophorèse. Le pourcentage en acides aminés a également été déterminé. Seuls les produits présentant une pureté supérieure à 98 % ont été retenus.

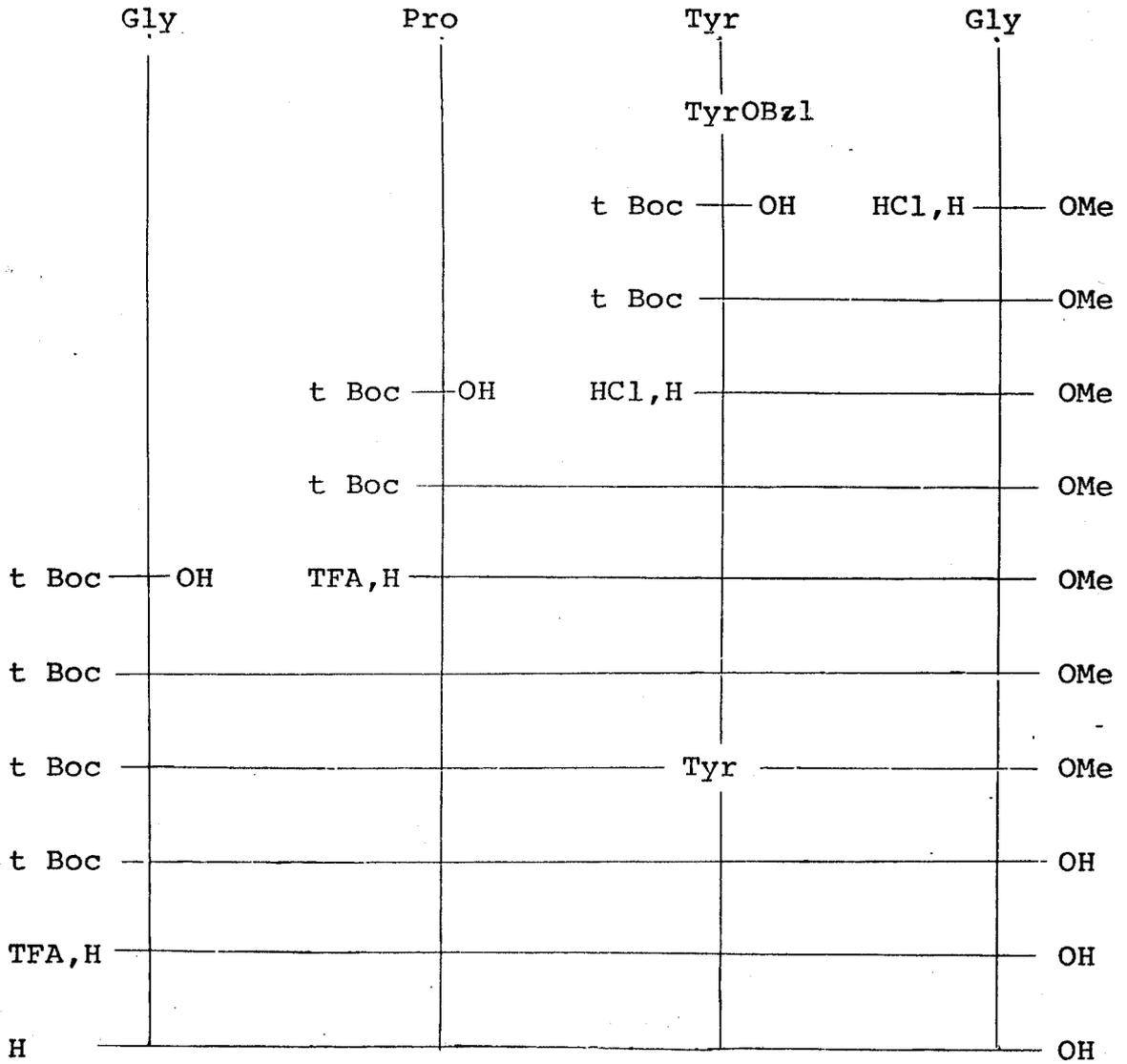
Le taux de racémisation n'a pas été évalué directement, mais les études RMN réalisées par Michel BATAILLE ont démontré que ce taux était négligeable.

D - SCHEMAS DE SYNTHESE

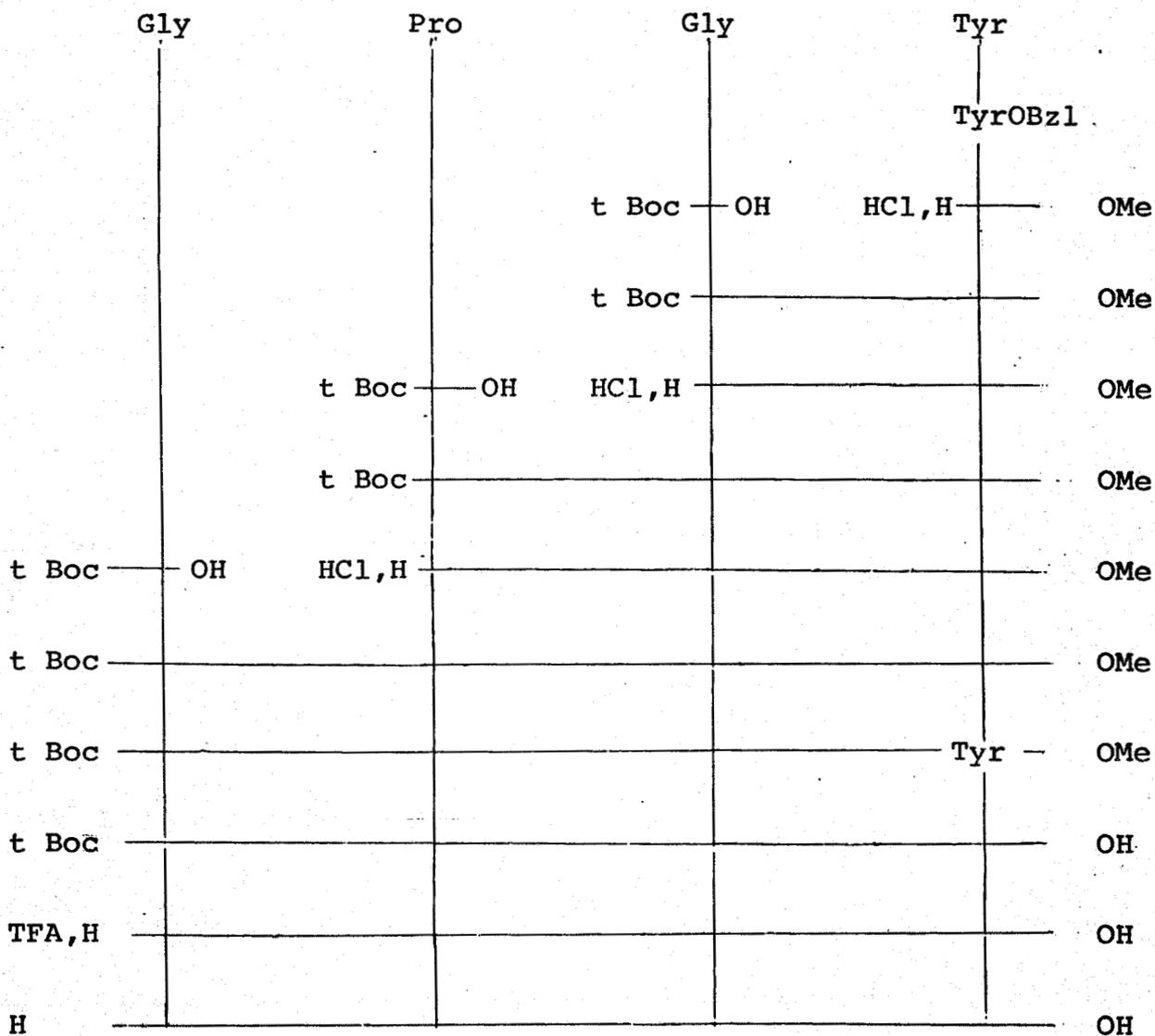
1 - Tyr - Pro - Gly - Gly



2 - Gly-Pro-Tyr-Gly



3 - Gly-Pro-Gly-Tyr



E - PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Produits de départ

a - Tyr OBzl (P11)

72,4 g (0,4 M) de L Tyrosine sont dissous dans 200 cm<sup>3</sup> de NaOH (2 N). Une solution aqueuse de 49,9 g de CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O est ajoutée et le tout est chauffé une demi-heure au bain-marie.

Après refroidissement le complexe cuivrique est remis en solution par l'addition de 1,5 l de méthanol et 200 ml de NaOH (2 N). 50 ml de bromure de benzyle sont alors ajoutés en une seule fois. Le mélange est agité 1 heure à 25°C.

Le précipité obtenu est lavé avec un mélange méthanol/eau (1/3,5) et séché à 60°C (jusqu'à poids constant). Le complexe obtenu est détruit par plusieurs additions d'HCl (N). Filtré, le précipité de Tyr OBzl est lavé à l'eau, à l'ammoniaque diluée et au mélange acétone-éther. Il est recristallisé dans l'acide acétique à 80 %.

Rendement 60 à 65 %.

b - Préparation des t Boc acides aminés à partir du tertiobutyloxycarbazate

*Préparation de l'azide (P15)*

26,4 g (0,2 M de carbazate de tertiobutyloxycarbonate) sont dissous dans un mélange de 36,5 ml d'eau + 22,5 ml d'acide acétique refroidi dans un bain de glace.

15,16 g (0,22 M) de nitrite de sodium sont ajoutés lentement (20 mn) en maintenant la température entre 9 et 13°C.

Après une agitation d'une heure 40 ml d'eau sont ajoutés et la couche d'azide (jaune) est séparée de la phase aqueuse qui est extraite 4 fois avec 50 ml d'éther éthylique. Les phases organiques sont rassemblées et lavées 3 fois par 50 ml d'eau et 3 fois par 50 ml de bicarbonate de sodium (M).

Après séchage sur sulfate de magnésium le solvant est évaporé sous vide sans chauffer. Le liquide restant (t Boc azide) est utilisé sans autre purification.

Rendement 85 à 90 %.

*Préparation des t Boc amino-acides (P9)*

0,05 mole d'acide-amino sont agitées dans un mélange dioxanne (10 ml) - eau (10 ml), 7,8 g de t Boc azide sont alors ajoutés. L'addition d'une solution de NaOH 4 N maintient le pH constant pendant la réaction suivant le tableau ci-après.

Acide aminé	pH	Temps de réaction
Tyr OBzl	10,4	9 h
Gly	10	2,5 h
Pro	8,6	0,5 h

L'azide en excès est éliminé par extraction à l'éther éthylique. Après acidification par l'acide citrique le t Boc amino-acide est extrait 3 fois par 50 ml d'éther éthylique et 1 fois par 50 ml d'acétate d'éthyle. Après séchage les phases organiques sont évaporées. Le résidu est dissous dans un faible volume de dichlorométhane et précipité dans l'éther de pétrole.

Rendement 70 à 80 %.

c - Préparation des esters méthyliques

Un courant de HCl sec est introduit dans une solution de méthanol (300 ml) contenant 20 g d'acide-amino pendant 3 heures sous léger reflux. Si le produit de réaction est insoluble il est lavé par du méthanol froid. S'il est soluble, après évaporation du méthanol le résidu est recristallisé dans l'éther éthylique anhydre.

## 2 - Réaction de couplage et déprotection de la fonction amine

Afin de faciliter la lecture, la procédure est présentée schématiquement :

### Mélange réactionnel

- .  $2 \cdot 10^{-2}$  mole de chlorhydrate d'ester d'acide aminé (ou peptide) dans 30 ml de chloroforme
- . 2,25 ml de N méthyl morpholine (pour neutraliser le chlorhydrate)
- .  $1,8 \cdot 10^{-2}$  mole de t Boc acide aminé
- .  $1,8 \cdot 10^{-2}$  mole de DCCI
- .  $1,8 \cdot 10^{-2}$  mole de HOBt
- . laisser la solution 4 H sous agitation à 0°C
- . ajouter  $4 \cdot 10^{-3}$  mole de DCCI
- . laisser la solution 1 heure à 0°C puis une nuit à température ambiante.

### Elimination des réactifs en excès

- . après contrôle du taux de réaction, ajouter 2 gouttes d'acide acétique (pour détruire le DCCI en excès) et filtrer la dicyclohexylurée
- . après rinçage du filtre au chloroforme, le filtrat est lavé 2 fois par une solution d'HCl 1 %, une fois par H<sub>2</sub>O saturée en NaCl, 2 fois par une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> 4 % et une dernière fois par H<sub>2</sub>O saturée en NaCl
- . l'efficacité du lavage est contrôlée par chromatographie sur gel de silice
- . la phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis évaporée

- . le résidu est repris par quelques ml d'acétate d'éthyle. Après une demi-heure la solution est filtrée et l'acétate d'éthyl évaporé.

### Déprotection de la fonction amine

- . le résidu est dissous soit dans 30 ml d'une solution dioxanne - HCl (4 M) soit dans 20 à 30 ml d'acide trifluoroacétique
- . quand la coupure est complète (20 à 30 mn) la solution est évaporée à sec
- . le résidu, repris par quelques ml de dichlorométhane est précipité soit dans l'éther anhydre soit dans l'éther de pétrole.

Rendement global (pour les 2 opérations) :

55 à 65 %

Remarque :

Le choix entre le mélange HCl - dioxanne et l'acide trifluoroacétique dépend de la facilité de cristallisation des sels correspondants.

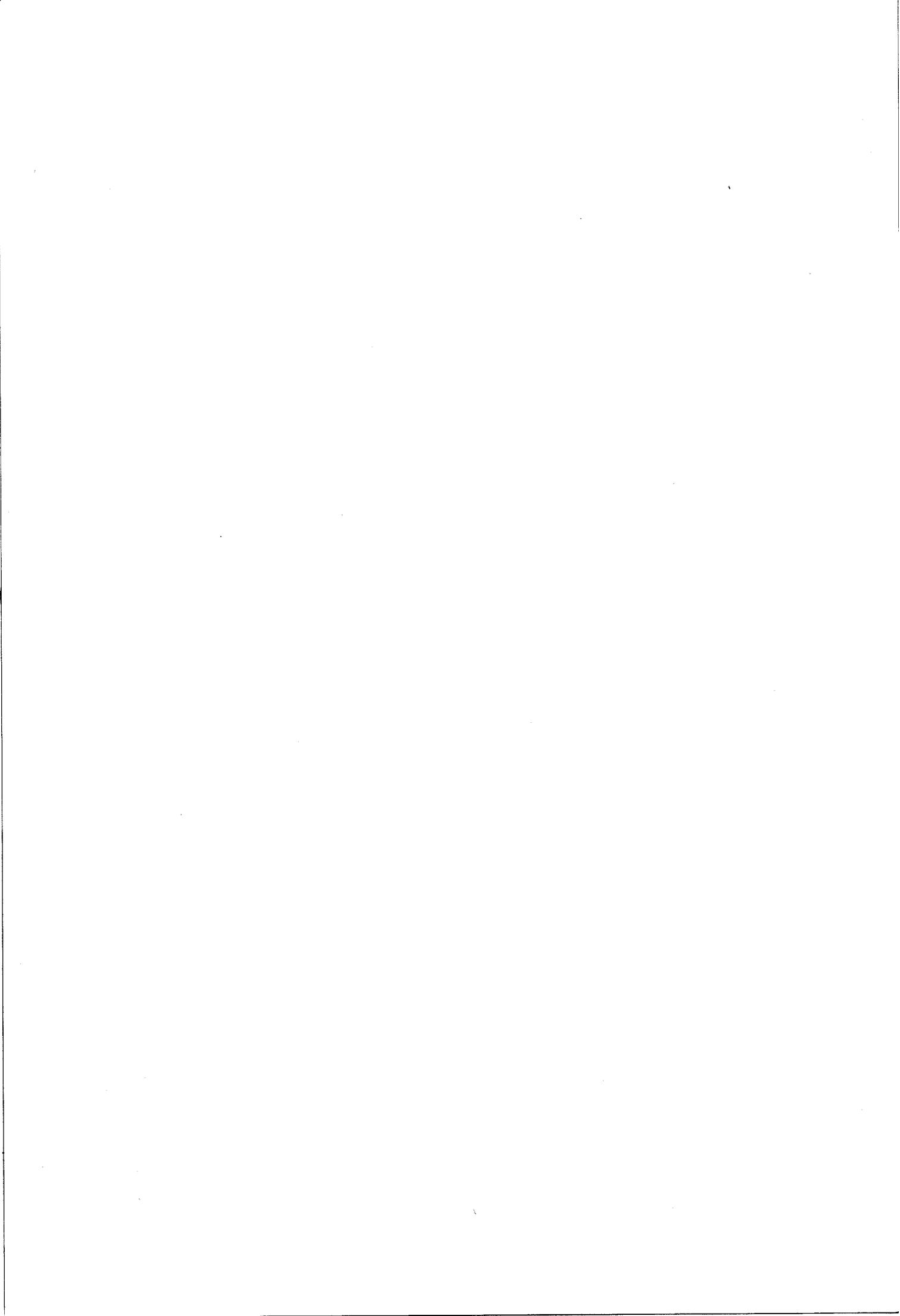
### 3 - Déprotection des autres fonctions

#### a - Fonction acide

L'ester méthylique de l'acide est saponifié en milieu basique (méthanol - soude N). Cette saponification est suivie par chromatographie sur gel de silice.

#### b - Fonction phénol de la Tyrosine

L'éther benzylique est coupé par hydrogénation dans le dioxanne en utilisant le palladium (10 % sur charbon) comme catalyseur. La réaction est suivie par mesure du volume d'hydrogène utilisé et par chromatographie sur gel de silice.



BIBLIOGRAPHIE

Généralités sur les peptides

- G1 IUPAC-IUB  
*Commission on Biochemical Nomenclature* (1970) 9, 3471-3478.
- G2 VENKATACHALAM C.M.  
*Biopolymers* (1968) 6, 1425-1436.
- G3 CRAWFORD J.L., LIPSCOMB W.N., SCHELLMAN C.G.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1973) 70, 538-542.
- G4 PRINTZ M.P., NEMETHY G., BLEICH E.  
*Nature* (1972) 237, 135-140.
- G5 NEMETHY G., PRINTZ M.P.  
*Macromolécules* (1972) 5, 755-758.
- G6 KHALED ABU M., URRY D.W., OKAMOTO K.  
*Biochim. Biophys. Acta* (1976) 72, 162-169.
- G7 LEWIS P.N., MOMANY F.A., SCHERAGA H.A.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1971) 68, 2293-2297.
- G8 LEWIS P.N., MOMANY F.A., SCHERAGA H.A.  
*Biochim. Biophys. Acta* (1973) 303, 211-229.
- G9 CHOU P.Y., FASMAN G.D.  
*Biochemistry* (1974) 13, 222-245.
- G10 CHOU P.Y., FASMAN G.D.  
*J. Mol. Biol.* (1977) 115, 135-175.
- G11 DEBER C.M., BOVEY F.A., CARVER J.P., BLOUT E.R.  
*"Peptides 1969"* (North Holland Pub. Co. Amsterdam)  
(1971) 181-199.
- G12 WUETHRICH K., GRATHWOHL Ch.  
*F.E.B.S. Letters* 43, 337-340.

PREMIERE PARTIE

CHAPITRES 1 et 2

- F1 COWGILL R.W.  
*Biochim. Biophys. Acta* (1967) 133, 6-18.
- F2 BORRENSEN H.  
*Acta Chem. Scand.* (1967) 21, 920-936.
- F3 FEITELSON J.  
*Photochem. Photobiol.* (1969) 9, 401-410.
- F4 CHEN R.F.  
*Anal. Lett.* (1967) 1, 35-42.
- F5 TEALE F.W.J., WEBER G.  
*Biochem. J.* (1957) 65, 476-482.
- F6 FEITELSON J.  
*J. Phys. Chem.* (1964) 68, 391-397.
- F7 WHITE A.  
*Biochem. J.* (1959) 71, 217-220.
- F8 COWGILL R.W.  
*Biochem. Biophys. Acta* (1965) 94, 81-88.
- F9 EDELHOCH H., PERLMAN R.L., WILCHEK M.  
*Biochem. J.* (1968) 7, 3893-3900.
- F10 EDELHOCH H., BERNSTEIN R.S., WILCHEK M.  
*J. Biol. Chem.* (1968) 243, 5985-5992.
- F11 COWGILL R.W.  
*Biochem. Biophys. Acta* (1968) 168, 417-430.
- F12 GAUDUCHON P.  
*Thèse Orléans* (1977).
- F13 COWGILL R.W.  
*Biochem. Biophys. Acta* (1970) 200, 18-25.
- F14 GAUDUCHON P., WAHL Ph.  
*Biophys. Chem.* (1978) 8, 87-104.

- F15 TOURNON J., EL-BAYOUMI M.A.  
*J. Am. Chem. Soc.* (1971) 93, 6396.
- F16 TOURNON J., KUNTZ E., EL-BAYOUMI M.A.  
*Photochem. Photobiol.* (1972) 16, 425-433.
- F17 TOURNON J., EL-BAYOUMI M.A.  
*J. Chem. Phys.* (1972) 59, 5128-5134.
- F18 COWGILL R.W.  
in "Biochemical Fluorescence", eds CHEN et EDELHOCH  
(M. DEKKER, N.Y.) (1976) vol. 2, chap. 9.
- F19 FLORY P.  
"Statistical Mechanics of Chain Molecules"  
(WILEY-Interscience) (1969).
- F20 HERMANS J., FERRO D.  
*Biopolymers* (1971) 10, 1121.
- F21 HOFFMANN J.  
*J. Chem. Phys.* (1963) 39, 1397.
- F22 POPLE G.A., SEGAL J.  
*J. Chem. Phys.* (1966) 44, 3289.
- F23 DINER S., MALRIEV J.P., CLAVERIE P.  
*Theor. Chem. Acta* (1969), 13, 1.
- F24 PULLMAN B.  
"The conformation of biological molecules and polymers"  
(Academic Press, N.Y.) (1973).
- F25 PULLMAN B., PULLMAN A.  
*Adv. in Protein Chemistry* (1974) 28, 347.
- F26 MOMANY F.A., CARRUTHERS L.M., Mc GUIRE R.F., SCHERAGA H.A.  
*J. Phys. Chem.* (1974) 78, 1595.
- F27 MOMANY F.A., Mc GUIRE R.F., BURGESS A.W., SCHERAGA H.A.  
*J. Phys. Chem.* (1975) 79, 22.
- F28 Mc GUIRE R.F., MOMANY F.A., SCHERAGA H.A.  
*J. Phys. Chem.* (1972) 76, 375.
- F29 SCHERAGA H.A.  
*Adv. Phys. Org. Chem.* (1968) 6, 103.



- F30 SCHERAGA H.A.  
*Chem. Rev.* (1971) 71, 195.
- F31 LEACH S.J., NEMETHY G., SCHERAGA H.A.  
*Biopolymers* (1966) 4, 369-407.
- F32 PREMILAT S., HERMANS J.  
*J. Chem. Phys.* (1973) 59, 5, 2602-2612.
- F33 ZIMMERMAN S.S., POTTLE M.S., NEMETHY G., SCHERAGA H.A.  
*Macromolécules* (1977) 10, 1-9.
- F34 COTRAIT M., BIDEAU J.P.  
*Acta Cryst.* (1974) B30, 1024-1028.
- F35 CODY V., DUAX W.L., HAUPTMAN H.  
*Int. J. Pept. Res.* (1973) 5, 297-308.

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE 1

- A1 LEE B., RICHARDS F.M.  
*J. Mol. Biol.* (1971) 55, 379-400.
- A2 CHOTHIA C.  
*J. Mol. Biol.* (1976) 105, 1-14.
- A3 GATES R.E.  
*J. Mol. Biol.* (1979) 127, 345.
- A4 MANAVALAN P.  
*J. Mol. Biol.* (1979) 127, 345.
- A5 SHRAKE A., RUPLAY J.A.  
*J. Mol. Biol.* (1973) 79, 351-371.
- A6 RICHARDS F.M.  
*Ann. Rev. Biophysic. Bioeng* (1978) 6, 151-176.

CHAPITRE 2

- D1 GLASSTONE S., LAIDLER K., EYRING H.  
*"Theory of rate processes"* (Mc GRAW-HILL, N.Y.) (1941).
- D2 TYRREL H.J.V.  
*"Diffusion and Heat flow in Liquids"* (Butterworths, LONDON) (1961).
- D3 BIRKS J.B.  
*"Organic Molecular Photophysics"* (WILEY, LONDON) (1973) 403-456.
- D4 EINSTEIN A.  
a) *Ann. Physik* (1905) 17, 549.  
b) *Ann. Physik* (1906) 19, 371.
- D5 SUTHERLAND W.  
*Phil. Mag.* (1905) 9, 781.
- D6 STOKES G.  
*Trans. Cambridge Phil. Soc.* (1856) 9, 5.

- D7 PERRIN F.  
*J. Phys. Radium* (1936) 7, 1.
- D8 ELWORTHY P.H.  
*J. Chem. Soc.* (1962) 4, 3718-3720.
- D9 DALE  
"Five Figure tables of Mathematical Functions"  
(ARNOLD, LONDON) (1949), 94.
- D10 WIRTZ K.  
*Z. Naturf* (1948) 3a, 672.
- D11 GIERER A., WIRTZ K.  
*Z. Naturf* (1953) 8a, 532.
- D12 SPERNOL A., WIRTZ K.  
*Z. Naturf* (1953) 8a, 522.
- D13 GORREL J.H., DUBOIS J.T.  
*Transfaraday Soc.* (1967) 63, 347.
- D14 BONDI A.  
*J. Phys. Chem.* (1964) 68, 441.
- D15 EDWARD J.J.  
*J. of Chem. Ed.* (1970) 47, 261.

CHAPITRE 3

- T1 SMOLUCHOWSKI M. von Z  
*Z. Phys. Chem.* (1917) 92, 129.
- T2 SVESHNIKOFF B.  
*Acta Physiochim. URSS* (1935) 3, 257.
- T3 SVESHNIKOFF B.  
*Acta Physiochim. URSS* (1937) 7, 755.
- T4 UMBERGER J.Q., LA MER V.K.  
*J. Am. Chem. Soc.* (1945) 67, 1099.
- T5 COLLINS F.C., KIMBALL G.F.  
*J. Colloid Sci.* (1950) 5, 499.

- T6 YGUERABIDE J., DILLON M.A., BURTON M.  
*J. Chem. Phys.* (1964) 40, 3040.
- T7 YGUERABIDE J.  
*J. Chem. Phys.* (1967) 47, 8, 3049.
- T8 NOYES R.M.  
*Prog. Reaction Kinetics* (1961) 1, 131.
- T9 NEMZEK T.L., WARE W.R.  
*J. Chem. Phys.* (1975) 62, 477-489.
- T10 ALWATTAR A.H., LUMB M.D., BIRKS J.B.  
in "*Organic Molecular Photophysics*" (WILEY Interscience)  
(1973) 1, 403-456.
- T11 STERN O., VOLMER M.  
*Phys. Z.* (1919) 20, 183.
- T12 GNEDENKO B.V.  
*"Theory of Probability (Chelsea Publ. N.Y.)* (1962).
- T13 ONSAGER L.  
*J. Chem. Phys.* (1934) 2, 599.
- T14 ONSAGER L.  
*Phys. Rev.* (1938) 54, 554.
- T15 MOZUMDER A.  
*J. Chem. Phys.* (1974) 61, 780.
- T16 MOZUMDER A.  
*J. Chem. Phys.* (1968) 48, 1659.
- T17 MAGEE J.L.  
*J. Chem. Phys.* (1972) 56, 3061.
- T18 HONG K.M., NOOLANDI J.  
*J. Chem. Phys.* (1978) 68, 5163.
- T19 DEBYE P.  
*Trans. Electrochem. Soc.* (1942), 82, 265.
- T20 MONTROLL E.W.  
*J. Chem. Phys.* (1946) 14, 202.

- T21 WILEMSKI G., FIXMAN M.  
*J. Chem. Phys.* (1973) 58, 4009.
- T22 HONG K.M., NOOLANDI J.  
*J. Chem. Phys.* (1978) 68, 5172.
- T23 VAN DYKE M.D.  
*"Perturbation Methods in Fluids Mechanics"*  
(Academic Press, N.Y.) (1964).
- T24 RITSON D.M., HASTED J.B.  
*J. Chem. Phys.* (1948) 16, 11.
- T25 EFTINK M.R., GHIRON C.A.  
*Biochemistry* (1976) 15, 672-680.
- T26 EFTINK M.R., GHIRON C.A.  
*J. Phys. Chem.* (1976) 80, 486-493.

TROISIEME PARTIE

CHAPITRE 1

- M1 MOMANY F.A.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1977) 75, 1098.
- M2 ISOGAI Y.I., NEMETHY G., SCHERAGA H.A.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1977) 74, 414.
- M3 DE COHEN J.L., HUMBLET C., KOCH M.H.J.  
*F.E.B.S. Lett.* (1977) 73, 38.
- M4 LOEW G.H., BURT S.K.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) 75, 7.
- M5 BALODIS Y.Y., NIKIFOROVICH G.V., GRINSTEINE I.V.,  
VEGNER R.E., CHIPENS G.I.  
*F.E.B.S. Lett.* (1978) 86, 239.
- M6 PREMILAT S., MAIGRET B.  
*J. Phys. Chem.* (1980) 84, 293-299.
- M7 BRADBURY A.F., SMYTH D.G., SNELL C.R.  
*Nature (London)* (1976) 260, 165.
- M8 GORIN F.A., MARSHALL G.R.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1977) 74, 5179.
- M9 LEVITT M.  
*J. Mol. Biol.* (1976) 104, 59.

CHAPITRE 2

- S1 COTTON F.A., WILKINSON G.W.  
"Advanced Inorganic Chemistry" (WILEY, LONDON) 2<sup>ème</sup> ed.
- S2 HOMER R.B., ALLSOPP S.R.  
*Biochem. Biophys. Acta* (1976) 434, 297-310.
- S3 STERN O., VOLMER M.  
*Phys. Z.* (1919) 20, 183.

- S4 LAUSTRIAT G., PFEFFER G., LAMI H., COCHE A.  
*Acta Phys. Polon.* (1964) 26, 449.
- S5 LAUSTRIAT G., PFEFFER G., LAMI H., COCHE A.  
*Colloque International d'Electronique Nucléaire de Paris* (1963).
- S6 LAMI H., PFEFFER G., LAUSTRIAT G.  
*J. Phys.* (1966) 27, 384-404.
- S7 GOWGILL R.W.  
*"Concept in Biochemical Fluorescence"* (M. DEKKER, N.Y.)  
(1976) Vol. 2.
- S8 GERARD D., LAUSTRIAT G., LAMI H.  
*Biochem. Biophys. Acta.* (1972) 263, 482-495.
- S9 ALTEKAR W.  
*Biopolymers* (1977) 16, 341.
- S10 ALTEKAR W.  
*Biopolymers* (1977) 16, 369.
- S11 LUX B., GERARD D., LAUSTRIAT G.  
*F.E.B.S. Lett.* (1977) 80, 1, 66-70.

ANNEXE

- P1 MERRIFIELD R.B.  
*J. Am. Chem. Soc.* (1963) 85, 2149-2154.
- P2 STEWARD J.M., YOUNG J.D.  
"Solid Phase peptide synthesis" (FREEMAN) (1969).
- P3 MUTTER M., BAYER E.  
*Angew. Chem.* (1974) 88, 101-102.
- P4 MUTTER M., UHMANN R., BAYER E.  
*Liebigs Ann. Chem.* (1975) 901-915.
- P5 GREENSTEIN J.P., WINITZ M.  
"Chemistry of Amino Acids" (WILEY, N.Y.) (1961) vol. 2.
- P6 SCHRÖDER E., LÜBKE K.  
"The peptides" (Academic Press, N.Y.) (1965).
- P7 CURTIUS T., GOEBEL F.  
*J. Prakt. Chem.* (2) (1888) 37, 150.
- P8 Mc KAY F.C., ALBERTSON N.F.  
*J. Am. Chem. Soc.* (1957) 79, 4686-4690.
- P9 SCHNABEL E.  
*Liebigs Ann. Chem.* (1967) 702, 188-196.
- P10 SCHWYZER R., KAPPELER H.  
*Helv. Chim. Acta* (1961) 44, 1991.
- P11 WÜNSCH E., FRIES G., ZWICK A.  
*Chem. Ber* (1958) 91, 542.
- P12 KATSOYANNIS P.G., SUZUKI K.  
*J. Am. Chem. Soc.* (1962) 84, 1420.
- P13 SHEEMAN J.C., HESS G.P.  
*J. Am. Chem. Soc.* (1955) 77, 1067-1068.
- P14 KOENIG W., GEIGER R.  
*Chem. Ber* (1970) 103, 788-798.
- P15 CARPINO L.A.  
*J. Am. Chem. Soc.* (1957) 79, 4427.