

50376
1980
218

50376
1980
218

N° d'ORDRE 498

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Bruno PERLY

ETUDE PAR RESONANCE ET RELAXATION MAGNETIQUES
DES CONFORMATIONS LOCALES ET DES MOUVEMENTS
MOLECULAIRES D'HOMOPOLYPEPTIDES EN SOLUTIONS AQUEUSES



Soutenu le 19 novembre 1980, devant la Commission d'Examen

MM. A. LABLACHE-COMBIER	Président
C. CHACHATY	
C. HELENE	Rapporteurs
P. RIGNY	
C. LOUCHEUX	Examineur

"Felix qui potuit rerum cognoscere causas"
Virgile, *Géorgiques* II, 489.

*"La seule chose qu'on ne peut embellir sans
qu'elle en périsse, c'est la vérité."*

Jean Rostand, *Pensées d'un biologiste*.

"Heureux qui a pu connaître les causes profondes des choses"

*A mes parents,
en témoignage d'affection et de reconnaissance.*

A Lydia et Carine.

Ce travail a été effectué au Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay. Monsieur RIGNY, Chef du Département de Physico-Chimie m'a fait l'honneur de participer au jury chargé de juger cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Monsieur LABLACHE-COMBIER, Professeur à l'Université de Lille a dirigé ce travail et accepté de présider le jury. Je lui suis très reconnaissant de l'intérêt qu'il a porté à ces études et de la confiance qu'il m'a accordée.

Je dois à Monsieur CHACHATY ma formation en Résonance Magnétique. Ses enseignements et encouragements quotidiens m'ont toujours été précieux. C'est pour moi un plaisir que de lui témoigner ici ma très profonde et respectueuse reconnaissance pour l'intérêt bienveillant qu'il m'a témoigné.

Messieurs HELENE, Professeur au Muséum d'Histoire Naturelle et LOUCHEUX, Professeur à l'Université de Lille m'ont fait l'honneur de s'intéresser à ce travail et de faire partie du jury. Qu'ils en soient vivement remerciés.

Je dois beaucoup à Monsieur TSUTSUMI, Professeur à l'Université d'Hokkaido (Japon) qui, au cours d'un stage dans notre laboratoire, a mis au point les théories et programmes de calculs originaux essentiellement utilisés dans cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour la collaboration amicale et fructueuse que nous avons eue à cette occasion.

La synthèse des polypeptides et analogues étudiés ici n'aurait pas été possible sans l'aide que m'ont apporté Monsieur GALLOT et toute son équipe du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, en particulier Monsieur DOUY. Je leur dois ma formation à la chimie des polypeptides. Qu'ils soient tous remerciés de leur accueil, de leur amitié et de leur disponibilité.

Le travail quotidien m'a été grandement facilité par l'ambiance amicale et studieuse qu'ont su créer tous mes collègues de laboratoire, Messieurs BELAID, BUU, CHEVALIER, DESALOS, FORCHIONI, LE BAIL, QUAEGEBEUR et ZEMB. Qu'ils soient tous assurés de ma profonde sympathie.

Que tous ceux qui ont contribué à la réalisation matérielle de ce mémoire, en particulier Madame BONGUET, trouve ici l'expression de mes remerciements sincères.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION	1
Chapitre I - PROPRIETES GENERALES DES POLYPEPTIDES ETUDIES.	3
I.a. Acide poly-L-glutamique.	
I.b. Poly N ⁵ (3 hydroxypropyl)-L-glutamine.	
I.c. Poly-L-lysine.	
I.d. Poly-L-histidine.	
Chapitre II - LA RESONANCE MAGNETIQUE.	9
II.a. Moments angulaires et magnétiques associés au spin.	
II.b. Comportement dans un champ externe H ₀ .	
II.c. Description mécanistique de la résonance.	
II.d. Equilibre thermique.	
II.e. Paramètres classiques d'un spectre de résonance magnétique : déplacements chimiques et constantes de couplage.	
Chapitre III - LA RELAXATION MAGNETIQUE.	21
III.1. Notion de "bruit magnétique".	
III.2. Définition des temps de relaxation.	
III.3. Composantes du bruit magnétique. Notion de densité spectrale.	
III.4. Origine du champ local perturbant.	

III.5. Relation entre les temps de relaxation et les mouvements moléculaires.	
III.6. Opérations en Transformée de Fourier.	
III.7. Techniques de mesure des paramètres de relaxation.	
III.8. Evolution de l'aimantation longitudinale en fonction du temps en relaxation dipolaire.	
III.9. Expressions analytiques des temps de relaxation et de l'effet Overhauser.	
Chapitre IV - DYNAMIQUE MACROMOLECULAIRE ET MODELES DE MOUVEMENTS.	47
IV.1. Modèles de mouvements pour le squelette.	
IV.2. Mouvements élémentaires de la chaîne latérale.	
IV.3. Systèmes à liaisons multiples.	
Chapitre V - ETUDE DES CONFORMATIONS LOCALES ET DES TRANSITIONS STRUCTURALES PAR LES METHODES CLASSIQUES DE LA RMN.	57
V.1. Etudes par RMN du proton.	
V.2. Analyse des conformations locales. Pourcentages de rotamères.	
V.3. Effet de la température sur les conformations locales.	
V.4. Comportement des déplacements chimiques lors des transitions structurales.	
V.5. Résonance magnétique du ^{13}C .	
V.6. Résonance magnétique du deutérium.	
Chapitre VI - APPLICATIONS DU MARQUAGE DE SPIN A L'ETUDE DYNAMIQUE DES POLYPEPTIDES.	75
VI.1. Etude par RPE de polypeptides marqués par des radicaux nitroxydes.	
VI.2. Etude de la dynamique des polypeptides par résonance magnétique du deutérium.	
VI.3. Avantages et inconvénients des méthodes de marquage de spin utilisées.	

	Page
Chapitre VII - ETUDE DYNAMIQUE DU SQUELETTE DES POLYPEPTIDES SOUS FORME DE PELOTES STATISTIQUES.	99
VII.1. Modèles de mouvement.	
VII.2. Comparaison des résultats ^{13}C et RPE.	
Chapitre VIII - ETUDE PAR RELAXATION NUCLEAIRE DES MOUVEMENTS LOCAUX DES CHAINES LATERALES.	107
VIII.1. Caractéristiques des programmes de calcul.	
VIII.2. Critères de sélection d'un type de mouvement.	
VIII.3. Etude du comportement dynamique des chaînes latérales du PLGA sous forme non organisée.	
VIII.4. Analyse du comportement dynamique des chaînes latérales de la PHPG.	
VIII.5. Dynamique conformationnelle des chaînes latérales de la poly-L-lysine non ordonnée.	
VIII.6. Analyse du comportement dynamique des chaînes latérales de la poly-L-histidine.	
VIII.7. Etude comparative des diverses chaînes latérales et conclusions.	
Chapitre IX - COUPLAGE DES MOUVEMENTS DES CHAINES PRINCIPALE ET LATERALE. ANALYSE DE LA RELAXATION DE $^1\text{H}_\alpha$.	139
IX.1. Problèmes posés par la relaxation de H_α .	
IX.2. Résultats expérimentaux et calculés.	
Chapitre X - RELAXATION NUCLEAIRE INDUITE PAR UN MARQUEUR DE SPIN RADICALAIRE.	145
X.1. Principe de la méthode.	
X.2. Théorie de la relaxation induite.	
CONCLUSION GENERALE.	151
Chapitre XI - APPENDICE TECHNIQUE.	153
XI.1. Schéma général de synthèse.	
XI.2. Protection des chaînes latérales.	
XI.3. Synthèse des N-carboxyanhydrides.	

- XI.4. Polymérisations.
- XI.5. Synthèse de polypeptides marqués par des radicaux nitroxydes.
- XI.6. Deutérations sélectives.
- XI.7. Préparation des échantillons.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

La connaissance des conformations locales et des mouvements moléculaires est un élément essentiel à la compréhension des paramètres régissant l'activité biologique de macromolécules naturelles telles que les protéines. Ces dernières sont formées d'une chaîne de type $H(NH-CHR-CO)_nOH$ résultant de la succession d'un nombre n important d'unités monomères, les α -amino-acides dont il existe une vingtaine de variétés différant par la nature de R. Pour une espèce donnée, cet enchaînement est rigoureusement codé par les caractéristiques génétiques de l'organisme considéré et constitue la structure primaire. Alors qu'à l'état cristallisé la conformation de ces protéines peut être déterminée par diffraction des rayons X, aucune technique ne permet une analyse aussi fine sur des solutions. Il est très tôt apparu nécessaire de faire appel à des composés modèles. Les homopolypeptides formés de la polycondensation de n motifs identiques se sont rapidement imposés comme des candidats parfaitement adaptés /1/. Dans une protéine naturelle l'organisation de la chaîne principale, c'est-à-dire la structure secondaire, n'est pas identique en tout point de la macromolécule. Cette éventuelle coexistence de diverses conformations ne simplifie pas l'interprétation des données expérimentales. Au contraire, dans des conditions déterminées, les homopolypeptides n'adoptent en général qu'un seul type de structure secondaire, hélice, feuillets plissés etc ... Ils constituent donc un matériel de choix pour l'étude de ces conformations et de leur interconversion.

En outre, ces composés ont été très utilisés pour diverses applications biologiques telles que l'étude des protéases /2, 3/ ou l'analyse des facteurs déterminant l'antigénicité /4/ par exemple. Le greffage de ces homopolypeptides à des macromolécules naturelles constitue une méthode élégante pour améliorer la résistance à la dénaturation ou à l'autolyse /5/ de certaines enzymes ou même pour purifier des t-RNA spécifiques /6/.

D'un point de vue purement organique les homopolypeptides appartiennent à la classe des polyamides. La variété de nature de la chaîne latérale R permet de disposer de matériaux macromoléculaires aux propriétés très diverses.

Enfin la polycondensation des α -amino-acides ne provoque pas l'apparition de carbones asymétriques supplémentaires comme c'est le cas avec les polymères vinyliques. Les problèmes de tacticité qui compliquent souvent l'interprétation des résultats expérimentaux sont donc ici inexistantes.

Le but de ce travail est d'étudier par les techniques de résonance magnétique les conformations et mobilités locales de quelques homopolypeptides typiques. Ces méthodes permettant une observation très locale des éléments moléculaires se sont révélées très efficaces pour analyser les propriétés structurales et dynamiques de multiples composés biologiquement importants /7, 8/ ainsi que leurs interactions /9-10/.

Chapitre I

PROPRIETES DES POLYPEPTIDES ETUDIES.

Nous avons limité l'étude présente à quatre homopolypeptides hydrosolubles représentant respectivement l'une des quatre grandes familles d' α -amino-acides naturels, en l'occurrence ceux dont la chaîne latérale R est neutre, acide, basique ou aromatique. Les amino-acides intervenant dans les protéines possèdent toujours la configuration L (Fig. I.1) autour du carbone C_{α} asymétrique.

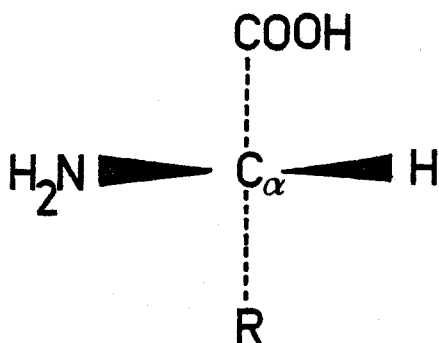
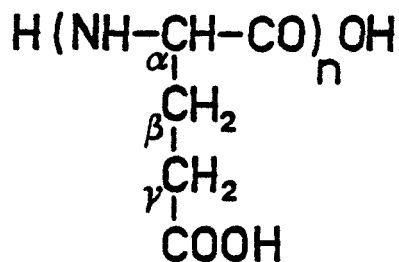


Figure I.1. Configuration L des α -amino-acides naturels.

Cette configuration L est conservée dans les homopolypeptides étudiés.

I.a. Acide poly L-glutamique (PLGA).



PLGA

Ce polymère à chaîne latérale acide (pKa de $\delta\text{COOH} = 4,5$) peut adopter une conformation en hélice α droite (ou hélice $3,6_{13}$) schématisée sur la figure I.2. Cette structure est stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupes NH et CO du squelette polypeptidique.

La transition entre cette structure et une chaîne désordonnée ("pelote statistique") peut être induite par ionisation des groupes δ -carboxyliques /11/ ou par élévation de température /12/. Le PLGA constitue donc un modèle réaliste pour l'analyse des phénomènes de dénaturation des protéines. Enfin le PLGA et les copolymères contenant de l'acide L-glutamique et de la L-tyrosine sont de puissants inhibiteurs de certaines enzymes en particulier le lysozyme /13/.

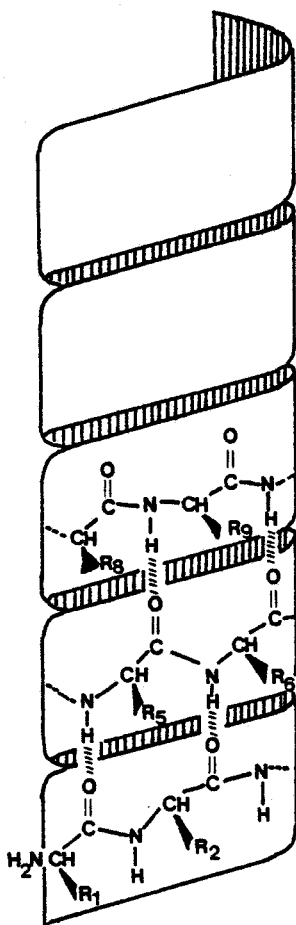
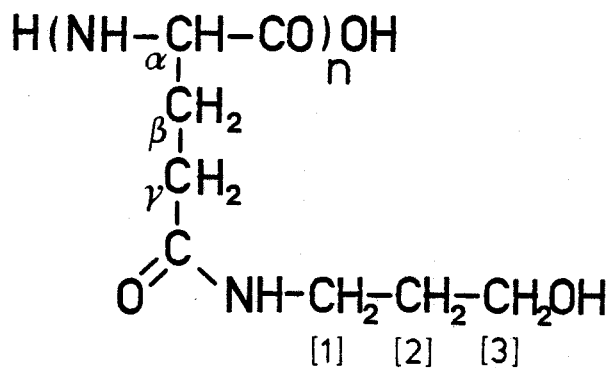


Figure I.2. Représentation schématique de l' α hélice droite.

I.b. Poly N⁵-(3-hydroxypropyl)L-glutamine (PHPG).



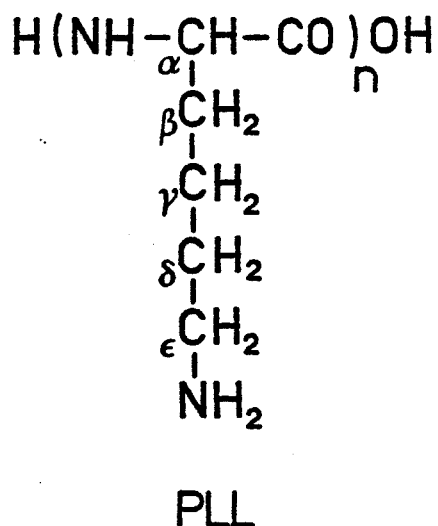
PHPG



Cet homopolypeptide ne correspond pas à un amino-acide naturel. Nous l'avons toutefois choisi car, contrairement à la grande majorité des poly α -amino-acides neutres, il est soluble dans l'eau. Il constitue de plus un matériel de choix pour l'analyse de la conformation et de la dynamique locales d'une chaîne longue fixée à une structure macromoléculaire.

En solution aqueuse ce polymère se présente sous forme quasi-désordonnée. Le passage à une α -hélice peut être induit par addition d'un solvant organique tel que le méthanol /14/.

I.c. Poly-L-lysine (PLL).



Ce polypeptide basique (pKa de $\epsilon\text{NH}_2 = 11$) possède de très nombreuses propriétés biologiques. Outre ses activités anticoagulantes /15/ et antitumorales /16/ il interagit fortement avec certaines enzymes. Cette interaction se traduit soit par une puissante inhibition de l'activité catalytique dans le cas de la cytochrome oxydase ou de la pepsine /17-18/ soit au contraire (par exemple avec la polynucléotide phosphorylase) par une importante activation /19/.

Le caractère basique de la PLL lui permet de s'associer avec des acides nucléiques /20-21/ simulant ainsi les histones et les protamines. Enfin, la poly-L-lysine interagit avec bon nombre de cellules, bactéries et virus /22/. Cette propriété a d'ailleurs été mise à profit pour favoriser la cohésion d'échantillons multicellulaires et leur adhésion aux supports utilisés en microscopie électronique /23/.

A pH neutre, la PLL se présente sous forme non organisée. La neutralisation des groupes amino à pH \approx 11 conduit à une conformation α hélicoïdale. Cette dernière peut être convertie en une structure β antiparallèle par élévation de la température (Fig. I.3). Dans ce cas les liaisons hydrogène sont intermoléculaires /24/.

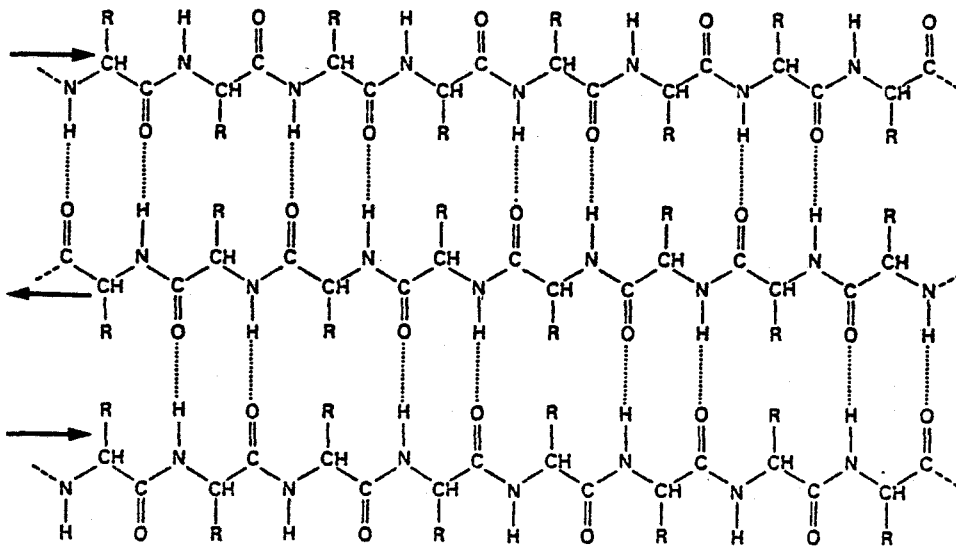
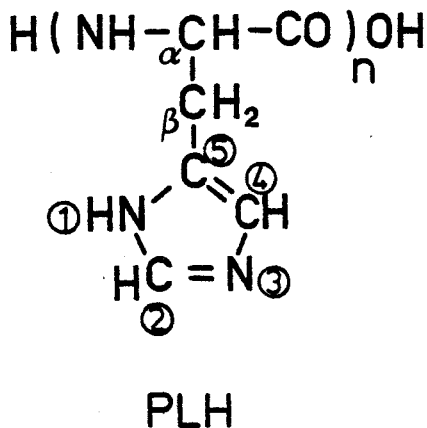


Figure I.3. Feuilletts plissés antiparallèles (structure β //).

I.d. Poly-L-histidine (PLH).



La L-histidine est un amino-acide très important que l'on rencontre fréquemment dans les sites catalytiques des protéines. Le polymère dérivé est à la fois faiblement basique et aromatique. Le pKa du cycle imidazole est de l'ordre de 5,0 et l'ionisation se traduit par le passage d'une structure en α -hélice droite à une chaîne désordonnée /25/. La PLH et les copolypeptides contenant une forte proportion d'histidine possèdent des propriétés catalytiques (en particulier estérolytiques) qui en font de bons modèles simplifiés des systèmes enzymatiques naturels /26/.

La synthèse de tous ces polypeptides et d'analogues est décrite dans l'appendice technique (chapitre XI).

Chapitre II

LA RESONANCE MAGNETIQUE

La résonance magnétique en général ne concerne que des entités possédant un paramagnétisme nucléaire (RMN) ou électronique (RPE). Cette restriction suppose l'existence d'un spin non nul. Dans le cas du paramagnétisme électronique, un électron au moins doit être célibataire. C'est le cas pour les radicaux libres transitoires ou stables, les molécules à l'état triplet (O_2 par exemple) ou les ions de métaux de transition. En ce qui concerne les noyaux atomiques il est possible de déterminer le spin nucléaire à partir des parités des nombres de masse A et de charge Z du noyau considéré. Celui-ci ne sera observable que si le spin I est non nul (Tableau I.1).

A	Z	Spin	Exemples
pair	pair	0	$^{12}C, ^{16}O, ^{32}S$
pair	impair	n	$^2H(I = 1), ^{14}N(I = 1)$
impair	pair	n/2	$^{13}C(I = 1/2)$
impair	impair	n/2	$^1H(I = 1/2), ^{15}N(I = 1/2)$

Tableau II.1

Détermination de la valeur du spin nucléaire ;
n est ici un nombre entier.

II.a. Moments angulaires et magnétiques associés au spin.

Le moment angulaire de toute entité possédant un spin non nul est un multiple entier ou demi entier de $h/2\pi = \hbar$, h étant la constante de Planck. La valeur maximale de ce moment angulaire est représentée par le nombre quantique de spin, I pour un noyau et S pour un électron, que l'on nomme plus simplement "le spin".

A ce moment angulaire est associé un moment magnétique nucléaire μ_N ou électronique μ_E dont les valeurs sont données par l'équation suivante :

$$\begin{aligned}\mu_N &= g_N \beta_N \sqrt{I(I+1)} \\ \mu_E &= -g_E \beta_E \sqrt{S(S+1)}\end{aligned}\tag{II.1}$$

g_N et g_E sont des grandeurs sans dimension, les facteurs g nucléaires et électroniques caractéristiques de la particule considérée. β_N et β_E sont respectivement les magnétons de Bohr nucléaire et électronique définis par l'équation (II.2) :

$$\beta_N = \frac{eh}{4\pi M_N c} ; \beta_E = \frac{eh}{4\pi M_E c}\tag{II.2}$$

Dans ces expressions e représente la charge élémentaire, M_N et M_E les masses respectives des entités considérées et c la célérité de la lumière. Les valeurs de M_N et M_E sont très différentes ($M_{\text{proton}} = 1836 M_E$). Dans ces conditions le moment magnétique associé à un électron sera considérablement plus important que pour un noyau. Une simple comparaison entre un proton isolé ($g = 5,5855$, $I = 1/2$) et un électron libre ($g = 2,0023$, $S = 1/2$) montre que $|\mu_E|/|\mu_H| \approx 658$.

II.b. Comportement dans un champ externe H_0 .

Lorsque le moment magnétique associé aux spins nucléaires ou électroniques est soumis à un champ magnétique externe intense et uniforme H_0 , il subit un couple. Pour toute orientation de ce moment par rapport à la direction de H_0 , l'énergie d'interaction est :

$$E = -H_0 \times \mu_{H_0} \quad (\text{II.3})$$

μ_{H_0} étant la composante de μ_E ou μ_N suivant la direction du champ H_0 . Or les lois de la mécanique quantique imposent que le moment angulaire (donc le moment magnétique) ne peut prendre, par rapport à une direction donnée, que $2I+1$ (ou $2S+1$) orientations discrètes. Les valeurs permises des composantes de μ_N ou μ_E sur la direction considérée sont définies par :

$$\mu_{m_I} = g_N \beta_N m_I \quad (\text{II.4})$$

$$\mu_{m_S} = g_E \beta_E m_S$$

m_I et m_S sont les nombres quantiques magnétiques $m_I = I, (I-1) \dots -I$. L'énergie d'interaction sera donc également quantifiée :

$$E = g_N \beta_N H_0 m_I \text{ pour un noyau} \quad (\text{II.5})$$

$$E = g_E \beta_E H_0 m_S \text{ pour un électron}$$

Chaque nombre quantique magnétique m sera donc caractérisé par un niveau d'énergie (niveau Zeeman). L'écart d'énergie ΔE entre deux niveaux sera de plus proportionnel à l'intensité du champ H_0 .

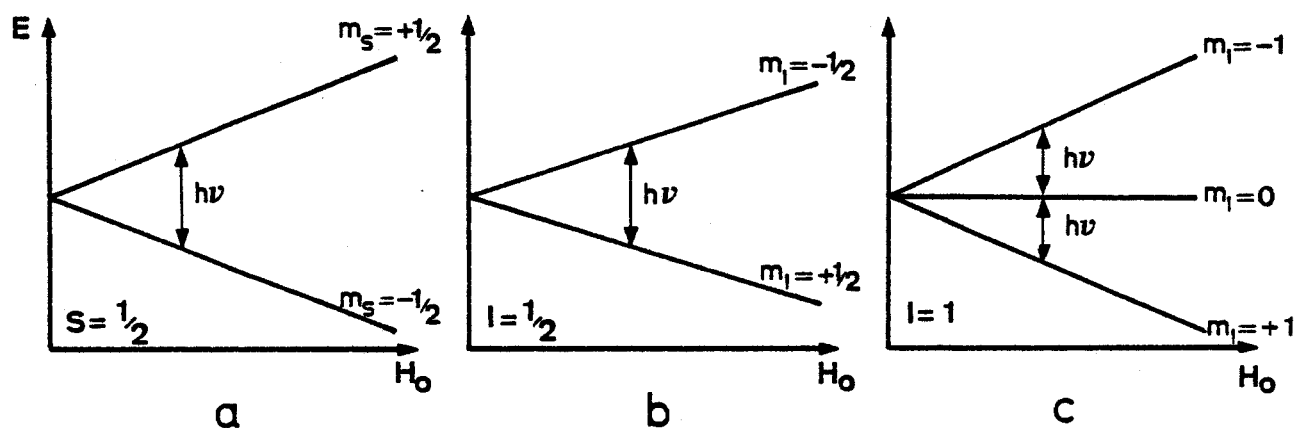


Figure II.1. Evolution des énergies des niveaux Zeeman avec le champ externe H_0 pour un électron $S = 1/2$ (a) ou un noyau de spin $I = 1/2$ (b), $I = 1$ (c).

C'est entre ces niveaux d'énergie que vont s'effectuer les transitions responsables du phénomène de résonance magnétique. La mécanique quantique impose toutefois une restriction : les transitions correspondant à $\Delta m = \pm 1$ seront seules permises. Ainsi dans le cas du noyau de spin $I = 1$, le passage direct de $m_I = -1$ à $m_I = +1$ est interdit.

La différence d'énergie $\Delta E = g_E \beta_E H_0$ ou $g_N \beta_N H_0$ est toujours très faible. Par exemple dans le cas de la résonance magnétique nucléaire du proton ΔE est de l'ordre de la millicalorie. mole^{-1} . A titre de comparaison, en spectroscopie ultra-violette, ΔE atteint quelques kilocalories. mole^{-1} . Les perturbations induites lors des transitions RMN ou RPE seront donc toujours extrêmement faibles.

Le passage d'un niveau énergétique à un autre peut être induit par un photon de fréquence ν telle que $\Delta E = h\nu$

$$\text{Pour un noyau } \nu = \frac{g_N \beta_N H_0}{h} \quad (\text{II.6})$$
$$\text{Pour un électron } \nu = \frac{g_E \beta_E H_0}{h}$$

On préfère souvent une autre formulation utilisant la fréquence angulaire $\omega = 2\pi\nu$ et en introduisant le rapport gyromagnétique γ_I (ou γ_S) de la particule considérée.

$$\gamma_I = g_N \beta_N / \hbar \Rightarrow \omega_I = \gamma_I H_0 \quad (\text{II.7})$$
$$\gamma_S = g_E \beta_E / \hbar \Rightarrow \omega_S = \gamma_S H_0$$

Le rapport gyromagnétique est en fait le quotient du moment magnétique μ_N (ou μ_E) au moment angulaire $I\hbar$ (ou $S\hbar$).

II.c. Description mécanistique de la résonance.

Le moment magnétique μ_m placé dans le champ H_0 subit un couple qui tend à l'aligner dans la direction de H_0 . Dans ces conditions $\vec{\mu}_m$ entre en précession autour de \vec{H}_0 . La fréquence ω de cette rotation est donnée par la loi de Larmor :

$$\omega_I = \gamma_I H_0 \quad (\text{II.8})$$
$$\omega_S = \gamma_S H_0$$

Cette situation est représentée sur la figure II.2 pour un noyau de spin $I = 1/2$.

Cette fréquence de Larmor ω_I correspond précisément à celle que doit posséder un photon pour induire une transition entre deux niveaux (équation II.7). Si on applique au système un second champ magnétique H_1 perpendiculaire à H_0 , les moments magnétiques auront tendance à entrer en précession également autour de H_1 . Si les fréquences angulaires autour de H_0 et H_1 sont égales, le système entre en résonance. Ce champ H_1 est en fait la composante magnétique du photon utilisé pour provoquer les transitions (Fig. II.3).

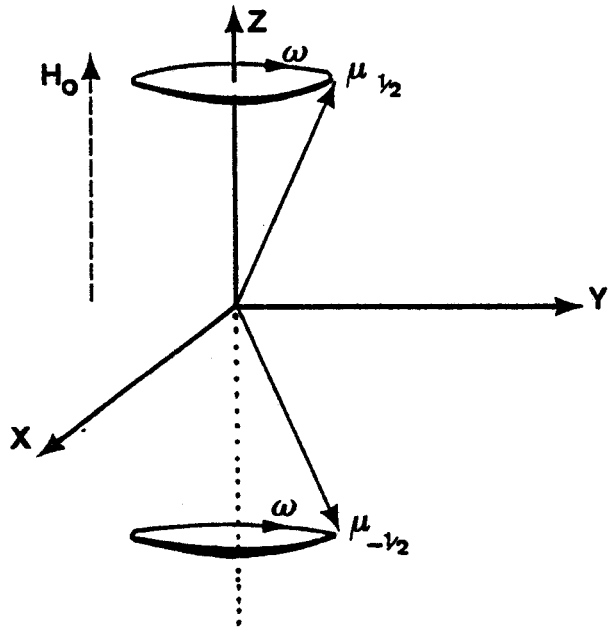


Figure II.2. Précession du moment magnétique autour de H_0 pour un noyau de spin $I = 1/2$.

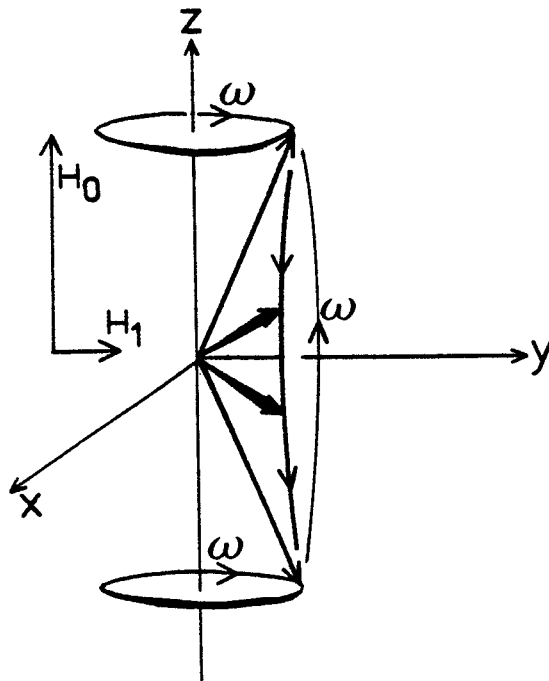


Figure II.3. Phénomène de résonance pour un noyau de spin $I = 1/2$.



Les équations (II.8) montrent que H_0 et ν sont directement proportionnels pour une espèce donnée. On pourra donc observer la résonance soit en balayant une plage de fréquence ν à champ H_0 constant (cas de la RMN) soit en faisant varier le champ magnétique H_0 à ν constante (cas de la RPE).

Les caractéristiques magnétiques des trois noyaux utilisés dans ce travail ainsi que de l'électron sont données dans le tableau II.2.

Particule	Spin	Abondance naturelle %	μ	γ rad.s ⁻¹ .G ⁻¹	Fréquence de résonance pour $H_0 = 23,5$ kG
¹ H	1/2	99,98	2,7927	26753	100 MHz
² H	1	0,0156	0,4283	4107	15,5 MHz
¹³ C	1/2	1,108	0,7022	6728	25,2 MHz
e ⁻	1/2	-	-1838	-1,761.10 ⁷	65,8 GHz

Tableau II.2

Caractéristiques magnétiques des noyaux étudiés et de l'électron. Pour toutes les particules le moment magnétique μ est exprimé en magnétons de Bohr nucléaires.

A H_0 constant, les fréquences d'observation des différents noyaux et de l'électron sont donc très séparées. Les caractéristiques des appareils utilisés sont décrites dans l'appendice technique (chapitre XI).

II.d. Equilibre thermique.

Dans un but de simplification, ce paragraphe sera illustré par des exemples concernant un noyau de spin $I = 1/2$. Les considérations générales présentées sont néanmoins valables pour tous les noyaux ainsi que pour l'électron. Si une population de spins $1/2$ est soumise à un champ H_0 uniforme il y a création de deux niveaux d'énergie E_1 et E_2 entre lesquels les transitions pourront avoir lieu. Les populations P_1 et P_2 de ces niveaux sont schématisées sur la figure II.4.

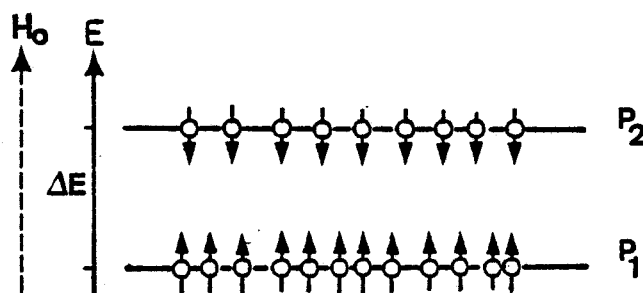


Figure II.4.

Le niveau 1 pour lequel les moments magnétiques sont orientés dans le même sens que H_0 a une énergie plus basse et se trouve donc favorisé. L'agitation thermique permet de plus des transitions entre 1 et 2. La répartition entre les deux états est régie par la loi de Boltzmann :

$$\frac{P_2}{P_1} = e^{-\Delta E/kT} \quad (\text{II.9})$$

En fait ΔE est très petit devant kT et les niveaux sont pratiquement également peuplés. Pour des protons dans un champ H_0 de 10 kG l'excès de population du niveau 1 est de l'ordre de 1 pour 10^5 spins. Ce phénomène explique la faible sensibilité intrinsèque de la résonance magnétique et en particulier de la RMN. Lors de l'application du champ H_1 à la fréquence de Larmor, des transitions sont induites entre les deux niveaux. Les probabilités de passage de $1 \rightarrow 2$ et $2 \rightarrow 1$ sont respectivement proportionnelles à P_1 et P_2 . On est donc rapidement conduit à une égalisation des populations. C'est le phénomène de saturation. Dans ces conditions l'énergie

absorbée est globalement nulle et le signal doit donc disparaître. En réalité on peut observer la résonance de manière continue. Le système doit donc disposer de mécanismes par lesquels les populations P_1 et P_2 correspondant à l'équilibre de Boltzmann sont rétablies en permanence. Contrairement à ce qui se produit en spectroscopie optique, la désactivation spontanée par réémission d'un photon est un processus quasi inexistant en résonance magnétique. Pour un proton dans un champ H_0 de 10 kG sa probabilité est de 10^{-25} s^{-1} . L'excès d'énergie doit donc être dissipé par d'autres mécanismes qui constituent les phénomènes de relaxation. Ils feront l'objet d'un chapitre séparé.

II.e. Paramètres classiques d'un spectre de résonance magnétique.
Déplacements chimiques et constantes de couplage.

Nous avons vu précédemment que la position de résonance d'un noyau ou d'un électron soumis à un champ H_0 est essentiellement déterminée par le rapport gyromagnétique γ . En réalité toutes les particules d'un même type ne perçoivent pas exactement le même champ H_0 . Pour un noyau par exemple, les nuages électroniques écrantent partiellement H_0 . Le champ magnétique H_{loc} réellement perçu par le noyau est défini par la relation (II.10) :

$$H_{loc} = H_0 (1 + \sigma) \quad (\text{II.10})$$

σ représente la constante d'écran.

Dans une molécule, tous les noyaux de même type (protons par exemple) ne sont pas soumis aux mêmes champs effectifs et résonneront donc à des fréquences différentes. Ces variations sont essentiellement dues à l'environnement immédiat du noyau, liaison chimique, densités électroniques locales, charges électriques, etc ... La position effective de résonance par rapport à une référence permet de définir le déplacement chimique δ :

$$\delta_i = (\sigma_{ref} - \sigma_i) \cdot 10^6$$

$$\delta_i = \frac{\nu_{ref} - \nu_i}{\nu_{ref}} \cdot 10^6$$

δ est exprimé en parties par million (ppm) de la fréquence nominale.

L'interaction entre deux spins A et B peut provoquer une levée de dégénérescence de niveaux d'énergie. Cette situation est représentée sur la figure II.5.

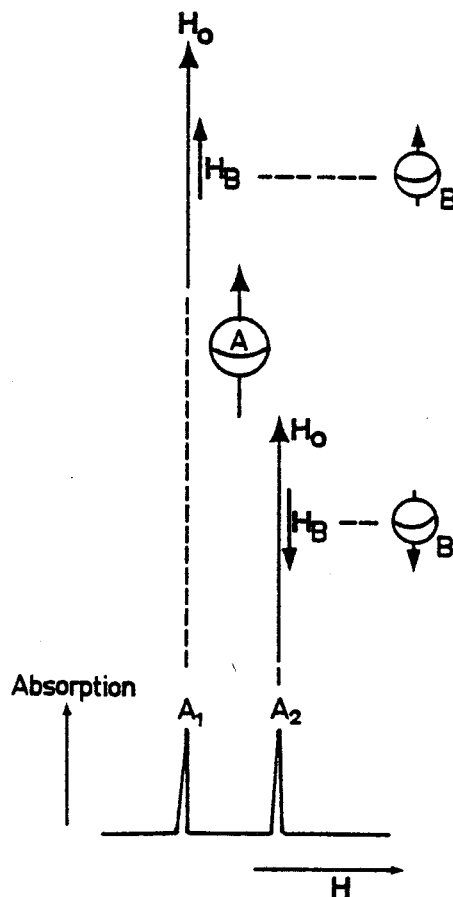


Figure II.5. Principe du couplage entre deux spins.

Le spin A peut percevoir deux champs locaux ($H_0 + H_B$) ou ($H_0 - H_B$) suivant l'orientation de H_B créé par le noyau B. L'observation du noyau A ne conduit pas à une raie unique mais à un doublet dont les deux composantes sont définies par :

$$\nu_{A1} = \frac{g\beta(H_0 + H_B)}{h} \quad \text{et} \quad \nu_{A2} = \frac{g\beta(H_0 - H_B)}{h}$$

La constante de couplage $J_{AB} = \nu_{A1} - \nu_{A2}$ caractérise donc l'interaction entre A et B et sera liée à l'orientation respective des spins A et B ainsi qu'à la distance r_{AB} . Il convient de distinguer ce couplage scalaire transmis à travers les liaisons σ du couplage dipolaire direct à travers l'espace. Ce dernier peut atteindre plusieurs kHz pour des solides. Toutefois, en solution fluide il est moyenné à zéro par les mouvements moléculaires et ne contribue qu'à la relaxation. Le couplage scalaire est toujours beaucoup plus faible (quelques Hz à dizaines de Hz).



Chapitre III

LA RELAXATION MAGNETIQUE.

III.1. NOTION DE "BRUIT MAGNETIQUE".

Dans un échantillon soumis à un champ magnétique externe H_0 , chaque entité possédant un spin non nul précessionne avec une vitesse angulaire directement proportionnelle à son rapport gyro-magnétique et au champ effectif qu'elle perçoit. Dans le dernier paragraphe du chapitre précédent concernant les déplacements chimiques et les couplages nous avons admis que H_{loc} est indépendant du temps. En fait tout noyau (ou électron libre) d'une molécule est entouré d'un grand nombre d'entités ayant leur fréquence de Larmor propre et créant ainsi un champ magnétique aléatoire au niveau de la particule considérée. De plus chaque molécule est en mouvement relativement à ses voisines et provoque un champ fluctuant supplémentaire. Dans ces conditions, le champ effectif perçu par un noyau ou un électron libre est modulé par une composante aléatoire définie comme le "bruit magnétique". En ce qui concerne les définitions de J et δ , on peut admettre que cette perturbation est moyennée à une valeur constante en fonction du temps et contribue à H_{loc} . Par contre ces fluctuations sont extrêmement importantes pour la relaxation. La notion de base consiste à définir tout phénomène aléatoire comme la somme de composantes variant de façon continue. Ainsi le "bruit magnétique" peut contenir une proportion plus ou moins grande de composantes à la fréquence de Larmor du noyau considéré. Celles-ci seront donc capables d'induire des transitions et de rétablir l'équilibre de Boltzmann. L'origine des phénomènes de relaxation se trouve donc dans certains éléments constitutifs du "bruit magnétique".

III.2. DEFINITION DES TEMPS DE RELAXATION.
EQUATIONS PHENOMENOLOGIQUES DE BLOCH.

A titre d'exemple, nous allons raisonner sur une population de spins nucléaires $I = 1/2$ représentée sur la figure III.1.a.

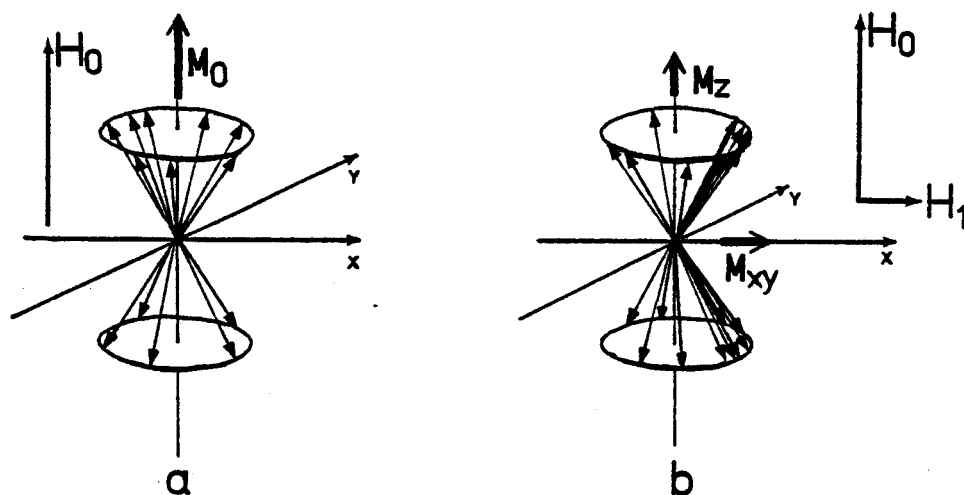


Figure III.1. Population de spins nucléaires $I = 1/2$ soumise à un champ H_0 en l'absence (a) et en présence d'un champ radio-fréquence H_1 (b).

En l'absence de champ H_1 il y a un excès de moments magnétiques orientés vers \vec{H}_0 . Il existe donc une aimantation résultante \vec{M}_0 suivant l'axe de \vec{H}_0 . Par contre il n'y a pas de cohérence de phase entre les spins et les composantes M_x et M_y sont nulles en moyenne. A l'application du champ H_1 (Fig. III.1.b) à la fréquence de Larmor ($H_1 \ll H_0$) il y a précession autour de H_1 . La valeur de M_0 suivant l'axe z décroît et il apparaît des composantes dans le plan xy par suite de la cohérence de phase induite par H_1 . Dès que H_1 est supprimé, le système tend à retourner à l'équilibre de la figure III.1.a grâce aux mécanismes de relaxation. M_z croît jusqu'à sa valeur d'équilibre M_0 et par suite de la perte de cohérence de phase, le déploiement des composantes dans le plan xy conduit à l'annulation de toute aimantation résultante dans ce plan.

Ce retour à l'équilibre n'est pas instantané mais se déroule selon une cinétique du premier ordre caractérisée par les temps de relaxation T_1 et T_2 définis par les équations de Bloch :

$$\begin{aligned}\frac{dM_x}{dt} &= -\frac{M_x}{T_2} \\ \frac{dM_y}{dt} &= -\frac{M_y}{T_2} \\ \frac{dM_z}{dt} &= \frac{M_0 - M_z}{T_1}\end{aligned}\tag{III.1}$$

T_1 et T_2 sont respectivement les temps de relaxation longitudinale (composante parallèle à H_0) et transversale (composantes perpendiculaires à H_0). T_2 intervient dans la définition de la largeur de raie. L'équation décrivant la raie d'absorption magnétique est la suivante :

$$g(\omega) = \frac{2T_2}{1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2}\tag{III.2}$$

$g(\omega)$ représente l'intensité du signal pour une fréquence ω par rapport à la valeur centrale ω_0 . Cette équation est caractéristique d'une raie Lorentzienne. Dans ces conditions la largeur de raie à mi-hauteur $\Delta\nu_{1/2}$ exprimée en Hertz est reliée à T_2 par la relation (III.3) :

$$\frac{1}{T_2} = \pi\Delta\nu_{1/2}\tag{III.3}$$

Les mesures de largeurs de raie permettent donc une détermination directe de T_2 .

III.3. COMPOSANTES DU BRUIT MAGNETIQUE. NOTION DE DENSITE SPECTRALE.

Considérons un ensemble de particules, chacune représentée par un vecteur, et soumises à l'agitation thermique (Fig. III.2).

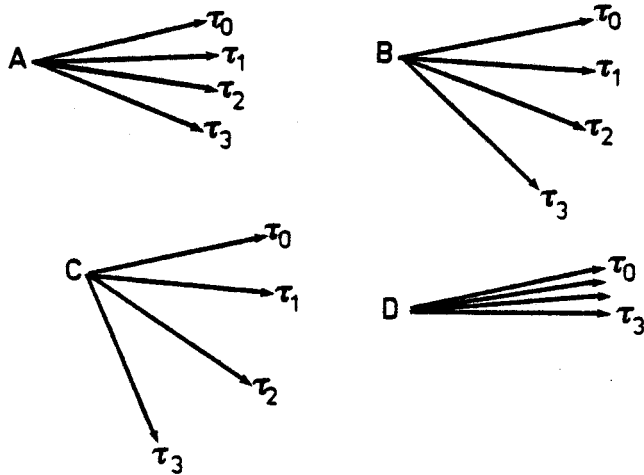


Figure III.2.

Supposons qu'à l'instant τ_0 toutes ces particules soient en phase. Après un court intervalle de temps τ_1 elles ont tourné de $\omega_A \tau_1, \omega_B \tau_1 \dots$ et sont légèrement déphasées. Au cours du temps la cohérence de phase disparaît. Ce processus est caractérisé par le temps de corrélation τ_c . La fonction de corrélation $G(\tau)$ décrit la persistance de phase d'un ensemble de particules c'est-à-dire la dispersion des valeurs de $\omega_A, \omega_B \dots$ Elle est définie par la relation (III.4) :

$$G(\tau) = \langle H_{loc}^2(0) \rangle e^{-\tau/\tau_c}$$

$H_{loc}(0)$ représente l'amplitude du champ magnétique microscopique créé par chaque particule. Le spectre de fréquences de $G(\tau)$ est obtenu par transformée de Fourier et définit ainsi la densité spectrale $J(\omega)$.

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} G(\tau) \cdot e^{i\omega\tau} d\tau \quad (III.5)$$

$J(\omega)$ représente donc la proportion d'une composante à la fréquence ω dans le bruit magnétique. Elle est donc liée à la nature du mouvement des particules considérées. A tout modèle dynamique seront donc associées une fonction de corrélation et une densité spectrale $J(\omega)$. Par exemple dans le cas d'un mouvement de rotation isotrope $J(\omega)$ est définie par :

$$J(\omega) = \langle H_{loc}^2(0) \rangle \cdot \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2\tau_c^2} \quad (\text{III.6})$$

Parmi les multiples composantes du bruit magnétique, seules seront efficaces celles dont la fréquence ω est égale à la fréquence de Larmor du noyau considéré. On pourra donc estimer l'évolution des temps de relaxation T_1 et T_2 en fonction des mouvements moléculaires.

III.4. ORIGINES DU CHAMP LOCAL PERTURBANT.

L'étude de la relaxation d'un noyau ou d'un électron exige la compréhension préliminaire des phénomènes qui sont à l'origine de H_{loc} .

III.4.a. Mécanisme dipolaire.

Le champ local créé par un noyau j sur un noyau i est défini par :

$$H_{loc} = \pm \mu_i \cdot \frac{3\cos\theta_{ij} - 1}{r_{ij}^3} \quad (\text{III.7})$$

θ_{ij} étant l'angle entre les moments magnétiques μ_i et μ_j et r_{ij} la distance internucléaire. Ce mécanisme sera prédominant pour le proton (en interaction dipolaire avec tous les autres protons de l'environnement) et pour le ^{13}C relaxé par les protons qu'il porte.

Une conséquence directe de l'existence de ce mécanisme est l'effet Overhauser nucléaire /27/. Considérons deux noyaux I_1 et I_2 en interaction dipolaire ; la saturation de I_2 par une irradiation continue induit une modification dans les populations des niveaux de I_1 en raison du couplage des polarisations. On observe donc une mo-

dification de l'intensité du signal de I_1 . Soit η le facteur d'accroissement Overhauser, on écrit alors :

$$1 + \eta = \frac{(M_1)_{2s}}{(M_1)_{2ns}} \quad (\text{III.8})$$

$(M_1)_{2s}$ et $(M_1)_{2ns}$ représentent respectivement l'intensité du signal intégré de I_1 en présence et en absence de saturation de I_2 . L'importance de cet accroissement est liée à la distance entre les noyaux concernés et à leurs mobilités relatives. La valeur maximale est définie par la relation (III.9) :

$$(1+\eta)_{\max} = 1 + \frac{1}{2} \frac{\gamma_2}{\gamma_1} \quad (\text{III.9})$$

L'effet Overhauser nucléaire traduit l'efficacité de la relaxation par un mécanisme exclusivement dipolaire. L'interaction dipolaire peut devenir extrêmement importante si l'une des particules est un électron, ceci en raison du moment magnétique considérable qui lui est associé. Les effets de relaxation par un électron seront donc très intenses même à longue distance. Cette caractéristique est largement utilisée pour l'étude conformationnelle de ligands fixés à un métal paramagnétique /28-29/. Une application de la relaxation induite par l'électron au problème des polypeptides sera présentée dans ce travail. Pourtant, dans la plupart des cas, ces phénomènes sont nuisibles et il est indispensable d'éliminer toutes les impuretés paramagnétiques telles que les ions de métaux de transition ou l'oxygène dissout pouvant fausser les mesures de relaxation en milieu diamagnétique.

III.4.b. Relaxation par anisotropie de déplacement chimique.

Si le tenseur d'écran d'un noyau n'est pas isotrope, le champ magnétique secondaire créé par le mouvement des électrons ne sera pas parallèle à H_0 mais possédera une composante perpendiculaire oscillant avec les mouvements moléculaires et pouvant donc contribuer à la relaxation du noyau. Contrairement à tous les autres mécanismes, celui-ci exige la présence de H_0 et son intensité sera proportionnelle à H_0^2 . Il peut contribuer de façon très importante à la relaxation de noyaux tels que ^{31}P et ^{19}F et de façon

non négligeable à celle de ^{13}C . Nous ne considérerons ici que des noyaux ^{13}C protonés pour lesquels la relaxation dipolaire est très largement prédominante /30/ et nous négligerons donc la contribution par déplacement chimique anisotrope.

III.4.c. Rotation de spin et couplage scalaire.

Ces deux mécanismes ne peuvent être importants dans les systèmes que nous étudions /31/. Leur éventuelle existence se traduirait par des anomalies de relaxation (non exponentialité, relaxations différentes pour les diverses raies d'un multiplet) que nous n'avons jamais observées avec les polypeptides.

III.4.d. Relaxation quadrupolaire.

Les noyaux de spin $I \geq 1$ possèdent un moment quadrupolaire électrique Q traduisant l'asymétrie de répartition des charges à la surface du noyau. Q peut interagir avec un gradient de champ électrique tel que celui existant au niveau d'une liaison covalente. Les fluctuations de ce gradient liées aux mouvements moléculaires peuvent donc induire des transitions du noyau quadrupolaire et contribuer ainsi à la relaxation. Ce mécanisme sera dominant pour le deutérium ($I=1$). Son moment quadrupolaire interagit avec le gradient de champ électrique fluctuant créé par la liaison $\text{C} - ^2\text{H}$ par exemple. Ce processus est extrêmement efficace et de plus très local. Pour cette raison le deutérium est un très bon marqueur de mouvement /32/.

III.5. RELATION ENTRE LES TEMPS DE RELAXATION ET LES MOUVEMENTS MOLECULAIRES.

Bien que les notions développées dans ce paragraphe soient absolument générales elles seront illustrées par des exemples concernant deux noyaux identiques de spin $I = 1/2$ en interaction dipolaire mutuelle et subissant un mouvement de rotation isotrope. Nous avons vu précédemment que dans le bruit magnétique seules les composantes à la fréquence ω_I sont efficaces pour la relaxation de I . Leur proportion est donnée par la densité spectrale $J(\omega)$.

La figure III.3 représente les courbes de répartition de $J(\omega)$ pour des mouvements très rapides ($1/\tau_c \gg \omega_0$) intermédiaires ($1/\tau_c \approx \omega_0$) ou lents ($1/\tau_c \ll \omega_0$) par rapport à la fréquence d'observation ω_0 du noyau considéré. τ_c est la constante de temps du mouvement. Ce temps de corrélation peut être défini dans le cas d'une rotation isotrope comme l'intervalle de temps nécessaire à la rotation d'un angle égal à un radian. Les fonctions $J(\omega)$ sont des Lorentziennes.

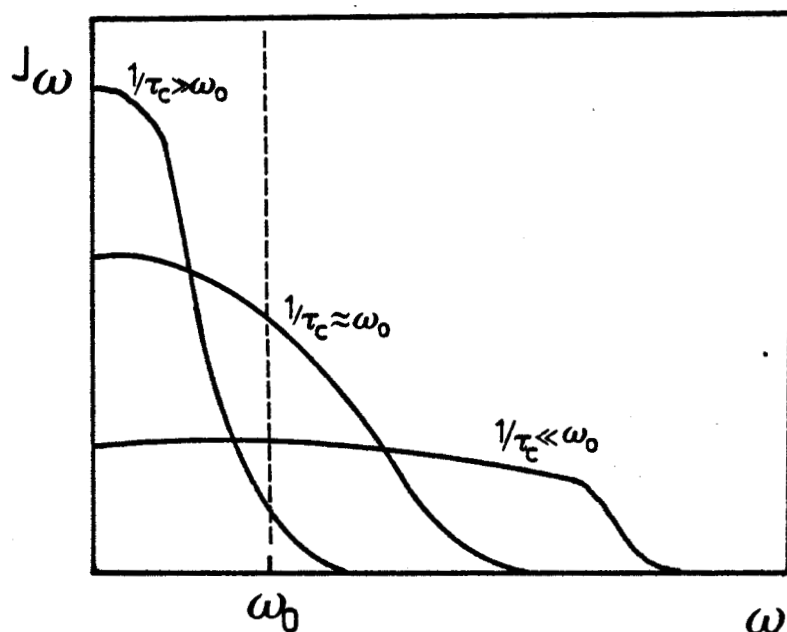


Figure III.3.

On constate que la proportion de composantes à la fréquence ω_0 est plus importante pour des mobilités intermédiaires telles que $1/\tau_c \approx \omega_0$. L'efficacité de la relaxation sera donc maximale pour $\tau_c = 1/\omega_0$. On doit donc observer un minimum dans la courbe représentant le temps de relaxation en fonction de τ_c . Ceci n'est vrai que pour la relaxation longitudinale (T_1). La figure III.4 montre l'évolution de T_1 et T_2 pour deux fréquences ω_1 et ω_2 en fonction du temps de corrélation.

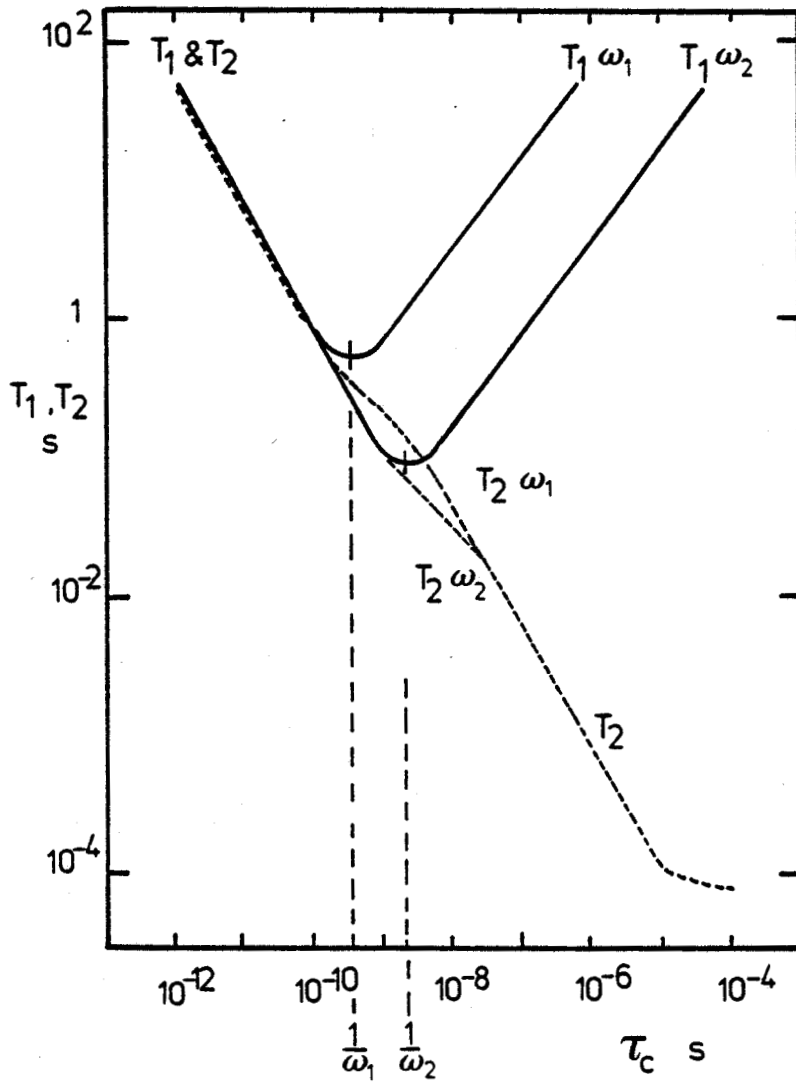


Figure III.4. Evolutions de T_1 et T_2 à deux fréquences ω_1 et ω_2 en fonction de τ_c . Ces courbes ont été calculées pour un proton H_i relaxé de façon exclusivement dipolaire par H_j situé à 2 Å avec

$$\omega_1 = 1,57 \cdot 10^9 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \quad (\nu_1 = 250 \text{ MHz}) \text{ et}$$

$$\omega_2 = 3,77 \cdot 10^8 \text{ rad} \cdot \text{s}^{-1} \quad (\nu_2 = 60 \text{ MHz}).$$

III.5.a. Relaxation longitudinale T_1 ou spin-réseau.

La courbe III.4 montre que l'évolution de T_1 avec le temps de corrélation est conforme aux prévisions avec en particulier un minimum pour $\tau_c = 1/\omega$. Pour les temps de corrélation très courts, c'est-à-dire les mouvements très rapides, les courbes $T_1(\omega_1)$ et $T_1(\omega_2)$ sont confondues. Cette zone est dite "de rétrécissement extrême". La suppression de l'effet de fréquence dans ces conditions sera expliquée par les expressions analytiques reliant T_1 à τ_c et ω . La relaxation T_1 longitudinale ayant pour origine le "bruit magnétique" créé par l'environnement du noyau considéré est souvent dénommée relaxation spin-réseau.

III.5.b. Relaxation transversale T_2 ou spin-spin.

T_2 caractérise la perte de cohérence de phase entre les composantes M_{xy} apparues lors de l'application de H_1 . Il est évident que tous les mécanismes à l'origine de la relaxation longitudinale T_1 contribuent à T_2 . En effet il n'y a pas de raison pour que la désactivation d'un spin par relaxation T_1 conserve la phase de départ. Cette constatation implique que T_2 ne peut être plus long que T_1 . Mais à ces contributions du réseau s'ajoutent d'autres phénomènes pouvant accélérer la perte de cohérence de phase. Ce sont essentiellement l'échange de spins et les effets d'inhomogénéité de H_0 .

i) Echange de spins.

Considérons deux noyaux identiques I. L'échange de spins est schématisé par la figure III.5.

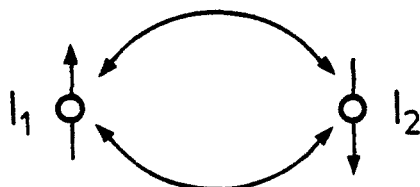


Figure III.5. Echange de spins ou flip-flop.

Le spin I_1 dans l'état $+1/2$ s'échange avec I_2 dans l'état $-1/2$. Ceci n'a aucune influence sur l'aimantation longitudinale M_z et ne participera donc pas à T_1 . Par contre, puisqu'il n'y a pas de cohérence de phase entre I_1 et I_2 , ce phénomène contribue au déphasage dans le plan xy et donc à T_2 . L'effet sera d'autant plus accentué que le milieu sera plus condensé et que les mobilités moléculaires seront faibles. L'échange de spins conduit à des relaxations très efficaces (en T_2) pour les solides alors que dans ces conditions T_1 sera très long en raison de l'absence de mouvements moléculaires importants. Cette contribution de l'échange de spins justifie l'utilisation du terme relaxation spin-spin pour T_2 . En solution fluide, cette terminologie n'est plus adaptée car la majeure partie de la relaxation transversale a pour origine des interactions spin-réseau.

ii) Effets d'inhomogénéité du champ H_0 .

Si le champ externe n'est pas parfaitement homogène, chaque noyau d'un type donné ne percevra pas exactement le même champ local et sa fréquence de Larmor ne sera pas strictement identique à celle d'un autre noyau similaire. La précession des composantes dans le plan xy étant donc légèrement différente pour chaque spin le déphasage sera beaucoup plus rapide (T_2 plus court). La raie d'absorption se trouvera donc artificiellement élargie.

Ces différentes contributions à T_2 expliquent son comportement singulier en fonction de τ_c par rapport à T_1 . La figure III.4 montre que T_2 varie de façon pratiquement continue avec τ_c . Pour $\omega\tau_c \gg 1$ la contribution de l'échange de spins est d'autant plus importante que τ_c est long. Cette vitesse d'échange n'étant pas affectée par la fréquence ω on n'observe pas de différence entre $T_2(\omega_1)$ et $T_2(\omega_2)$. Pour $\omega\tau_c \ll 1$ seules les interactions avec le réseau sont efficaces et les courbes de T_1 et T_2 sont confondues. Enfin dans la zone intermédiaire ($\tau_c \approx 1/\omega$) les effets du réseau et de l'échange de spins sont en compétition et une dépendance en ω apparaît. Dans les conditions de rétrécissement extrême ($\omega\tau_c \ll 1$) T_1 et T_2 ne sont confondus que si les inhomogénéités de H_0 ne viennent pas diminuer artificiellement T_2 et dans l'hypothèse d'une relaxation exclusivement dipolaire ou quadripolaire.

On peut remarquer dès à présent que pour un modèle de mouvement donné (donc une valeur de $J(\omega)$) les mesures de T_1 à plusieurs fréquences ω peuvent fournir des résultats différents. Cette observation nous permettra de choisir de façon univoque entre plusieurs modèles dynamiques a priori possibles. Les mesures à plusieurs fréquences sont indispensables pour la détermination précise de mobilités moléculaires /33-35/.

III.6. OPERATIONS EN TRANSFORMEE DE FOURIER /36/.

En résonance magnétique classique, on balaie le champ (ou la fréquence) très lentement pour induire et détecter les transitions. En RMN par transformée de Fourier on maintient au contraire le champ H_0 fixe et on stimule à la fois tous les spins (d'une espèce donnée) par une impulsion radiofréquence brève et intense contenant toutes les fréquences élémentaires du spectre.

Les aimantations nucléaires sont alors modifiées. On peut simplifier en disant que M_0 est inclinée d'un angle de nutation α (Fig. III.6).

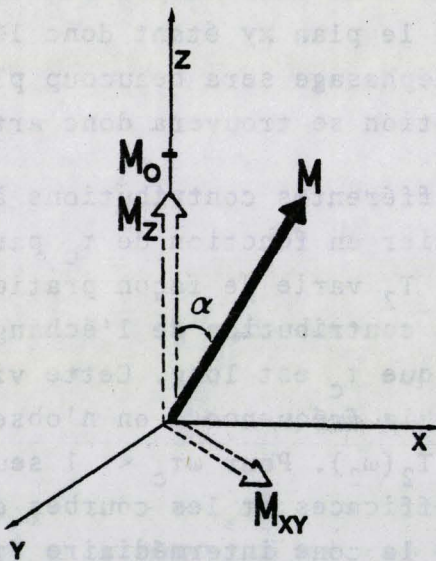


Figure III.6.

La valeur de α est donnée par la relation :

$$\alpha = \gamma H_1 t \quad (\text{III.10})$$

dans laquelle t représente la durée de l'impulsion. Pour une puissance H_1 donnée on peut donc ajuster la valeur de α .

On détecte alors l'évolution de l'aimantation M_{xy} en fonction du temps après l'impulsion. La réponse obtenue est une sinusoïde amortie, le signal de précession libre ou FID (Free Induction Decay) (Fig. III.7).

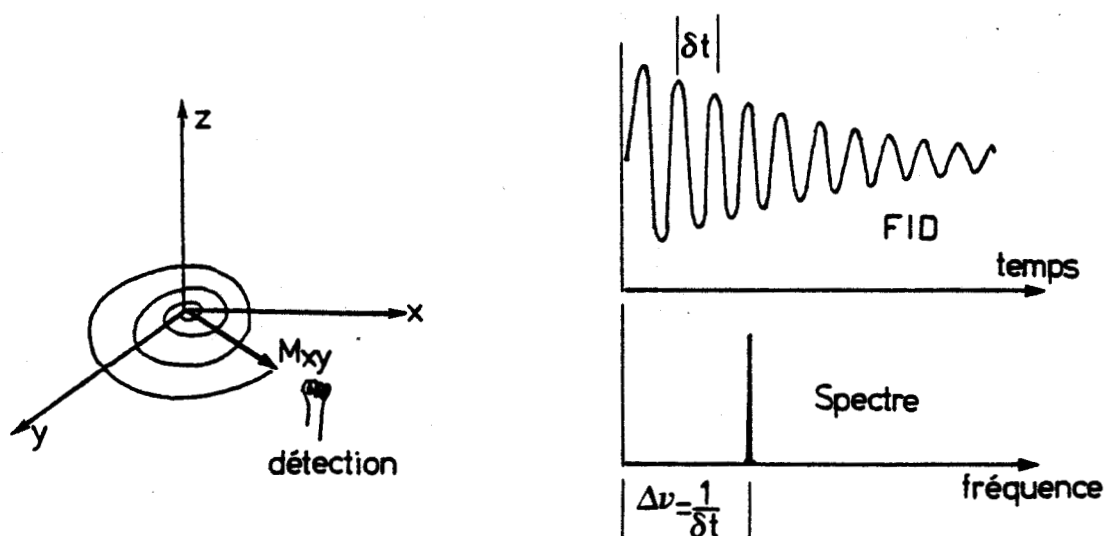


Figure III.7. Précession libre après impulsion, signal détecté (FID) et spectre obtenu après transformation de Fourier.

L'amortissement du FID est relié au T_2 par la relation (III.11) :

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0) e^{-t/T_2} \quad (\text{III.11})$$

décrivant l'évolution de l'enveloppe du FID. La conversion est réalisée par transformation de Fourier à l'aide du calculateur du spectromètre :

$$M(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} M(t) e^{-i\omega t} dt \quad (\text{III.12})$$

Si le spectre d'absorption est constitué d'une série de raies, le FID correspondant sera la somme des sinusoides amorties individuelles. Un cas réel est représenté sur la figure III.8.

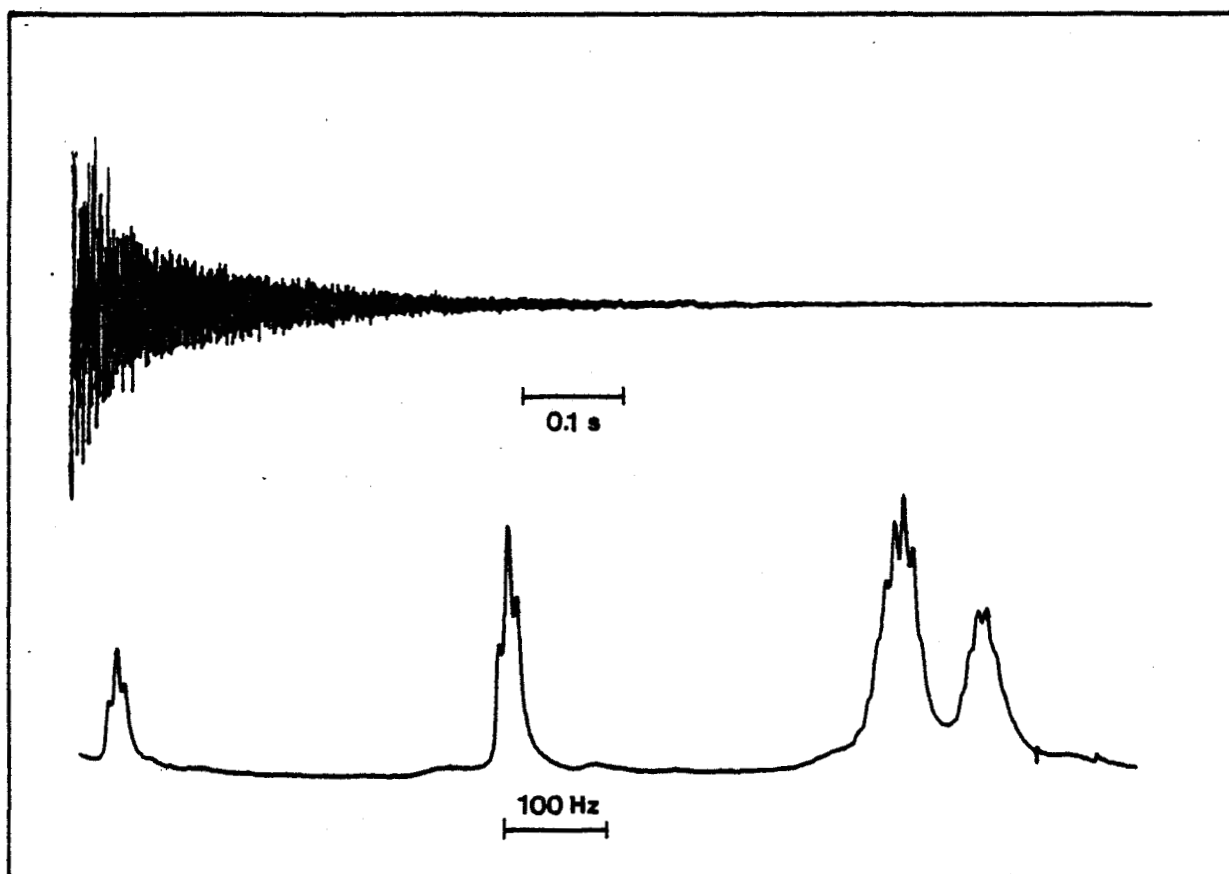


Figure III.8. FID et spectre ^1H de la poly-L-lysine dans D_2O à 250 MHz (0,1 M pD = 3, 300 K).

L'acquisition d'un spectre est beaucoup plus rapide que par les méthodes de balayage en continu. De plus on peut additionner dans le calculateur une série de FID dans le but d'accroître le rapport signal sur bruit. Il est alors possible d'observer des noyaux peu sensibles ou peu abondants.

III.7. TECHNIQUES DE MESURE DES PARAMETRES DE RELAXATION.

III.7.a. Mesure de T_1 .

Nous avons essentiellement utilisé la méthode d'inversion-récupération ($180, \tau, 90, T$) schématisée sur la figure III.9.

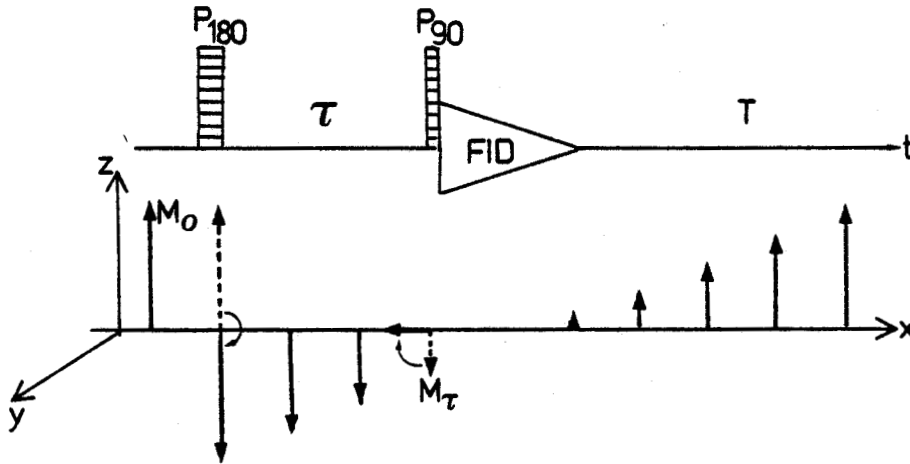


Figure III.9. Principe de la mesure de T_1 par inversion-récupération.

A un instant donné on applique au système à l'équilibre une impulsion radiofréquence correspondant à un angle α de 180° . L'aimantation longitudinale bascule de M_0 à $-M_0$ et tend à revenir à sa valeur d'origine avec une constante de temps T_1 . Après un intervalle de temps τ on applique une impulsion de 90° (P_{90}) destinée à amener $M_z(\tau)$ dans le plan xy où s'effectue l'acquisition du signal. Le délai T permet un retour complet à l'équilibre de Boltzmann ($T \geq 5 \times T_1$). Cette séquence est reproduite le nombre de fois nécessaires à l'obtention d'un rapport signal sur bruit satisfaisant. On obtient finalement une série de spectres correspondant aux différentes valeurs de τ utilisées (Fig. III.10).

Le retour à l'équilibre de M_z est défini par :

$$M_z(t) = M_z(0) \left(1 - 2e^{-\tau/T_1} \right) \quad (\text{III.13})$$

T_1 sera la pente du graphe de $\text{Log} [M_z(0) - M_z(\tau)]$ en fonction de τ (Fig. III.11).

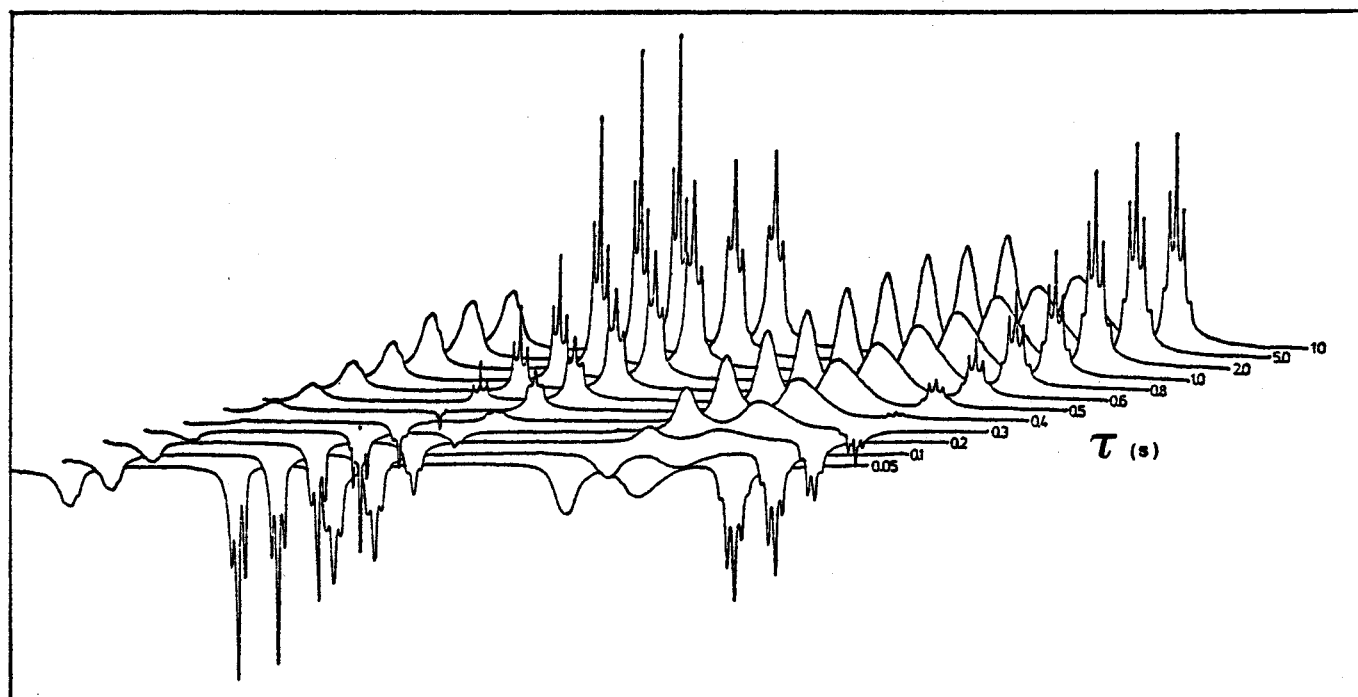


Figure III.10. Diagramme stéréoscopique des spectres obtenus lors d'une expérience d'inversion-récupération sur les protons de la poly-hydroxypropyl-L-glutamine observés à 250 MHz (solution aqueuse dans D_2O , 0,1 M, 303 K).



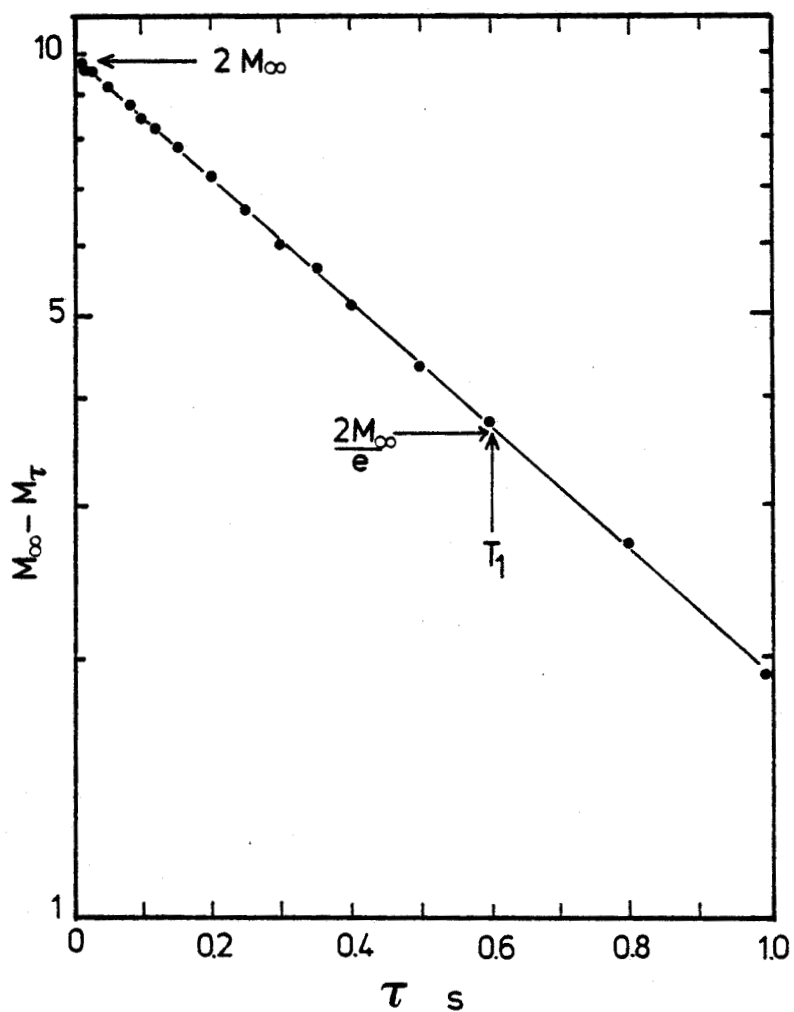


Figure III.11. Exemple de traitement d'une expérience d'inversion-récupération. Signal $^1\text{H}_{[3]}$ de la poly-hydroxypropyl-L-glutamine à 250 MHz, 293 K ($T_1 = 0,66$ sec.).



III.7.b. Mesure de T_2 .

Les éventuelles contributions d'inhomogénéité de H_0 à T_2 font de ce temps de relaxation un paramètre plus difficile à déterminer de façon précise que T_1 . Son utilisation a été limitée au cas du deutérium. Ce noyau dont la relaxation quadrupolaire est très efficace conduit à des raies naturellement larges pour lesquelles les effets d'inhomogénéité de H_0 seront relativement moins sensibles. Dans ces conditions T_2 peut être déterminé avec une précision satisfaisante à partir de la largeur de raie à mi-hauteur (équation (III.3)). Cette approche est bien sûr très imprécise pour les raies très fines ou les multiplets. T_2 est alors obtenu par les méthodes d'écho de spin /37/.

III.7.c. Mesure de l'effet Overhauser nucléaire (NOE).

Le NOE a été mesuré pour le ^{13}C en interaction dipolaire avec ^1H . Nous avons utilisé une technique de découplage pulsé schématisée sur la figure III.12.

On effectue deux spectres respectivement dans les conditions A et B. Le rapport des intensités des signaux fournit directement $1 + \eta$ et évite d'intégrer. La précision des mesures est de $\pm 5\%$. Le nombre d'accumulations a été choisi de telle sorte que le rapport signal sur bruit du spectre sans effet Overhauser (B) soit meilleur que 40/1.

III.8. EVOLUTION DE L'AIMANTATION LONGITUDINALE EN FONCTION DU TEMPS EN RELAXATION DIPOLAIRE.

Considérons deux spins nucléaires quelconques I et S en interaction dipolaire mutuelle. Les polarisations sont couplées et on peut définir complètement l'évolution des aimantations M_z avec le temps après une impulsion de 180° . Ceci constitue les équations de SOLOMON /38/.

$$\frac{dM_I}{dt} = \Sigma \sigma_{IS} (M_{0I} - M_I) + \rho_{IS} (M_{0S} - M_S)$$

$$\frac{dM_S}{dt} = \Sigma \rho_{SI} (M_{0S} - M_S) + \sigma_{SI} (M_{0I} - M_I)$$

(III.14)

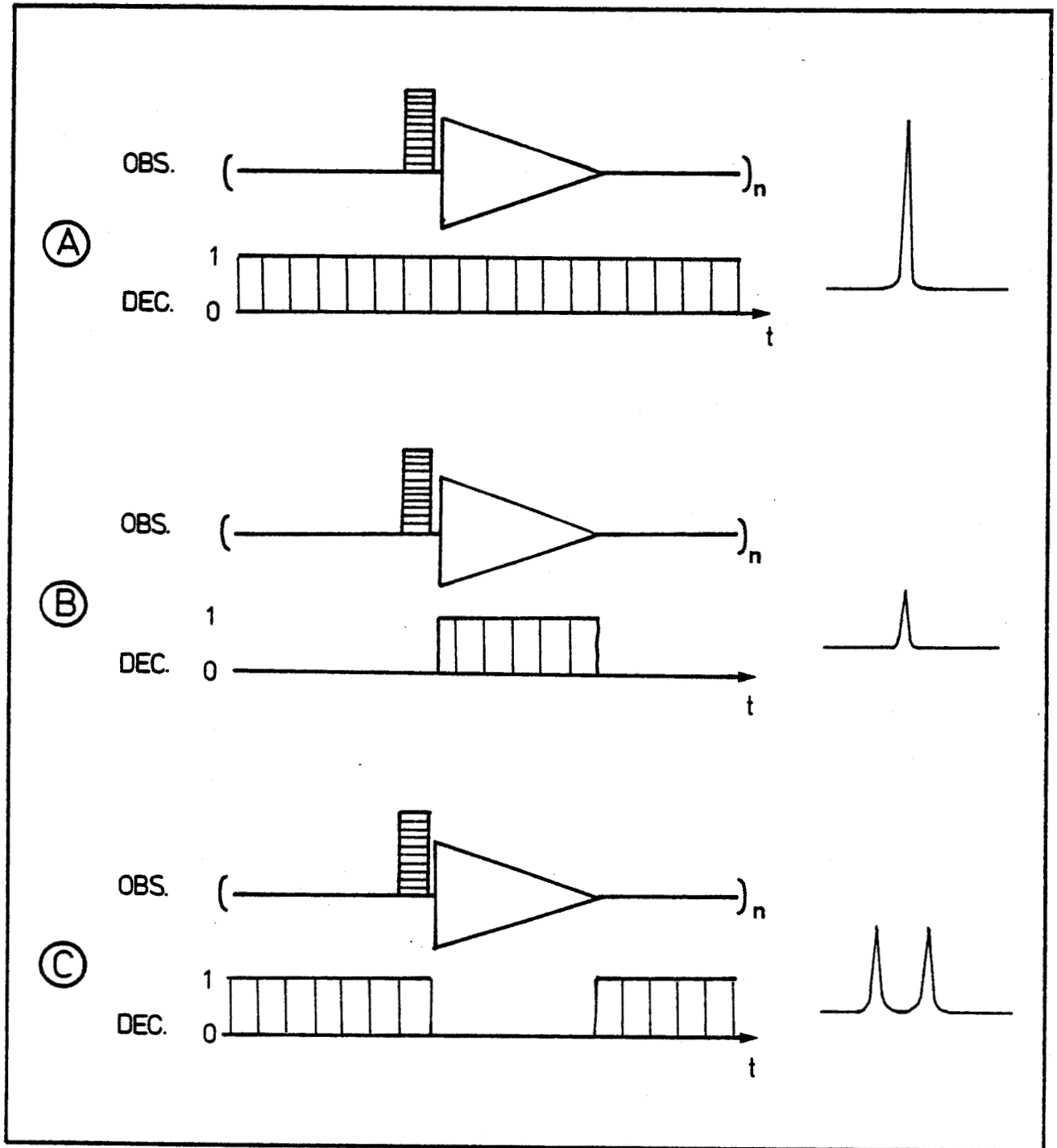


Figure III.12. Techniques de découplage pulsé.
Observation de ^{13}C et découplage de ^1H .

- A Découplage continu \Rightarrow signal découplé avec effet Overhauser.
- B Découplage ^1H uniquement pendant l'acquisition du FID \Rightarrow signal ^{13}C découplé de ^1H sans effet Overhauser.
- C Découplage hors du temps d'acquisition \Rightarrow signal ^{13}C couplé avec effet Overhauser.

Les termes ρ et σ correspondent respectivement aux vitesses de relaxation directe et croisée. M_0 est la valeur de l'aimantation de I ou S à l'équilibre.

III.8.a. Système hétéronucléaire (I≠S).

C'est le cas pour $^{13}\text{C}-^1\text{H}$. Les équations de Solomon appliquées à la relaxation de ^{13}C par un ou plusieurs protons peuvent s'écrire :

$$\begin{aligned} \frac{dM_C}{dt} &= \Sigma \rho_{CH} (M_{0C} - M_C) + \Sigma \sigma_{CH} (M_{0H} - M_H) \\ \frac{dM_H}{dt} &= \Sigma \rho_{HC} (M_{0H} - M_H) + \Sigma \sigma_{HC} (M_{0C} - M_C) \end{aligned} \quad (\text{III.15})$$

La première relation montre que la relaxation de ^{13}C ne peut pas être décrite par une seule exponentielle car deux vitesses de relaxation interviennent. En fait, expérimentalement, on irradie en permanence les protons (système A de la figure III.12) pour profiter de l'accroissement Overhauser et supprimer les couplages $^{13}\text{C}-^1\text{H}$. Les niveaux d'énergie de ^1H sont donc saturés à tout instant et dans ces conditions on a :

$$\frac{dM_H}{dt} = 0 ; \langle M_H \rangle = 0 \quad (\text{III.16})$$

A l'état stationnaire on a :

$$M_C = \frac{\Sigma \sigma_{CH} M_{0H}}{\Sigma \rho_{CH} M_{0C}} + M_{0C} = M_{0C} (1 + \eta)$$

ce qui permet de justifier l'équation (III.8). Le terme croisé σ de l'équation (III.15) disparaît et la relaxation de ^{13}C peut être décrite par une seule exponentielle /39/.

III.8.b. Système homonucléaire (S=I).

C'est le cas de la relaxation dipolaire de ^1H induite par tous les autres protons du système. Les équations de Solomon appliquées à deux spins identiques I_i et I_j deviennent alors :

$$\begin{aligned} \frac{dM_i}{dt} &= \Sigma \rho_{ij} (M_o - M_i) + \Sigma \sigma_{ij} (M_o - M_j) \\ &= \Sigma (\rho_{ij} + \sigma_{ij}) (M_o - M_i) + \Sigma \sigma_{ij} (M_i - M_j) \end{aligned} \quad (\text{III.17})$$

Pour un groupe $-\text{CH}_2$ ou $-\text{CH}_3$ les deux protons H_i et H_j se relaxent mutuellement et sont équivalents. A tout instant on a donc $M_i = M_j$, donc :

$$\begin{aligned} \frac{dM_i}{dt} = \frac{dM_j}{dt} &= \Sigma (\rho_{ij} + \sigma_{ij}) (M_o - M_j) \\ &= \Sigma (\rho_{ij} + \sigma_{ij}) (M_o - M_i) \end{aligned} \quad (\text{III.18})$$

On obtient donc une relaxation monoexponentielle de H_i et H_j . Par contre dans le cas d'un système du type $-\text{CH}-\text{CH}_2-$, le proton H_α est relaxé par H_{β_1} et H_{β_2} . Ces derniers sont proches l'un de l'autre et se relaxent mutuellement. Le T_1 de H_β sera donc beaucoup plus court que celui de H_α . On peut donc dire de façon simplifiée que lors de son retour à l'équilibre H_α voit H_β dans une succession de configurations rejoignant beaucoup plus vite que lui-même leur position d'équilibre. Les équations de Solomon ne peuvent être simplifiées et les diagrammes de relaxation ne seront pas monoexponentiels. L'extraction des vitesses de relaxation σ et ρ ne peut être envisagée que par la simulation complète des courbes de retour à l'équilibre. Dans ce cas, un paramètre très utile est la vitesse de relaxation à $\tau = 0$, c'est-à-dire la pente initiale de la courbe de retour à l'équilibre de l'aimantation. En effet lors de la mesure de T_1 par inversion-récupération, aussitôt après l'impulsion non sélective de 180° on a $M_i = M_j = -M_o$ et les équations de Solomon se réduisent à :

$$\frac{dM_i}{dt} = \Sigma (\rho_{ij} + \sigma_{ij}) (2M_o) \quad (\text{III.19})$$

Cette méthode du T_1 initial /39/ associée à la simulation complète des courbes de retour à l'équilibre a été appliquée à l'étude dynamique de la conformation de nucléotides et oligonucléotides ou de complexes amino-acides nucléotides /40-41/.

Ces remarques montrent que la relaxation de protons isolés (tels que H_α de peptides) doit être analysée avec de grandes précautions. Au contraire les protons de $-CH_2$ ou $-CH_3$ donnent lieu à des relaxations monoexponentielles sous réserves que le mécanisme responsable soit exclusivement l'interaction dipolaire.

III.9. EXPRESSIONS ANALYTIQUES DES TEMPS DE RELAXATION ET DE L'EFFET OVERHAUSER.

Les relations présentées dans ce paragraphe sont démontrées dans l'ouvrage général d'ABRAGAM /42/.

III.9.a. Relaxation dipolaire entre deux spins 1/2 différents I et S avec découplage de S.

T_1 , T_2 et l'effet Overhauser NOE sont donnés par les relations (III.20) à (III.22) :

$$\rho_{IS} = \frac{1}{T_1(I)} = \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) r_{IS}^{-6} \left[\frac{1}{12} J_{(\omega_I - \omega_S)}^{(0)} + \frac{3}{2} J_{(\omega_I)}^{(1)} + \frac{3}{4} J_{(\omega_I + \omega_S)}^{(2)} \right] \quad (III.20)$$

$$\frac{1}{T_2(I)} = \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) r_{IS}^{-6} \left[\frac{1}{6} J_{(0)}^{(0)} + \frac{1}{2\hbar} J_{(\omega_I - \omega_S)}^{(0)} + \frac{3}{4} J_{(\omega_I)}^{(1)} + \frac{3}{2} J_{(\omega_S)}^{(1)} + \frac{3}{8} J_{(\omega_I + \omega_S)}^{(2)} \right] \quad (III.21)$$

$$NOE(I) = 1 + \eta = 1 - \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \cdot \frac{J_{(\omega_I - \omega_S)}^{(0)} - 9J_{(\omega_I + \omega_S)}^{(2)}}{J_{(\omega_I - \omega_S)}^{(0)} + 18J_{(\omega_I)}^{(1)} + 9J_{(\omega_I + \omega_S)}^{(2)}} \quad (III.22)$$

Afin de rendre plus compréhensibles ces relations, considérons un mouvement de rotation isotrope. La fonction de corrélation $G(\tau)$ est alors une exponentielle et la densité spectrale devient /50/ :

$$J_{(\omega)}^{(q)} = A^{(q)} \cdot \frac{\tau_C}{1 + \omega^2 \tau_C^2} \quad (\text{III.23})$$

avec :

$$A^{(0)} = \frac{8}{5} ; A^{(1)} = \frac{4}{15} ; A^{(2)} = \frac{16}{15}$$

Nous allons de plus considérer le cas typique du ^{13}C (noyau I) relaxé par les N protons (noyau S) qui lui sont liés. Les expressions de $T_1(^{13}\text{C})$, $T_2(^{13}\text{C})$ et $\text{NOE}(^{13}\text{C})$ sont alors :

$$T_1^{-1}(\text{C}) = \frac{N}{10} \gamma_H^2 \gamma_C^2 \hbar^2 r_{\text{CH}}^{-6} \left[\frac{\tau_C}{1 + (\omega_H - \omega_C)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_C^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_H + \omega_C)^2 \tau_C^2} \right] \quad (\text{III.24})$$

$$T_2^{-1}(\text{C}) = \frac{N}{20} \gamma_H^2 \gamma_C^2 \hbar^2 r_{\text{CH}}^{-6} \left[4\tau_C + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_C^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + \omega_H^2 \tau_C^2} + \frac{\tau_C}{1 + (\omega_H - \omega_C)^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_C + \omega_H)^2 \tau_C^2} \right] \quad (\text{III.25})$$

$$\text{NOE}(^{13}\text{C}) = 1 - \frac{\gamma_H}{\gamma_C} \cdot \frac{\frac{\tau_C}{1 + (\omega_H - \omega_C)^2 \tau_C^2} - \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_C + \omega_H)^2 \tau_C^2}}{\frac{\tau_C}{1 + (\omega_H - \omega_C)^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_C}{1 + \omega_C^2 \tau_C^2} + \frac{6\tau_C}{1 + (\omega_H + \omega_C)^2 \tau_C^2}} \quad (\text{III.26})$$

Si $\omega \tau_C \ll 1$ (mouvements très rapides par rapport à ω) on obtient les expressions simplifiées :

$$T_1^{-1}(C) = T_2^{-1}(C) = N\gamma_H^2\gamma_C^2\hbar^2 r_{CH}^{-6} \tau_C \quad (III.27)$$

$$NOE_{(^{13}C)} = 1 + \eta = 1 + \frac{1}{2} \frac{\gamma_H}{\gamma_C} = 2,98$$

Cette zone dite "de rétrécissement extrême" pour laquelle $T_1 = T_2$ et l'accroissement Overhauser est maximal correspond à la partie gauche de la courbe $T_1, T_2 = f(\tau_C)$ représentée sur la figure III.4. T_1 et T_2 sont de plus indépendants de la fréquence ω car cette dernière n'intervient pas dans l'équation (III.27).

III.9.b. Relaxation dipolaire entre spins identiques, c'est-à-dire résonnant au même champ H_0 .

Les expressions des paramètres de relaxation pour des noyaux de même nature I_i et I_j en interaction dipolaire sont les suivantes :

$$\frac{1}{T_1(I_i)} = \frac{3}{2} \gamma_I^4 \hbar^2 I(I+1) \sum_j r_{ij}^{-6} \cdot \left[J(\omega) + J(2\omega) \right] \quad (III.28)$$

$$\frac{1}{T_2(I_i)} = \gamma_i^4 \hbar^2 I(I+1) \sum_j r_{ij}^{-6} \cdot \left[\frac{3}{8} J(0) + \frac{15}{4} J(\omega) + \frac{3}{8} J(2\omega) \right] \quad (III.29)$$

Dans le cas de deux protons H_i et H_j en interaction dipolaire mutuelle et se réorientant de façon isotrope ces expressions sont modifiées comme suit :

$$\frac{1}{T_1(H_i)} = \frac{3}{10} \gamma_H^4 \hbar^2 r_{ij}^{-6} \left[\frac{\tau_C}{1+\tau_C^2} + \frac{4\tau_C}{1+4\omega^2\tau_C^2} \right] \quad (III.30)$$

$$\frac{1}{T_2(H_i)} = \frac{3}{20} \gamma_H^4 \hbar^2 r_{ij}^{-6} \left[3\tau_C + \frac{5\tau_C}{1+\omega^2\tau_C^2} + \frac{2\tau_C}{1+4\omega^2\tau_C^2} \right] \quad (III.31)$$

et dans les conditions de rétrécissement extrême :

$$T_1^{-1}(H_i) = T_2^{-1}(H_i) = \frac{3}{2} \hbar^2 \gamma_H^4 r_{ij}^{-6} \tau_C$$

Contrairement à l'équation (III.31), l'équation (III.30) reste valable pour deux spins i et j de même nature mais inéquivalents.

III.9.c. Relaxation quadrupolaire.

C'est le cas du deutérium par exemple. Dans les expressions suivantes η représente le paramètre d'asymétrie du noyau considéré. Ce terme est négligeable pour le noyau de deutérium ($\eta \approx 0,03$). e^2Qq/\hbar , constante de couplage quadrupolaire, caractérise l'énergie d'interaction entre le moment quadrupolaire du noyau eq et le gradient de champ électrique perturbant eQ . La valeur de e^2Qq est pratiquement constante pour une liaison C-D /43/. Nous avons toujours utilisé $e^2Qq/\hbar = 1.11.10^6 \text{ rad.s}^{-1}$ /44/.

Les expressions générales de T_1 et T_2 sont les suivantes /42/ :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{40} \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \left(\frac{e^2qQ}{\hbar}\right)^2 \left[J_{(\omega)}^{(1)} + 4J_{(2\omega)}^{(2)} \right] \quad (\text{III.33})$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{80} \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right) \left(\frac{e^2qQ}{\hbar}\right)^2 \left[3J_{(0)}^{(0)} + 5J_{(\omega)}^{(1)} + 2J_{(2\omega)}^{(2)} \right] \quad (\text{III.34})$$

Dans l'hypothèse d'un mouvement de rotation isotrope (équation (III.23)) on obtient pour le deutérium ($\eta = 0$)

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{40} \left(\frac{e^2qQ}{\hbar}\right)^2 \left[\frac{\tau_C}{1 + \omega^2 \tau_C^2} + \frac{4\tau_C}{1 + 4\omega^2 \tau_C^2} \right] \quad (\text{III.35})$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{3}{80} \left(\frac{e^2qQ}{\hbar}\right)^2 \left[3\tau_C + \frac{5\tau_C}{1 + \omega^2 \tau_C^2} + \frac{2\tau_C}{1 + 4\omega^2 \tau_C^2} \right] \quad (\text{III.36})$$

et dans les conditions de rétrécissement extrême :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{1}{T_2} = \frac{3}{8} \left(\frac{e^2qQ}{\hbar}\right)^2 \tau_C \quad (\text{III.37})$$



Chapitre IV

DYNAMIQUE MACROMOLECULAIRE ET MODELES DE MOUVEMENTS.

Il nous faut déterminer les caractéristiques dynamiques d'un système macromoléculaire que l'on peut schématiser par la figure IV.1.

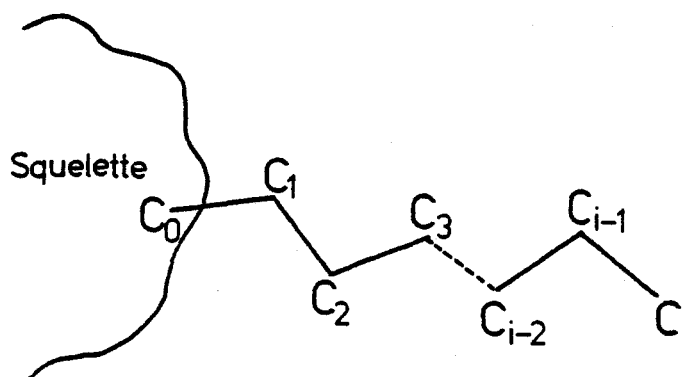


Figure IV.1. Modèle de macromolécule.

La mobilité effective observée en un point C_i résulte de la combinaison des mouvements locaux considérés comme indépendants du squelette et des segments C_0-C_1 , C_1-C_2 , ..., $C_{i-1}-C_i$. L'analyse dynamique complète suppose donc la détermination de tous les mouvements locaux et globaux de la macromolécule.

IV.1. MODELES DE MOUVEMENT POUR LE SQUELETTE.

Le cas le plus simple consiste en une réorientation isotrope diffusionnelle /45/. On peut alors définir un temps de corrélation unique τ_R relié à la constante de diffusion rotationnelle D_R par :

$$\tau_R = (6D_R)^{-1} \quad (\text{IV.1})$$

La densité spectrale est alors définie simplement par l'équation suivante (voir équation (III.23)) :

$$J_{(\omega)}^{(q)} = A(q) \cdot \frac{\tau_R}{1 + \omega^2 \tau_R^2} \quad (\text{IV.2})$$

Dans le cas des polymères sous forme désordonnée il est souvent nécessaire de faire intervenir une distribution de τ_R /46-47/ liée à l'existence de mouvements internes. Ce point particulier sera développé dans le chapitre VII.

Si le squelette macromoléculaire rigide ne peut être assimilé à une sphère on utilise alors le modèle de diffusion anisotrope de WOESSNER /48/. C'est le cas par exemple pour les polypeptides sous forme hélicoïdale. Le système est assimilé à un ellipsoïde symétrique de révolution. Le mouvement est alors décrit par deux temps de corrélation τ_A et τ_B (ou τ_2 et τ_1) dépendant des constantes de diffusion D_A et D_B .

La densité spectrale est définie par la relation (IV.3)

$$J_{(\omega)}^{(q)} = A(q) \left[\frac{A\tau_1}{1 + \omega^2 \tau_1^2} + \frac{B\tau_2}{1 + \omega^2 \tau_2^2} + \frac{C\tau_3}{1 + \omega^2 \tau_3^2} \right] \quad (\text{IV.3})$$

$$\text{avec } \tau_1^{-1} = 6D_B \quad A = (3\cos^2\theta - 1)^2/4$$

$$\tau_2^{-1} = D_A + 5D_B \quad B = 3\sin^2\theta\cos^2\theta$$

$$\tau_3^{-1} = 4D_A + 2D_B \quad C = 3\sin^4\theta/4$$

θ est l'angle entre le vecteur internucléaire considéré et l'axe principal de l'ellipsoïde.

IV.2. MOUVEMENTS ELEMENTAIRES DE LA CHAINE LATERALE.

Nous allons considérer le premier segment C_0-C_1 de la chaîne latérale. La mobilité effective observée sur C_1 sera donc la combinaison des mouvements du squelette et de la liaison C_0-C_1 .

IV.2.a. Réorientation de C_0-C_1 par diffusion rotationnelle.

Ce mouvement peut être schématisé par une succession de sauts élémentaires aléatoires de très faible amplitude. On peut donc le décrire par un seul temps de corrélation τ_G . Ce système a été étudié par WOESSNER et généralisé par DODDRELL *et al.* /49-50/. L'expression de $J_{(\omega)}^{(q)}$ est similaire à celle du mouvement anisotrope (relation (IV.3)) avec /51/ :

$$\begin{aligned} \tau_1 &= \tau_R & A &= (3\cos^2\Delta - 1)^2/4 \\ \tau_2^{-1} &= \tau_R^{-1} + (6\tau_G)^{-1} & B &= 3\sin^2\Delta\cos^2\Delta & (IV.4) \\ \tau_3^{-1} &= \tau_R^{-1} + 2(3\tau_G)^{-1} & C &= 3\sin^4\Delta/4 \end{aligned}$$

Δ représente ici l'angle entre l'axe de rotation C_0-C_1 et la paire de spins considérée (C_1-H_1 en ^{13}C , H_1-H_1' en proton. Plusieurs modifications de ce modèle ont été envisagées pour rendre compte des résultats expérimentaux en particulier la diffusion réduite à un domaine angulaire restreint (autour de C_0-C_1) /52-53/ et l'oscillation d'amplitude limitée /54/. Ce dernier cas a été appliqué avec succès au mouvement de cycles aromatiques. Mais le plus souvent ces modèles diffusionnels ne permettent pas de rendre compte de l'ensemble des données de relaxation /55/. Il faut donc envisager des systèmes plus élaborés.

IV.2.b. Réorientation par sauts entre sites.

WOESSNER a le premier proposé un modèle de réorientation autour d'une liaison C-C par sauts entre trois sites équivalents couplé à un mouvement isotrope /56/ ou anisotrope /57/ du squelette. La courbe de potentiels correspondante comporte donc trois puits équivalents. En fait il est rare de rencontrer ce cas de figure.

Afin de généraliser ce type de modèle, TSUTSUMI a mis au point au laboratoire une extension à trois sites dont deux seulement sont équivalents permettant de simuler de multiples cas de figure et de rendre compte de l'inéquivalence des puits de potentiel /58/.

La figure IV.2 représente ce type de modèle pour la réorientation par sauts autour de C_0-C_1 . Contrairement au modèle de diffusion rotationnelle, C_1C_2 ne peut occuper que trois positions stables définissant les sites ① ② ③. Il en est de même bien sûr pour C_1H_1 et C_1H_1' .

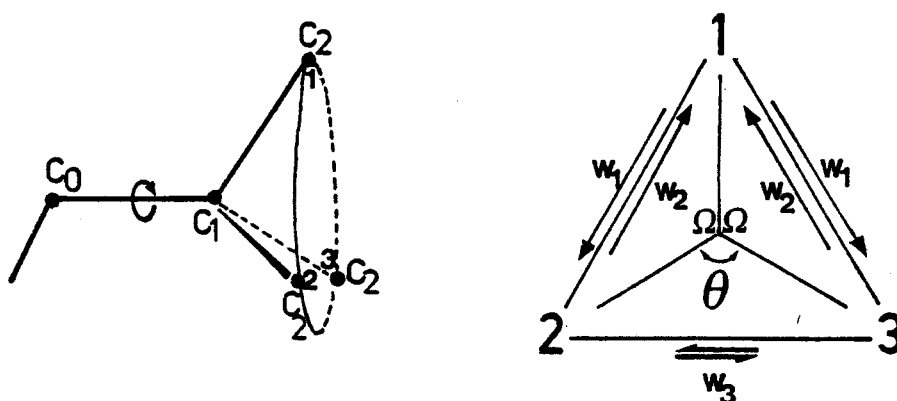


Figure IV.2. Principe de la réorientation de la liaison C_0-C_1 par sauts entre trois sites.

Les sites 2 et 3 sont équivalents. w_1 représente la vitesse de passage d'un site à l'autre. Enfin l'angle θ est ajustable ($\theta = 120^\circ$ dans le modèle original de Woessner). Ce schéma permet de simuler de multiples cas de figures, en particulier le saut entre deux sites seulement (avec $w_1 \gg w_2$ et $\theta =$ quelconque ou $\theta = 0$ et w_1/w_2 variable). Nous allons en exposer l'aspect théorique afin de définir les paramètres qui seront utilisés ultérieurement pour simuler les données expérimentales. La courbe de potentiels caractéristique de ce type de modèle est représentée sur la figure IV.3. Dans cette figure le rapport E_a/E_b est choisi de façon arbitraire. ϕ représente la moitié de l'angle θ entre les sites 2 et 3. Les probabilités P_1, P_2, P_3 d'occupation des sites 1, 2 et 3 sont proportionnelles aux facteurs de Boltzmann et donc définies par les relations (IV.5) :

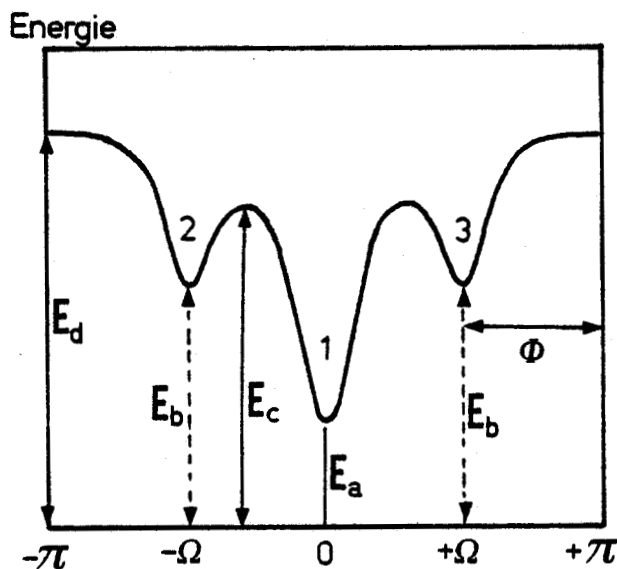


Figure IV.3. Courbe de potentiels caractéristique du mouvement de réorientation par sauts entre trois sites dont deux sont équivalents.

$$\begin{aligned}
 P_1 &= N \\
 P_2 &= P_3 = N \exp[-\xi(E_b - E_a)] \\
 \text{avec} \quad N &= \left\{ 1 + 2 \exp[-\xi(E_b - E_a)] \right\}^{-1} \\
 \text{et} \quad \xi &= (kT)^{-1}
 \end{aligned}
 \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} P_1 \\ P_2 \\ N \\ \xi \end{aligned}} \right\} \quad \text{(IV.5)}$$

Les vitesses de sauts sont alors :

$$\begin{aligned}
 W_1 &= \exp[-\xi(E_c - E_a)] \\
 W_2 &= \exp[-\xi(E_c - E_b)] \\
 W_3 &= \exp[-\xi(E_d - E_c)]
 \end{aligned}
 \quad \left. \vphantom{\begin{aligned} W_1 \\ W_2 \\ W_3 \end{aligned}} \right\} \quad \text{(IV.6)}$$

Avec $v = W_1/W_2$ les probabilités P_1 , P_2 et P_3 peuvent être exprimées plus simplement par les équations (IV.7) :

$$v = \frac{W_1}{W_2} = \exp [-\xi(E_b - E_a)]$$

$$\rightarrow P_1 = \frac{W_2}{2W_1 + W_2} = \frac{1}{2v+1} \quad (\text{IV.7})$$

$$\rightarrow P_2 = P_3 = \frac{W_1}{2W_1 + W_2} = \frac{v}{2v+1}$$

Les paramètres à déterminer pour établir les relations fournissant $J_{(\omega)}$ sont les probabilités conditionnelles de sauts. Elles peuvent être obtenues par résolution des équations différentielles décrivant les populations fractionnaires des sites en fonction du temps (équations (IV.8)) :

$$\frac{dP_1(t)}{dt} = -2W_2 P_1(t) + W_2 \left\{ P_2(t) + P_3(t) \right\}$$

$$\frac{dP_2(t)}{dt} = W_1 P_1(t) - (W_2 + W_3) P_2(t) + W_3 P_3(t) \quad (\text{IV.8})$$

$$\frac{dP_3(t)}{dt} = W_1 P_1(t) + W_3 P_2(t) - (W_2 + W_3) P_3(t)$$

Les solutions sont données ci-dessous :

$$P_1(t) = l_1 + \lambda_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_t}\right)$$

$$P_3(t) = P_2(t) = l_2 - \frac{\lambda_1}{2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_t}\right) + \lambda_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) \quad (\text{IV.9})$$

l_1 , l_2 et l_3 sont les populations initiales des sites.

$$\tau_t^{-1} = 2W_1 + W_2 \quad \text{et} \quad \tau_s^{-1} = 2W_3 + W_2$$

λ_1 et λ_2 sont des termes constants dépendant des conditions initiales :
initiales :

$$P_1(0) = 1 - \lambda_1 = 2l_2 \quad \text{et} \quad \lambda_2 = 0$$

$$P_2(0) = 1 - \lambda_1 = -l_1 \quad \text{et} \quad \lambda_2 = 1/2$$

$$P_3(0) = 1 - \lambda_1 = -l_1 \quad \text{et} \quad \lambda_2 = -1/2$$

Le développement mathématique permettant de relier ces probabilités conditionnelles aux densités spectrales $J_{(\omega)}^q$ est décrit en détails dans l'article théorique de TSUTSUMI /58/. Le résultat final apparaît dans l'équation (IV.10) :

$$J_{(\omega)}^q = 2K_q \left\{ S_R f(\tau_R) + S_1 f(\tau_1) + S_2 f(\tau_2) \right\} \quad (\text{IV.10})$$

avec :

$$K_0 = \frac{4}{5} ; K_1 = \frac{2}{15} ; K_2 = \frac{8}{15}$$

$$f(\tau) = \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2}$$

$$S_R = A + B \left(\frac{2v \cos \phi - 1}{2v + 1} \right)^2 + C \left(\frac{1 - \cos 2\phi}{2v + 1} \right)^2$$

$$S_1 = 2v \left[B \left(\frac{1 + \cos \phi}{2v + 1} \right)^2 + C \left(\frac{1 - \cos 2\phi}{2v + 1} \right)^2 \right]$$

$$S_2 = \frac{2v}{2v + 1} \cdot (B \sin^2 \phi + C \sin^2 2\phi)$$

$$A = \frac{1}{4} (1 - 3 \cos^2 \Delta)^2$$

$$B = \frac{3}{4} \sin^2 2\Delta$$

$$C = \frac{3}{4} \sin^2 2\Delta$$

$$\tau_1 = (\tau_R^{-1} + \tau_t^{-1})^{-1}$$

$$\tau_2 = (\tau_R^{-1} + \tau_s^{-1})^{-1}$$

τ_R est le temps de corrélation du squelette, τ_t et τ_s ont été définis dans l'équation (IV.9), ϕ est le demi-angle entre les sites 2 et 3 et enfin Δ représente l'angle entre l'axe de rotation et la paire de spins en interaction considérée.

On dispose donc de l'équation de $J_{(\omega)}$. Il est alors possible d'obtenir les expressions analytiques des temps de relaxation. Elles sont présentées ci-après (équations (IV.11) à (IV.15)).

- Pour deux spins $I_i = I_j = 1/2$ identiques (^1H par exemple)

$$T_{1(I_i)}^{-1} = \frac{3}{10} \gamma_I^4 \hbar^2 \sum_j r_{ij}^{-6} \left\{ S_R A(\tau_R) + S_1 A(\tau_1) + S_2 A(\tau_2) \right\} \quad (\text{IV.11})$$

$$T_{2(I_i)}^{-1} = \frac{3}{20} \gamma_I^4 \hbar^2 \sum_j r_{ij}^{-6} \left\{ S_R B(\tau_R) + S_1 B(\tau_1) + S_2 B(\tau_2) \right\} \quad (\text{IV.12})$$

avec :

$$A(\tau) = \frac{\tau}{1+\omega^2\tau^2} + \frac{4\tau}{1+4\omega^2\tau^2}$$

$$B(\tau) = 3\tau + \frac{5\tau}{1+\omega^2\tau^2} + \frac{2\tau}{1+4\omega^2\tau^2}$$

- Pour un spin $I = 1/2$ relaxé par un autre spin $S = 1/2$ différent (cas hétéronucléaire de ^{13}C relaxé par ^1H)

$$T_{1(I)}^{-1} = \frac{1}{10} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 r_{IS}^{-6} \left\{ S_R C(\tau_R) + S_1 C(\tau_1) + S_2 C(\tau_2) \right\} \quad (\text{IV.13})$$

$$T_{2(I)}^{-1} = \frac{1}{20} \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 r_{IS}^{-6} \left\{ S_R D(\tau_R) + S_1 D(\tau_1) + S_2 D(\tau_2) \right\} \quad (\text{IV.15})$$

$$\text{NOE}_{(I)} = 1 + \eta = 1 - \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \cdot \frac{S_R E(\tau_R) + S_1 E(\tau_1) + S_2 E(\tau_2)}{S_R C(\tau_R) + S_1 C(\tau_1) + S_2 C(\tau_2)} \quad (\text{IV.15})$$

avec :

$$C(\tau) = \frac{\tau}{1+(\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1+\omega_I^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1+(\omega_I + \omega_S)^2 \tau^2}$$

$$D(\tau) = 4\tau + \frac{\tau}{1+(\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} + \frac{3\tau}{1+\omega_I^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1+\omega_S^2 \tau^2} + \frac{6\tau}{1+(\omega_I + \omega_S)^2 \tau^2}$$

$$E(\tau) = \frac{\tau}{1+(\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2} - \frac{6\tau}{1+(\omega_I - \omega_S)^2 \tau^2}$$

IV.3. SYSTEMES A LIAISONS MULTIPLES.

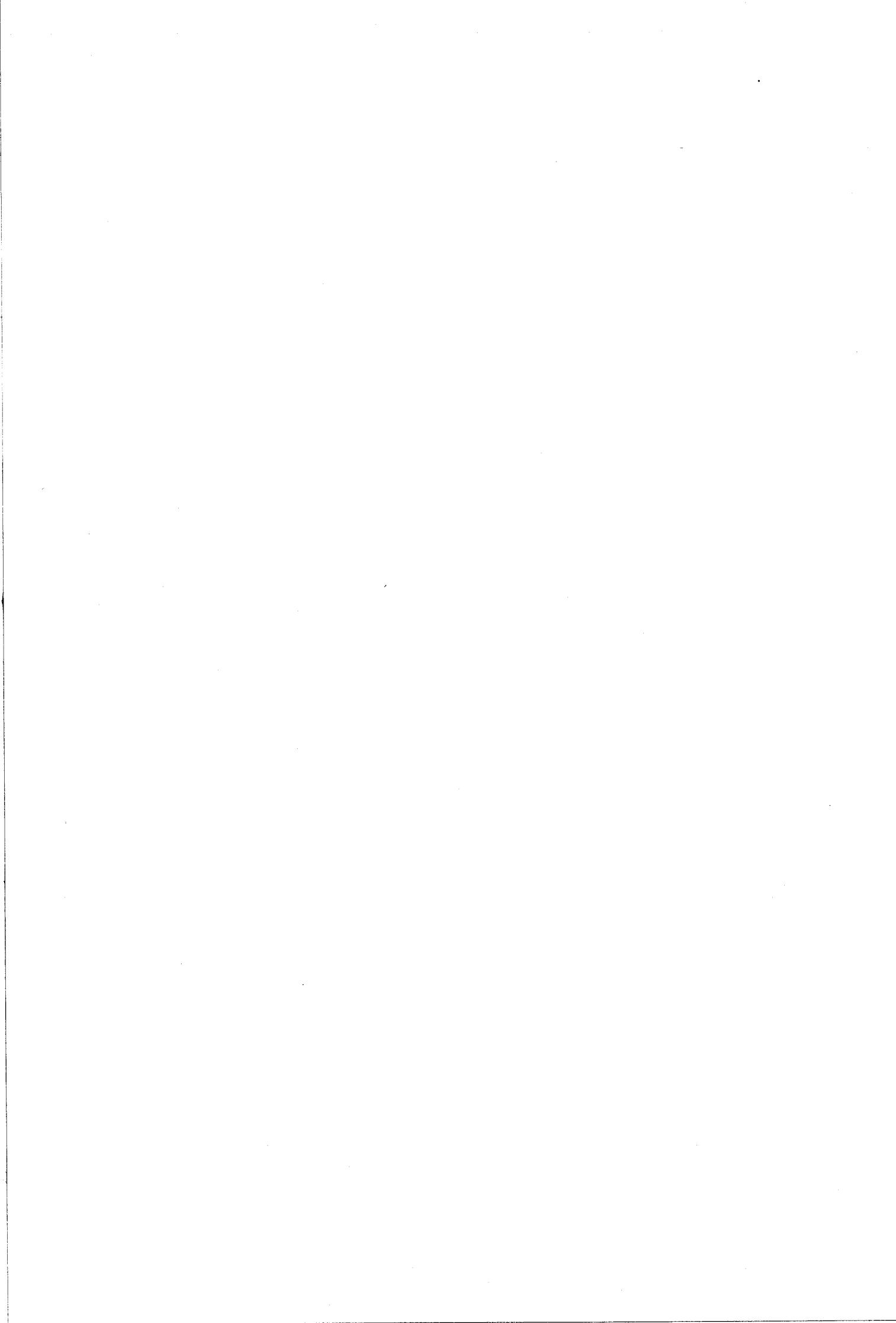
Lorsque la chaîne latérale comporte n liaisons, il faut disposer des relations permettant la combinaison de tous les mouvements locaux. On peut alors déterminer la mobilité effective en tout point.

Plusieurs cas typiques ont été traités :

- Diffusion rotationnelle le long d'une chaîne latérale à n liaison couplée avec à un mouvement isotrope /59-61/ ou anisotrope /62/ du squelette macromoléculaire.

- Réorientation d'une chaîne par sauts (isomérisation gauche-trans) couplée à un mouvement global isotrope /63/. Ce problème a été traité par CHACHATY *et al.* /64/ par la méthode de Monte-Carlo.

- Le cas général pour lequel chacune des n liaisons de la chaîne latérale peut se réorienter par sauts entre sites ou par diffusion rotationnelle a été traité dans ce laboratoire pour un mouvement isotrope /65/ ou anisotrope /66/ de la chaîne principale. Les relations complètes et générales sont donc regroupées dans ces deux dernières références.



Chapitre V

ETUDE DES CONFORMATIONS LOCALES ET DES TRANSITIONS STRUCTURALES DES POLYPEPTIDES PAR LES METHODES CLASSIQUES DE LA RMN.

Ce chapitre ne concerne donc que l'analyse des paramètres classiques de déplacements chimiques et de constantes de couplage (δ et J).

V.1. ETUDES PAR RMN DU PROTON.

V.1.a. Méthodes générales.

Les spectres RMN ^1H des homopolypeptides sont en général obtenus à 250 MHz. Si le polymère est sous forme désordonnée, les couplages ^1H - ^1H sont visibles à des températures en général supérieures à 50°C. Les déplacements chimiques sont donnés par rapport à une référence interne de TSP (3-triméthyl silyl-2-2-3-3 tétra

deutéropropionate de sodium) $\text{CH}_3\text{-}\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{Si}}}\text{-CD}_2\text{-CD}_2\text{-COONa}$.

Les constantes de couplage sont déterminées en simulant complètement le spectre expérimental à l'aide de programmes itératifs du type LAOCOON III directement sur les calculateurs associés aux spectromètres. On obtient ainsi tous les déplacements chimiques δ et toutes les constantes de couplage J /67/. La précision de J est estimée à $\pm 0,2$ Hz et peut être meilleure que 0,05 Hz pour les raies très fines.

V.1.b. Acide poly-L-glutamique (PLGA).

Les figures V.1.a et V.1.b montrent les spectres expérimentaux et calculés du PLGA et de son homologue γ -deutééré. L'analyse du signal complexe de H_β du PLGA a été grandement facilitée par l'étude préalable du PLGA $\gamma\gamma d_2$ pour lequel les couplages $H_\beta-H_\gamma$ sont inexistantes.

Les paramètres utilisés pour la simulation du spectre du PLGA sont regroupés dans le tableau V.1.

Proton	α	β	β'	γ	γ'
δ (ppm)	4,320	2,044	1,932	2,300	2,248

Protons couplés	$\alpha\beta$	$\alpha\beta'$	$\beta\beta'$	$\beta\gamma=\beta'\gamma'$	$\beta\gamma'=\beta'\gamma$	$\gamma\gamma'$
$J_{H_A H_B}$ (Hz)	5,50	9,0	-15	8,0	6,0	-16

Tableau V.1

Déplacements chimiques δ_H et constantes de couplage $J_{H_A H_B}$ du PLGA 0,1 M pH=7 à 350 K. δ est exprimé en parties par million (ppm) par rapport au TSP.

V.1.c. Poly N⁵ (3-hydroxypropyl)-L-glutamine (PHPG).

Les spectres 1H expérimentaux et calculés apparaissent sur la figure V.2. La simulation a été effectuée à l'aide des paramètres de déplacements chimiques constantes de couplage et largeurs de raies définis dans le tableau V.2.

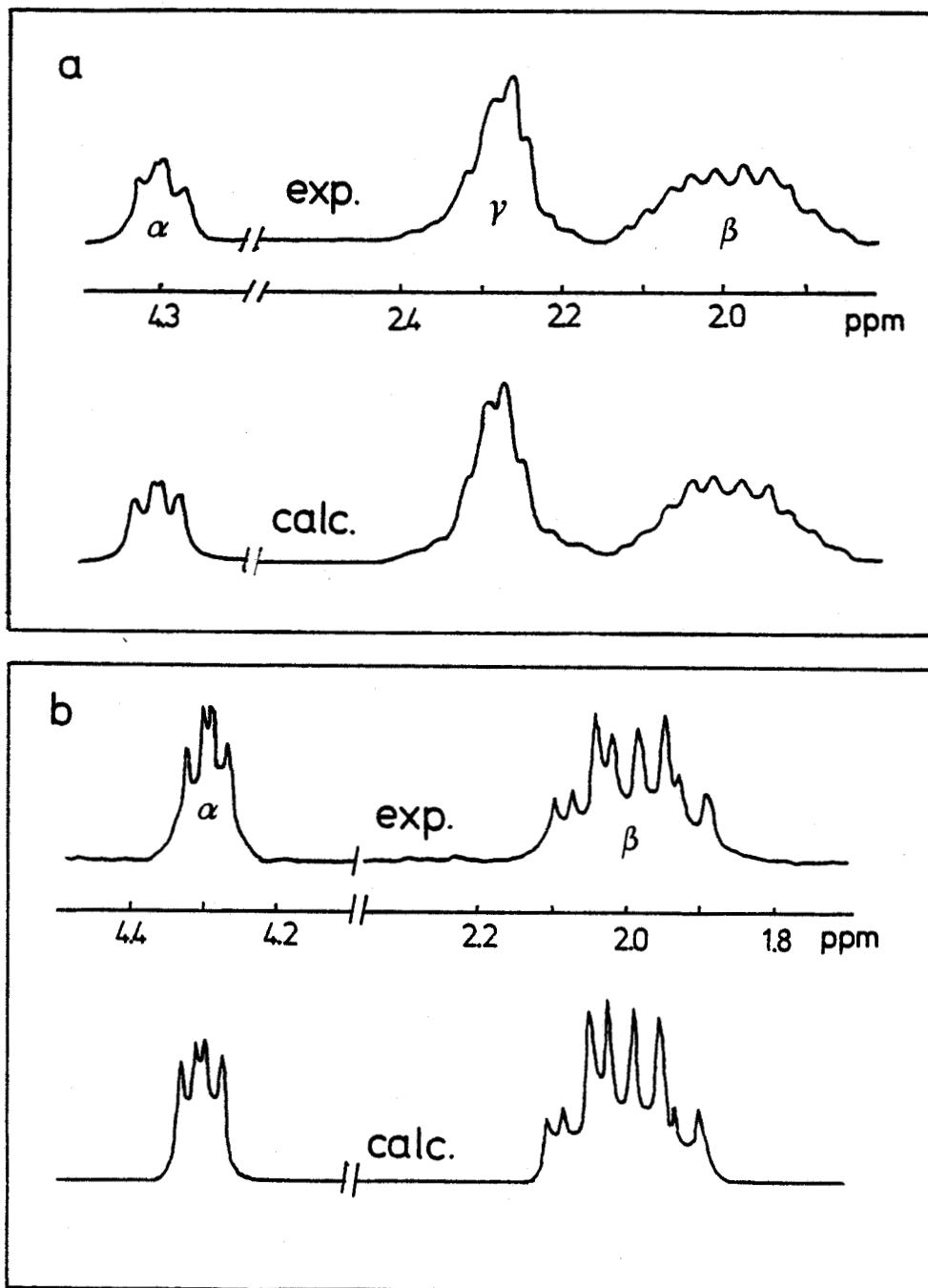


Figure V.1. Spectres ^1H à 250 MHz expérimentaux et calculés du PLGA (a) et du PLGA $\gamma\text{-d}_2$ (b). Les mesures sont effectuées à 250 MHz sur des solutions 0,1 M (en unités monomères) dans D_2O , pD=7, 350 K.

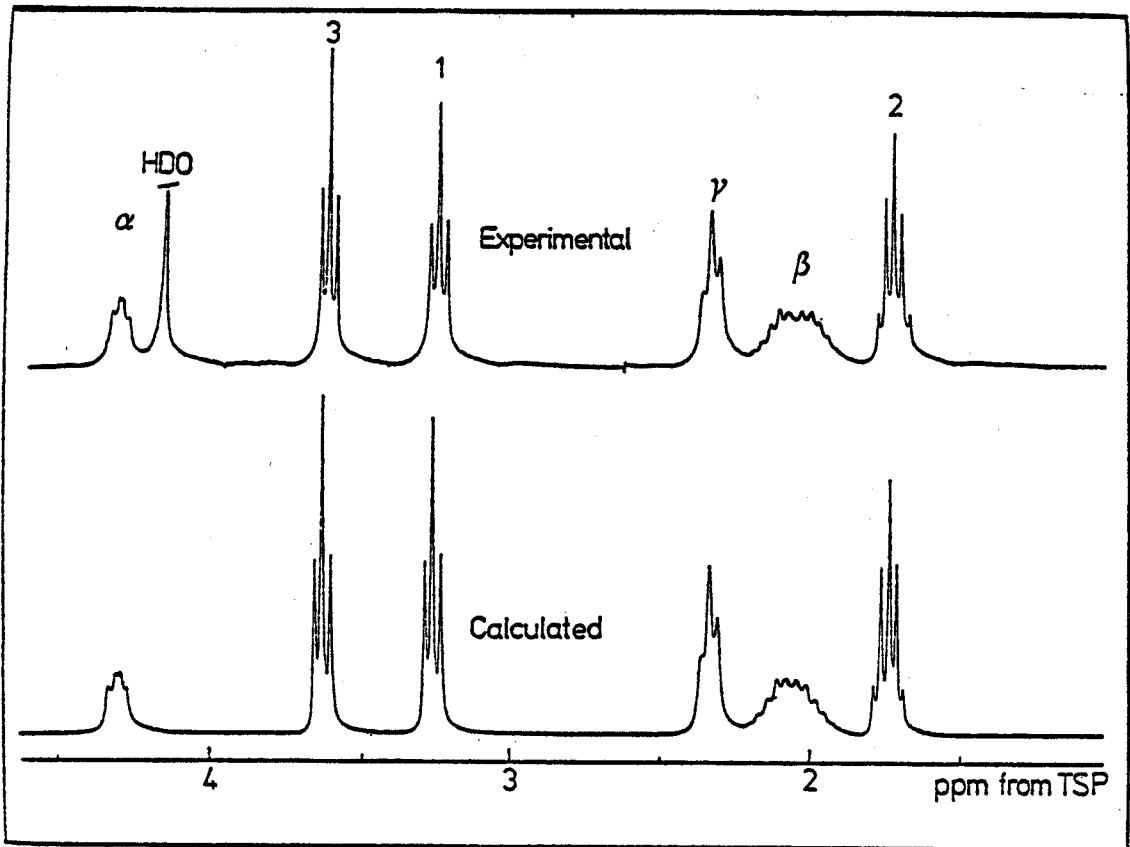


Figure V.2. Spectres ^1H expérimentaux et calculés de la polyhydroxypropyl-L-glutamine à 250 MHz. Solution 0,1 M (en unités monomères) dans D_2O à 350 K.

Proton	α	β	β'	γ	γ'	$H_{[1]}$	$H_{[2]}$	$H_{[3]}$
δ (ppm)	4,300	2,120	2,008	2,348	2,328	3,250	1,736	3,610
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	5,0					2,50		

Protons couplés $H_A H_B$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta'$	$\beta\beta'$	$\beta\gamma$	$\beta\gamma'$	$\beta'\gamma$	$\beta'\gamma'$	$\gamma'\gamma'$	$H_{[1]}H_{[2]}$	$H_{[2]}H_{[3]}$
$J_{H_A H_B}$ (Hz)	5,0	9,0	-15	7,0	7,0	7,0	7,0	-16	6,30	6,50

Tableau V.2

Paramètres utilisés pour la simulation du spectre 1H de la PHPG (Figure V.2).

Les largeurs de raies $H_{[1]}H_{[2]}$ et $H_{[3]}$ sont deux fois plus faibles que celles de la partie glutamyl ($H_\alpha H_\beta H_\gamma$) et traduisent une grande différence de mobilités de part et d'autre de la liaison amide interne.

V.1.d. Poly-L-lysine (PLL).

Même à 250 MHz, les signaux de H_α et H_δ sont partiellement superposés (Fig. V.3). Afin de les isoler pour mesurer les constantes de couplage nous avons mis à profit la différence de T_1 pour ces deux types de protons. Lors d'une expérience d'inversion-récupération les massifs H_β et H_δ sont sélectivement annulés pour des valeurs de τ différentes. Dans les conditions utilisées on isole ainsi H_δ pour $\tau = 0,145$ s et H_β pour $\tau = 0,270$ s. Les spectres correspondants sont représentés sur la figure V.4. On peut alors analyser tous les couplages et simuler le spectre expérimental de la figure V.3.

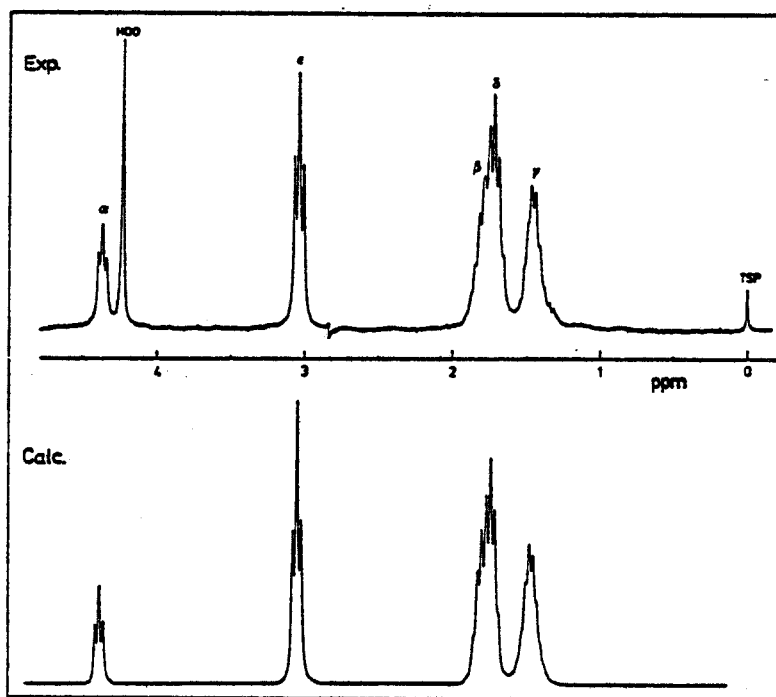


Figure V.3. Spectre ^1H à 250 MHz pour la PLL 0,1 M $\text{pD}=7,0$ dans D_2O à 350 K et signal calculé correspondant.

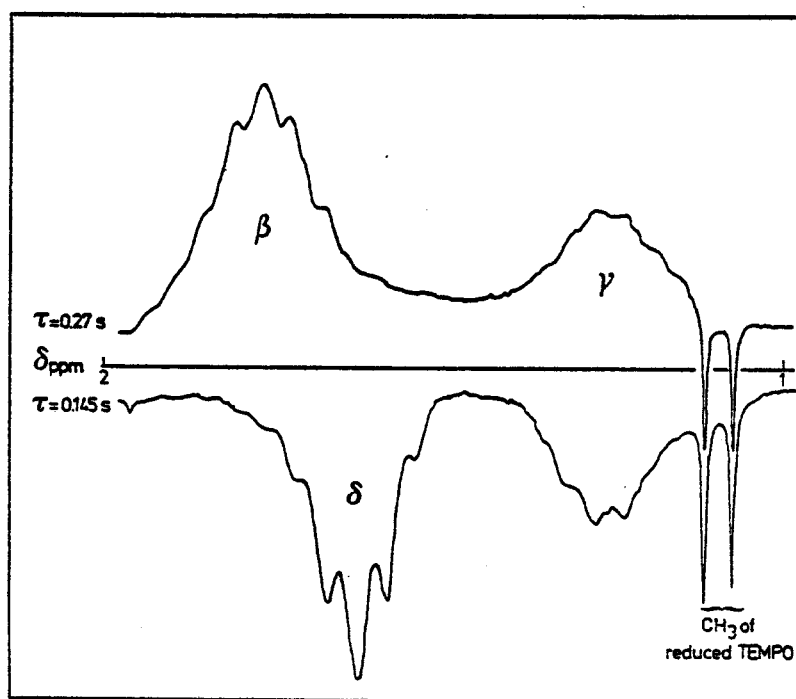


Figure V.4. Séparation par inversion-récupération des résonances de H_β et H_δ à 250 MHz. PLL 0,1 M $\text{pD} = 7$; 350 K.

Les paramètres de simulation sont regroupés dans le tableau V.3.

Proton	α	β	β'	γ	γ'	δ	ϵ
δ (ppm)	4,440	1,744	1,760	1,424	1,396	1,673	2,985
$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	5,5	5,5	5,5	5,0	5,0	5,0	4,2

Protons couplés $H_A H_B$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta'$	$\beta\beta'$	$\beta\gamma=\beta\gamma'$	$\beta'\gamma=\beta'\gamma'$	$\gamma\gamma'$	$\gamma\delta=\gamma'\delta$	$\delta\epsilon$
$J_{H_A H_B}$ (Hz)	6,06	7,76	-14	6,50	7,70	-14	7,07	7,56

Tableau V.3

Paramètres de simulation du spectre 1H à 250 MHz pour la PLL à 350 K. Solution 0,1 M pD=7 dans D_2O .

V.1.e. Poly-L-histidine.

Les spectres 1H expérimentaux et calculés de la poly-L-histidine sous forme désordonnée apparaissent figure V.5. Les paramètres de simulation sont regroupés dans le tableau V.4.

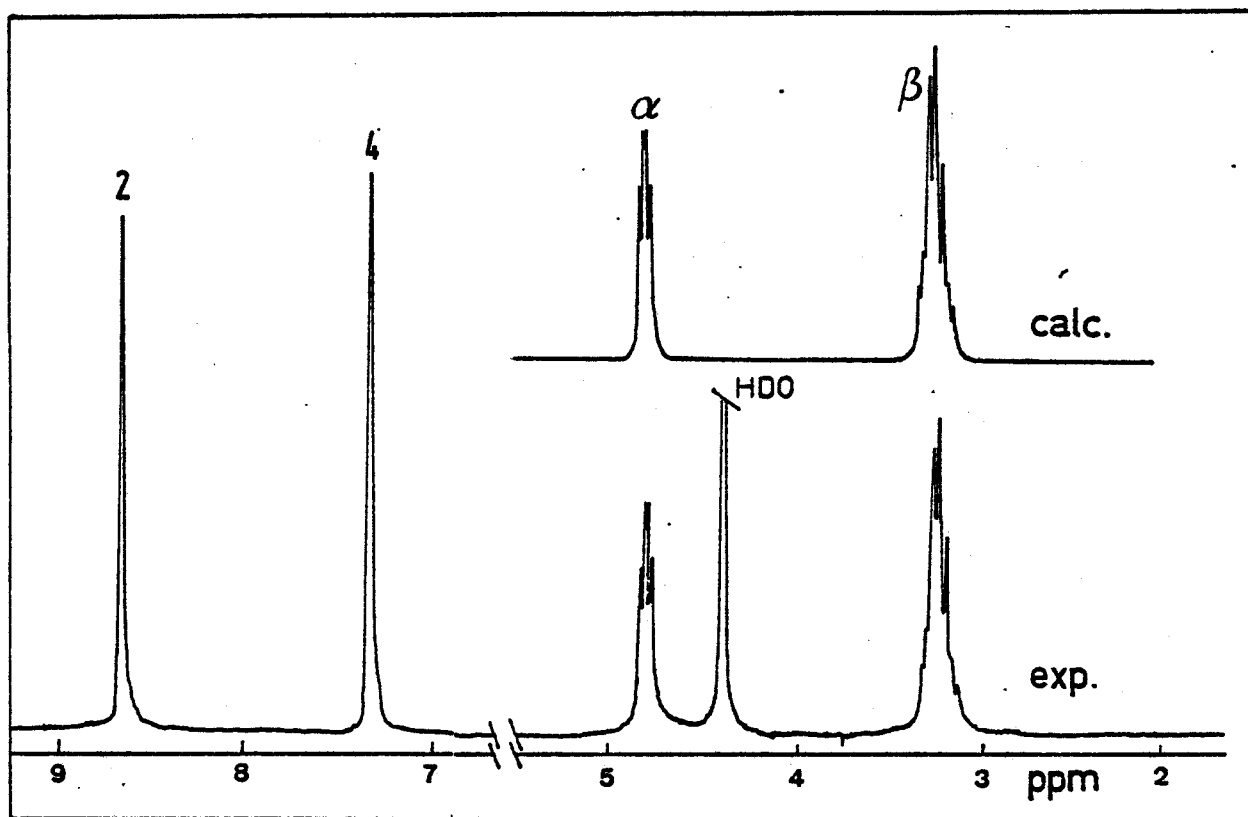


Figure V.5. Spectre ^1H expérimental et calculé de la PLH à 250 MHz et 350 K. Solution 0,1 M pD=3,0 dans D_2O .

Proton	H[2]	H[4]	α	β	β'
δ (ppm)	8,650	7,351	4,750	3,250	3,191

Protons couplés $\text{H}_\text{A}\text{H}_\text{B}$	$\alpha\beta$	$\alpha\beta'$	$\beta\beta'$
$J_{\text{H}_\text{A}\text{H}_\text{B}}$ (Hz)	5,09	8,96	-16,7

Tableau V.4

Paramètres de simulation du spectre ^1H de la PLH dans les conditions de la figure V.5.



V.2. ANALYSE DES CONFORMATIONS LOCALES. POURCENTAGES DE ROTAMERES.

Les constantes de couplages vicinales ${}^3J_{HH}$ sont reliées à l'orientation relative des deux spins en interaction. Cette propriété est exprimée par la relation de Karplus, ${}^3J_{H_i H_j} = kf(\theta)$ où θ représente l'angle dièdre $\overline{H_i C_i C_j H_j}$. Cette relation est semi empirique et plusieurs expressions peuvent être utilisées. Nous avons choisi celle de KOPPLE *et al.* /68/ :

$${}^3J_{HH} = 11 \cos^2 \theta - 1,4 \cos \theta + 1,6 \sin^2 \theta \quad (V.1)$$

Les valeurs limites sont alors :

$$J_t = 12,4 \text{ Hz (position trans } \theta = 180^\circ)$$

$$J_g = 3,25 \text{ Hz (position gauche } \theta = \pm 60^\circ).$$

Cette relation a été choisie car elle a été définie pour les α amino-acides. Toutefois l'utilisation d'autres expressions telle que celle de PACHLER /69/ conduit à des résultats comparables.

Les rotamères G, G' et T sont définis par la figure V.6

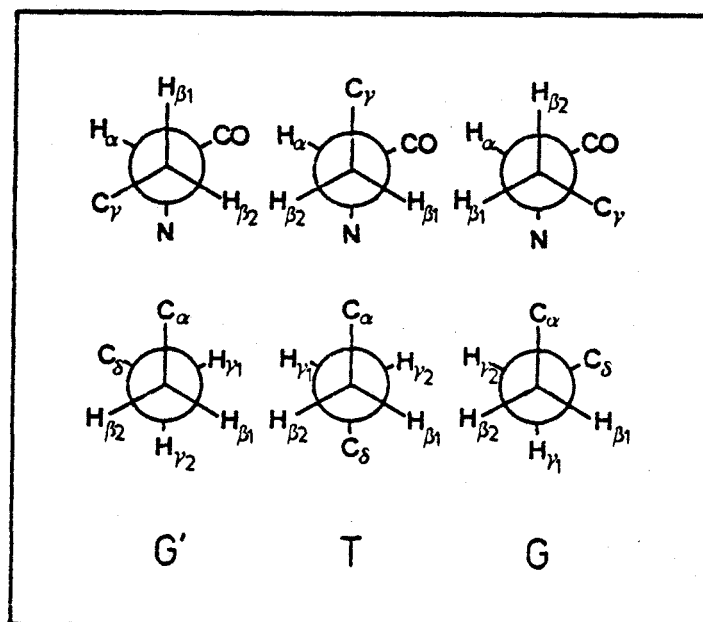


Figure V.6. Définition des rotamères autour d'une liaison $C_\alpha - C_\beta$ ou $-CH_2 - CH_2-$ (exemple de $-CH_2_\beta - CH_2_\gamma$).

Les populations de rotamères G, G' et trans sont alors obtenues grâce aux relations suivantes :

$$\begin{array}{l}
 \text{Pour un système } \left. \begin{array}{l} \text{CH-CH}_2\text{-} \\ \text{tel que } C_\alpha\text{-}C_\beta \end{array} \right\} \begin{array}{l} P_T = \frac{J_{\alpha\beta_1} - J_g}{J_t - J_g} \\ P_{G'} = \frac{J_{\alpha\beta_2} - J_g}{J_t - J_g} \\ P_G = 1 - P_T - P_{G'} \end{array} \quad (V.3)
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 \text{Pour un système } \left. \begin{array}{l} \text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-} \\ \text{tel que } C_\beta\text{-}C_\gamma \end{array} \right\} \begin{array}{l} P_T = \frac{J_{\beta_1\gamma_1} - J_g}{J_t - J_g} \\ P_{G'} = \frac{J_{\beta_1\gamma_1} - J_g}{J_t - J_g} \\ P_G = 1 - P_T - P_{G'} \end{array} \quad (V.4)
 \end{array}$$

En réalité il n'est pas possible d'attribuer de façon univoque β_1 ou β_2 à l'un des deux signaux β et β' du spectre expérimental. Donc $J_{\alpha\beta_1}$ peut être $J_{\alpha\beta}$ ou $J_{\alpha\beta'}$. Il est dès lors impossible de différencier $P_{G'}$ et P_T . Dans ces conditions les pourcentages de rotamères déterminés seront P , P' et P'' sans attribution définitive aux conformations G, G' ou T.

L'analyse de couplage ^{13}C - ^{13}C , ^{13}C - ^{15}N et ^{13}C - ^1H a permis à FISCHMANN *et al.* /70/ de montrer que dans les α amino acides, la forme G' est très favorisée autour de C_α - C_β . Ceci nous permet donc une tentative d'attribution à G' du rotamètre le plus abondant. Les résultats pour les quatre polypeptides étudiés sont regroupés dans les tableaux V.5 à V.8.

Liaison	P	P'	P''
$C_{\alpha}-C_{\beta}$	0,62 = $P_{G'}$	0,24 = P_T	0,14 = P_G
$C_{\beta}-C_{\gamma}$	0,50	0,30	0,20

Tableau V.5

Populations de rotamères pour le PLGA à 350 K pD = 7,0.

Liaison	P	P'	P''
$C_{\alpha}-C_{\beta}$	0,63 = $P_{G'}$	0,24 = P_T	0,13 = P_G
$C_{\beta}-C_{\gamma}$	0,40	0,40	0,20
$C_{[1]}-C_{[2]}$	0,33	0,33	0,33
$C_{[2]}-C_{[3]}$	0,35	0,35	0,30

Tableau V.6

Pourcentages de rotamères pour la PHPG à 350 K dans D_2O .

Liaison	P	P'	P''
$C_{\alpha}-C_{\beta}$	0,49	0,32	0,19
$C_{\beta}-C_{\gamma}$	0,48	0,35	0,17
$C_{\gamma}-C_{\delta}$	0,41	0,41	0,18
$C_{\delta}-C_{\epsilon}$	0,45	0,45	0,10

Tableau V.7

Populations des rotamères pour la poly-L-lysine à 350 K pD=7,0.



Liaison	P	P'	P''
$C_{\alpha}-C_{\beta}$	$0,62 = P_{G'}$	$0,20 = P_T$	$0,18 = P_G$

Tableau V.8

Poly-L-histidine à 350 K pD = 3,0. Pourcentages de rotamères.

En ce qui concerne la poly-L-lysine nous n'avons pas attribué P à $P_{G'}$ pour $C_{\alpha}-C_{\beta}$ car il n'y a pas de rotamère vraiment dominant. Cette observation sera d'ailleurs confirmée par les mesures de relaxation nucléaire.

V.3. EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LES CONFORMATIONS LOCALES.

A l'exception de la partie hydroxypropyl de la PHPG, il n'est généralement pas possible d'observer les couplages $^1H-^1H$ à des températures inférieures à 40°C. La figure V.7 montre l'évolution de quelques populations de rotamères pour la PHPG entre 0 et 100°C.

Comme pour la PHPG nous n'avons jamais observé de variation significative des populations de rotamères avec les autres polypeptides dans toute la gamme de température étudiée.

V.4. COMPORTEMENT DES DEPLACEMENTS CHIMIQUES LORS DES TRANSITIONS HELICE → PELOTE STATISTIQUE.

Le déplacement chimique reflète l'environnement immédiat du noyau considéré et sera donc très sensible aux variations de conformation, charge électrique etc ... On peut donc attendre une variation importante de δ lors des transitions hélice-pelote induites par le pH. C'est effectivement ce que l'on observe sur les figures V.8.a.b et c.

Il est alors possible de localiser avec précision la transition bien que la valeur de δ ne permette pas de caractériser la conformation adoptée.

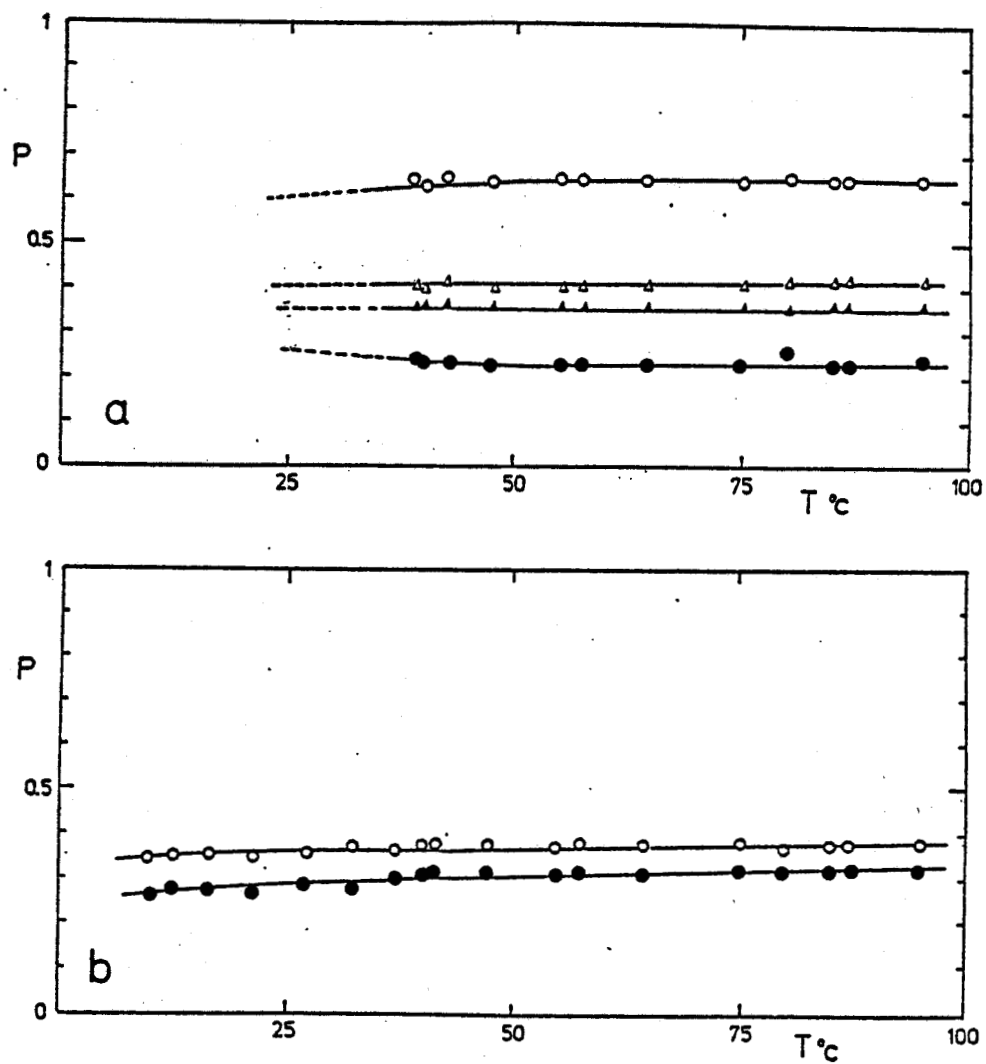


Figure V.7. Dépendance en température des populations de rotamères de la partie glutamyl (a).

[$P_{\alpha\beta}$ (o) ; $P'_{(\alpha\beta)}$ (●) ; $P_{\beta\gamma}$ (Δ) et $P'_{(\beta\gamma)}$ (\blacktriangle)]
 et du groupe hydroxypropyl (b)

[$P_{C_1-C_2}$ (o), $P_{C_2-C_3}$ (●)] de la PHPG dans D_2O .



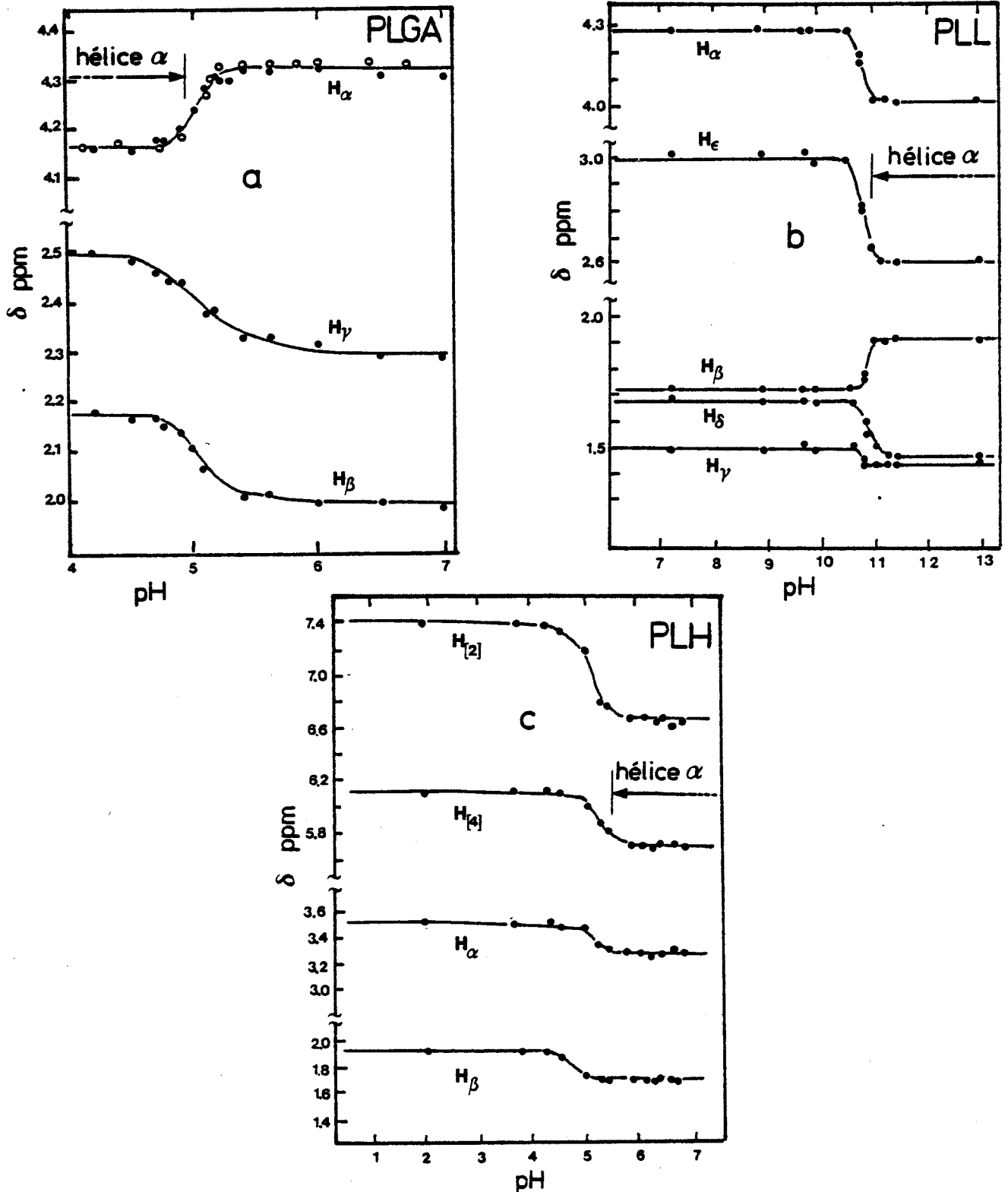


Figure V.8. Variations de δ des protons lors des transitions hélice \rightarrow pelote statistique

a : PLGA 0,1 M à 300 K dans D_2O (●) ou H_2O (○)

b : PLL 0,1 M à 278 K dans D_2O

c : PLH 0,1 M à 298 K dans D_2O .



Bien que les courbes de titration obtenues montrent une importante variation de δ , ces mesures sont très pauvres en renseignements. En effet le calcul des déplacements chimiques est encore au stade des balbutiements. En milieu diamagnétique au moins, toute variation de δ peut avoir des causes multiples (modifications de charge électrique, de conformation, de solvatation, etc ...) dont les contributions individuelles sont difficiles à estimer. Malgré le grand nombre d'études de transitions hélice pelote par les déplacements chimiques aussi bien de ^1H /8/ que de ^{13}C /71/ les interprétations restent plus que qualitatives. SMITH *et al.* /72/ ont toutefois montré que les variations de δ du ^{13}C de la poly-L-lysine induits lors de la transition pelote \rightarrow α -hélice sont dues essentiellement à des effets de charge électrique et non pas de modification de conformation.

La figure V.8.a. permet de faire une constatation importante à un tout autre point de vue. Certaines mesures de δ ont été effectuées soit dans H_2O , soit dans D_2O . Dans tous les cas les valeurs de pH ou pD sont celles lues directement sur le pHmètre. Or on constate que, quel que soit le solvant, les transitions se produisent strictement au même pH lu. La correction classique $\text{pD} = \text{pH}_{1\text{u}} + 0,4$ introduite pour des solutions salines /73/ ne doit donc pas être appliquée. Cette observation confirme celle de LED *et al.* /74/.

L'analyse de l'évolution des couplages vicinaux $^1\text{H}-^1\text{H}$ lors du passage à une structure hélicoïdale est quasi-impossible car les raies s'élargissent souvent considérablement.

L'apparition de doublements de raies lors des transitions hélice \rightarrow pelote a longtemps été attribuée à une interconversion lente entre les deux formes /75-78/. Il semble en réalité que ce phénomène soit un artefact lié à la polydispersité des échantillons étudiés /79/. Cette hypothèse paraît d'ailleurs confirmée par les observations récentes de MANDELKERN *et al.* /80/ sur le PLGA. Nous n'avons jamais, en ce qui nous concerne, mis en évidence de doublements de raies et nous pouvons donc conclure à une relativement faible polydispersité de nos polymères.

V.5. RESONANCE MAGNETIQUE DU ^{13}C .

Les figures V.9 montrent les spectres du ^{13}C des quatre polypeptides étudiés sous forme désordonnée.

Les couplages $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ne sont pas visibles par suite de l'irradiation simultanée de tous les protons (découplage hétéro-nucléaire). L'étude des transitions hélice \rightarrow pelote statistique par RMN de ^{13}C est très peu instructive car les effets observés sur les déplacements chimiques sont en général liés à des modifications de charge /72/. Enfin le passage à une structure hélicoïdale se traduit par un élargissement important des raies qui deviennent difficiles à détecter.

V.6. RESONANCE MAGNETIQUE DU DEUTERIUM.

Les déplacements chimiques du deutérium exprimés en ppm sont identiques à ceux du proton. Les raies sont en général larges et l'enrichissement sélectif est indispensable au moins pour les macromolécules. La figure V.10 montre à titre d'exemple le spectre ^2H de la poly-L-histidine sélectivement deutérée sur le $\text{C}_{[2]}$ de l'imidazole.

Le deutérium est un noyau intéressant pour la relaxation et sera à ce titre étudié dans un chapitre ultérieur.

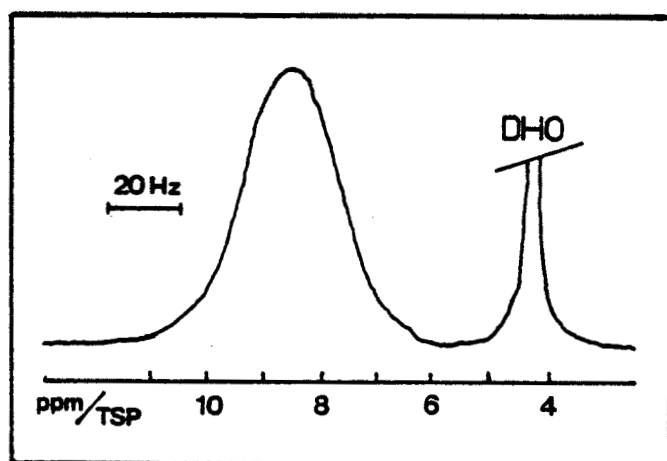


Figure V.10. Spectre RMN de ^2H à 13,80 MHz de la PLH deutérée sur le $\text{C}_{[2]}$ de l'imidazole. PLH im-2d₁ 0,1 M, pH=3,0 dans H_2O , 305°K.

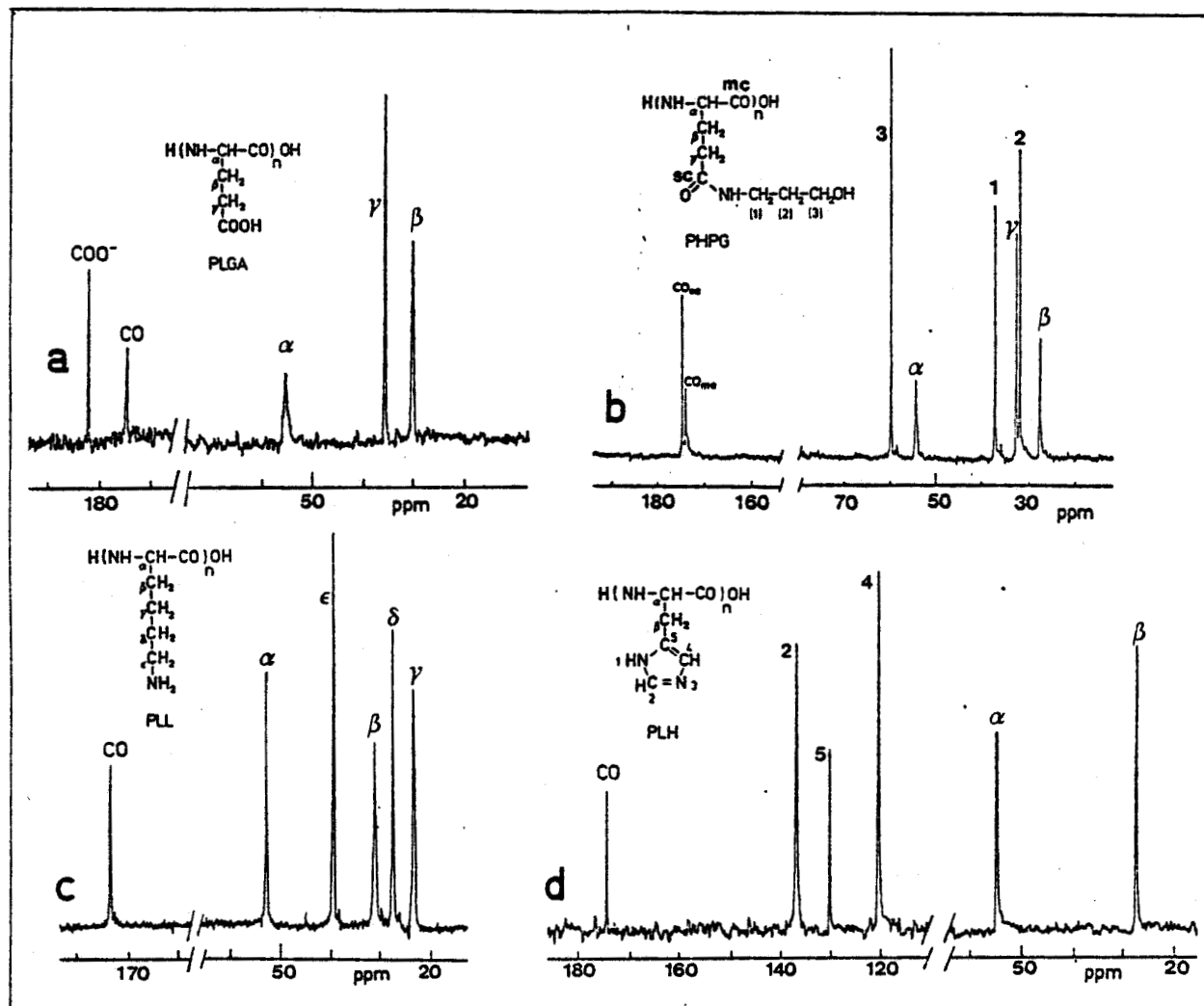


Figure V.9. Spectres RMN ^{13}C des polypeptides sous forme désordonnée à 62,86 MHz.

a : PLGA 0,5 M pD=7 340 K

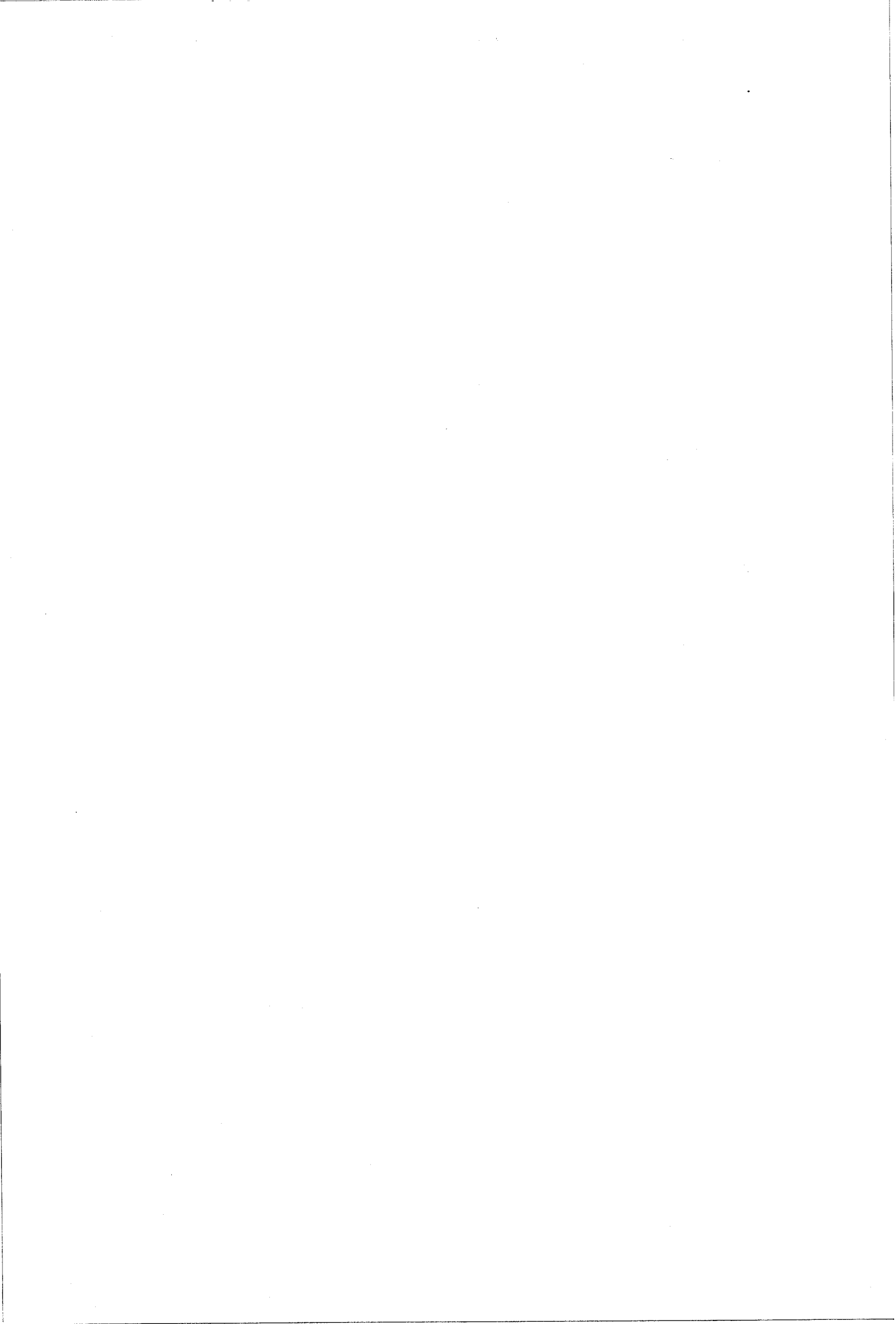
b : PHPG 0,5 dans D_2O 350 K

c : PLL 0,53 M pD=7,0 340 K

d : PLH 0,4 M pD = 3,0 340 K

Les déplacements chimiques sont par rapport au tétraméthylsilane (TMS).





Chapitre VI

APPLICATIONS DU MARQUAGE DE SPIN A L'ETUDE DYNAMIQUE DES POLYPEPTIDES.

On peut envisager un marquage de spin électronique (fixation d'un radical libre) ou nucléaire (enrichissement en un isotope). Ces deux cas seront considérés successivement.

VI.1. ETUDE PAR RPE DE POLYPEPTIDES MARQUES PAR UN RADICAL LIBRE STABLE.

Cette technique a été très largement utilisée en particulier pour les protéines /81/. Dans le cas présent nous avons choisi le radical nitroxyde TEMPO (2-2-6-6-tétraméthyl-pipéridine-N-oxy) dont la structure de base est représentée sur la figure VI.1.

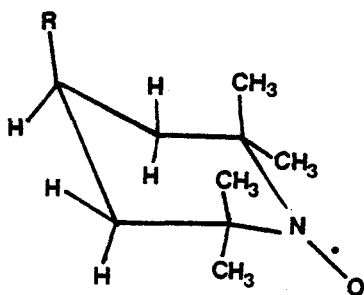
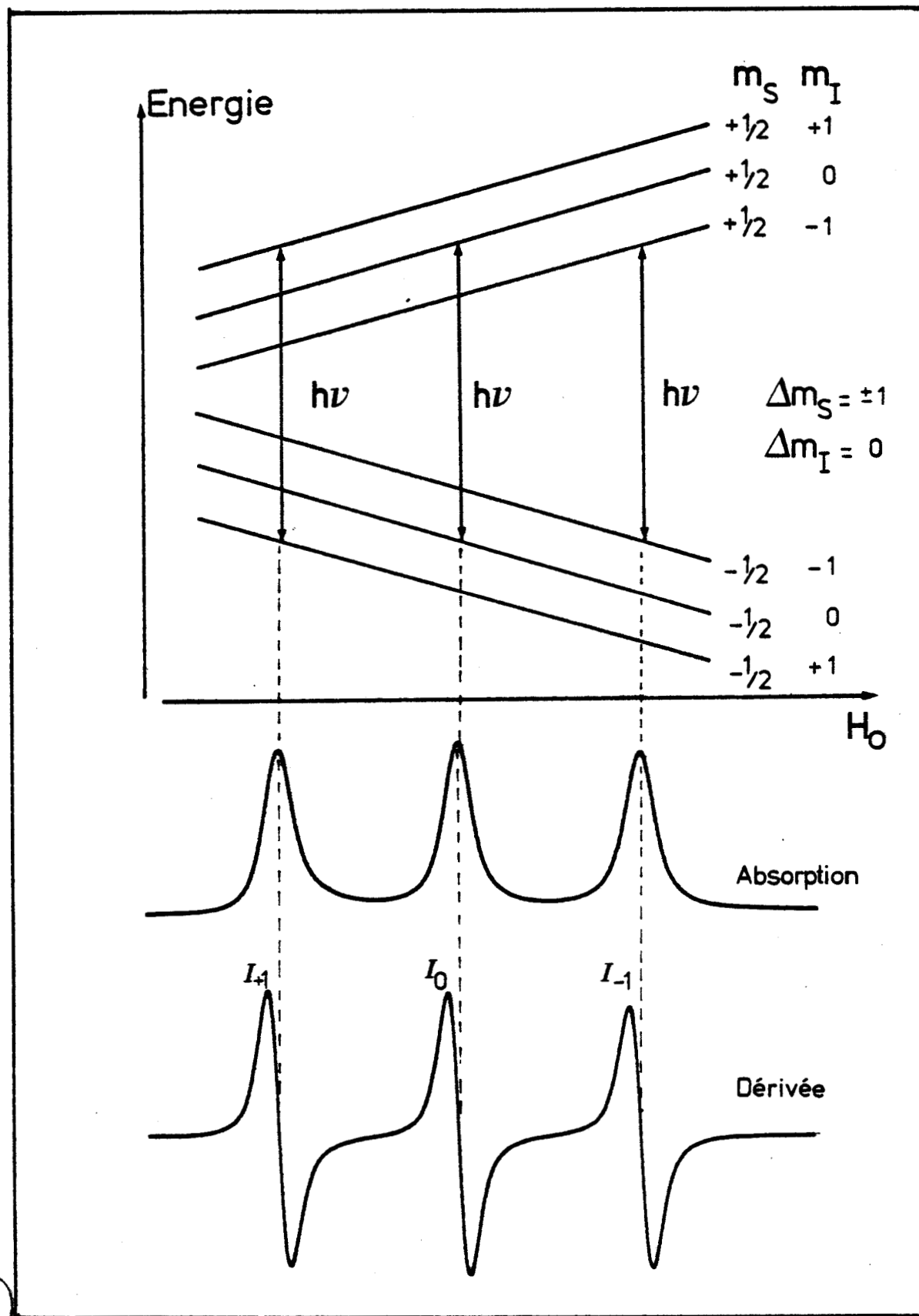


Figure VI.1. Structure du radical TEMPO.

La disponibilité de composés possédant des groupes fonctionnels R très divers permet d'envisager des marquages sélectifs.



BHS
LILLE

Figure VI.2. Niveaux d'énergie d'un radical nitroxyde dans un champ H_0 .

VI.1.a. Détermination des mobilités de radicaux nitroxydes par RPE.

Le spin électronique $S = 1/2$ est couplé avec le spin nucléaire $I = 1$ de l'azote ^{14}N . Le diagramme des niveaux d'énergie en fonction du champ externe H_0 est représenté sur la figure VI.2. Les règles de sélection $\Delta m_S = \pm 1$, $\Delta m_I = 0$ conduisent à une structure de triplet. Expérimentalement on obtient la première dérivée du signal d'absorption. De plus en RPE on balaie le champ H_0 en maintenant la radiofréquence fixe. La position de la raie centrale I_0 permet de définir le facteur g électronique analogue à un déplacement chimique. La structure moléculaire induit une variation de g par rapport à la valeur associée à un électron libre ($g = 2,00232$), variation qui restera très faible dans le cas des nitroxydes. La séparation entre les trois raies définit la constante de couplage hyperfine A^N entre l'électron et le noyau ^{14}N .

En réalité les valeurs de g et A^N ne sont pas identiques dans toutes les directions d'un repère lié à la molécule (Fig. VI.3).

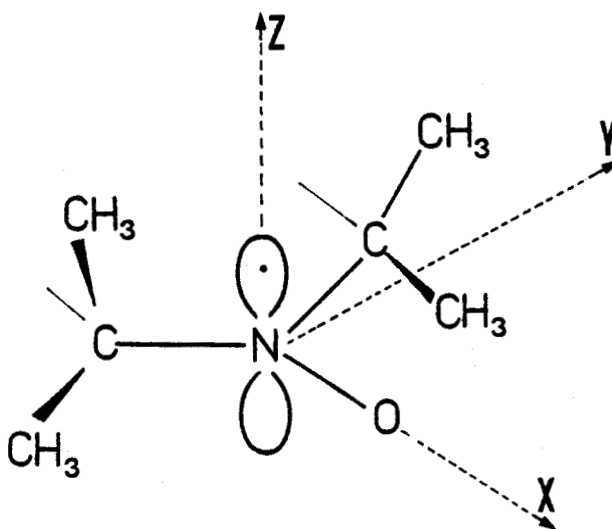


Figure VI.3. Structure électronique d'un nitroxyde.

L'électron est essentiellement localisé dans l'orbitale p de l'azote. g et A^N ne peuvent alors être convenablement représentés que par les tenseurs :

$$\tilde{g} = \begin{pmatrix} g_{xx} & & \\ & g_{yy} & \\ & & g_{zz} \end{pmatrix} \quad \tilde{A}^N = \begin{pmatrix} A_{xx}^N & & \\ & A_{yy}^N & \\ & & A_{zz}^N \end{pmatrix} \quad (\text{VI.1})$$

Dans ces conditions les valeurs de \tilde{g} et \tilde{A}^N seront différentes suivant l'orientation relative du champ H_0 et du radical. Cette anisotropie de \tilde{g} et de \tilde{A}^N apparaît sur la figure VI.4. L'anisotropie de \tilde{g} et \tilde{A}^N est en fait modulée par les mouvements moléculaires. Si la réorientation du radical est très rapide ($\tau_C \gg 10^{-11}$ s) les effets d'anisotropie sont moyennés. On définit alors :

$$g_{\text{iso}} = \frac{1}{3} (g_{xx} + g_{yy} + g_{zz})$$

$$A_{\text{iso}}^N = \frac{1}{3} (A_{xx}^N + A_{yy}^N + A_{zz}^N) \quad (\text{VI.2})$$

Le spectre isotrope ainsi obtenu est représenté sur la figure VI.4. Par contre dans le cas d'un échantillon polycristallin (poudre ou solution gelée) il y a superposition d'un nombre très important de signaux élémentaires correspondant chacun à une orientation particulière du radical. De ce spectre de poudre représenté figure VI.4. on peut extraire A_{zz}^N (et g_{zz}).

Dans le cas des nitroxydes il existe en fait une quasi symétrie cylindrique par rapport à l'axe moléculaire Z défini par l'orbitale p de l'azote et donc perpendiculaire à la liaison N-O

$$A_{\parallel}^N = A_{zz}^N \quad g_{\parallel} = g_{zz}$$

$$A_{\perp}^N = A_{yy}^N = A_{xx}^N \quad g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy} \quad (\text{VI.3})$$

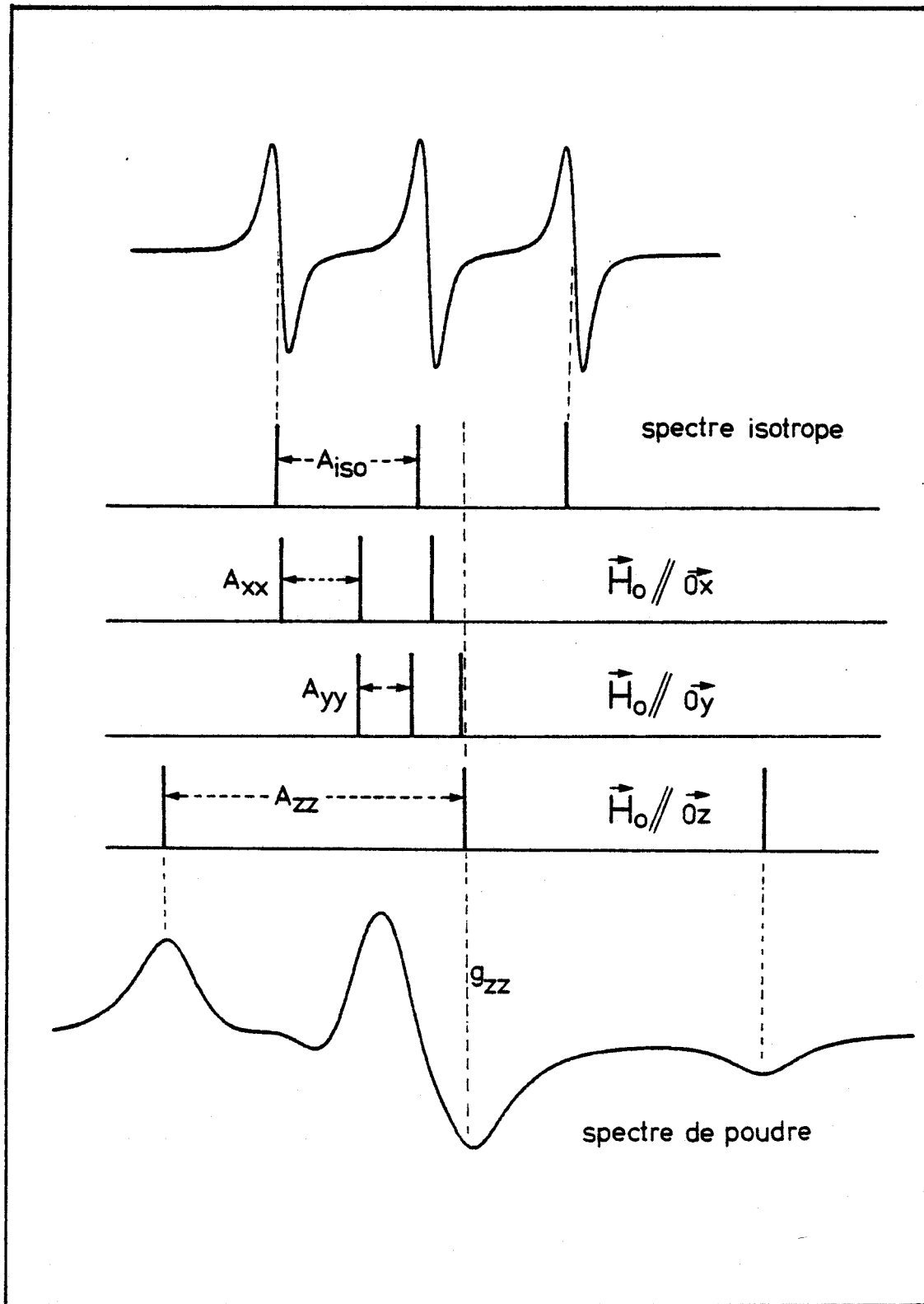


Figure VI.4. Anisotropie de \tilde{g} et \tilde{A}^N pour les nitroxydes.



Le spectre isotrope est alors caractérisé par les équations (VI.4) :

$$g_{iso} = \frac{1}{3} (g_{\parallel} + 2g_{\perp})$$

$$A_{iso}^N = \frac{1}{3} (A_{\parallel}^N + 2A_{\perp}^N)$$
(VI.4)

Entre ces deux extrêmes que sont le spectre isotrope et le spectre de poudre tous les intermédiaires sont possibles suivant la mobilité moléculaire, c'est-à-dire en fonction du degré d'anisotropie de \tilde{A} et \tilde{g} /82-84/. La figure VI.5 représente quelques spectres typiques qui serviront de référence pour l'étude présente.

Un autre paramètre important du spectre RPE est la largeur de raie liée au T_2 électronique, donc à la mobilité moléculaire. En RPE, toute l'information est contenue dans un seul spectre. Pour les cas où l'anisotropie de \tilde{g} et \tilde{A}^N n'est pas moyennée par le mouvement (spectres de types c, d) l'analyse dynamique est réalisée par simulation spectrale /85/. La théorie des formes de raie est en effet parfaitement établie tant pour les mouvements isotropes /86-87/ qu'anisotropes /88/.

En ce qui concerne les spectres de types a et b pour lesquels l'anisotropie de \tilde{A}^N et \tilde{g} n'est plus apparente, la mobilité peut être obtenue à partir des largeurs de raie. Le temps de relaxation électronique T_2 d'une des raies d'indice m_N ($m_N = -1, 0, +1$) est donné par la relation (VI.5) /89/.

$$T_{2(m_N)}^{-1} = \pi\sqrt{3}\Delta\nu_{pp} = \left[\frac{3b^2}{20} + \frac{4}{45} (\Delta\gamma H_0)^2 + \frac{b^2}{8} m_N^2 - \frac{4}{15} b\Delta\gamma m_N H_0 \right] \tau_C + X$$
(VI.5)

$\Delta\nu_{pp}$ = largeur pic à pic de la dérivée de la raie d'absorption ;

$$b = \frac{4\pi}{3} (A_{\parallel}^N - A_{\perp}^N) = 2\pi (A_{\parallel}^N - A_{iso}^N) ;$$

$$\Delta\gamma = -\frac{\beta}{\hbar} (g_{\parallel} - g_{\perp}) = \frac{3\beta}{2\hbar} (g_{iso} - g_{\parallel}) ;$$

H_0 = valeur centrale du champ.

X est une contribution à T_2 indépendante de τ_C .

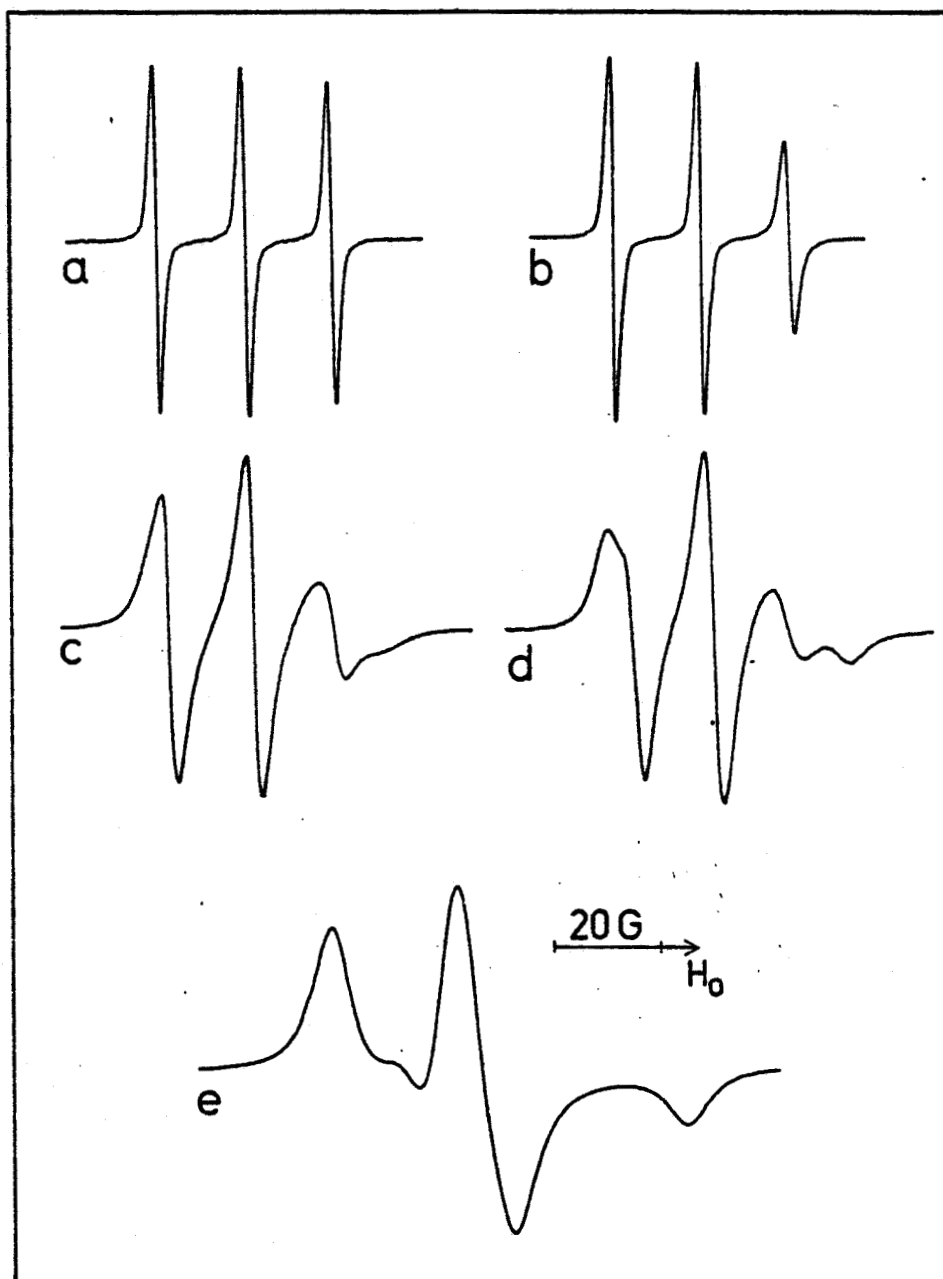


Figure VI.5. Quelques exemples de spectres RPE de nitroxydes.

- a : Spectre isotrope ($\tau_C \geq 10^{-11}$ sec) Tempo-amine 10^{-3} M dans H_2O $20^\circ C$.
- b : Signal de radical très faiblement immobilisé ($\tau_C \approx 10^{-10}$ sec). Radical Tempo fixé à un polypeptide non ordonné^C (PLGA, DP = 100 ; 0,1 M pH=7).
- c : Spectre de radical modérément immobilisé ($\tau_C \approx 10^{-8}-10^{-9}$ sec). Groupe TEMPO fixé à l'extrémité d'une α -hélice de poly-L-glutamate de benzyle (DP=20) dans le DMF à $20^\circ C$.
- d : Signal de radical fortement immobilisé ($\tau_C \approx 10^{-7}-10^{-8}$ sec). Même système que pour le spectre c mais pour une α -hélice beaucoup plus grande (DP=450).
- e : Spectre de radical immobilisé. Solution gelée de Tempo-amine $10^{-3}M$ dans l'eau à 77 K.

Les raies d'absorption étant lorentziennes, l'amplitude des signaux dérivés de I_{+1} , I_0 et I_{-1} est proportionnelle au carré de leurs largeurs de raie respectives /90/.

On peut alors extraire τ_C de l'équation (VI.5) de deux façons différentes en utilisant les coefficients de m_N et m_N^2 . On définit alors deux expressions du temps de corrélation, τ_C et τ_C^* .

$$\tau_C = \frac{15T_2^{-1}(o)}{8b\Delta\gamma H_o} \left[\left(\frac{I_0}{I_{+1}} \right)^{1/2} - \left(\frac{I_0}{I_{-1}} \right)^{1/2} \right]$$

$$\tau_C^* = \frac{4T_2^{-1}(o)}{b^2} \left[\left(\frac{I_0}{I_{+1}} \right)^{1/2} + \left(\frac{I_0}{I_{-1}} \right)^{1/2} - 2 \right]$$

(VI.6)

I_{-1} , I_0 et I_{+1} représentent les amplitudes des dérivées premières de chaque raie et $T_2^{-1}(o)$ est relié à la largeur de la raie centrale par $T_2^{-1}(o) = \pi\sqrt{3}\Delta\nu_{pp}(o)$.

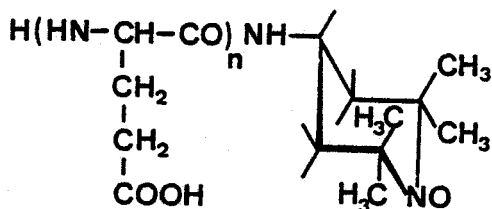
Si le mouvement moléculaire considéré est isotrope, il doit pouvoir être décrit par un seul temps de corrélation. Toute différence entre τ_C et τ_C^* sera donc l'indice d'une anisotropie de réorientation /91/.

Nous allons appliquer ces méthodes à l'analyse des mobilités des polypeptides et en particulier aux transitions hélice-pelote statistique.

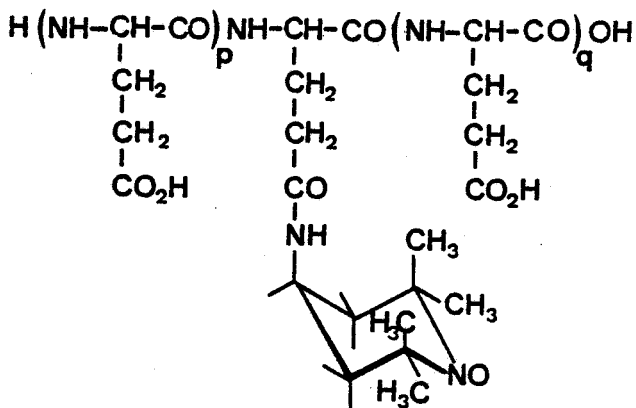
VI.1.b. Etude de l'acide poly-L-glutamique par RPE.

Nous avons fixé un radical TEMPO à l'acide poly-L-glutamique soit à l'extrémité C-terminale de la chaîne principale (PLGA-CP), soit sur le carboxyle d'une chaîne latérale (PLGA-CL).

Les techniques de marquage utilisées sont décrites dans l'appendice technique. Nous avons toujours opéré de façon à limiter statistiquement le nombre de groupes marqueurs à un par macromolécule.



PLGA-CP



PLGA-CL

Que le PLGA soit sous forme organisée (α-hélice) ou non, nous avons toujours obtenu des spectres du type b (voir figure VI.5) traduisant une importante mobilité du marqueur. Ces résultats diffèrent notablement de ceux obtenus avec le poly-L-glutamate de benzyle hélicoïdal /92/ pour lequel on rencontre normalement des signaux de type c ou d. La figure VI.6 montre l'évolution de τ_C et τ_C^* lors des transitions α-hélice → pelote statistique.

τ_C et τ_C^* sont déterminés grâce à l'équation (VI.6) avec les paramètres suivants :

$$\begin{aligned}
 H_0 &= 3240 \text{ G} \\
 b &= 3,482 \cdot 10^8 \text{ rad.s}^{-1} \\
 \Delta\gamma &= 4,65 \cdot 10^4 \text{ rad.s}^{-1}
 \end{aligned}$$

$g_{\text{iso}} = 2,00586$ et $A_{\text{iso}}^N = 47,77$ MHz ont été mesurés directement sur le spectre expérimental. $g_{\parallel} (=g_{zz}) = 2,00233$ et $A_{\parallel}^N (=A_{zz}^N) = 103,2$ MHz sont obtenus avec les mêmes échantillons sous forme gelée à 100 K.

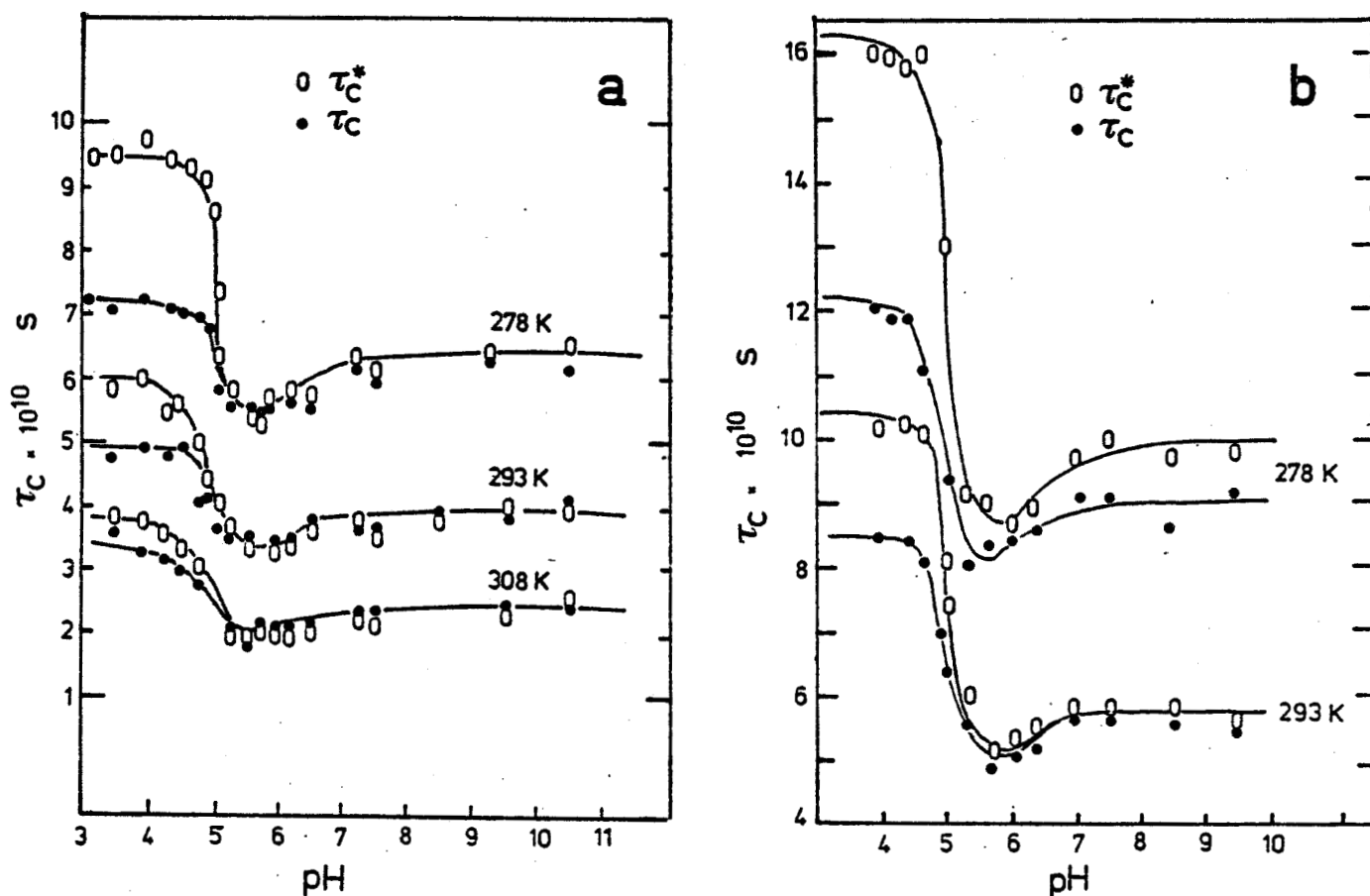


Figure VI.6. Variation de τ_C et τ_C^* de PLGA-CP (a) et PLGA-CL (b) en fonction du pH. Les températures sont indiquées en regard des courbes. Dans tous les cas les concentrations exprimées en unités monomères sont 0,1 M.

Pour les deux types de polymères on observe la transition α -hélice \rightarrow pelote à pH=5. En ce qui concerne le PLGA-CP sous forme désordonnée (pH>6) à 278 K, les valeurs de τ_C et τ_C^* sont pratiquement identiques ce qui traduit le mouvement quasi-isotrope du radical. Lorsqu'au contraire le polypeptide adopte une structure α -hélicoïdale (pH 5) la mobilité du marqueur décroît et le mouvement devient anisotrope ($\tau_C \neq \tau_C^*$). Pour des températures plus importantes les profils sont identiques mais les écarts entre τ_C et τ_C^* s'estompent rapidement à cause de l'instabilité de la forme hélicoïdale à $T > 320$ K. On met ainsi en évidence la dénaturation thermique de l' α -hélice.

Enfin, au niveau de la transition ($5 < \text{pH} < 6$) un net minimum de τ_C (ou τ_C'') apparaît. Ceci suggère l'existence d'une forme intermédiaire plus souple. Ce minimum à la transition a également été observé par viscosimétrie du PLGA dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{dioxane}$ /93/ et pour des esters de l'acide poly-L-glutamique /94/. La nature réelle de cette structure transitoire n'est pas directement identifiable par RPE. Nous aurons recours à une technique de RMN (chapitre X) pour tenter de cerner la signification physique de ce phénomène.

En ce qui concerne le PLGA-CL (Fig. VI.6.b) les mêmes observations peuvent être faites. Toutefois la mobilité du radical est un peu plus faible que pour le PLGA-CP sans doute à cause d'une restriction de mobilité du marqueur due au voisinage des autres chaînes latérales. Enfin même sous forme désordonnée à 298 K on constate une différence significative entre τ_C et τ_C'' traduisant une anisotropie du mouvement de la chaîne latérale.

- Effet de la force ionique (Figures VI.7.a et b).

L'addition de quantités importantes de sel se traduit d'abord par une légère diminution du pH de la transition. Cette observation contredit celles effectuées par RMN du ^{35}Cl /95/ pour lesquelles aucune variation significative du pH de transition n'est enregistrée même à haute force ionique, sans doute à cause d'une incertitude relativement importante des mesures. Lorsque la force ionique augmente l'écart de τ_C entre les formes désordonnées et hélicoïdales décroît traduisant l'instabilité de l' α -hélice dans ces conditions. On observe d'ailleurs une précipitation rapide du polymère à $\text{pH} \leq 4,5$. Mais le phénomène le plus significatif est la disparition du minimum de τ_C au niveau de la transition. L'identification ultérieure de cette structure intermédiaire devra pouvoir rendre compte de cet effet de la force ionique.

Bien que les différences de τ_C entre les formes hélicoïdales et désordonnées soient très significatives on constate toutefois que les mobilités restent très importantes même pour l'hélice- α . Pour illustrer cette observation on peut calculer les τ_C théoriques du PLGA à partir de modèles de bâtonnet (α -hélice) ou de sphère rigides (pelote). Dans le cas d'une hélice- α strictement rigide, la mobilité globale peut être décrite par deux constantes de diffusion D_{\parallel} et D_{\perp} /96/ telles que :

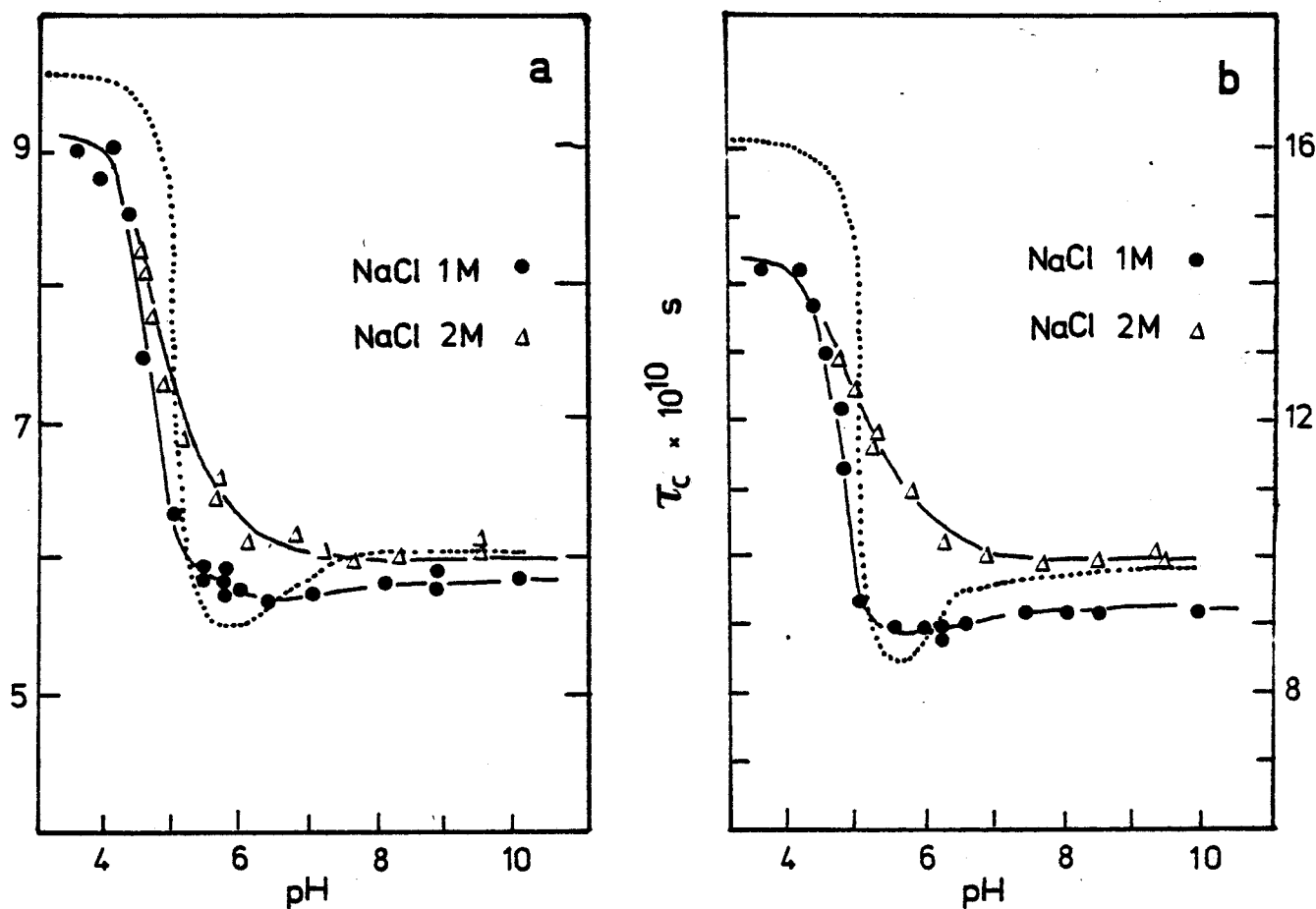


Figure VI.7. Influence de la force ionique [en NaCl] sur le τ_c du radical TEMPO pour le PLGA-CP (a) et le PLGA-CL (b) respectivement. Les courbes pointillées correspondent aux profils de τ_c en l'absence de sel ajouté (Fig. VI.6) ([PLGA] = 0,1 M à 298 K).

$$D_L = \left(\frac{3kTM_o^3}{2\pi\eta d^3 M^3} \right) \left[2 \ln \left(\sqrt{\frac{2}{3}} \frac{Md}{M_o R} \right) - 1 \right]$$

$$D_{//} = \left(\frac{kTM_o}{4\pi\eta R^2 Md} \right) \left[1 - \frac{6M_o^2 R^2}{M^2 d^2} \ln \left(\sqrt{\frac{2}{3}} \frac{Md}{M_o R} \right) \right] - D_L \quad (VI.7)$$

M et M_o étant respectivement les masses moléculaires du polymère et du motif (M/M_o = degré de polymérisation), d est l'avancement par résidu sur l'axe de l'hélice (1,5 Å pour α -hélice), R le rayon effectif de cette hélice et η la viscosité du solvant.

On peut alors définir un temps de corrélation effectif :

$$\langle \tau_C \rangle = \frac{1}{2} (D_{\parallel} + 2D_{\perp})^{-1} \quad (\text{VI.8})$$

Si la macromolécule est sous forme désordonnée le rayon de gyration est donné par la relation suivante :

$$\langle R_G^2 \rangle = Kl^2 \times DP \quad (\text{VI.9})$$

K est une constante choisie égale à 1,3, valeur estimée par FLORY /97/ pour la poly-L-alanine, l est la longueur d'un motif de la chaîne et DP le nombre moyen de résidus. Le temps de corrélation global de la macromolécule, ne tenant donc pas compte des mouvements internes, est défini par la relation de Stokes-Einstein :

$$\tau_{\text{global}} = \frac{4\pi \langle R_G^2 \rangle^{3/2} \eta}{3kT} \quad (\text{VI.10})$$

Le tableau VI.1 permet de comparer les τ_C théoriques et expérimentaux pour le PLGA-CP (DP=67 ; l=3,77 Å). Pour la forme hélicoïdale les calculs ont été effectués avec r = 5 Å.

Dans le cas de la forme désordonnée, le τ_C est toujours beaucoup plus court que ne le laisse prévoir l'hypothèse d'une sphère rigide. Les mouvements internes sont donc très importants et la réorientation globale de la macromolécule n'a pas d'influence significative sur la mobilité locale réelle /98-99/. En ce qui concerne l' α -hélice, il doit exister une flexibilité interne très importante. Le modèle du bâtonnet rigide n'est pas applicable ce qui confirme les observations de SPACH *et al.* /100/ par viscosimétrie. Cette flexibilité locale explique que les spectres RPE obtenus sont typiques d'une réorientation relativement rapide du marqueur.

T°K	$\langle R_G^2 \rangle^{1/2}$ calc. (Å)	τ_{global} calc. (s)	τ_C^{exp} (s)
278	35	$7,07 \cdot 10^{-8}$	$6,5 \cdot 10^{-10}$
293	35	$4,44 \cdot 10^{-8}$	$3,8 \cdot 10^{-10}$
308	35	$2,85 \cdot 10^{-8}$	$2,3 \cdot 10^{-10}$

} Chaîne désordonnée

T°K	D_{\parallel} calc. (rad.s ⁻¹)	D_{\perp} calc. (rad.s ⁻¹)	$\langle \tau_C \rangle$ calc. (s)	τ_C^{exp} (s)
278	$6,8 \cdot 10^7$	$6,8 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^{-9}$	$9,5 \cdot 10^{-10}$
293	$1,1 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^{-9}$	$6 \cdot 10^{-10}$
308	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^7$	$2,3 \cdot 10^{-9}$	$3,8 \cdot 10^{-10}$

} α -hélice

Tableau VI.1

Comparaison des τ_C expérimentaux et théoriques pour le PLGA.

VI.1.c. Etude par RPE de la poly-L-lysine.

Ce polypeptide a été marqué à l'extrémité C-terminale par un radical TEMPO (PLL-CP). La préparation en est décrite dans l'appendice technique. La transition pelote statistique \rightarrow α -hélice a été étudiée en solution aqueuse à 5°C afin de prévenir la formation de structures β à pH élevé. Les résultats obtenus sont regroupés dans la figure VI.8.

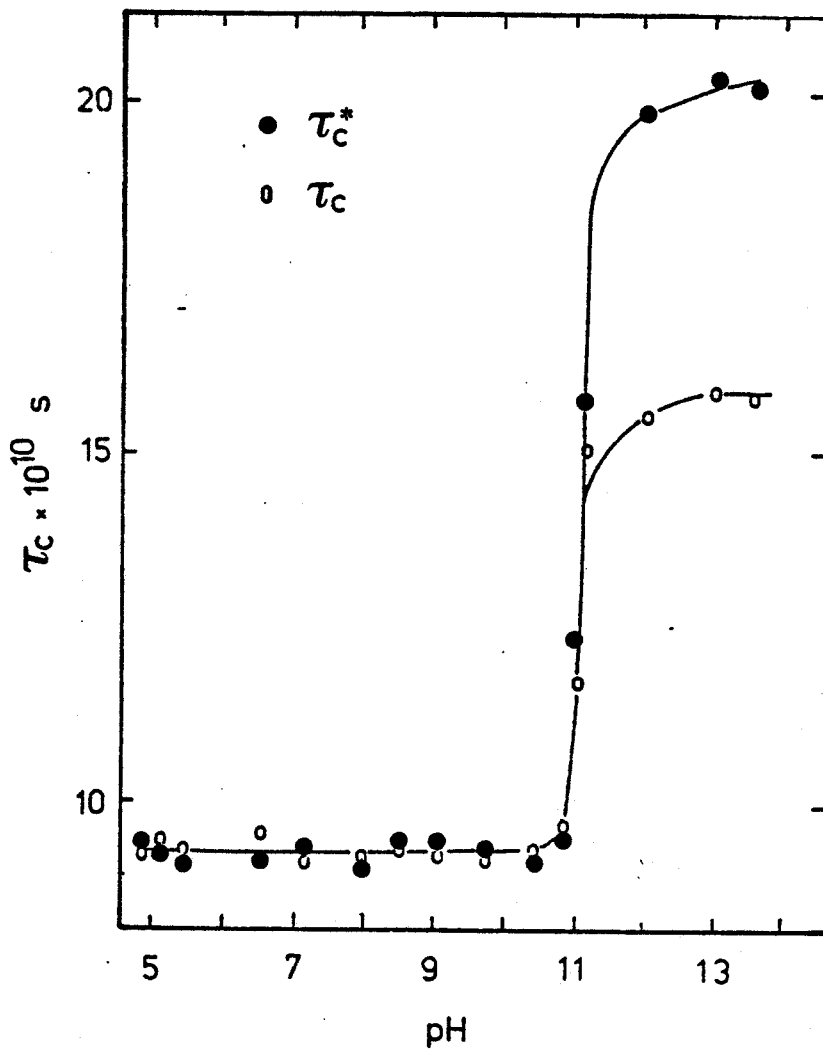
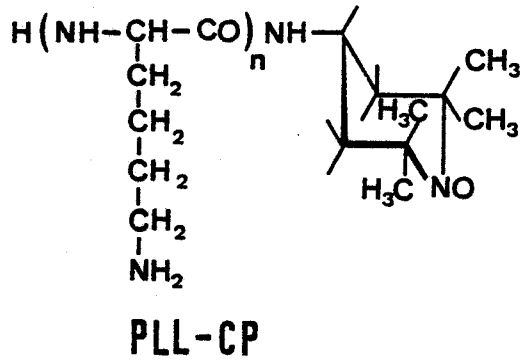


Figure VI.8. Etude de la transition pelote statistique \rightarrow α -hélice de la poly-L-lysine marquée par RPE à 278°K (PLL-CP, 0,1 M dans H₂O).

Tout au long du domaine de pH étudié, les spectres RPE sont du type b. On observe une transition très nette centrée à pH = 10,8. Pour des valeurs de pH supérieures, la forme hélicoïdale se manifeste par une anisotropie de réorientation ($\tau_C \neq \tau_C^{\parallel}$) inexistante dans la chaîne statistique. Contrairement au cas du PLGA, on n'observe pas d'anomalie au niveau de la transition alors qu'un net minimum est détecté par viscosimétrie /101/.

On peut également calculer les τ_C théoriques des formes désordonnées et hélicoïdales avec les modèles de sphère et de bâtonnet rigides respectivement. C'est l'objet du tableau VI.2.

Forme	D_r (rad.s ⁻¹)	D_L (rad.s ⁻¹)	$\langle \tau_C \rangle$ calc. (s)	τ_{global} calc. (s)	τ_C^{\parallel} exp. (s)
désordonnée	-	-	-	$2,1 \cdot 10^{-7}$	$9 \cdot 10^{-10}$
hélicoïdale	$1,7 \cdot 10^7$	$6,8 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^{-8}$	-	$2,1 \cdot 10^{-9}$

Tableau VI.2

Comparaison des valeurs théoriques et expérimentales de τ_C pour la poly-L-lysine à 278 K (PLL-CP 0,1 M/H₂O)
Les caractéristiques sont les suivantes :

(DP = 140 ; R = 7,5 Å ; $\langle R_G^2 \rangle^{1/2} = 50,8$ Å ; 278 K).

La mobilité interne reste donc très importante aussi bien pour la forme désordonnée que pour l' α -hélice. La RPE permet donc d'estimer le degré de stabilité des structures hélicoïdales et en particulier la solidité des liaisons hydrogène assurant leur cohésion. La figure VI.9 permet ainsi de comparer les spectres RPE de deux polypeptides marqués sous forme α -hélicoïdale.

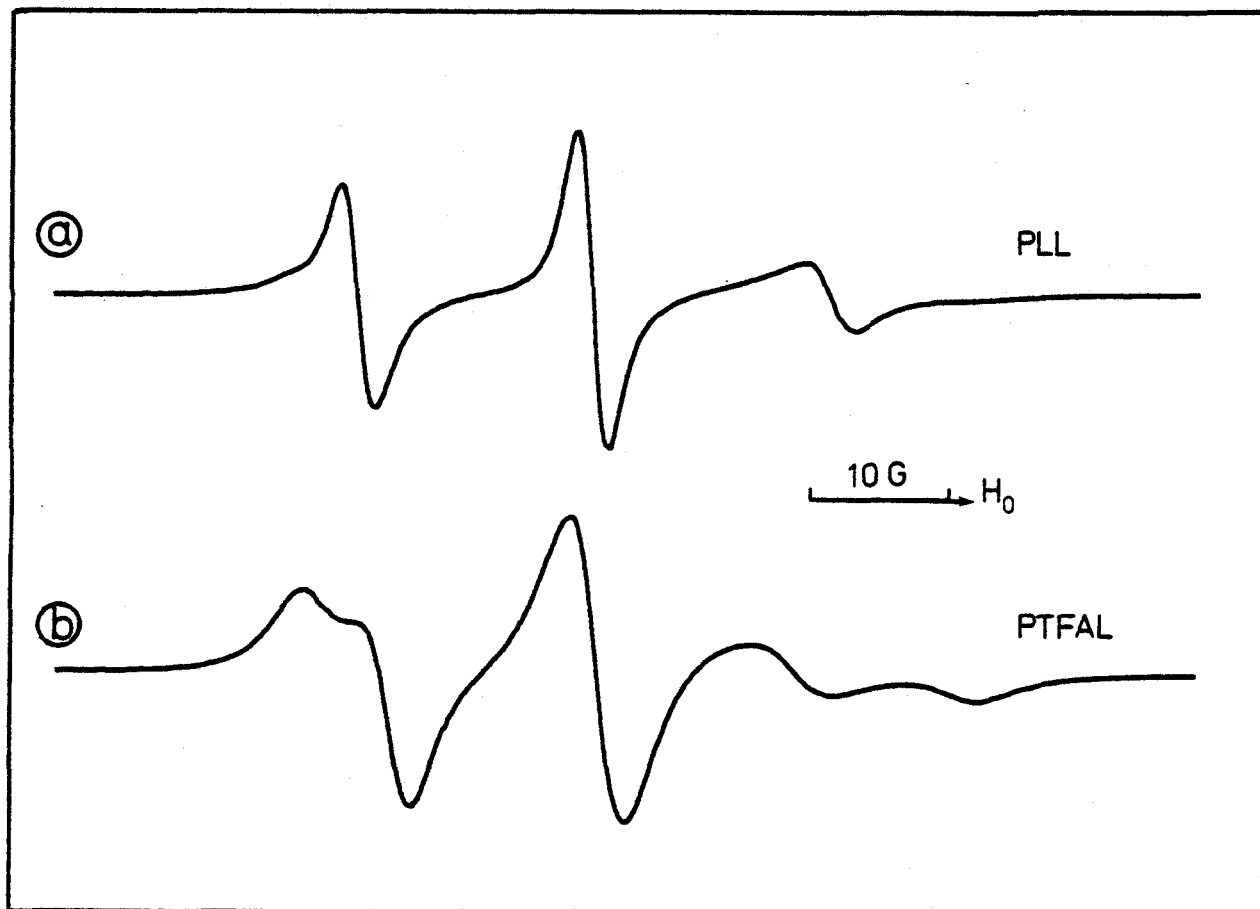


Figure VI.9.

- a : Spectre RPE de la poly-L-lysine (PLL-CP ; DP = 138) (forme α -hélice). Solution aqueuse 0,1 M, pH = 11,8, 278 K).
- b : Spectre RPE de la poly-trifluoroacétyl-L-lysine (PTFAL-CP, DP = 145) dans l'éthanol absolu (0,1 M, 298 K) sous forme α -hélicoïdale.

Dans le cas de la PTFAL-CP, on obtient un spectre de type d ($\tau_C \approx 10^{-7}$ - 10^{-8} sec) en accord avec les valeurs prévisibles pour un bâtonnet rigide possédant une faible mobilité interne. Les liaisons hydrogène sont efficaces et il est vraisemblable de considérer que le marqueur est fermement ancré au bâtonnet grâce à la participation de la liaison TEMPO-NH-CO- au système stabilisant comme le représente la figure VI.10.

En ce qui concerne la poly-L-lysine le radical n'est pas fermement ancré trahissant la faiblesse des forces de cohésion de l' α -hélice sans doute à cause du rôle perturbant de l'eau. La flexibilité reste très importante et l' α -hélice ne peut absolument pas être assimilée à un bâtonnet rigide. La RPE permet donc d'estimer l'efficacité des forces stabilisant les structures α -hélicoïdales en solution.

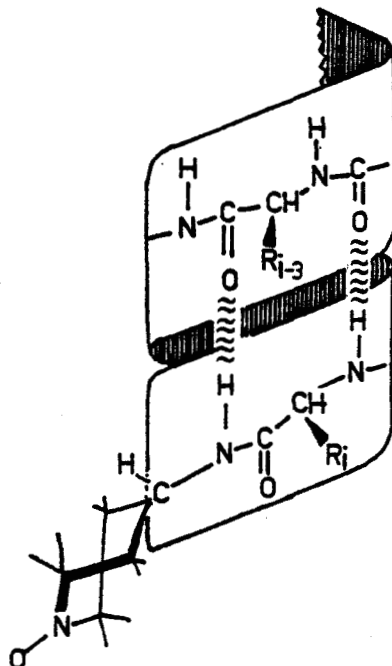


Figure VI.10. Modèle d'immobilisation forte d'un radical à l'extrémité d'un polypeptide hélicoïdal.

Utilisées seules, ces techniques sont toutefois critiques. On assimile en effet la mobilité du marqueur à celle que la macromolécule porteuse, négligeant ainsi l'éventualité d'une réorientation propre du radical libre. Cette restriction nous a conduit à effectuer des mesures complémentaires permettant d'estimer le degré de confiance que l'on peut attribuer aux mesures par RPE. C'est l'objet des études par marquage de spin nucléaire, dans le cas présent par deutération sélective.

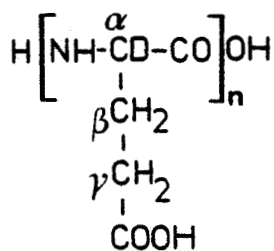
VI.2. ETUDE DE LA DYNAMIQUE DES POLYPEPTIDES PAR RESONANCE
MAGNETIQUE DU DEUTERIUM.

VI.2.a. Aspect théorique.

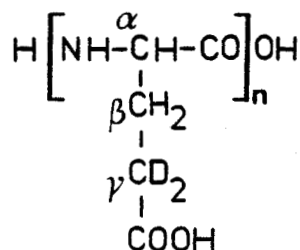
Nous avons vu précédemment que la mesure de T_2 du deutérium permet une détermination directe de τ_C . Nous utiliserons exclusivement l'équation simplifiée (III.36) qui s'applique à un mouvement de réorientation diffusionnelle isotrope. Cette approche semi-quantitative n'est pas absolument rigoureuse mais permet une estimation rapide des valeurs de τ_C . Cette technique a été appliquée à l'acide poly-L-glutamique et à la poly-L-histidine.

VI.2.b. Etude du PLGA par RMN du deutérium.

La faible abondance naturelle et l'étroitesse du domaine spectral de résonance (10 ppm) rendent indispensable l'enrichissement sélectif. Nous avons donc mis au point un certain nombre de techniques de marquage décrites au chapitre XI. Le PLGA a été sélectivement deutéré en position α (PLGA αd_1) ou γ (PLGA $\gamma\gamma d_2$) pour permettre l'observation du squelette et des chaînes latérales.



PLGA αd_1



PLGA $\gamma\gamma d_2$

Les résultats obtenus sont consignés dans la figure VI.11.

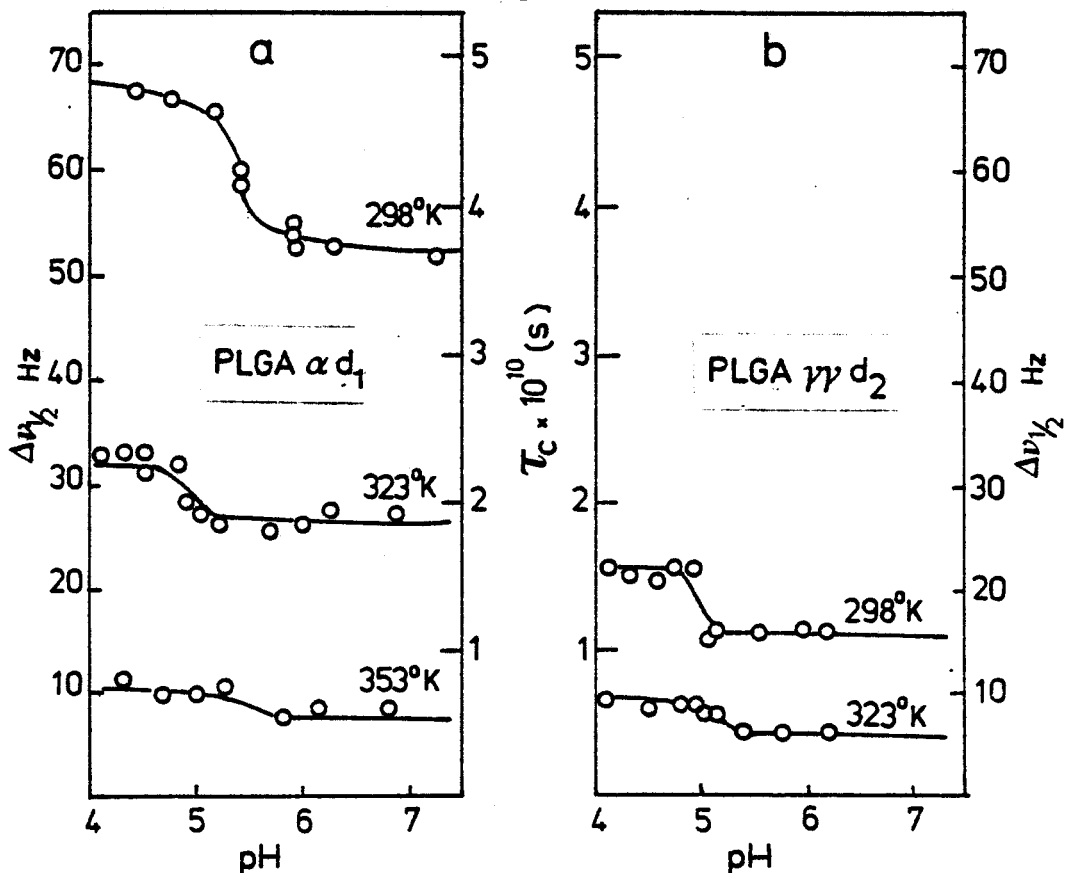


Figure VI.11. Etude par RMN du deutérium à 15,4 MHz de la mobilité du squelette (a) et des chaînes latérales (b) du PLGA lors des transitions hélice \rightarrow pelote. Solutions 0,1 M dans H_2O .

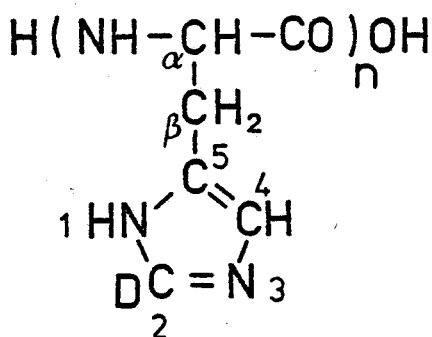
Les résultats obtenus sont tout à fait comparables à ceux de la RPE (Fig. VI.5). Le minimum de τ_C à la transition n'est pas détecté sans doute à cause de l'imprécision des mesures par rapport à la RPE. Les effets de température ainsi que les valeurs de τ_C sont comparables par les deux méthodes. Les conclusions développées à la suite des expériences de RPE restent donc valables. On retrouve en particulier la très grande flexibilité de la forme hélicoïdale en solution aqueuse. Ce phénomène est lié à la solvatation puisque l'addition d'un solvant organique provoque une rigidification des α -hélices /102-104/. A titre de comparaison nous avons effectué des mesures similaires ($\Delta\nu_{1/2}$ du deutérium) sur du PBLG αd_1 et de la poly-L-méthionine αd_1 dans des conditions pour lesquelles ces polypeptides sont sous forme α -hélicoïdale ($CHCl_3$ + 0,5 volume % de TFA /105/). Les largeurs des raies obtenues sont comprises entre

500 et 800 Hz. Dans ces conditions les valeurs de τ_C sont de l'ordre de 10^{-7} - 10^{-8} s et le polypeptide peut être assimilé à un bâtonnet rigide.

La compatibilité des mesures de RPE et de RMN du deutérium prouve que l'observation du radical libre est bien, au moins dans le cas présent, le reflet de la mobilité de la macromolécule, la contribution du mouvement propre du marqueur restant faible. Une confirmation supplémentaire sera d'ailleurs apportée par l'analyse de la relaxation ^{13}C .

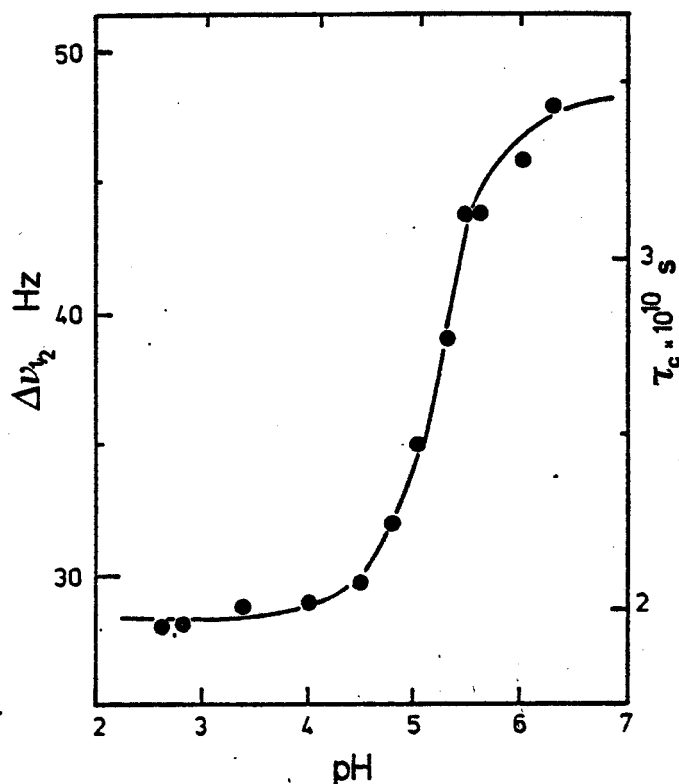
VI.2.c. Etude de la transition α -hélice-pelote statistique de la poly-L-histidine par RMN du deutérium.

La PLH a été sélectivement deutérée sur ce cycle imidazole en position 2 (voir appendice technique)



im2 d₁ PLH

La figure VI.12 montre les résultats obtenus. On peut constater que la mobilité est considérablement réduite dans la forme hélicoïdale (pH<5). Le passage de la chaîne désordonnée à l' α -hélice se traduit donc par une importante restriction du mouvement de l'imidazole associée à la rigidification du squelette. En comparant ces résultats à ceux du PLGAYd₂, on peut estimer raisonnablement que l' α -hélice formée par la poly-L-histidine est beaucoup plus rigide que celle du PLGA malgré le fait que l'échantillon de PLH utilisé ait une masse moléculaire (DP=67) plus faible que le PLGA (DP=100).



- Figure VI.12. Temps de corrélation du cycle de la PLH im-2d 0,1 M par RMN du deutérium observé à 15,4 MHz 25°C.

Nous verrons dans l'étude dynamique de la chaîne latérale de la poly-L-histidine que les données de relaxation du deutérium seront très utiles pour l'analyse du mouvement du cycle imidazole.

VI.3. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DES METHODES DE MARQUAGE DE SPIN UTILISEES.

L'inconvénient majeur de ces techniques réside bien sûr dans la nécessité de disposer d'échantillons marqués sélectivement. De plus il est souhaitable d'utiliser des méthodes complémentaires pour justifier la validité des observations effectuées. Ces deux obstacles surmontés, le marquage de spin apparaît comme très attrayant. L'avantage essentiel de ces méthodes est la rapidité d'acquisition des données. La RPE étant intrinsèquement plus sensible que la RMN, le signal est en général obtenu en un seul passage. De la même façon, l'efficacité de la relaxation du deutérium par effet quadropolaire permet des impulsions très rapprochées et

l'obtention d'un signal satisfaisant dans un temps raisonnable avec un échantillon enrichi dilué ($5 \cdot 10^{-2}$ M par exemple). Il est alors possible d'étudier des systèmes instables dans le temps comme le PLGA sous forme α -hélicoïdale en solution aqueuse.

Toute l'information étant contenue dans un spectre unique, le marquage sélectif par un radical libre ou par deutération permet l'investigation rapide de l'influence des paramètres extérieurs (température, pH, force ionique, etc ...) sur la dynamique du système étudié.



Chapitre VII

ETUDE DYNAMIQUE DU SQUELETTE DES POLYPEPTIDES SOUS FORME DE PELOTES STATISTIQUES.

Le noyau le mieux adapté à cette étude est le $^{13}\text{C}_\alpha$ relaxé par H_α . Le proton H_α ne peut pas être utilisé pour déterminer la mobilité du squelette car il est relaxé en grande partie par les protons H_β . Or la distance $\text{H}_\alpha\text{-H}_\beta$ est modulée par le mouvement autour de $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ et elle dépend donc du temps. La relaxation de H_α est donc un témoin du couplage entre le mouvement des chaînes principale et latérale. Le problème est complexe et sera traité ultérieurement.

AUS
LILLE

VII.1. MODELES DE MOUVEMENT.

Nous avons décrit dans le chapitre IV les divers modèles envisageables pour le squelette macromoléculaire.

L'étude présente étant restreinte aux polymères sous forme désordonnée, nous nous limiterons aux modèles isotropes. Les mesures préalables de τ_C par RPE et relaxation du deutérium ayant montré que la mobilité est grande au niveau de la chaîne principale, on soupçonne que la réorientation globale de la macromolécule ne sera pas le paramètre dominant. Le choix d'un modèle de réorientation isotrope suggéré par la RPE ne justifie pas l'emploi d'un temps de corrélation unique. En effet la macromolécule étant formée de la juxtaposition d'unités monomères, il faut considérer outre les mouvements purement locaux d'un motif, ceux qui intéressent 2, 3 ... n résidus. Cette difficulté peut être contournée en utilisant le modèle de HUNT et POWLES /106-108/ basé sur le mouvement coopératif de plusieurs unités monomères dans un réseau tétraédrique. Mais ceci est irréaliste dans le cas présent en raison du caractère non aliphatique de la chaîne principale des polypeptides. La simulation de

ce spectre de temps de corrélation peut alors être envisagée par l'artifice des distributions de τ_C . Bien que cette méthode n'ait pas de sens physique véritable, elle est intuitivement justifiée et a été souvent utilisée avec succès dans le cas de macromolécules /109, 110, 54, 65/. Parmi tous les types de distribution envisageables nous avons retenu celles de FUOSS-KIRKWOOD /111/ et de COLE-COLE /112/ qui sont symétriques. Soit $S = \ln(\tau_a/\tau_R)$, τ_R étant la valeur centrale de la distribution, les fonctions densité sont représentées par les équations (VII.1) pour Fuoss-Kirkwood et (VII.2) pour Cole-Cole :

$$F(S) = \frac{\gamma}{\pi} \frac{\cos(\gamma\pi/2) \cdot \cosh(\gamma S)}{\cos^2(\gamma\pi/2) \cdot \sinh(\gamma S)} \quad (\text{VII.1})$$

$$F(S) = \frac{1}{2\pi} \frac{\sin(\gamma\pi)}{\cosh(\gamma S) + \cos(\gamma\pi)} \quad (\text{VII.2})$$

$0 < \gamma < 1$ est le paramètre caractérisant la largeur de la distribution. Si $\gamma = 1$ on retrouve le cas limite d'un seul temps de corrélation. Ces deux équations fournissent des résultats tout à fait comparables aux valeurs de γ près. Par souci de cohérence nous avons uniquement utilisé la distribution de Cole-Cole. Si on associe cette fonction densité à un mouvement isotrope, la densité spectrale $J(\omega)$ devient /106/ :

$$J(\omega) = \frac{1}{2\pi} \frac{\cos(1-\gamma)(\pi/2)}{\cosh(\gamma \ln \omega \tau_R) + \sin(1-\gamma)(\pi/2)} \quad (\text{VII.3})$$

L'introduction d'une distribution de τ_C provoque un éva-
sement des courbes de T_1 en fonction de τ_C (ou de $10^3/T$). De plus les rapports de T_1 à deux fréquences diffèrent des valeurs théori-
ques prévisibles en l'absence de distribution. Afin de déterminer la valeur du paramètre γ , nous avons donc simulé les courbes de T_1 de $^{13}\text{C}_\alpha$ à deux fréquences très distinctes et pour toute la gamme de températures utilisable ($5^\circ\text{C} < T < 100^\circ\text{C}$).

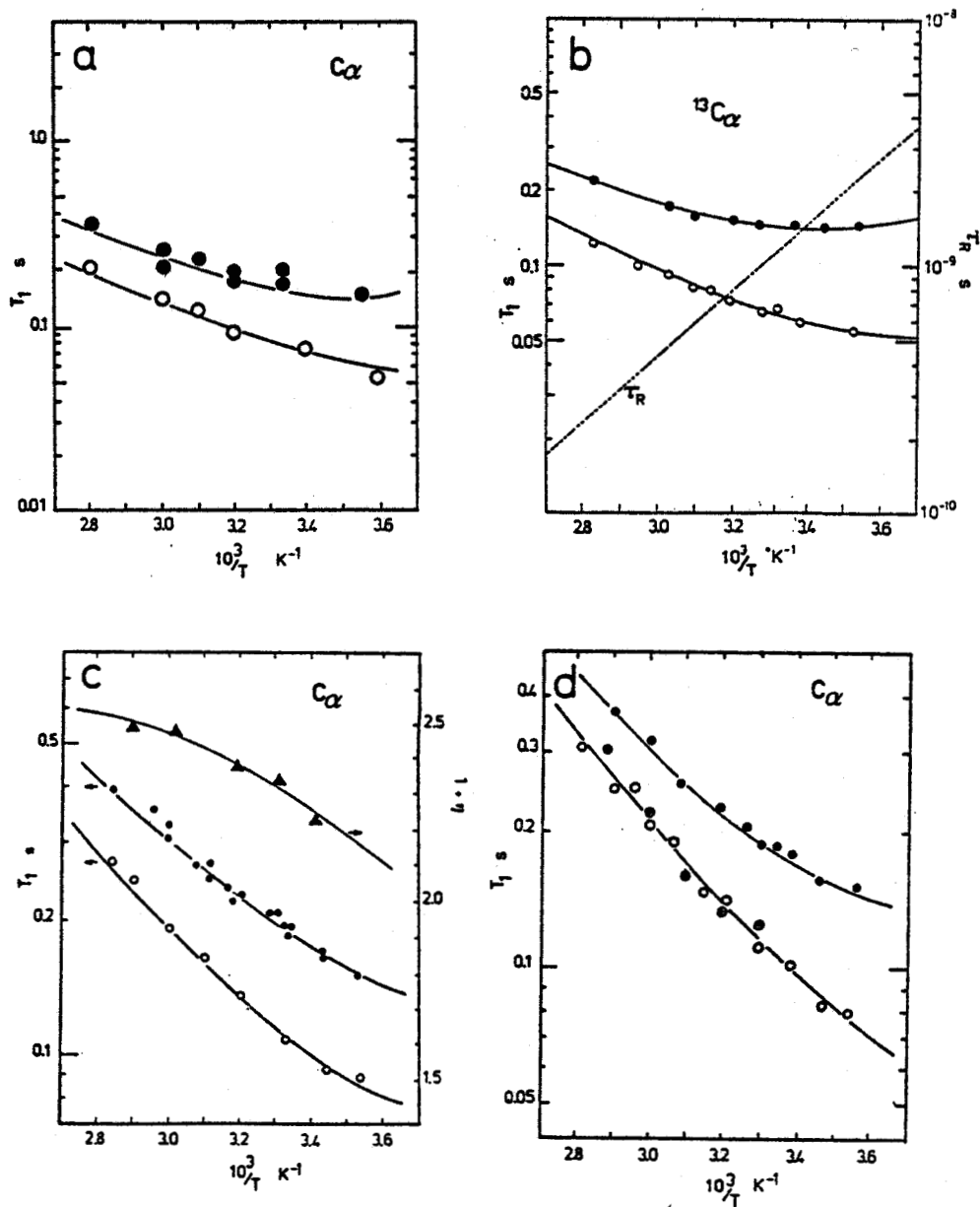


Figure VII.1. Résultats expérimentaux et calculs de relaxation de $^{13}\text{C}_\alpha$ en fonction de la température.

a : PLGA 0,5 M, pD = 7,0, $^{13}\text{C}_\alpha$ T_1 à 25,2 MHz (O) et 62,86 MHz (●).

b : PHPG 0,6 M dans D_2O . T_1 de $^{13}\text{C}_\alpha$ à 22,63 MHz (O) et 62,86 MHz (●).

c : PLL 0,55 M, pD = 7,0, T_1 de ^{13}C à 22,63 MHz (O) et 62,86 MHz (●). Effet Overhauser $^\alpha$ nucléaire (1+ η) de $^{13}\text{C}_\alpha$ à 22,63 MHz (▲).

d : PLH 0,4 M, pD = 3, T_1 de $^{13}\text{C}_\alpha$ à 20 MHz (⊙), 22,63 MHz (O) et 62,86 MHz (●).

Les courbes continues sont calculées avec les paramètres définis dans le tableau VII.1.



Les figures VII.1.a à VII.1.d montrent les résultats expérimentaux et les courbes simulées correspondantes pour les quatre polypeptides étudiés. Les calculs ont été effectués à l'aide de programmes écrits en langage conversationnel APL. La distance inter-nucléaire r_{CH} est ici prise égale à 1,09 Å. En ce qui concerne la poly-L-lysine nous avons également mesuré et recalculé l'effet Overhauser nucléaire ce qui contribue à rendre plus réaliste le modèle utilisé. Les paramètres utilisés pour ces simulations sont regroupés dans le tableau VII.1. τ_R étant la valeur centrale de la distribution on peut définir τ_{R_0} extrapolé à $10^3/T = 0$:

$$\tau_R = \tau_{R_0} \cdot e^{\Delta H/RT}$$

Polymère	γ	τ_{R_0} (s)	ΔH (kcal.mole ⁻¹)	τ_R à 300 K (s)
PLGA	0,67	$1,38 \cdot 10^{-14}$	6,4	$5,9 \cdot 10^{-10}$
PHPG	0,70	$4,83 \cdot 10^{-14}$	6,0	$1,06 \cdot 10^{-9}$
PLL	0,70	$7,57 \cdot 10^{-15}$	6,5	$3,83 \cdot 10^{-10}$
PLH	0,75	$8,71 \cdot 10^{-15}$	6,3	$3,16 \cdot 10^{-10}$

Tableau VII.1

Paramètres de simulation de la relaxation de $^{13}C_\alpha$.
Analyse dynamique de la chaîne principale.

Les valeurs de γ sont comparables pour les quatre polymères étudiés. Elles correspondent à des distributions relativement très larges de τ_C . On est donc très loin de l'hypothèse d'un temps de corrélation unique. La réorientation de la chaîne principale est donc dominée par un mouvement segmentaire rapide.

On constate également que les énergies d'activation sont pratiquement identiques d'un polymère à l'autre. Les barrières de potentiel existant entre les diverses conformations ne sont donc pas influencées par la nature de la chaîne latérale. Cette observation est à rapprocher de celles de TONELLI et BOVEY /113/ qui ont montré que la structure locale moyenne de la chaîne principale déduites des constantes de couplage $^3J_{\text{NH-C}_\alpha\text{H}}$ est indépendante de la nature de la chaîne latérale pour des homopolypeptides en milieu dénaturant.

Bien que les valeurs de τ_R à 300 K ne soient pas très différentes d'un polymère à l'autre on peut néanmoins constater des variations significatives. La PHPG a une mobilité plus faible que le PLL et PLH par ailleurs comparables en raison de l'importance de la chaîne latérale. Par contre on pourrait attendre une mobilité plus importante encore pour le PLGA dont la chaîne latérale est très courte. Une interprétation de cette restriction de flexibilité sera donnée à la lumière de résultats ultérieurs concernant en particulier les interactions entre chaînes. Il n'est pas possible d'invoquer des différences de masses moléculaires pour expliquer les variations de τ_R d'un polymère à l'autre. En effet pour les systèmes sous forme de pelotes statistiques, la valeur de T_1 $^{13}\text{C}_\alpha$ (ou du squelette en général) atteint un plateau quand le degré de polymérisation est supérieur à 50 unités monomères environ ce qui est le cas pour nos échantillons. Dans ces conditions en effet le mouvement segmentaire domine complètement la mobilité globale. Ce phénomène a été étudié en détail par de nombreux auteurs /115-116/ et les résultats obtenus sont très homogènes. A titre de confirmation nous avons mesuré le T_1 de $^{13}\text{C}_\alpha$ sur deux échantillons de PLGA de masses moléculaires respectivement égales à 15 000 daltons ($\overline{DP} \approx 100$) et 125000 daltons ($\overline{DP} = 830$). Aucune différence significative n'a pu être décelée. Bien que les viscosités macroscopiques des solutions de ces deux polymères soient très différentes, c'est en effet la microviscosité locale qui détermine la mobilité segmentaire /117/.

VII.2. COMPARAISON DES RESULTATS ^{13}C ET RPE.

VII.2.a. Confirmation de la validité des mesures de τ_C par RPE.

La mesure des largeurs de raie des nitroxydes en RPE peut être entachée d'erreur à cause de l'existence d'une structure superhyperfine due aux couplages de l'électron avec les protons des CH_3 . Nous avons donc effectué des mesures de relaxation nucléaire complémentaires pour justifier la validité des τ_C obtenus par RPE. Le radical TEMPO possède quatre groupes méthyls. Leurs signaux ne sont pas normalement visibles en RMN du proton car l'interaction dipolaire avec l'électron libre les élargit considérablement. Par contre, si on réduit le groupe TEMPO préalablement fixé au polymère, le paramagnétisme électronique disparaît et les raies des méthyls deviennent parfaitement visibles sur le spectre ^1H du polymère (voir par exemple la figure V.4). Ces expériences ont été réalisées avec la PLL-CP et la préparation du polymère réduit est décrite dans l'appendice technique.

Les méthyls sont de très bons marqueurs de mouvement /118-119/. La relaxation des trois protons est essentiellement due à leur interaction dipolaire mutuelle. La vitesse de relaxation $1/T_1$ des protons d'un groupe CH_3 fixé à une molécule quelconque est donnée par la relation (VII.5) /118-7/ :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{10} \gamma_H^4 \hbar^2 \sum_i r_i^{-6} (3\cos^2\Delta - 1) \left[\frac{1}{4} \left\{ \frac{\tau_C}{1 + \omega_H^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_{CM}}{1 + \omega_H^2 \tau_{CM}^2} \right\} + \left\{ \frac{\tau_C}{1 + 4\omega_H^2 \tau_C^2} + \frac{3\tau_{CM}}{1 + 4\omega_H^2 \tau_{CM}^2} \right\} \right] \quad (\text{VII.5})$$

avec $1/\tau_{CM} = 1/\tau_C + 1/\tau_{C\text{Rot}}$.

τ_C et $\tau_{C\text{Rot}}$ étant les temps de corrélation de l'axe de rotation du méthyl, donc de la molécule porteuse, et du groupe méthyl lui-même. Δ est l'angle entre l'axe de rotation du méthyl et la paire H-H considérée (ici $\Delta = 90^\circ$).

Si le mouvement propre du méthyl est très rapide ($\tau_{C_{Rot.}} \ll 10^{-11}$ s) ce qui est habituel on a alors $\tau_{C_{Rot.}} \ll \tau_C$ et la relation (VII.5) devient, pour une paire de protons :

$$\frac{1}{T_1} = \frac{3}{80} \gamma_H^4 \hbar^2 \frac{1}{r_{HH}^6} \left(\frac{2\tau_C}{1+\omega_H^2\tau_C^2} + \frac{8\tau_C}{1+4\omega_H^2\tau_C^2} \right) \quad (VII.6)$$

La mesure de T_1 du méthyl fournit donc le τ_C du groupe qui le porte, donc ici le temps de corrélation du TEMPO réduit. Dans toute cette étude nous avons pris $r_{HH} = 1,780 \text{ \AA}$. La mesure de T_1 des protons des CH_3 permet donc d'obtenir le τ_C du TEMPO réduit pour toute la gamme de température. La figure VII.2 montre la comparaison entre les valeurs de τ_C ainsi obtenues et celles déduites de la RPE.

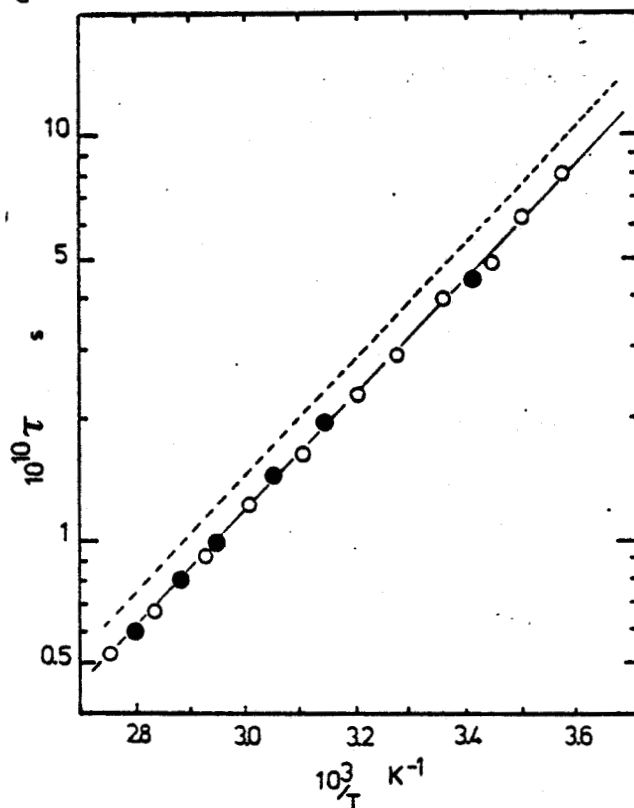


Figure VII.2. Comparaison des différentes méthodes de détermination des temps de corrélation du squelette de la poly-L-lysine non ordonnée (pH=7,0).

- o τ_C obtenu par RPE sur PLL-CP 0,1 M/H₂O pH = 7.
- τ_C déterminé à partir de la relaxation des protons du TEMPO réduit (PLL-CP réduite, 0,1 M, pD = 7, 250 MHz).
- (-----) τ_R extrait de la relaxation de $^{13}C_\alpha$ (Fig. VII.1.c).

Les τ_C obtenus par RPE et par relaxation protonique des méthyls sont identiques. Dans le cas présent l'élargissement des raies RPE dû aux couplages protons-électron non résolus est négligeable. Il semble indispensable de justifier la validité des mesures en RPE sur les nitroxydes par une technique de ce type, au moins quand les raies sont peu larges, la contribution de la sous-structure pouvant devenir très importante. Si cette dernière n'est pas négligeable, une amélioration appréciable peut être apportée en utilisant des marqueurs perdeutérés /120/, les couplages $^2\text{H}-\bar{e}$ étant 6,5 fois plus faibles que $^1\text{H}-\bar{e}$.

VII.2.b. Comparaison avec les τ_R déterminés par relaxation de $^{13}\text{C}_\alpha$.

Sur cette même figure VII.2, nous avons également reporté les τ_R extraits de la simulation des données de relaxation $^{13}\text{C}_\alpha$ (Fig. VII.1.c). Les énergies d'activation sont strictement identiques par les deux méthodes mais les mesures obtenues par RPE (ou RMN des méthyls) sont décalées de 12% environ vers les mouvements rapides. Cette différence se justifie facilement par un effet de bout de chaîne. Il est logique que la mobilité locale soit un peu plus importante aux extrémités du polymère, là où est fixé le marqueur TEMPO. On peut aussi invoquer la contribution d'un mouvement interne du marqueur. Néanmoins, la différence entre les deux méthodes de mesure reste faible. L'utilisation de la RPE permet donc de déterminer avec une faible incertitude les mobilités segmentaires de polymères désordonnés. La très grande rapidité de réponse, la sensibilité et l'interprétation facile des mesures en font donc une méthode de choix pour l'étude de mobilités moléculaires et des paramètres qui sont susceptibles de les affecter.

Chapitre VIII

ETUDE PAR RELAXATION NUCLEAIRE DES MOUVEMENTS LOCAUX DES CHAINES LATERALES.

VIII.1. CARACTERISTIQUES DES PROGRAMMES DE CALCUL.

Nous avons vu au chapitre IV les divers modèles de mouvement envisageables. Un programme de calcul a été écrit en langage FORTRAN. Il permet de simuler les résultats de relaxation T_1 , T_2 , NOE, pour les noyaux habituels à savoir ^1H , ^{13}C , ^2H et ^{14}N . Le calcul est effectué liaison par liaison à partir du squelette macromoléculaire dont le mouvement peut être isotrope (avec ou sans distribution de τ_C) ou anisotrope à symétrie axiale. Nous allons définir les principaux paramètres d'entrée de ce programme.

VIII.1.a. Paramètres classiques.

Il s'agit bien entendu de la sélection du noyau considéré, de la fréquence de Larmor d'observation et de la constante de couplage quadrupolaire dans le cas du deutérium. De plus il faut définir les caractéristiques dynamiques de la chaîne principale, c'est-à-dire la valeur de τ_R et la largeur de distribution pour un mouvement segmentaire isotrope ou bien les constantes de diffusion D_{\parallel} et D_{\perp} pour un mouvement anisotrope de symétrie axiale (cas des systèmes hélicoïdaux).

VIII.1.b. Paramètres géométriques.

Le paramètre fondamental est l'angle existant entre l'axe de réorientation considéré et le vecteur internucléaire liant les deux spins en interaction. Dans le cas du ^{13}C , la paire de spins considérée est le C-H. La figure VIII.1 montre l'angle Δ que l'on considère et qui pour une chaîne aliphatique a été pris égal à $70,5^\circ$.

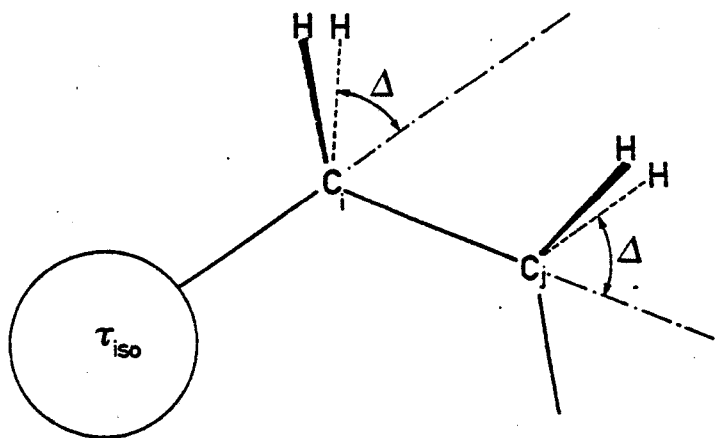


Figure VIII.1.

Pour le proton, le programme effectue le calcul pour des groupes méthylènes exclusivement. Il considère la relaxation dipolaire mutuelle des deux protons de ce groupe. La paire de spins en interaction est alors H-H. L'angle de l'axe de rotation avec cette paire de spins est alors de 90° , le vecteur H-H étant orthogonal à l'axe de rotation. En ce qui concerne le deutérium, l'angle à considérer est identique à celui du ^{13}C , car l'axe principal du tenseur de couplage quadrupolaire est colinéaire à la liaison C-D.

Pour le cycle aromatique de la poly-L-histidine nous avons utilisé les données de cristallographie. La figure VIII.2 montre les valeurs des angles Δ entre l'axe de rotation $\text{C}_\beta\text{-C}_{[5]}$ et les paires $\text{C}_{[2]}\text{-H}$ et $\text{C}_{[4]}\text{-H}$ /121/.

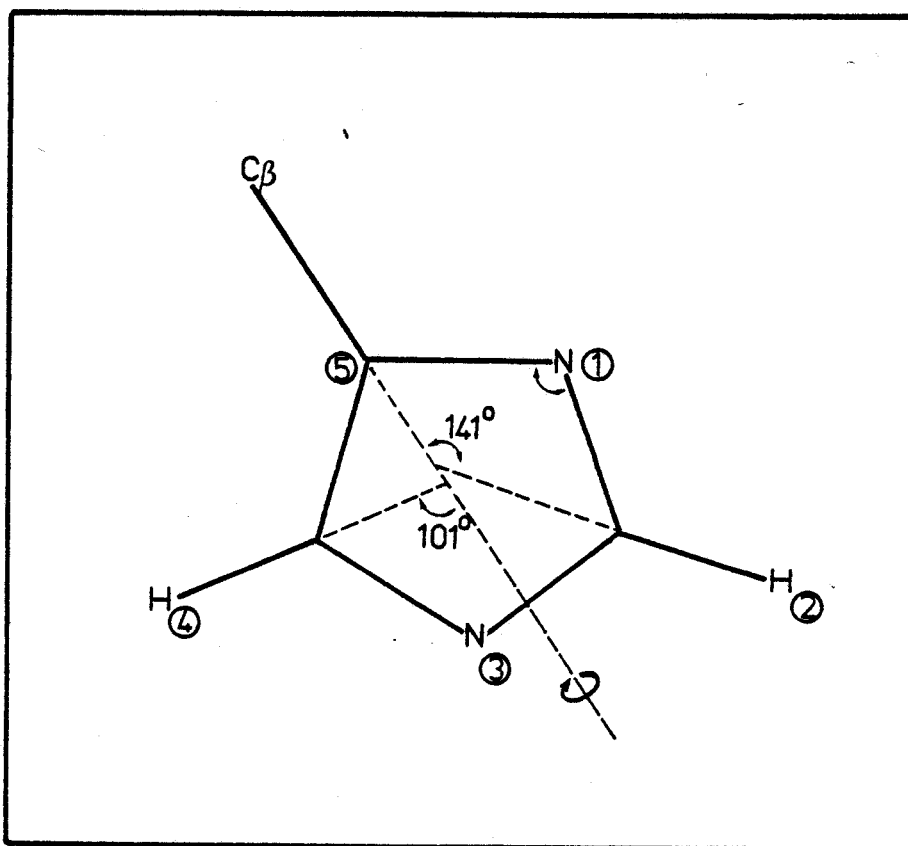


Figure VIII.2. Définition des angles Δ pour l'imidazole de PLH.

VIII.1.c. Distances internucléaires.

En relaxation de ^{13}C nous avons pris comme valeur standard $r_{\text{CH}} = 1,09 \text{ \AA}$. En fait dans la littérature on peut trouver pour des carbones aliphatiques des distances C-H comprises entre 1,08 et 1,10 \AA . Nous avons effectué un calcul avec ces valeurs extrêmes pour montrer l'amplitude des différences induites par cette modification. Il sera présenté dans un paragraphe ultérieur de ce chapitre.

Dans le cas de la relaxation du proton, le problème est un peu plus complexe. La distance entre les deux ^1H d'un groupe méthylène est de 1,78 \AA . C'est une valeur suffisamment grande pour que les contributions des protons portés par les carbones voisins (effets vicinaux) ne puissent être complètement négligées. Cette influence est néanmoins très difficile à estimer. En effet, elle dépend fortement des rotamères existant au niveau de ces liaisons C-C qui ne sont pas connus dans la plupart des cas. De plus cette

interaction est modulée par le mouvement. Une méthode simple destinée à tenir compte de ces contributions vicinales consiste à diminuer légèrement la distance r_{HH} . Afin de ne pas apporter de corrections absurdes, il convient de déterminer la limite inférieure de r_{HH} dans le cas le plus défavorable, c'est-à-dire celui où les contributions vicinales seront maximales. Cette situation est représentée sur la figure VIII.3.

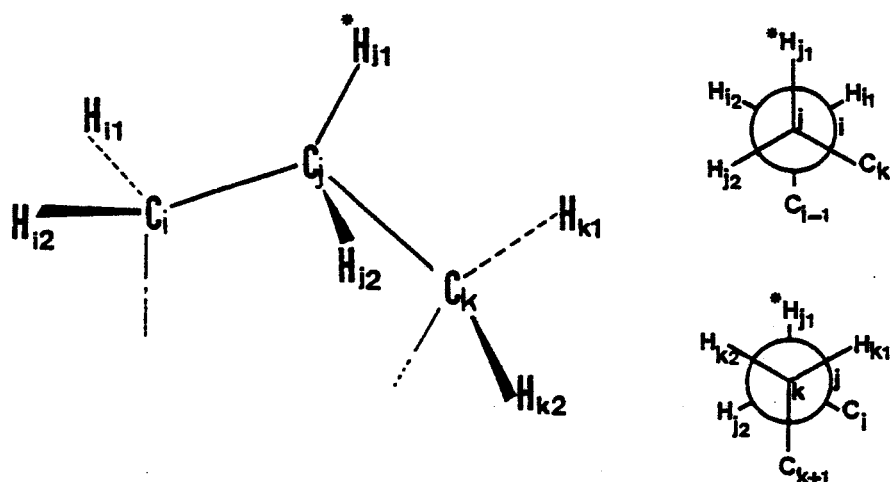


Figure VIII.3. Détermination des contributions vicinales maximales à la relaxation de H_{j1} .

Considérons le proton H_{j1} . Il est relaxé par H_{j2} ($r_{H_{j1}-H_{j2}} = 1,78 \text{ \AA}$) et par les protons vicinaux i et k . La conformation G a été choisie pour les liaisons C_i-C_j et C_j-C_k . Dans cette position bloquée, l'approche des protons vicinaux est optimale. La distance effective r^* pour la relaxation de j_1 sera alors :

$$r_{HH_{j1}}^* = -6 \sqrt{\Sigma r_{H_{j1}H}^{-6}} \quad (\text{VIII.1})$$

Soit dans le cas présent :

$$\Sigma r_{H_{j1}H}^{-6} = r_{H_{j1}H_{j2}}^{-6} + r_{H_{j1}H_{i1}}^{-6} + r_{H_{j1}H_{j2}}^{-6} + r_{H_{j1}H_{k1}}^{-6} + r_{H_{j2}H_{k2}}^{-6} \quad (\text{VIII.2})$$

En utilisant les valeurs classiques d'angles et de longueurs de liaison on obtient $r_{H_{j1}H}^* = 1,650 \text{ \AA}$ à comparer à la valeur de $1,78 \text{ \AA}$ en l'absence de contribution des protons vicinaux. Ceci correspond à une limite inférieure de r_{HH}^* . Le mouvement autour des liaisons

diminue beaucoup l'effet vicinal. La valeur de r'' permettant de simuler les résultats de relaxation de ^1H sera donc un bon critère de l'importance des contributions dipolaires vicinales.

VIII.1.d. Modèles de mouvement.

Le programme utilisé permet de simuler le mouvement de diffusion rotationnelle et tous les modèles de sauts entre sites. Dans le premier cas la réorientation est caractérisée par une constante de diffusion unique alors que dans le second il convient de définir outre les vitesses W_1, W_2 et W_3 l'angle θ entre les sites 2 et 3 équivalents.

Enfin à chaque liaison on peut affecter un modèle de mouvement particulier. La détermination complète des caractéristiques dynamiques d'une chaîne latérale est réalisée liaison par liaison en partant de la chaîne principale.

VIII.2. CRITERES DE SELECTION D'UN TYPE DE MOUVEMENT.

Avant de décrire les modèles cinétiques adoptés il convient de montrer dans quelle mesure les données de relaxation nucléaire permettent de sélectionner de façon quasi-univoque parmi plusieurs éventualités. C'est l'objet de la figure VIII.4 concernant les résultats de relaxation du ^{13}C de C_β de la poly-hydroxypropyl-L-glutamine, donc la réorientation autour de $C_\alpha-C_\beta$.

Nous avons utilisé trois modèles différents :

A : diffusion rotationnelle

B : sauts entre trois sites équivalents $W = W_1 = W_2 = W_3$

C : sauts entre trois positions non équivalentes telles que $W_1/W_2 = 0,167$ et $W_3 = 0$.

On constate que si l'on ne considère qu'une fréquence, ici 22,63 MHz, il est parfaitement possible de simuler la courbe de T_1 avec l'un ou l'autre de ces modèles. En effet on utilise pour le calcul un couple de paramètres, à savoir une vitesse (de diffusion ou de sauts) et une énergie d'activation ΔH . Il existe pratiquement toujours une combinaison de ces deux termes permettant de rendre compte des résultats expérimentaux à une seule fré-

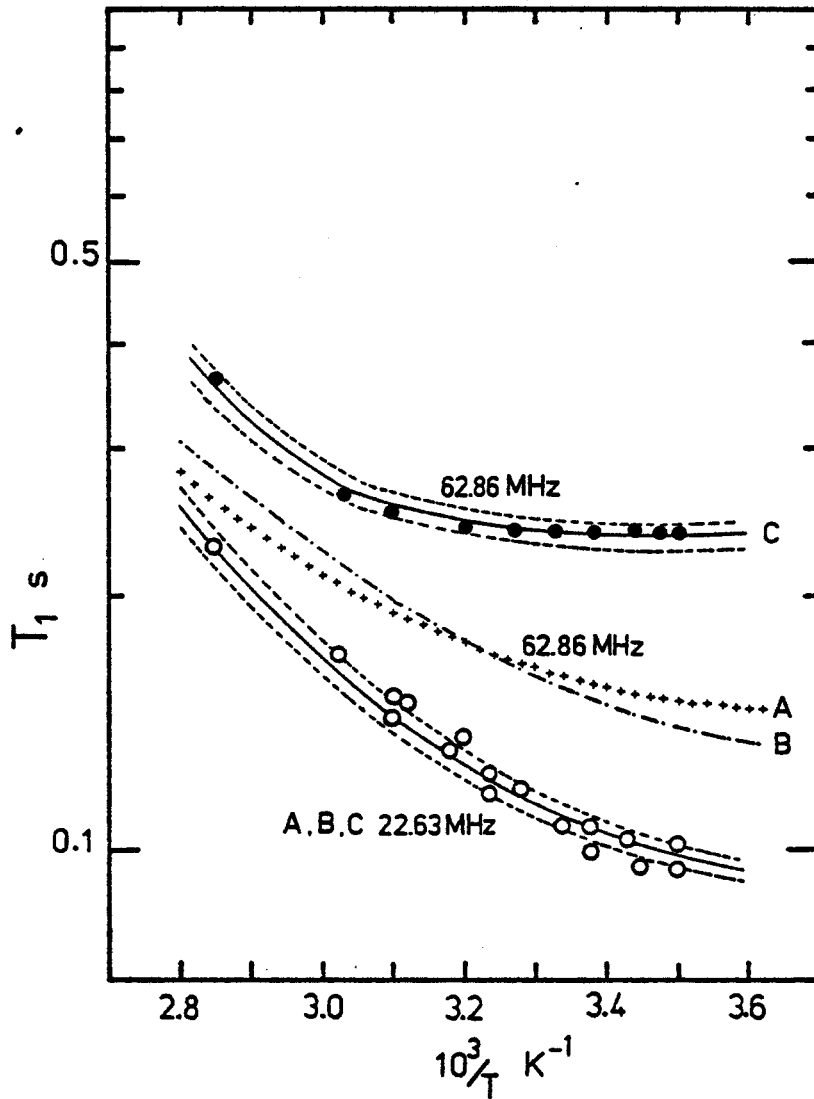


Figure VIII.4. Sélectivité du choix d'un modèle de mouvement. Relaxation de $^{13}C_{\beta}$ de la PHPG à 22,63 MHz (O) et 62,86 MHz (●). Les courbes en traits pleins sont calculées grâce aux modèles A, B et C définis dans le texte. Les pointillés supérieurs et inférieurs représentent les courbes calculées avec $r_{CH} = 1,10 \text{ \AA}$ et $r_{CH} = 1,08 \text{ \AA}$ respectivement.



quence et à plus forte raison à une seule température. Par contre si les combinaisons ainsi définies pour un modèle sont utilisées pour simuler les résultats expérimentaux à une autre fréquence, ici 62,86 MHz, l'accord n'est en général satisfaisant que pour un seul des modèles possibles a priori. Dans le cas présent, seul le modèle C permet de rendre compte à la fois des données expérimentales à deux fréquences de Larmor très distinctes. Il apparaît donc, comme l'avaient suggéré d'autres auteurs /33-35/, que les études dynamiques par RMN et en particulier le choix univoque d'un modèle de réorientation nécessitent l'utilisation de plusieurs fréquences d'observation ou de différents noyaux.

Enfin la figure VIII.4 montre que le choix d'une valeur r_{CH} comprise entre 1,08 et 1,1 Å n'apporte pas de profonde variation aux courbes simulées. L'ajustement avec les données expérimentales pouvant être réalisé par une faible modification des paramètres cinétiques (vitesses de sauts ou de diffusion). Etant donné l'imprécision sur les valeurs de T_1 ($\pm 5\%$) nous avons préféré maintenir r_{CH} à 1,09 Å, cette valeur n'étant jamais connue à mieux que 0,01 Å près.

VIII.3. ETUDE DU COMPORTEMENT DYNAMIQUE DES CHAINES LATÉRALES DU PLGA SOUS FORME NON ORGANISÉE.

Les résultats exposés ici ont déjà été publiés /122/ ; néanmoins certaines améliorations ont été apportées en particulier en ce qui concerne la liaison $C_\beta - C_\gamma$.

III.3.a. Analyse de la réorientation autour de $C_\alpha - C_\beta$ et modèle de présentation des résultats.

La réorientation autour de $C_\alpha - C_\beta$ a été analysée par la relaxation de $^{13}C_\beta$ et de $^1H_\beta$ à deux fréquences très différentes. Les résultats expérimentaux et calculés ainsi que le modèle choisi apparaissent sur les figures VIII.5.a et b.

Les paramètres cinétiques utilisés pour simuler les résultats expérimentaux sont regroupés dans le tableau VIII.1.

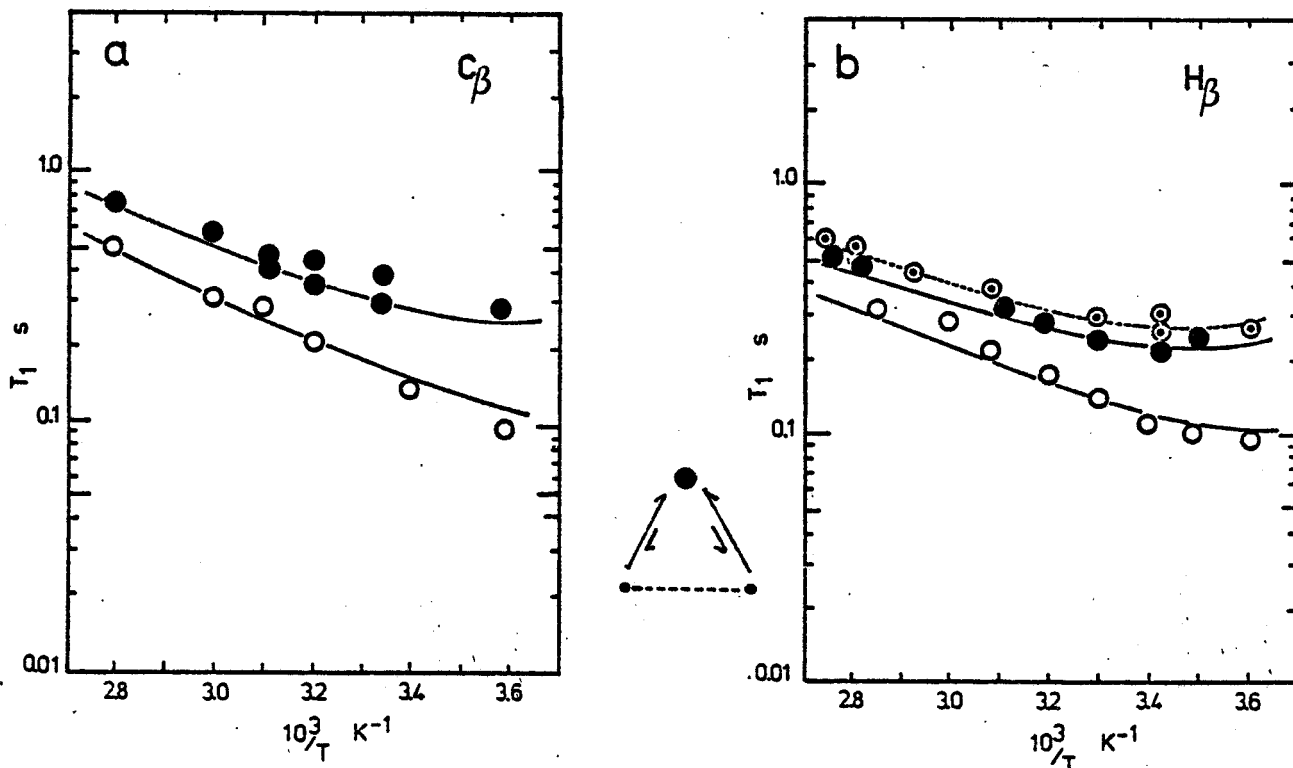


Figure VIII.5. PLGA. Réorientation autour de $C_{\alpha}-C_{\beta}$.

a : NT_1 de $^{13}C_{\beta}$ à 25,2 MHz (○) et 62,86 MHz (●).

b : T_1 de H_{β} à 100 MHz (○) et à 250 MHz pour le PLGA normal (●) et le PLGAYd₂ (⊙).

Les courbes en traits pleins et pointillés sont calculées avec les paramètres du tableau VIII.1.

$W_{1(0)}$ (s ⁻¹)	$W_{2(0)}$ (s ⁻¹)	$W_{3(0)}$ (s ⁻¹)	$v = \frac{W_1}{W_2}$	ΔH_1 (kcal.mole ⁻¹)	θ	$W_1(300 K)$	$W_2(300 K)$	$W_3(300 K)$
1.10^{12}	3.10^{12}	-	1/3	4,6	120°	$4,7.10^8$	$1,4/10^9$	-

Tableau VIII.1

Paramètres cinétiques de la liaison $C_{\alpha}-C_{\beta}$ du PLGA.

$W_{i(0)}$ (i=1, 2, 3) correspond à la valeur extrapolée de W_i pour $10^3/T = 0$. W_i est alors défini pour toute température par la relation :

$$W_i = W_{i(0)} e^{-\Delta H/RT} \quad \text{(VIII.3)}$$



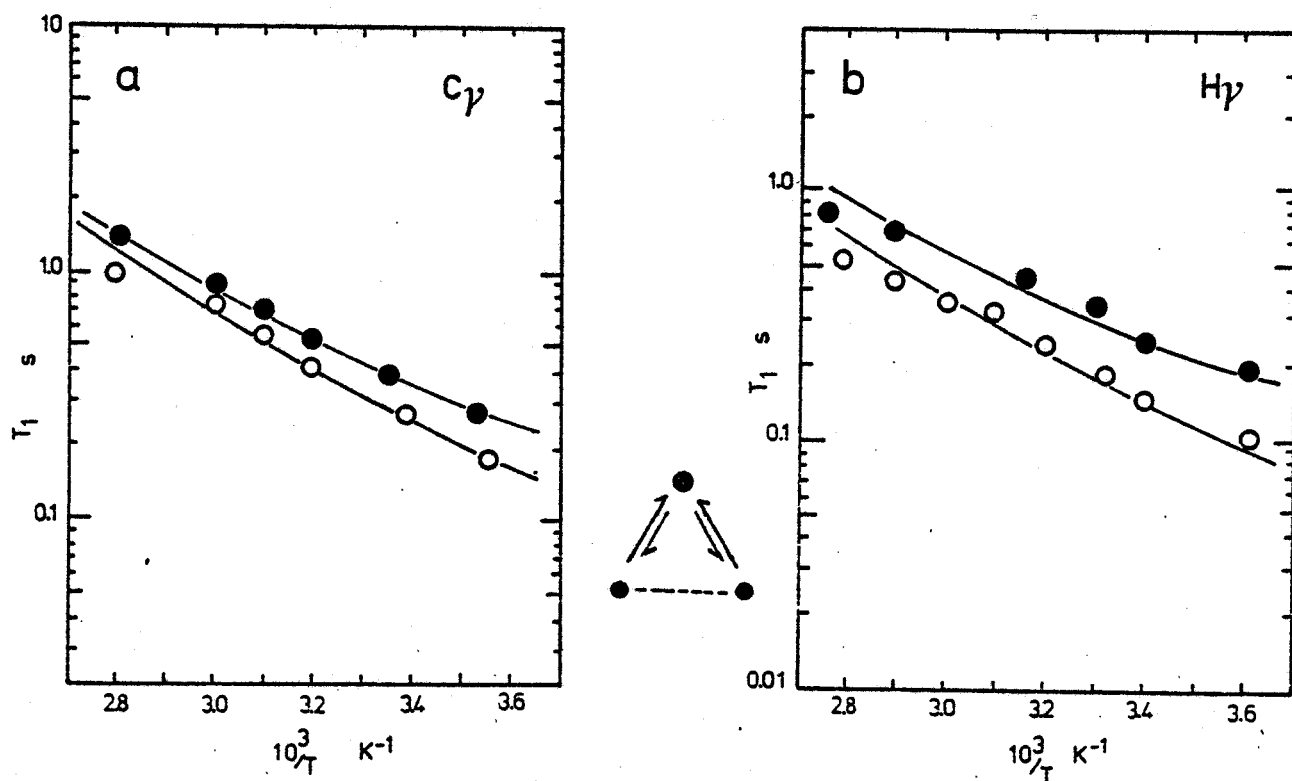


Figure VIII.6. Réorientation autour de $C_\beta-C_\gamma$ du PLGA.

a : NT_1 de $^{13}C_\gamma$ à 25,2 MHz (○) et 62,86 MHz (●)
 PLGA 0,6 M pD = 7,0

b : T_1 de H_γ à 100 (○) et 250 MHz (●), PLGA 0,2 M pD = 7,0

Les lignes continues ont été simulées avec le modèle de sauts dont les paramètres sont regroupés dans le tableau VIII.2.

$W_1(o)$ (s^{-1})	$W_2(o)$ (s^{-1})	$W_3(o)$ (s^{-1})	ν	ΔH_1 (kcal.mole $^{-1}$)	$W_1(300 K)$ (s^{-1})	$W_2(300 K)$ (s^{-1})	$W_3(300 K)$ (s^{-1})	r_{HH}^{\ddagger} (Å)	θ
$7 \cdot 10^{12}$	$4,6 \cdot 10^{12}$	-	0,66	5,0	$1,68 \cdot 10^9$	$1,1 \cdot 10^9$	0	1,750	120°

Tableau VIII.2

Paramètres cinétiques de la réorientation
 autour de $C_\beta-C_\gamma$ du PLGA.



On peut définir trois énergies d'activation :

$$\begin{aligned}\Delta H_1 &\Rightarrow 1 \rightarrow 2, 3 \\ \Delta H_2 &\Rightarrow 2, 3 \rightarrow 1 \\ \Delta H_3 &\Rightarrow 2 \rightarrow 3\end{aligned}\tag{VIII.4}$$

θ est l'angle entre les sites 2 et 3. Les valeurs de W_i à 300 K permettent d'avoir l'ordre de grandeur des vitesses de sauts à température ambiante.

Les mesures de T_1 du proton ont été effectuées soit sur du PLGA normal soit sur l'analogue perdeutééré en γ . Les contributions vicinales à la relaxation de H_β sont évidemment plus faibles dans ce dernier polymère. La simulation des courbes de T_1 de H_β a effectivement été réalisée avec une distance r_{HH} corrigée de 1,73 Å et 1,76 Å pour le PLGA normal et le PLGA $\gamma\gamma d_2$ respectivement.

VIII.3.b. Liaison C_β - C_γ du PLGA.

Les résultats de relaxation de C_γ et H_γ traduisant la réorientation autour de C_β - C_γ apparaissent sur la figure VIII.6.

VIII.3.c. Discussion des résultats.

Seuls les modèles par sauts permettent de rendre compte des résultats expérimentaux de ^{13}C et 1H à deux fréquences. A partir des rapports $v = W_1/W_2$, on peut alors déterminer les populations relatives des sites 1, 2 et 3 (équations (IV.7)) et les comparer aux proportions de rotamères déduites des constantes de couplage 1H (chapitre V). C'est l'objet du tableau VIII.3. On constate un très bon accord entre les deux méthodes. Pour les deux liaisons l'un des rotamères est favorisé. Pour C_α - C_β il s'agit de la forme G'. Bien sûr la relaxation fournit en plus les vitesses d'interconversion et les paramètres thermodynamiques ΔH . Dans le cas présent il n'a pas été nécessaire de faire intervenir la vitesse d'échange W_3 entre les deux sites équivalents 2 et 3. En fait W_3 doit être trop faible pour influencer les paramètres de relaxation de façon appréciable.

Liaison	P ₁	P ₂	P ₃	P	P'	P''
C _α -C _β	0,6	0,2	0,2	0,62	0,24	0,14
C _β -C _γ	0,5	0,25	0,25	0,52	0,30	0,18
	Relaxation			³ J _{HH}		

Tableau VIII.3

Comparaison des conformations locales (pourcentages de rotamères) obtenus par relaxation et par analyse des couplages ¹H pour le PLGA.

Enfin la simulation des courbes expérimentales a pu être réalisée en maintenant $v = W_1/W_2$ constant dans toute la gamme de température étudiée. Ceci implique que la différence entre les barrières de potentiel ΔH_1 (1 → 2,3) et ΔH_2 (2,3 → 1) est très faible. Les valeurs habituellement rencontrées dans la littérature pour une chaîne aliphatique correspondent en effet à $\Delta H_1 - \Delta H_2 \approx 0,5 \text{ kcal.mole}^{-1} / 97/$.

La dynamique complète de la chaîne latérale du PLGA est donc décrite par des mouvements de sauts entre trois positions aussi bien pour C_α-C_β que pour C_β-C_γ. Ces modèles permettent de rendre compte des données de couplages ¹H et de l'ensemble des résultats de relaxation. Les valeurs de r_{HH}^{α} utilisées sont compatibles avec l'environnement des protons considérés. La correction est par exemple plus forte pour C_β (relaxé par trois protons vicinaux) que pour C_γ (subissant seulement l'influence des deux protons β).

VIII.4. ANALYSE DU COMPORTEMENT DYNAMIQUE DES CHAINES LATÉRALES DE LA PHPG /123/

VIII.4.a. Partie glutamyl ($C_{\alpha}-C_{\beta}$ et $C_{\beta}-C_{\gamma}$).

Les méthodes d'étude sont identiques à celles utilisées pour le PLGA. De plus toutes les mesures de relaxation 1H ont été effectuées sur des solutions 0,5 et 0,05 M de polymère dans D_2O . Aucune différence significative n'ayant été détectée, on peut conclure à l'absence d'effets intermoléculaires. Les résultats concernant les liaisons $C_{\alpha}-C_{\beta}$ et $C_{\beta}-C_{\gamma}$ sont respectivement présentés sur les figures VIII.7.a, b et c.

Liaison	$W_{1(o)}$ (s^{-1})	$W_{2(o)}$ (s^{-1})	$W_{3(o)}$ (s^{-1})	ν	θ	ΔH_1 (kcal.mole $^{-1}$)	$W_{1(300 K)}$ (s^{-1})	$W_{2(300 K)}$ (s^{-1})	r_{HH}^* (Å)
$C_{\alpha}-C_{\beta}$	10^{11}	6.10^{11}	-	0,166	120°	3,0	$6,7.10^8$	4.10^9	1,733
$C_{\beta}-C_{\gamma}$	$4,2.10^{12}$	$2,1.10^{12}$	-	2	120°	5,0	1.10^9	5.10^8	1,740

Tableau VIII.7

Paramètres cinétiques permettant la simulation des courbes de relaxation (Fig. VIII.7) de la partie glutamyl de la PHPG.

VIII.4.b. Partie hydroxypropyl de la PHPG.

Liaisons $NH-C_{[1]}$, $C_{[1]}-C_{[2]}$ et $C_{[2]}-C_{[3]}$.

Les résultats de relaxation et les modèles sélectionnés sont présentés sur les figures VIII.8, VIII.9 et VIII.10. Les paramètres permettant la simulation de ces données sont regroupés dans le tableau VIII.5.

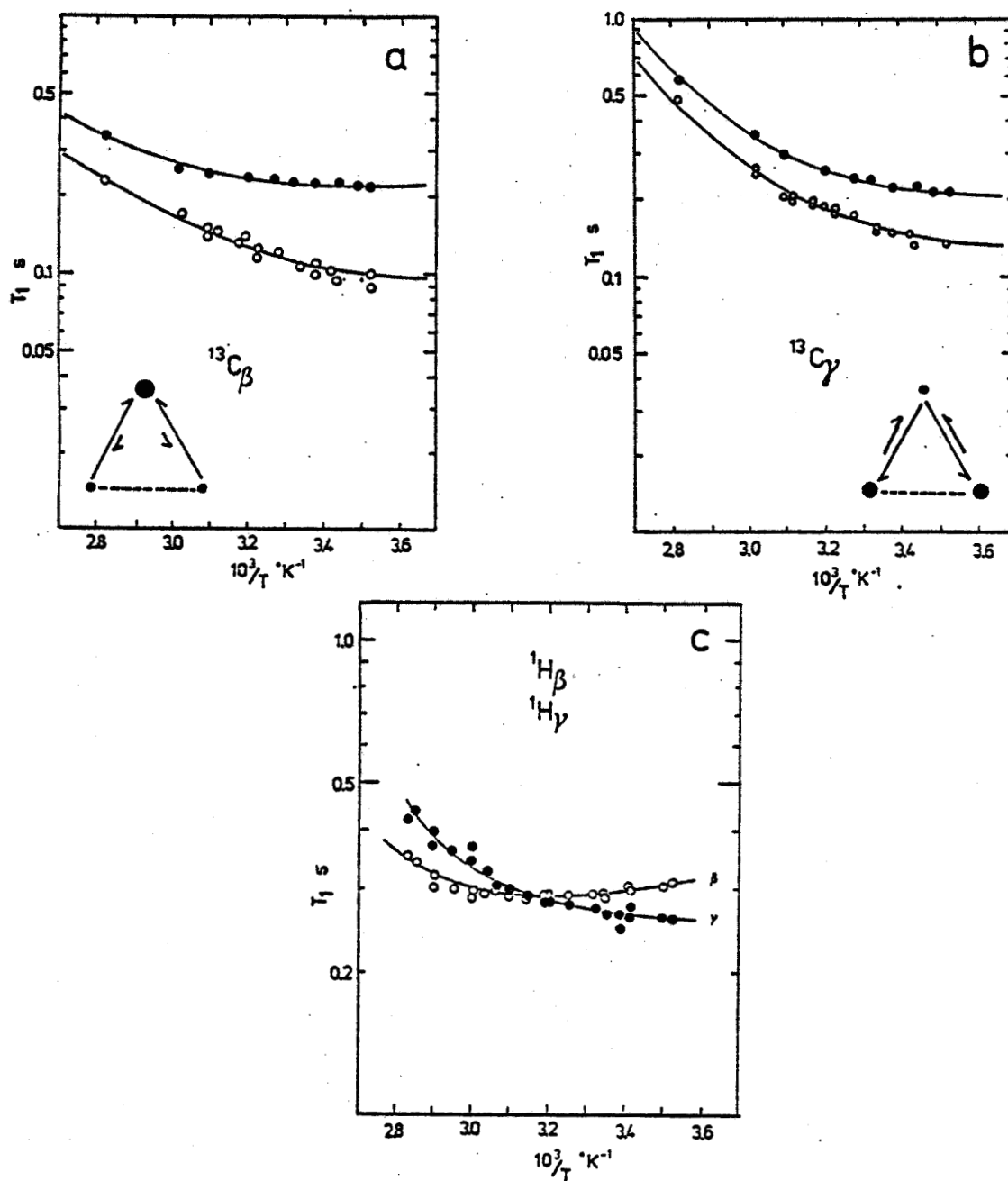


Figure VIII.7

NT_1 de $^{13}C_\beta$ (a) et $^{13}C_\gamma$ (b) à 22,63 MHz (O) et 62,86 MHz (•) pour la PHPG 0,5 M dans D_2O .

c : T_1 de $^1H_\beta$ (O) et $^1H_\gamma$ (•) à 250 MHz pour la PHPG 0,5 M dans D_2O . Les paramètres cinétiques permettant la simulation (courbes en traits pleins) sont regroupés dans le tableau VIII.4.



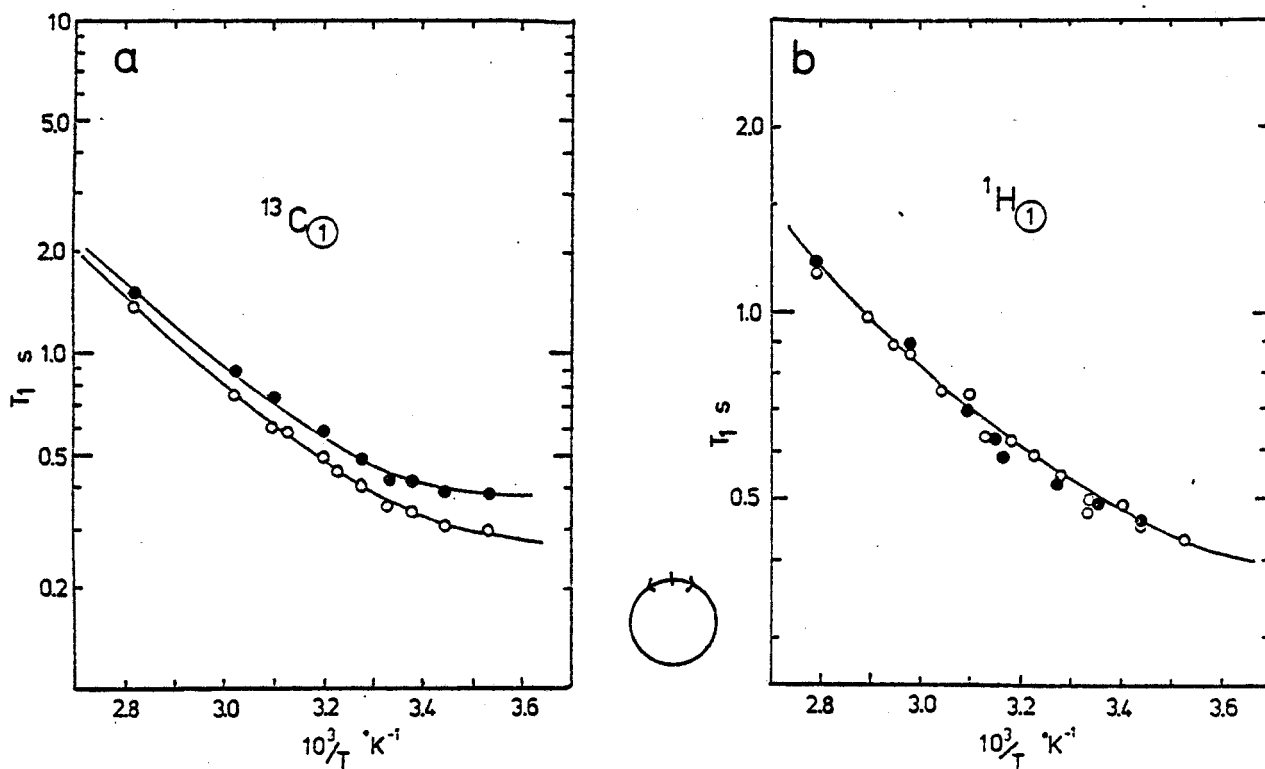


Figure VIII.8. Réorientation autour de NH-C_[1] de la PHPG.

- a : NT₁ de ¹³C_[1] à 22,63 MHz (○) et 62,86 MHz (●)
 PHPG 0,5 M dans D₂O.
 b : T₁ de ¹H_[1] à 250 MHz pour des solutions 0,5 M (○) et
 0,05 M (●) de PHPG dans D₂O.

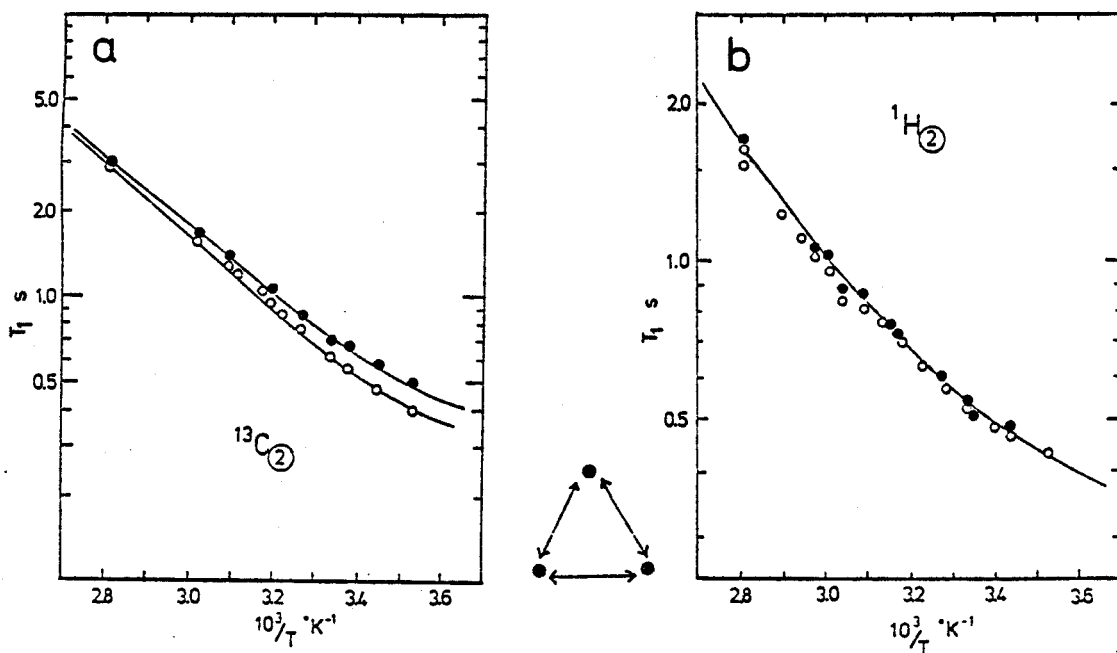


Figure VIII.9. Réorientation autour de C_[1]-C_[2] de la PHPG.

- a : NT₁ de ¹³C_[2] à 22,63 MHz (○) et 62,86 MHz (●)
 PHPG 0,5 M dans D₂O.
 b : T₁ de ¹H_[2] à 250 MHz. PHPG 0,5 M (○) et 0,05 M (●) dans D₂O.



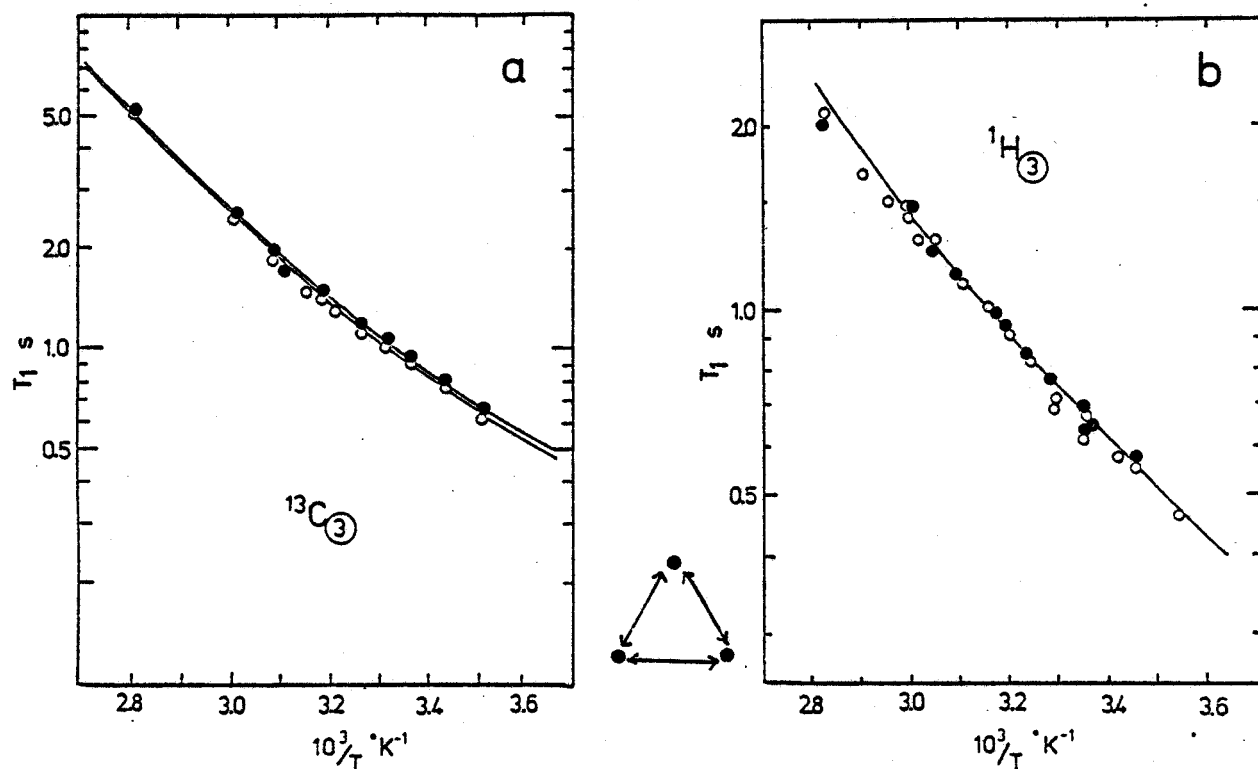


Figure VIII.10. Réorientation autour de C_[2]-C_[3] de la PHPG.

a : NT₁ de ¹³C_[3] à 22,63 MHz (○) et 62,86 MHz (●) PHPG 0,5 M dans D₂O.
 b : T₁ de ¹H_[3] à 250 MHz. PHPG 0,5 M (○) et 0,05 M (●) dans D₂O.

Liaison	W ₁ (o) (s ⁻¹)	W ₂ (o) (s ⁻¹)	W ₃ (o) (s ⁻¹)	ΔH (kcal. mole ⁻¹)	θ	v	W ₁ (300 K) (s ⁻¹)	W ₂ (300 K) (s ⁻¹)	W ₃ (300 K) (s ⁻¹)	r _{HH} [*] (Å)
NH-C _[1]	4,4.10 ¹³	-	-	6,0	-	-	2.10 ⁹	-	-	1,76
C _[1] -C _[2]	5,6.10 ¹³	5,6.10 ¹³	5,6.10 ¹³	5,9	120°	1	3.10 ⁹	3.10 ⁹	3.10 ⁹	1,735
C _[2] -C _[3]	4,4.10 ¹³	4,4.10 ¹³	5,6.10 ¹³	6,0	120°	1	2.10 ⁹	2.10 ⁹	2.10 ⁹	1,76

Tableau VIII.5

Paramètres cinétiques de la partie hydroxypropyl de la PHPG.
 Pour la liaison N-C_[1], W₁ représente la constante
 de diffusion rotationnelle.



VIII.4.c. Discussion des résultats.

Liaison	Relaxation			$^3J_{HH}$		
	P_1	P_2	P_3	P	P'	P''
$C_\alpha-C_\beta$	0,75	0,125	0,125	0,63	0,13	0,24
$C_\beta-C_\gamma$	0,20	0,40	0,40	0,20	0,40	0,40
$C_{[1]}-C_{[2]}$	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
$C_{[2]}-C_{[3]}$	0,33	0,33	0,33	0,35	0,35	0,30

Tableau VIII.6

Comparaison des populations des sites 1, 2 et 3 obtenues par relaxation nucléaire et des pourcentages de rotamères P, P' et P'' issues de l'analyse des couplages $^3J_{HH}$ pour la PHPG sous forme désordonnée dans D_2O .

Le tableau VIII.6 montre que les résultats de relaxation sont globalement en accord avec les données de couplages vicinaux. La plus grande différence existe au niveau de $C_\alpha-C_\beta$. Néanmoins la tendance à un site très favorisé est identique par les deux méthodes. Les différences observées peuvent être aussi bien dues à l'imprécision des mesures de T_1 qu'à l'incertitude existant toujours sur la validité absolue de la relation semi-empirique de Karplus utilisée pour l'analyse des couplages.

Alors que la réorientation à l'intérieur des fragments glutamyl et hydroxypropyl s'effectue exclusivement par sauts entre sites privilégiés le mouvement global de $C_{[1]}-C_{[2]}-C_{[3]}$ peut être décrit par une simple rotation diffusionnelle. Il existe en effet trois liaisons entre C_γ et $C_{[1]}$ et la rotation est possible pour

deux d'entre elles (C_γ -CO et $NH-C_{[1]}$). Même si pour chacune de ces liaisons la réorientation s'effectue entre sites privilégiés la combinaison de ces deux mouvements conduit à un modèle proche d'une diffusion rotationnelle. Il n'est pas possible d'extraire les deux composantes dues à C_γ -CO et $NH-C_{[1]}$ car la relaxation de CO n'est pas directement analysable. Ce carbone non protoné est sans doute soumis à des mécanismes de relaxation non entièrement dipolaires. De plus la raie ^{13}C de CO n'est séparée de celle du carbonyle du squelette qu'au-dessus de 330 K à 63 MHz. L'existence de cette fonction amide rigide provoque un découplage des mouvements respectifs des parties glutamyl et hydroxypropyl. Le comportement est analogue à celui d'une charnière. Ceci permet d'expliquer la grande différence de largeurs de raies observée sur les spectres 1H à 250 MHz (cf. Fig. V.2).

Les valeurs de ΔH obtenues montrent que la réorientation est facile en particulier pour la liaison C_α - C_β . Les vitesses de sauts, ou de diffusion rotationnelles, sont relativement constantes le long de toute la chaîne. On peut toutefois constater que l'on n'observe pas de gradient net de mobilités locales croissant vers l'extrémité de la chaîne comme c'est souvent le cas avec les hydrocarbures /61-65/. Au contraire l'analyse des vitesses de sauts (à 300 K par exemple) montre que W_1 est plus faible pour $C_{[1]}-C_{[2]}$ que pour $C_{[2]}-C_{[3]}$. Les valeurs de W sont ici directement comparables car les modèles cinétiques sont identiques pour ces deux liaisons. Ce phénomène peut être expliqué par l'hydratation du groupe hydroxyméthyl $C_{[3]}H_2OH$ terminal. L'effet d'inertie dû aux molécules d'eau solvatant l'extrémité de la chaîne conduit à une mobilité intrinsèque plus faible autour de $C_{[2]}-C_{[3]}$ que pour la liaison $C_{[1]}-C_{[2]}$.

Enfin une dernière constatation rassurante peut être faite concernant les valeurs corrigées r_{HH}^{**} utilisées pour simuler les résultats de relaxation protonique.

	β	γ		[1]	[2]	[3]	
C_α	-	CH_2	-	CH_2	-	CONH	-
	CH_2	-	CH_2	-	CH_2	-	CH_2
							OH
r_{HH}^{**}	1,733	1,74		1,76	1,735	1,76	

La correction apportée reflète bien l'environnement des protons considérés. Elle est par exemple plus importante pour $^1\text{H}_{[2]}$ entourés de quatre protons vicinaux que pour $^1\text{H}_{[1]}$ ou $^1\text{H}_{[3]}$ par ailleurs similaires.

VIII.5. DYNAMIQUE CONFORMATIONNELLE DES CHAINES LATERALES DE LA POLY-L-LYSINE NON ORDONNEE /124/.

VIII.5.a. Résultats expérimentaux.

Les mesures de T_1 de ^{13}C et de NOE ^{13}C ont été effectuées à l'aide de solutions 0,5 - 0,6 M en PLL à pD = 7 dans D_2O . Dans ces conditions la PLL est à 100% sous forme de chaîne statistique /125/. En ce qui concerne les études de relaxation ^1H la concentration est de 0,2 M dans les mêmes conditions de pD. Le T_1 des protons à 100 MHz n'a pu être obtenu que pour H_γ et H_ϵ . Les massifs H_β et H_δ ne sont en effet pas séparés à cette fréquence.

Les résultats apparaissent sur les figures VIII.11 à VIII.14. Les paramètres cinétiques utilisés pour les simulations sont regroupés dans le tableau VIII.7.

Liaison	$W_1(o)$ (s^{-1})	$W_3(o)$ (s^{-1})	ν	θ	ΔH_1	ΔH_3	$W_1(300\text{K})$ (s^{-1})	$W_3(300\text{K})$ (s^{-1})	T_{HH}^*
					(kcal.mole $^{-1}$)				
$\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$	$2,5 \cdot 10^{15}$	$5 \cdot 10^{12}$	2	120°	10,6	4,0	$5,3 \cdot 10^7$	$6,3 \cdot 10^9$	1,738
$\text{C}_\beta\text{-C}_\gamma$	$5 \cdot 10^{11}$	-	0,5	120°	3,5	-	$1,46 \cdot 10^7$	-	1,73
$\text{C}_\gamma\text{-C}_\delta$	$1,2 \cdot 10^{14}$	$2,5 \cdot 10^{14}$	2	120°	10,9	5,8	$1,54 \cdot 10^6$	$1,58 \cdot 10^{10}$	1,725
$\text{C}_\delta\text{-C}_\epsilon$	$1,2 \cdot 10^{13}$	$7 \cdot 10^{15}$	2	120°	10,9	8,2	$1,54 \cdot 10^5$	$8,1 \cdot 10^9$	1,74

Tableau VIII.7

Paramètres cinétiques de la chaîne latérale de la PLL sous forme désordonnée.

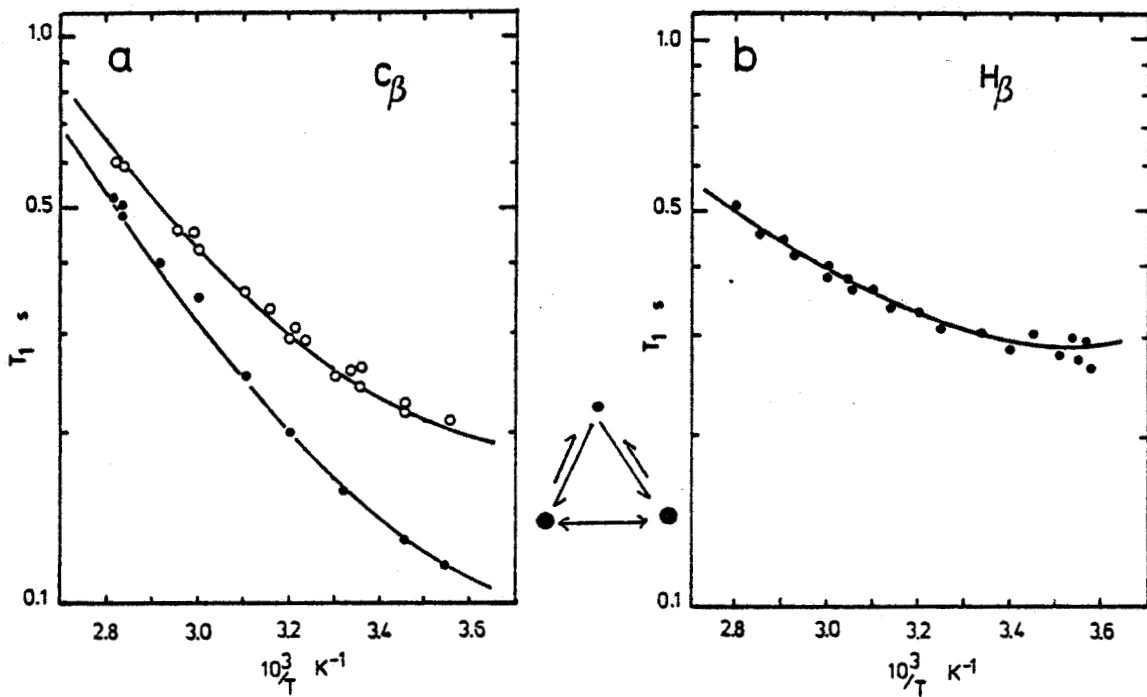


Figure VIII.11. Réorientation autour de $C_\alpha-C_\beta$.

a : NT_1 de $^{13}C_\beta$ à 22,63 MHz (•) et 62,86 MHz (O).

b : T_1 de H_β à 250 MHz (•).

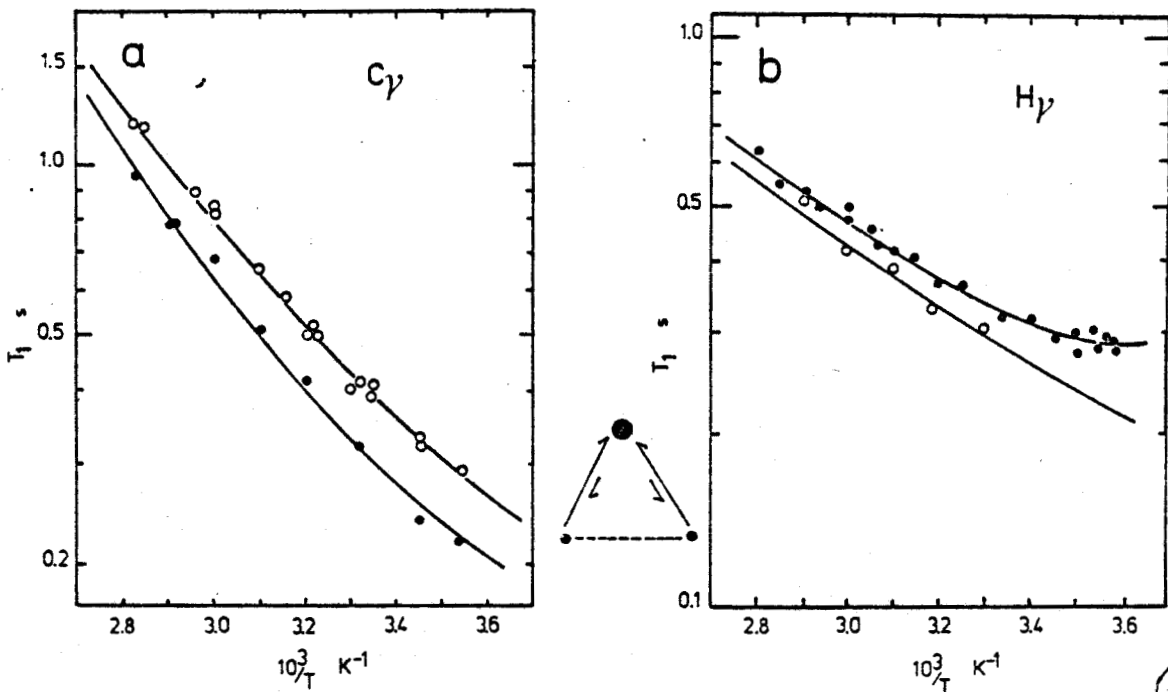


Figure VIII.12. Réorientation autour de $C_\beta-C_\gamma$ pour la PLL.

a : NT_1 de $^{13}C_\gamma$ à 22,63 MHz (•) et 62,86 MHz (O).

b : T_1 de H_γ à 100 MHz (O) et 250 MHz (•).

BUS
LILLE

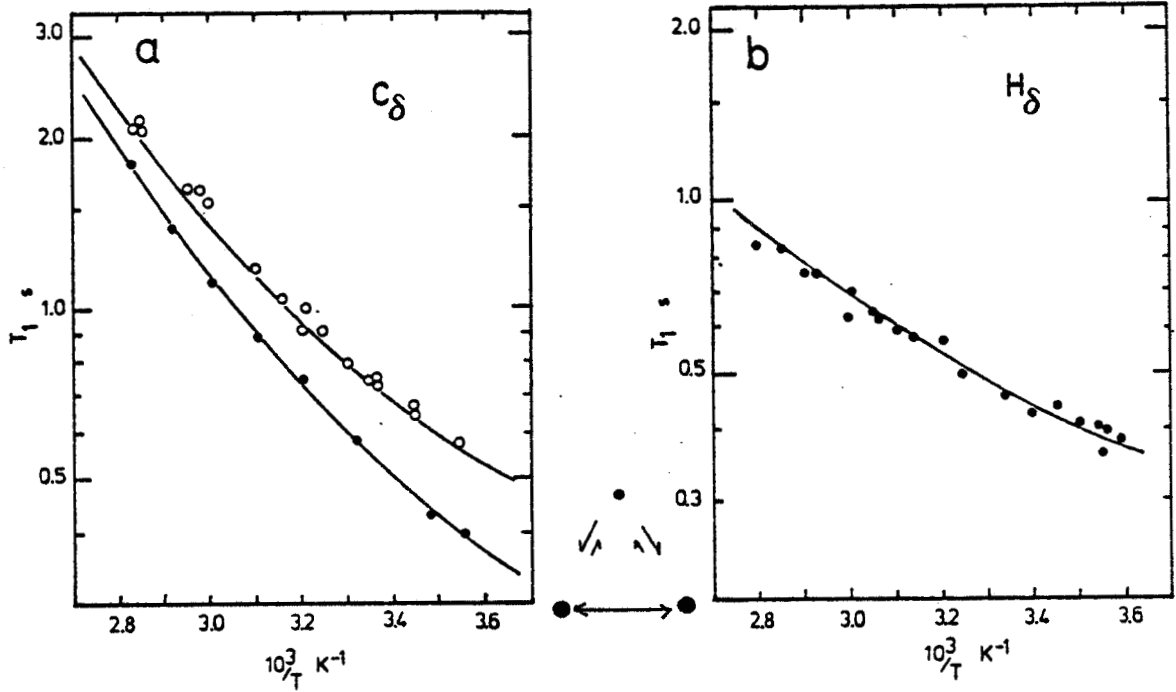


Figure VIII.13. Réorientation autour de C_γ - C_δ pour la PLL.
 a : NT_1 de $^{13}C_\delta$ à 22,63 MHz (●) et 62,86 MHz (○).
 b : T_1 de $^1H_\delta$ à 250 MHz (●).

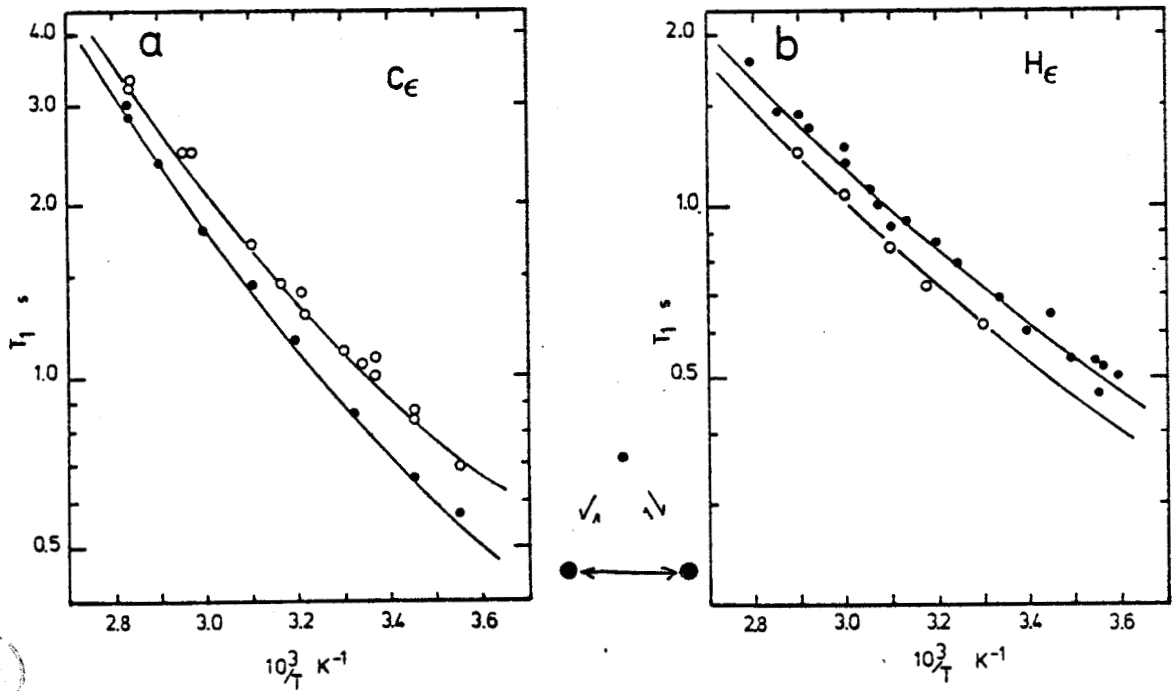


Figure VIII.14. Réorientation autour de C_δ - C_ϵ pour la PLL.
 a : NT_1 de $^{13}C_\epsilon$ à 22,63 MHz (●) et 62,86 MHz (○).
 b : T_1 de $^1H_\epsilon$ à 100 MHz (○) et 250 MHz (●).

Les paramètres définis dans le tableau VIII.7 nous ont également permis de calculer les valeurs théoriques de l'effet Overhauser nucléaire ^{13}C à 22,63 MHz. La comparaison aux résultats expérimentaux apparaît dans le tableau VIII.8 pour deux températures.

$10^3/T = 3,0$	C_β	C_γ	C_δ	C_ϵ
1 + η calculé	2,66	2,81	2,85	2,90
1 + η observé	$2,65 \pm 0,05$	$2,8 \pm 0,05$	$2,86 \pm 0,05$	$2,90 \pm 0,05$
$10^3/T = 3,5$				
1 + η calculé	2,38	2,43	2,47	2,55
1 + η observé	$2,4 \pm 0,05$	$2,45 \pm 0,05$	$2,48 \pm 0,05$	$2,6 \pm 0,05$

Tableau VIII.8

Comparaison des valeurs observées de l'effet Overhauser ^{13}C à 22,63 MHz et calculées grâce aux paramètres du tableau VIII.7.

Les énergies d'activation ΔH_1 et ΔH_3 sont obtenues en traçant le diagramme d'Arrhénius pour les différentes valeurs de W_i en fonction de $10^3/T$. Dans le cas de la PLL les courbes ont été simulées à quatre valeurs de température. Un exemple de ce type de diagramme est donné sur la figure VIII.15 pour les vitesses W_1 .

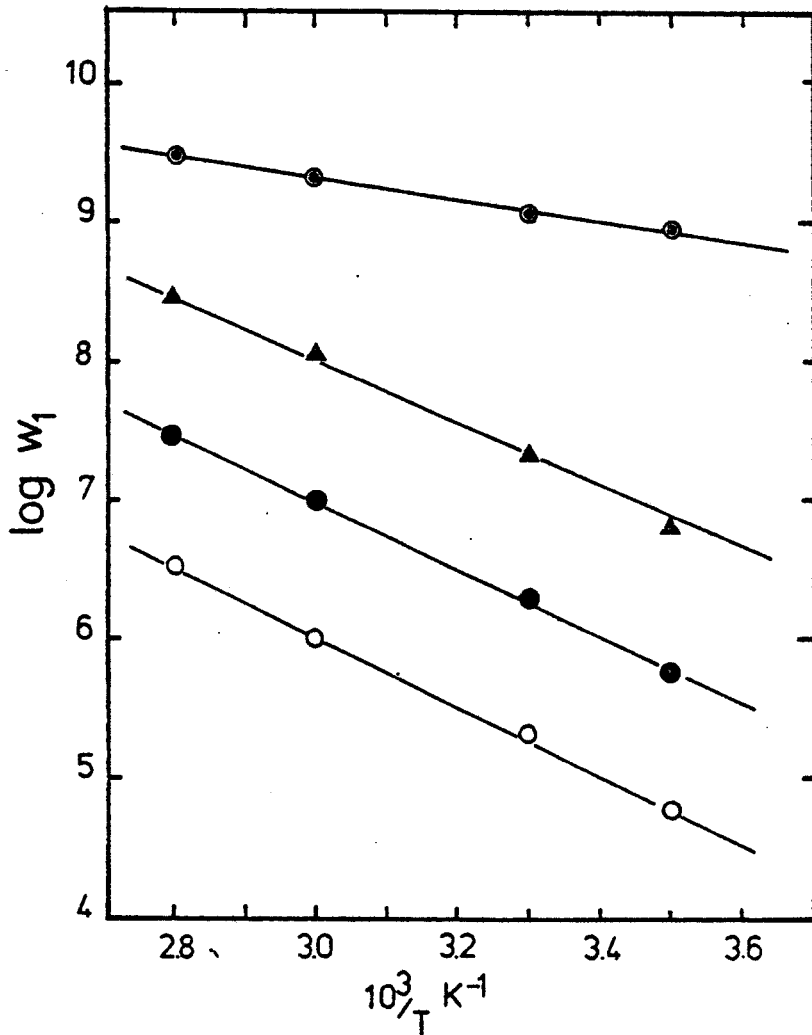


Figure VIII.15. Diagramme d'Arrhénius des vitesses de sauts W_1 pour les liaisons $C_\alpha-C_\beta$ (\blacktriangle) $C_\beta-C_\gamma$ (\odot), $C_\gamma-C_\delta$ (\bullet) et $C_\delta-C_\epsilon$ (\circ) de la PLL.



III.5.b. Discussion des résultats.

Liaison	Relaxation			$^3J_{HH}$		
	P ₁	P ₂	P ₃	P	P'	P''
C _α -C _β	0,2	0,4	0,4	0,19	0,49	0,32
C _β -C _γ	0,5	0,25	0,25	0,48	0,35	0,17
C _γ -C _δ	0,2	0,4	0,4	0,18	0,41	0,41
C _δ -C _ε	0,2	0,4	0,4	0,10	0,45	0,45

Tableau VIII.9

Comparaison des populations des sites 1, 2 et 3 déduites des modèles cinétiques et des pourcentages de rotamères (P, P' et P'') obtenus par analyse des couplages vicinaux $^3J_{HH}$ pour la poly-L-lysine.

On constate un accord assez satisfaisant entre les données de relaxation et des couplages 1H . Les populations de rotamères autour de C_α-C_β pourraient conduire à envisager deux modèles cinétiques, avec la restriction P₂ = P₃ qui sont (0,25 ; 0,50 ; 0,25) et (0,20 ; 0,40 ; 0,40). En réalité les résultats de relaxation ne peuvent être correctement simulés qu'avec le second système correspondant à v = 2.

L'analyse de la chaîne latérale de la PLL nécessite l'utilisation de modèles plus complexes que ceux rencontrés jusqu'à présent avec en particulier l'introduction de W₃. Le caractère singulier du comportement de cette chaîne est d'ailleurs visible directement sur les diagrammes de relaxation ^{13}C à deux fréquences. Dans la plupart des cas (PHPG par exemple) on observe une diminution rapide de l'écart entre les courbes de T₁ ^{13}C à 22,63 et 62,86 MHz au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la chaîne principale, c'est-à-dire que la mobilité effective croît.

Ce comportement est théoriquement prévisible car on se rapproche des conditions de rétrécissement extrême pour lesquelles les effets de fréquence disparaissent. Au contraire, avec la PLL, même au niveau de C_ϵ l'écart entre les T_1 à 23 et 63 MHz reste très important. Enfin la valeur de $^3J_{H_\delta-H_\epsilon}$ est très différente de celle observée pour le couplage $H_{[2]}-H_{[3]}$ de la PHPG par exemple (7,6 Hz contre 6,5 Hz) traduisant l'existence de conformations préférentielles autour de $C_\delta-C_\epsilon$.

A l'exception de $C_\beta-C_\gamma$ pour laquelle le comportement est classique (W_3 très faible) les autres liaisons se réorientent préférentiellement entre deux sites équivalents (2 et 3). Le passage au site 1 est limité par des barrières d'énergie potentielle très importantes ($\Delta H_1 > 10 \text{ kcal.mole}^{-1}$).

Enfin on n'observe pratiquement pas de gradient de mobilité locale le long de la chaîne comme c'est le cas avec les systèmes purement aliphatiques /126-127/. La vitesse de réorientation autour de $C_\delta-C_\epsilon$ est même dix fois plus faible que celle autour de $C_\gamma-C_\delta$ à 300 K. Cette inertie très importante au niveau de $C_\delta-C_\epsilon$ est vraisemblablement due à la très importante solvatation du groupe ammonium terminal de la poly-L-lysine /128-129/. L'hydratation particulièrement forte de la PLL sur le ϵNH_3^+ permet d'ailleurs d'expliquer le comportement singulier de la chaîne latérale qui apparaît beaucoup moins flexible qu'un segment hydrocarboné de même longueur /127/. On peut en effet considérer qu'il existe deux régions hydratées sur la PLL. D'une part le squelette macromoléculaire grâce aux liaisons peptidiques polaires et d'autre part l'extrémité de la chaîne latérale. Cette dernière se trouve alors ancrée entre deux zones polaires de mobilité restreinte, d'une part la chaîne principale et de l'autre le groupe NH_3^+ chargé d'un cortège de molécules d'eau. On conçoit alors que l'ensemble hydrophobe $C_\beta C_\gamma C_\delta C_\epsilon$ adopte une conformation particulière et un mode de réorientation singulier avec en particulier absence de gradient de mobilité et faible flexibilité. L'existence de cette conformation particulière est d'ailleurs confirmée par les corrections de distance r_{HH}^* utilisées. Elles sont plus importantes que celles rencontrées jusqu'à présent surtout pour H_δ et H_ϵ et traduisent l'existence de contributions vicinales importantes liées à la mobilité restreinte.

Cet exemple montre l'importance des phénomènes d'hydratation. Les calculs conformationnels qui en règle générale ne tiennent pas compte de la solvation peuvent ainsi conduire à des résultats douteux.

VIII.6. ANALYSE DU COMPORTEMENT DYNAMIQUE DES CHAINES LATÉRALES DE LA POLY-L-HISTIDINE.

Toutes les mesures présentées ici ont été effectuées avec des solutions 0,4 M en poly-L-histidine dans D_2O (pD=3,0) pour ^{13}C et 1H et dans H_2O (pH=3,0) pour la relaxation du deutérium. L'analyse du mouvement d'ensemble du cycle imidazole a été réalisée par simulation des courbes de relaxation des carbones $C_{[2]}$ et $C_{[4]}$ à deux fréquences et de la variation de largeur de raie du deutérium fixé sélectivement à $C_{[2]}$.

VIII.6.a. Résultats expérimentaux.

Les figures VIII.16 et VIII.17 montrent les résultats de relaxation et les courbes simulées grâce aux paramètres cinétiques regroupés dans le tableau VIII.10.

VIII.6.b. Discussion des résultats.

Le modèle par sauts défini pour la liaison $C_\alpha-C_\beta$ conduit à des populations de sites ($P_1=0,6$; $P_2=P_3=0,2$) en accord avec les proportions de rotamères déduites des couplages vicinaux $^3J_{HH}$ ($P=0,62$; $P'=0,20$; $P''=0,18$). La réorientation obéit à un modèle classique pour une liaison $C_\alpha-C_\beta$ avec un rotamère très favorisé. Les résultats de relaxation de ^{13}C et de 2H du cycle imidazole nous conduisent à envisager une réorientation par sauts entre deux sites à 90° l'un de l'autre. Ce modèle est assez semblable à celui envisagé pour les cycles aromatiques de poly-4-vinyl-pyridine /54/.

La vitesse de réorientation autour de $C_\alpha-C_\beta$ est relativement faible. Cela est d'ailleurs prévisible car les valeurs de NT_1 de $^{13}C_\beta$ sont très peu différentes de celles de $^{13}C_\alpha$ indiquant une contribution peu importante du mouvement local $C_\alpha-C_\beta$. Cette réorientation est en outre défavorisée par une énergie d'activation assez importante.

Liaison	$W_1(o)$ (s^{-1})	$W_3(o)$ (s^{-1})	v	θ	ΔH_1	ΔH_3	$W_1(300\text{ K})$ (s^{-1})	$W_3(300\text{ K})$ (s^{-1})	T_{HH}^* (\AA)
					(kcal.mole^{-1})				
$C_\alpha-C_\beta$	5.10^{12}	-	0,33	120°	7,0	-	$4,2.10^7$	-	1,74
$C_\beta\text{-cycle}$	-	10^{12}	≈ 0	90°	-	3,8	0	$1,7.10^9$	-

Tableau VIII.10

Paramètres cinétiques de la chaîne latérale de la poly-L-histidine.

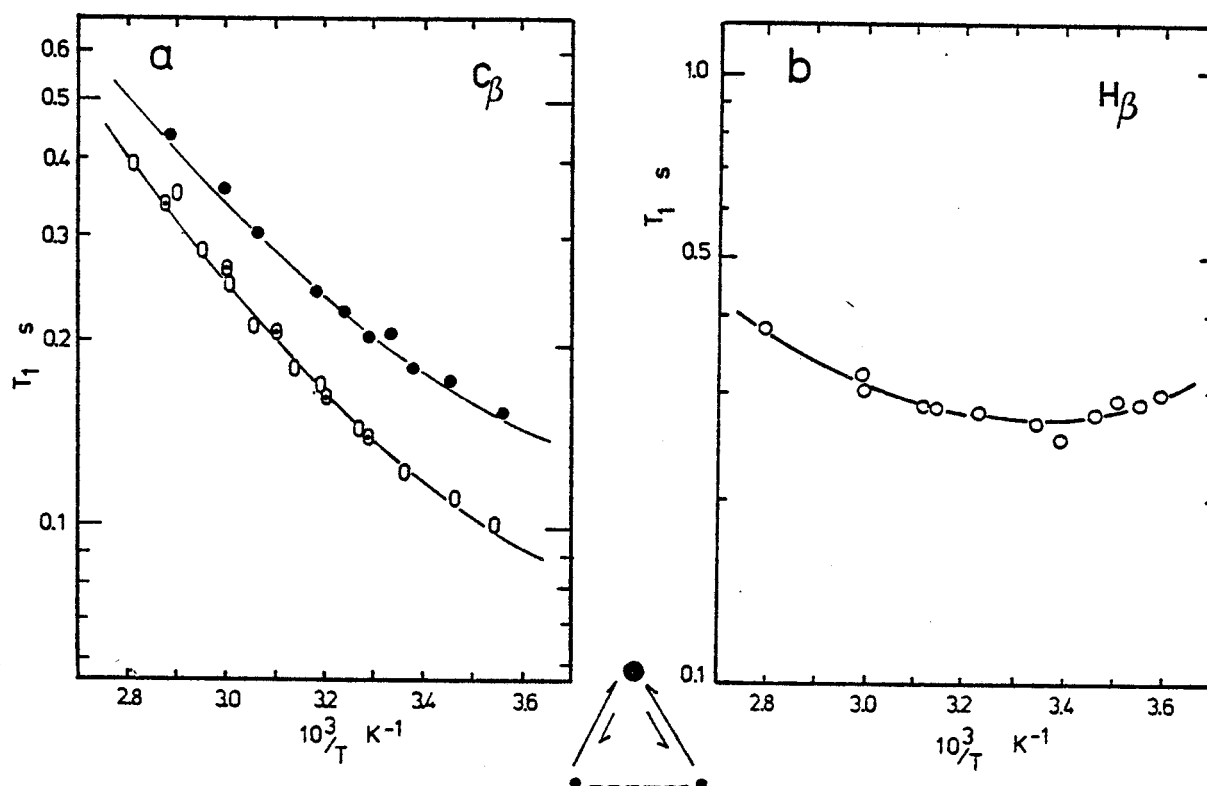


Figure VIII.16. Réorientation autour de $C_\alpha-C_\beta$ de la PLH.

a : NT_1 de $^{13}C_\beta$ à 20 MHz (θ) 22,63 MHz (0) et 62,86 MHz (\bullet).
 b : T_1 de $^1H_\beta$ à 250 MHz.

BUS
LILLE

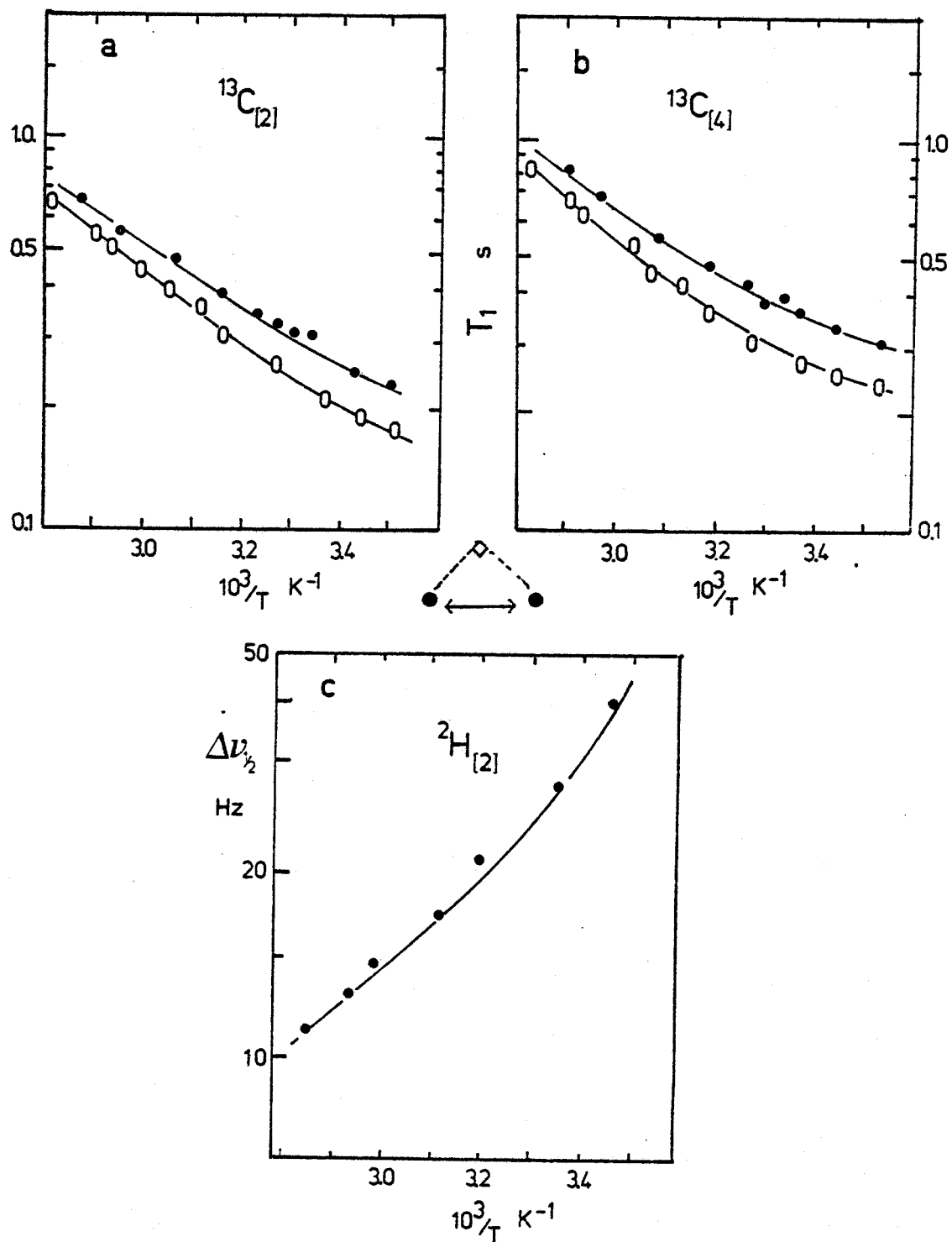


Figure VIII.17. Réorientation autour de $\text{C}_\beta\text{-C}_{[5]}$ (imidazole).

- a : NT_1 de $^{13}\text{C}_{[2]}$ à 22,63 MHz (O) et 62,86 MHz (●).
 b : NT_1 de $^{13}\text{C}_{[4]}$ à 22,63 MHz (O) et 62,86 MHz (●).
 c : $\Delta\nu_{1/2}$ de $^2\text{H}_{[2]}$ à 13,80 MHz.



Au contraire le mouvement du cycle imidazole autour de $C_{\beta}-C_{[5]}$ est environ quarante fois plus rapide que celui de $C_{\alpha}-C_{\beta}$ à 300 K. Bien que d'amplitude limitée la mobilité est favorisée par une faible barrière de potentiel ($3,8 \text{ kcal.mole}^{-1}$). Il apparaît donc que le mouvement de la chaîne latérale de la PLH est essentiellement le fait de la réorientation rapide du cycle.

On peut proposer un modèle conformationnel pour rendre compte de la restriction de mobilité du cycle. Elle peut avoir pour origine une interaction entre $H_{\beta}H_{\beta}$, et le proton $H_{[4]}$ de l'imidazole. Dans ces conditions la seule conformation possible est représentée sur la figure VIII.18.

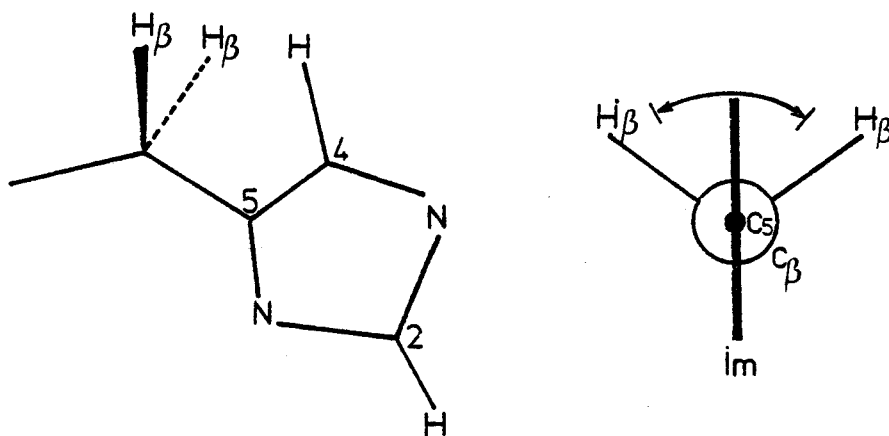


Figure VIII.18. Modèle conformationnel de la réorientation de l'imidazole de la PLH.

VIII.7. ETUDE COMPARATIVE DES DIVERSES CHAINES LATERALES ET CONCLUSIONS.

Nous avons représenté sur la figure VIII.18 la récapitulation schématisée des divers modèles de réorientation adoptés pour les chaînes latérales des quatre polypeptides étudiés.

Dans l'immense majorité des cas, la réorientation s'effectue entre deux ou trois sites. Le seul cas de rotation diffusionnelle rencontré correspond en fait à la combinaison de deux types de mouvements indéfinis dont la résultante est proche d'un modèle de diffusion ($C_{[1]}$ de PHPG).

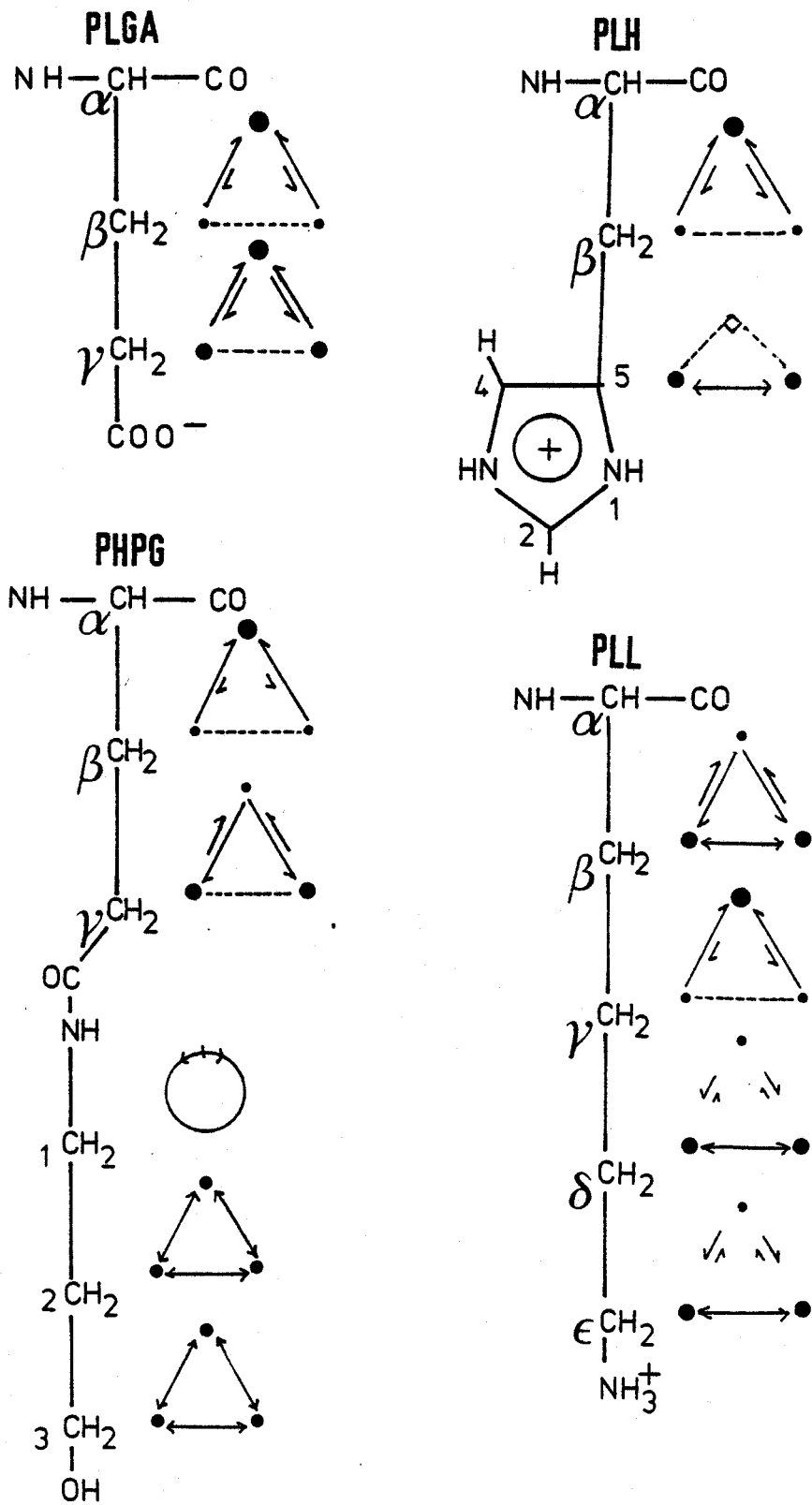


Figure VIII.18. Récapitulation des modèles de mouvement des chaînes latérales.

L'analyse développée par les méthodes de relaxation nucléaire permet de définir outre le modèle de mouvement les paramètres cinétiques (vitesses d'interconversion) et thermodynamiques (barrières de potentiels entre conformères). On peut alors localiser les liaisons favorisées et proposer un modèle imagé pour chacune des chaînes latérales. C'est l'objet de la figure VIII.19.

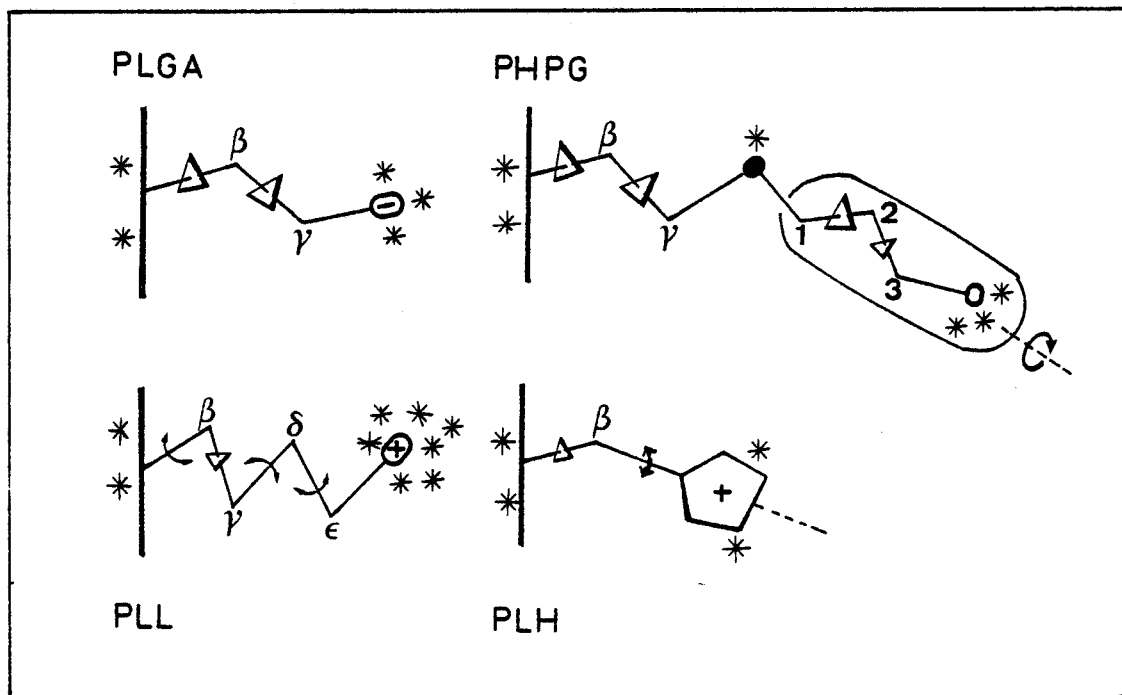


Figure VIII.19. Modèles imagés des mouvements de chaînes latérales des polypeptides étudiés. * représente les molécules d'eau.

- PLGA : chaîne flexible avec gradient de mobilité.
- PHPG : mouvement découplé par une rotule, la liaison amide interne.
- PLL : réorientation et flexibilité interne restreintes par la présence de deux points d'ancrage.
- PLH : très faible mobilité autour de C_{α} - C_{β} . Modèle de godille pour l'ensemble de la chaîne latérale.

La quasi généralité des réorientations par sauts pour les systèmes aliphatiques conduit à une conclusion importante. Il n'est en effet pas justifié d'utiliser les équations générales reliant par exemple le T_1 de ^{13}C à un temps de corrélation τ_C car ces relations sont établies pour un mouvement de rotation diffusionnelle. Ce procédé ne peut fournir qu'une estimation semi-quantitative des mobilités locales mais ne peut en aucun cas faire l'objet d'une analyse rigoureuse. Ce problème a d'ailleurs été récemment soulevé par URRY *et al.* /130/. Il apparaît enfin que les mobilités locales des chaînes latérales de polypeptides sont très spécifiques de la nature de R. On conçoit que la substitution d'un α -amino-acide par un autre dans une protéine puisse introduire des modifications considérables de conformation ou d'activité.



Chapitre IX

COUPLAGE DES MOUVEMENTS DES CHAINES PRINCIPALE ET LATÉRALE. ANALYSE DE LA RELAXATION DE $^1\text{H}_\alpha$.

IX.1. PROBLEMES POSES PAR LA RELAXATION DE H_α .

Les protons H_α se trouvent dans une situation privilégiée. Faisant partie intégrante du squelette macromoléculaire leur réorientation est liée au mouvement de celui-ci. Mais leur relaxation est due en grande partie à l'effet dipolaire de H_β et $\text{H}_{\beta'}$. Or ces derniers appartiennent à la chaîne latérale. La distance $\text{H}_\alpha\text{-H}_\beta$ n'est pas fixe mais modulée par la réorientation autour de $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$. La relaxation de H_α sera donc le reflet du couplage entre le mouvement du squelette et celui de la chaîne latérale et son analyse peut constituer un critère de validité pour ces deux mouvements.

En fait le problème est complexe pour les trois raisons suivantes :

a) - H_α est isolé et ne subit l'influence dipolaire que de protons relativement éloignés (H_β surtout). Les T_1 de H_α seront beaucoup plus longs que pour un groupe méthylène. Dans ces conditions, les contributions de protons assez lointains peuvent ne pas être négligeables.

b) - La contribution de $\text{H}_{\beta\beta'}$ est toutefois prédominante. Ces derniers sont en interaction mutuelle et relaxent rapidement. Lors d'une expérience d'inversion-récupération l'interaction $\text{H}_\alpha\text{-H}_{\beta\beta'}$ n'est donc pas constante dans le temps et on observe une relaxation non purement mono-exponentielle due à l'existence de termes croisés. On peut toutefois s'affranchir de cette anomalie en ne considérant que la vitesse de relaxation initiale.

c) - La raie de H_α est pratiquement toujours très proche du pic résiduel de HDO et les perturbations induites par celui-ci nuisent à l'obtention des T_1 de H_α avec une bonne précision.

Nous allons limiter l'analyse de la relaxation de H_α au cas du PLGA.

IX.2. RESULTATS EXPERIMENTAUX ET CALCULES.

Le paramètre le plus important à déterminer est la distance $H_\alpha-H_{\beta_1}$ (et $H_\alpha-H_{\beta_2}$) dépendant du temps en raison du mouvement autour de $C_\alpha-C_\beta$. Les paramètres utilisés sont représentés sur la figure IX.1.

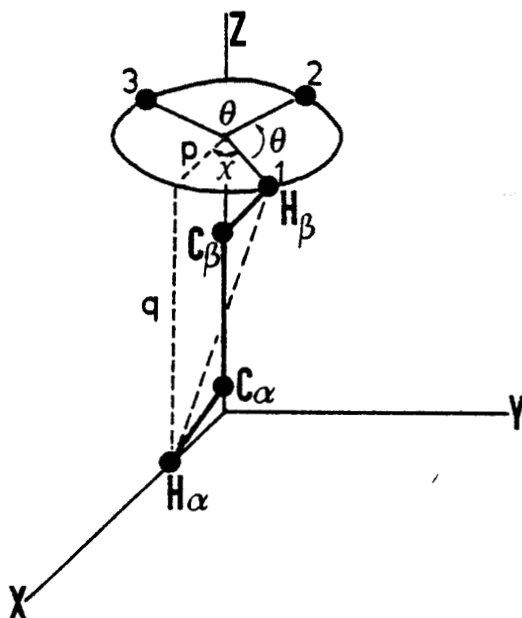


Figure IX.1. Définition des paramètres géométriques impliqués dans le calcul de l'interaction dipolaire de H_α avec H_β .

Sur cette figure un seul proton β est représenté pour simplifier. χ est la position d'équilibre et θ représente l'angle entre les sites 2 et 3, 120° dans le cas présent.

Nous avons choisi le rotamère G' comme position d'équilibre soit $\chi_{1(\beta_1)} = 180^\circ$ et $\chi_{1(\beta_2)} = 300^\circ$. Les distances de H_α aux sites 1, 2 et 3 deviennent alors :

$$\begin{aligned}
 r_{01}^2 &= 2p^2(1-\cos\chi) + q^2 \\
 r_{02}^2 &= 2p^2[1-\cos(\chi-\theta)] + q^2 \\
 r_{03}^2 &= 2p^2[1-\cos(\chi+\theta)] + q^2
 \end{aligned}
 \tag{IX.1}$$

Les relations complètes permettant d'obtenir la vitesse initiale de relaxation de H_α sont décrites dans l'article de TSUTSUMI /58/.

Les mesures de T_1 de H_α ont été effectuées sur le PLGA normal et le PLGAY γ d₂. La figure IX.2 montre que les T_1 de H_α sont un peu plus longs dans le cas de l'analogue γ deutéré. Il doit donc exister une contribution non négligeable de $H_{\gamma 1}$ et $H_{\gamma 2}$ à la relaxation de H_α . Elle est toutefois très difficile à estimer car les distances H_α - $H_{\gamma 1}$ et H_α - $H_{\gamma 2}$ dépendent à la fois des angles $\chi_1(C_\alpha-C_\beta)$ et $\chi_2(C_\beta-C_\gamma)$. Pour simplifier nous avons seulement considéré la projection de $H_{\gamma 1}$ et $H_{\gamma 2}$ sur la direction de $C_\alpha-C_\beta$. Dans ces conditions nous avons obtenu la simulation représentée en pointillés sur la figure IX.2.

Il doit donc exister d'autres contributions à la relaxation de H_α . Nous avons alors envisagé de faire intervenir les protons H_α et H_β des résidus immédiatement voisins. Cette contribution supplémentaire à la relaxation de H_α est définie par la relation (IX.2) :

$$(T_1^{-1} \text{ ext})_\alpha = \frac{3}{10} \gamma_H^4 \pi^2 [2\langle r_{\alpha\alpha'} \rangle^{-6} + 4\langle r_{\alpha\beta'} \rangle^{-6}] G(\tau_R) \tag{IX.2}$$

avec $G(\tau_R) = J(\omega_H) + J(2\omega_H)$.

Les valeurs de $J(\omega)$ tiennent bien sûr compte de la distribution de τ_R .

Les valeurs moyennes les plus probables de $r_{\alpha\alpha'}$ et $r_{\alpha\beta'}$ ont été obtenues en faisant varier les angles ϕ , ψ et χ_1 par pas de 20° et en tenant compte des empêchements stériques (méthode des sphères dures). Les angles concernés sont définis à la figure IX.3.

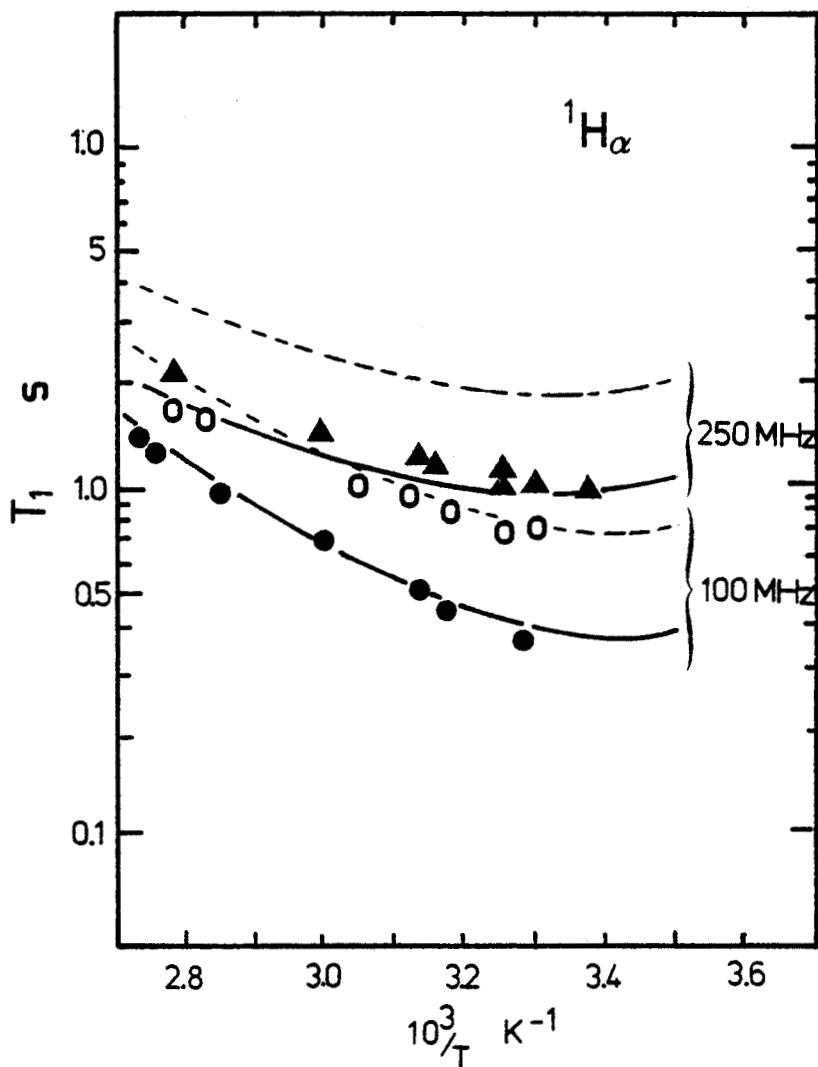


Figure IX.2. Relaxation de $^1\text{H}_\alpha$ du PLGA 0,1 M pD = 7,0. T_1 de $^1\text{H}_\alpha$ à 100 MHz (●) et 250 MHz pour le PLGA normal (○) ou deutéré sélectivement en γ (▲). Les courbes en traits pleins ou pointillés sont simulées respectivement avec et sans contributions des protons des résidus voisins (explications dans le texte) pour le PLGA normal.



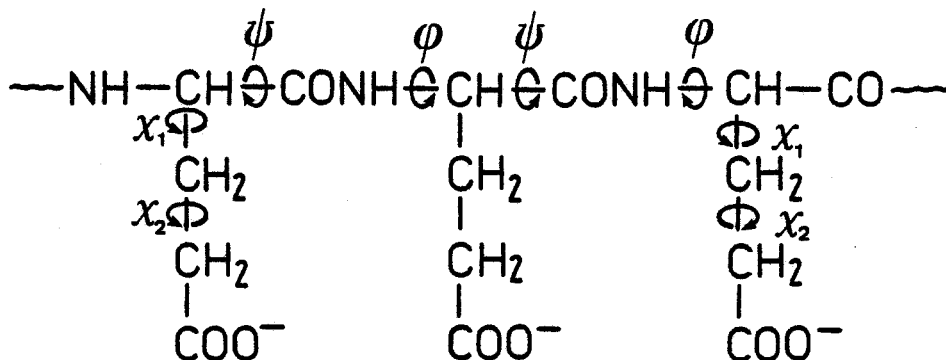
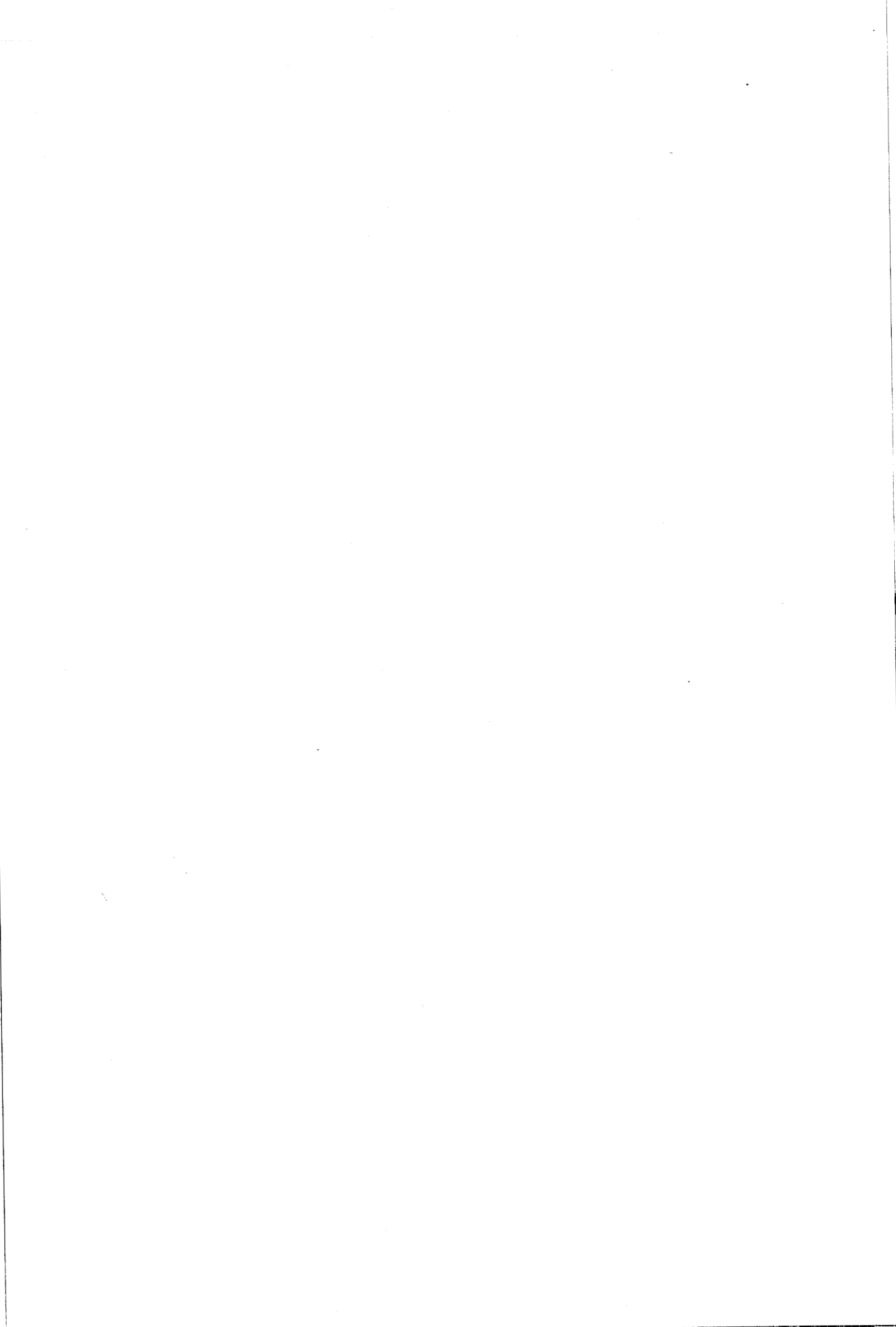


Figure IX.3. Définition des angles ϕ , ψ et χ_1 , utilisés pour calculer les distances les plus probables entre H_α et les protons α et β des plus proches voisins.

On obtient alors $\langle r_{\alpha\alpha} \rangle = 3,65 \text{ \AA}$ et $\langle r_{\alpha\beta} \rangle = 4,15 \text{ \AA}$.
 On peut alors recalculer les courbes de relaxation de H_α . Ceci est montré sur la figure IX.2 (traits pleins). La simulation est à peu près satisfaisante compte tenu de l'imprécision des mesures de T_1 de H_α .

La relaxation de H_α peut donc être simulée à partir des données cinétiques du squelette et de la chaîne latérale. Néanmoins l'analyse détaillée et précise des courbes de relaxation requiert la contribution de protons éloignés dont les positions exactes sont difficiles à déterminer. La conclusion la plus importante de ce chapitre est qu'il ne saurait être question de limiter l'origine de la relaxation de H_α à la contribution exclusive des protons H_β du même résidu.

La multiplicité des paramètres et les incertitudes importantes sur les valeurs de T_1 des protons H_α ne nous ont pas encouragé à appliquer cette méthode aux autres polypeptides.



Chapitre X

RELAXATION NUCLEAIRE INDUITE PAR UN MARQUEUR DE SPIN RADICALAIRE.

En raison de leur caractère essentiellement local les méthodes utilisées jusqu'à présent ne nous permettent pas d'obtenir des renseignements au moins qualitatifs sur les dimensions des polypeptides considérés. Dans le but d'étudier les variations de structure globale induites par les transitions hélice-pelote, nous avons mis au point une technique mixte associant la RMN et la RPE. Il s'agit de la relaxation protonique induite par un radical libre. Elle a été appliquée essentiellement au PLGA pour élucider les anomalies apparues lors des études par RPE.

X.1. PRINCIPE DE LA METHODE.

Le principe de la relaxation induite peut être résumé par la figure X.1.

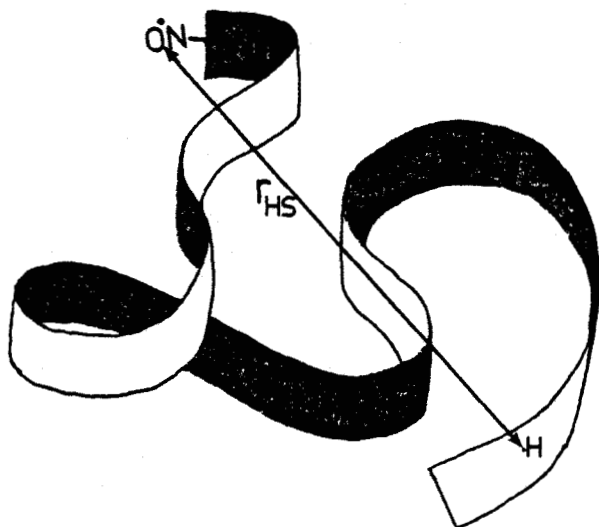


Figure X.1. Principe de la relaxation protonique stimulée par un radical libre.

Considérons une macromolécule dans une conformation quelconque et portant à l'une de ses extrémités un radical stable, par exemple le groupe TEMPO. Le moment magnétique associé à l'électron célibataire de spin $S = 1/2$ étant très important pourra induire une relaxation dipolaire même à longue distance. A titre d'exemple, si deux protons H_i et H_j sont situés à plus de 5 Å l'un de l'autre, leur interaction dipolaire mutuelle sera presque négligeable. Par contre un électron libre pourra encore contribuer de façon significative à la relaxation d'un proton situé à plus de 30 Å. Donc tous les H_i de la macromolécule subiront une relaxation induite par l'électron en fonction de la distance r_{HS} .

La vitesse de relaxation longitudinale (T_1^{-1}) d'un proton H_i peut être considérée comme la somme de deux termes, l'un diamagnétique dépendant exclusivement des autres protons (T_{1d}^{-1}), l'autre paramagnétique dû à l'électron (T_{1p}^{-1}) :

$$T_{1d+p}^{-1} = T_{1d}^{-1} + T_{1p}^{-1} \quad (X.1)$$

La mesure de la contribution paramagnétique T_{1p}^{-1} permet de déterminer la distance r_{HS} entre l'électron et le proton considéré. Expérimentalement, la technique la plus précise consiste à mesurer T_{1d+p}^{-1} sur un échantillon de polymère portant le radical libre. Après destruction du paramagnétisme électronique par l'acide ascorbique (cf. appendice technique) une nouvelle mesure fournit T_{1d}^{-1} . Cette procédure permet d'utiliser le même échantillon de polymère.

X.2. THEORIE DE LA RELAXATION INDUITE.

Nous pouvons utiliser l'équation générale de SOLOMON /38/ pour laquelle S est un spin électronique et I un spin nucléaire, ici le proton :

$$T_{1p}^{-1} = \frac{2}{15} \gamma_H^2 \gamma_S^2 \hbar^2 S(S+1) r_{HS}^{-6} \left(\frac{3\tau_{C1}}{1+\omega_H^2 \tau_{C1}^2} + \frac{7\tau_{C2}}{1+\omega_S^2 \tau_{C2}^2} \right) \quad (X.2)$$

τ_C étant le temps de corrélation du radical mesuré par RPE, τ_{C1} et τ_{C2} sont définis par :

$$\begin{aligned} \tau_{C1} &= (\tau_C^{-1} + T_{1e})^{-1} \\ \tau_{C2} &= (\tau_C^{-1} + T_{2e})^{-1} \end{aligned} \quad (X.3)$$

T_{1e} et T_{2e} sont les temps de relaxation électroniques. Nous avons appliqué cette méthode au PLGA marqué en bout de chaîne principale. Dans ces conditions, des simplifications importantes peuvent être apportées à l'équation (X.2). Les mesures de relaxation induite du proton ont été effectuées dans un champ de 58,7 kG.

($\omega_H = 1,57 \text{ rad.s}^{-1}$, $\omega_S = 1,033 \cdot 10^{12} \text{ rad.s}^{-1}$). τ_C est de l'ordre de $5 \cdot 10^{-10} \text{ s}$. T_{2e} mesuré dans un champ de 3 kG (par les largeurs de raie du signal RPE) est compris entre $2 \cdot 10^{-8}$ et $5 \cdot 10^{-8} \text{ s}$; à 58,7 kG il doit être supérieur à cette valeur. De plus comme $T_{1e} > T_{2e}$ on peut écrire :

$$\tau_C \approx \tau_{C1} \approx \tau_{C2}$$

Enfin dans les conditions utilisées on a $\omega_S \tau_C \gg 1$. L'équation (X.2) peut donc être simplifiée comme suit :

$$T_{1p}^{-1}(H) = \frac{3}{10} \gamma_H^2 \gamma_S^2 \hbar^2 r_{HS}^{-6} \frac{\tau_C}{1 + \omega_H^2 \tau_C^2} \quad (X.4)$$

Dans le cas présent nous observons à la fois tous les protons d'un même type le long de la chaîne macromoléculaire. Dans ces conditions r_{HS} n'a pas de signification réelle. C'est une valeur moyenne que nous noterons $\langle r_{HS}^6 \rangle^{1/6}$. Par contre l'évolution de ce terme lors des transitions structurales sera le reflet des variations des dimensions de la macromolécule dans son ensemble. Nous avons ainsi mesuré les valeurs de T_{1p}^{-1} que les protons H_β et H_γ du PLGA en fonction du pH. La relaxation de H_α n'a pas été considérée car elle n'est pas parfaitement mono-exponentielle et de plus à la température utilisée (23°C) le signal de H_α est fortement perturbé par la raie résiduelle de HDO. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure X.2.

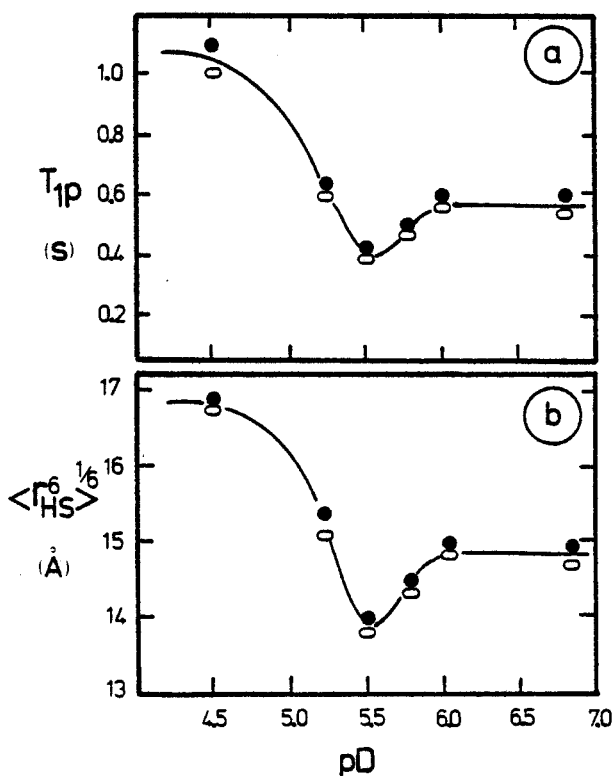


Figure X.2. Relaxation ^1H stimulée du PLGA (0,1 M/ D_2O) à 250 MHz et 296 K. T_{1p} (a) et $\langle r_{HS}^6 \rangle^{1/6}$ (b) obtenus à partir de la relaxation de H_β (○) et H_γ (●).

A pH = 5, la destabilisation de la structure hélicoïdale conduit à une diminution importante de la distance r_{HS} . La macromolécule devient donc plus compacte. Pourtant de pH = 5,5 à 6 on observe une augmentation significative de r_{HS} . On peut interpréter ce résultat grâce au schéma de la figure X.3.

L'ionisation des groupes carboxyles commence à pH \approx 4,9. Ceci entraîne la dislocation rapide de la structure hélicoïdale et conduit à pH \approx 5,2 à une chaîne totalement désordonnée. Puis, lorsque toutes les chaînes latérales sont ionisées, les interactions répulsives coulombiennes conduisent à une nouvelle élongation de la chaîne macromoléculaire. On peut donc dire que la transition hélice-pelote du PLGA est en fait un phénomène à trois étapes :

hélice α \rightarrow chaîne statistique compacte \rightarrow chaîne plus étendue.

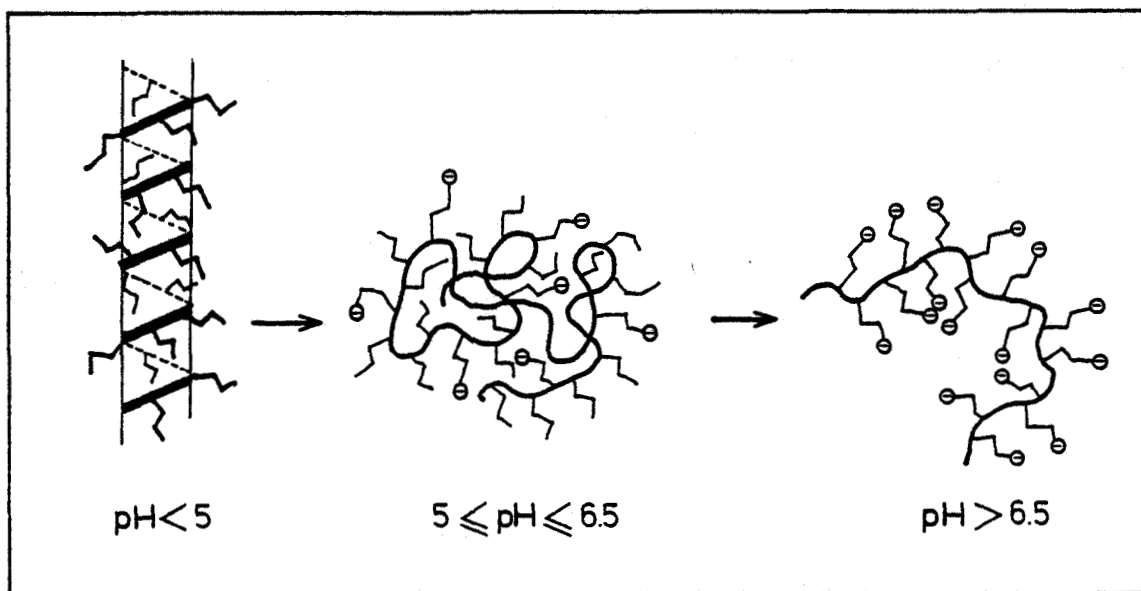


Figure X.3. Schéma de dénaturation du PLGA.

La "pelote statistique" ne serait donc en réalité présente que dans la phase intermédiaire. Un processus similaire proposé par WADE *et al.* /131/, pour les transitions induites par des dénaturants (TFA par exemple) est en accord avec les mesures de RPE. Le minimum observé dans les courbes de τ_C traduit en effet l'existence d'une forme intermédiaire plus compacte entre l'hélice et la chaîne "étendue". Les mêmes mesures effectuées sur la poly-L-lysine n'ont pas permis de mettre en évidence ce phénomène. De la même façon les études par RPE ne montrent pas d'anomalie à la transition. Dans ce cas les chaînes latérales sont beaucoup plus longues et le groupe chargé terminal dispose d'un volume propre considérablement plus important que pour l'acide poly-L-glutamique. On conçoit alors que les répulsions inévitables entre ces groupes ne conduisent pas à des modifications aussi importantes de conformation globale de la chaîne. Il faut toutefois noter que dans le cas de la poly-L-lysine, le polymère étudié a un degré de polymérisation deux fois plus important que le PLGA marqué. Dans ces conditions les valeurs moyennes de T_{1p}^{-1} seront beaucoup plus faibles et difficiles à déterminer avec une grande précision.

Cette extension de la chaîne principale du PLGA à pH > 6 nous permet d'expliquer la relative rigidité du squelette observée par relaxation de $^{13}\text{C}_\alpha$ par rapport aux autres polypeptides étudiés, en particulier la poly-L-lysine dont le degré de polymérisation est comparable à celui du PLGA.

Contrairement aux autres techniques de résonance magnétique, la relaxation ^1H stimulée par un nitroxyde permet donc de suivre l'évolution des dimensions globales de la macromolécule, en particulier lors de transitions structurales.

CONCLUSION GENERALE

Les techniques de résonance magnétique apparaissent comme des outils privilégiés pour l'analyse des mobilités globales et locales de macromolécules. Le marquage sélectif par un radical libre ou par deutération permet une investigation rapide du comportement dynamique du système considéré et des paramètres pouvant l'influencer. Outre leur facilité d'interprétation, ces méthodes permettent l'étude de solution relativement diluées. Le caractère plus laborieux des expériences de relaxation nucléaire du ^{13}C ou de ^1H est largement compensé par la richesse d'informations obtenues. L'analyse ponctuelle liaison par liaison permet alors de définir complètement la réorientation en tout point de la macromolécule. Il apparaît que les modèles simplifiés de mouvement trop souvent utilisés (rotation diffusionnelle) ne sont pas réalistes pour une chaîne hydrocarbonée. Les réorientations par sauts entre sites préférentiels sont au contraire beaucoup plus générales.

L'analyse complète du mouvement requiert l'utilisation de plusieurs fréquences d'observation et autant que possible pour différents noyaux. Dans ces conditions un modèle univoque peut être proposé. Les populations de rotamères déduites de la relaxation sont en bon accord avec celles obtenues à partir des couplages vicinaux ^1H . On peut alors envisager l'analyse conformationnelle par relaxation si les couplages sont inexistantes ou non analysables. Cette technique fournit en outre les vitesses d'interconversion entre sites et les paramètres thermodynamiques.

Enfin la relaxation ^1H stimulée par un nitroxyde nous a permis de déterminer les dimensions globales de chaînes macromoléculaires et en particulier leur évolution lors de transitions structurales. Ces méthodes peuvent être envisagées pour n'importe quel type de molécule et il serait particulièrement intéressant de considérer des systèmes plus complexes tels que des protéines globulaires ou des hélices α stables et rigides. L'analyse de ces systèmes élaborés sera sans doute grandement favorisée par la disponibilité d'appareils à très haut champ permettant outre l'identification d'un nombre maximum de signaux, les études à forte dilution.

Chapitre XI

APPENDICE TECHNIQUE

XI.1. SCHEMA GENERAL DE SYNTHESE.

Nous avons utilisé comme monomères actifs les N-carboxyanhydrides d' α -amino-acides (NCA) dont la structure générale est représentée figure XI.1.

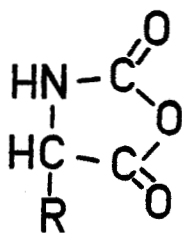


Figure XI.1. Structure générale des N-carboxyanhydrides (NCA).

Les mécanismes de polymérisation des NCA ont été très étudiés /132/. Tous les composés à caractère basique (amines, alcoolates, bases minérales, etc ...) sont susceptibles d'initier la polymérisation. Les amines primaires constituent un groupe très intéressant. La polymérisation se compose de deux phases qui sont illustrées sur la figure XI.2.

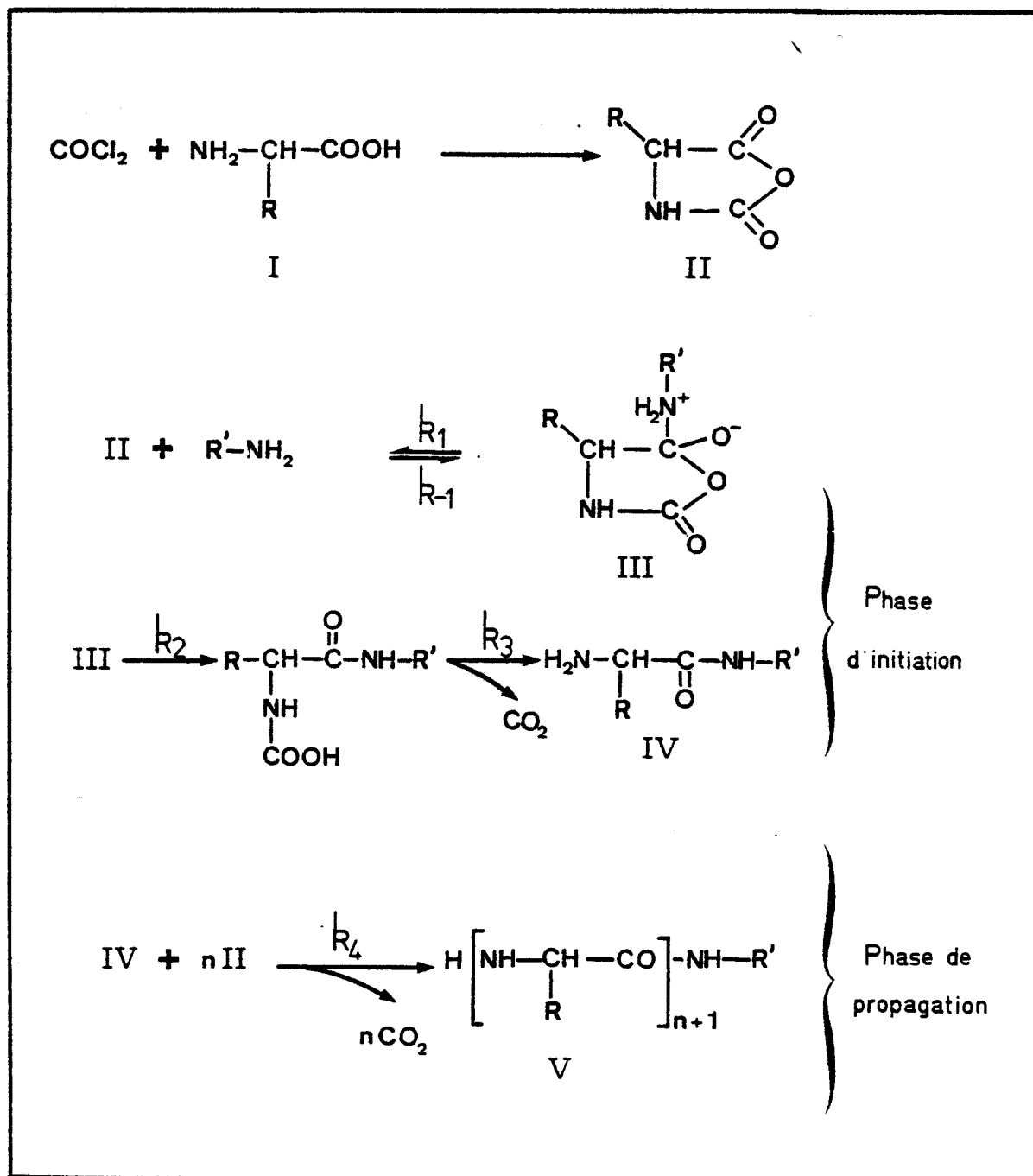


Figure XI.2. Schéma général du mécanisme de polymérisation des NCA initié par les amines primaires.



On constate que l'initiateur $R'-NH_2$ est incorporé dans le polymère. Ce phénomène très important n'existe pas avec les amines tertiaires ou les alcoolates /133/. Nous avons mis à profit cette particularité pour le marquage sélectif des polypeptides par un radical libre stable fixé à l'extrémité C-terminale. Les caractéristiques cinétiques ($k_1 \gg k_3$ et $k_1 \gg k_4$) sont telles que la vitesse d'initiation est beaucoup plus importante que la vitesse de propagation. Ces conditions sont bien sûr favorables à l'obtention d'un polymère peu polydispersé. Le degré de polymérisation moyen \overline{DP} ne dépend alors que des rapports molaires du NCA (le monomère) à l'initiateur ($R'-NH_2$). Nous sommes donc en mesure de préparer des homopolypeptides peu polydispersés et dont la masse moléculaire moyenne peut être prédéterminée par le rapport initial $[NCA]/[R'-NH_2]$.

Il convient toutefois de noter que ces considérations ne sont valables que pour l'initiation par des amines primaires et dans certains solvants. Dans des systèmes tels que le chloroforme, le benzène ou le dioxane, l'établissement de structures hélicoïdales agrégées conduit en effet à une accélération importante de la phase de propagation. Les polymères obtenus sont alors plus polydispersés que prévu et leur \overline{DP} n'est pas directement relié au rapport monomère/initiateur. Ces anomalies ne sont jamais observées dans le DMF /134-135/ que nous avons choisi pour toutes les polymérisations. Le schéma de synthèse des différents homopolypeptides étudiés est représenté sur la figure XI.3. La préparation des différents NCA (VI-X-XIII) exige le blocage préalable des fonctions actives des chaînes latérales des amino-acides.

XI.2. PROTECTION DES CHAINES LATERALES DES α -AMINO-ACIDES.

XI.2.a. Acide-L-glutamique.

La méthode classique /136/ consiste à former un ester benzylique avec la fonction γ carboxylique (composé VI). Celui-ci peut en effet être éliminé de façon quantitative par traitement avec HBr gazeux ou réduction catalytique. De plus l'aminolyse du poly-L-glutamate de benzyle (PBLG composé VII) conduit directement à la poly N^5 (3-hydroxypropyl)L-glutamine (PHPG) (composé IX)/137/. Le L-glutamate de benzyle est préparé suivant la méthode de

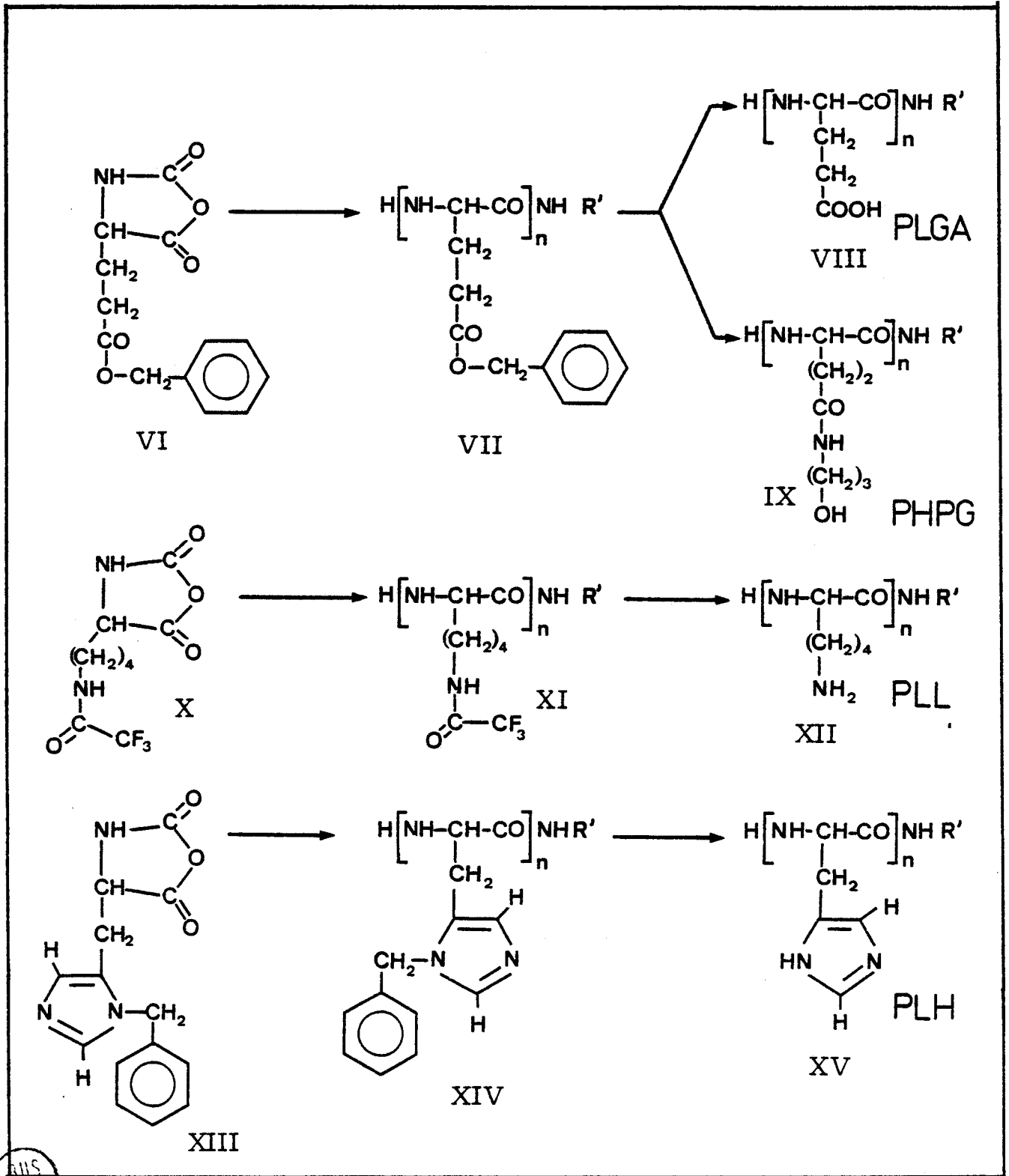


Figure XI.3.

UNIVERSITÄT
LILLE

BLOUT *et al.* /136/ avec un rendement de 30%. Il est recristallisé avant emploi à 62°C dans l'eau à pH = 7 et conservé à -30°C.

Cette protection par un ester benzylique ne permet pas d'envisager la synthèse de PLGA marqué par un nitroxyde en bout de chaîne principale. En effet les conditions de déblocage du PBLG (HBr gazeux ou H₂ catalytique) conduiraient à la destruction du paramagnétisme du radical très instable en milieu acide fort ou en présence de réducteurs. Pour ce cas particulier nous avons préféré une protection par un ester méthylique qui peut ensuite être éliminé par saponification, conditions dans lesquelles les nitroxydes sont stables. Le L-glutamate de γ -méthyle est préparé /138/ par action du chlorure d'acétyle dans le méthanol. Après recristallisation dans le méthanol à 70% dans l'eau (v/v), le produit est obtenu très pur avec un rendement global de 62%.

XI.2.b. Protection de la L-lysine.

La méthode classique consiste à bloquer la fonction ϵ -amino par le groupe Z (benzyloxycarbonyl) /139/.

Malheureusement les conditions d'un déblocage ultérieur (HCl + HBr gazeux ou hydrogénation catalytique) interdisent la synthèse de polymères analogues marqués par des radicaux nitroxydes.

Nous avons donc préféré la protection par trifluoroacétylation (composé X) introduite par SELA *et al.* /140/. L'élimination ultérieure de ces groupes trifluoroacétyls peut être réalisée dans des conditions très douces (pipéridine 1M) autant pour les radicaux libres que pour l'intégrité de la macromolécule. L'élimination des TFA bloquant les lysines de la ribonucléase peut par exemple être réalisée sans perte d'activité enzymatique. La trifluoroacétylation est effectuée par action du S-éthyl-thiotrifluoroacétate /141/ lui-même préparé selon le mode opératoire décrit par HAUPTSCHHEIN *et al.* /142/. La ϵ TFA-L-lysine est obtenue avec un rendement global de 69%.

XI.2.c. Protection de l'imidazole de la L-histidine.

Nous avons utilisé la méthode classique de N-benzoylation décrite par du VIGNEAUD *et al.* /143/ (composé XIII par exemple). La im-1-benzyl-L-histidine est obtenue sous forme cristalline très pure avec un rendement global de 57% par action de chlorure de benzyle sur la L-histidine en solution dans NH_3 liquide et en présence de sodium métallique à -50°C .

XI.3. SYNTHÈSE DES N-CARBOXYANHYDRIDES.

XI.3.a. Méthode générale.

Les NCA sont facilement obtenus par action du phosgène sur l' α -amino-acide protégé. FULLER *et al.* /144/ ont considérablement simplifié les modes de préparation des NCA. Nous avons modifié leur méthode comme suit :

50 mmoles d'un α -amino-acide protégé (L-glutamate de benzyle ou de méthyle, ϵ -trifluoroacétyl-L-lysine par exemple) sont finement broyés et suspendus dans 500 ml de tétrahydrofurane (THF) anhydre. On ajoute alors deux équivalents d'une solution de phosgène ≈ 4 M dans le THF et on porte à reflux pendant une heure. La solution limpide obtenue est versée dans un litre d'éther de pétrole sec. Après une nuit à -15°C les cristaux formés sont isolés par filtration, lavés avec deux fois 100 ml d'éther de pétrole sec et séchés sous vide. Les NCA étant très sensibles à l'humidité sont conservés à -30°C sur CaCl_2 . En cas de stockage prolongé, une recristallisation dans acétate d'éthyle-éther de pétrole est indispensable. La teneur en chlore (sous forme de chlorures) de ces composés est inférieure à 0,1%. Les mesures ont été effectuées par la méthode à la diphenylcarbazone /145/. Les rendements sont très satisfaisants :

L glu(γ OMe)NCA : 89%

L glu(γ OBz)NCA : 91%

ϵ TFA-L-Lys NCA : 72%.

XI.3.b. Synthèse du NCA de l'histidine protégée.

Le traitement de l'im-1-benzyl-L-histidine (XV) par le phosgène ne conduit pas au NCA (composé XIII) mais à de nombreux produits de dégradation résultant d'une attaque du cycle imidazole par COCl_2 . Nous avons donc utilisé le schéma réactionnel /146-147/ représenté figure XI.4.

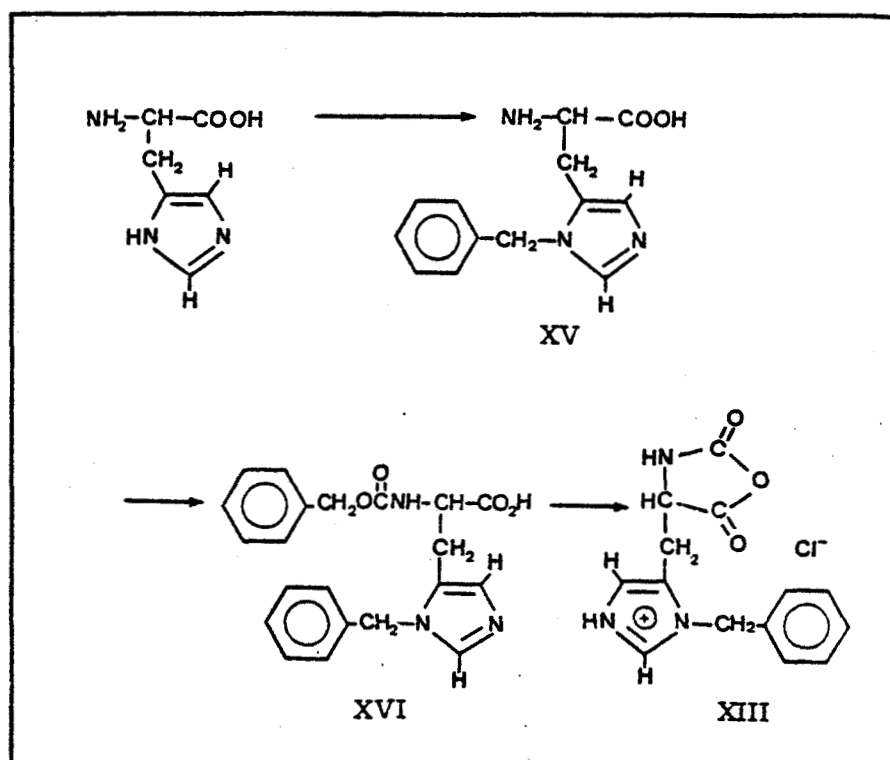


Figure XI.4. Synthèse du NCA de l'histidine benzylée.

L'im-1-benzyl-L-histidine (XV) est traitée par le chloroformiate de benzyle en milieu alcalin. On obtient la im-1-benzyl carbobenzoxy-L-histidine (XVI) avec un rendement de 66% /148/. L'action de PCl_5 dans le dioxane conduit à la formation du chlorhydrate de im-1-benzyl-L-histidine-N-carboxy-anhydride (XIII) avec un rendement de l'ordre de 50%. Ce composé est très sensible à l'humidité et doit être préparé extemporanément /147/.

XI.4. POLYMERISATION.

XI.4.a. Acide poly-L-glutamique (PLGA) (VIII).

A une solution à 100 mg/ml de NCA de L glutamate de benzyle dans le DMF anhydre on ajoute 0,01 équivalent de n-hexylamine ($[NCA]/[C_6NH_2] = 100$). La polymérisation se déroule avec dégagement de CO_2 . Après 48 heures, le poly-L-glutamate de benzyle (VII) (PBLG) ainsi formé est isolé par précipitation dans le méthanol anhydre puis séché sous vide. Le rendement est de 95%. La masse moléculaire du PBLG est de 25 000 ($\overline{DP} = 120$) d'après la viscosité mesurée dans l'acide dichloroacétique et en utilisant les relations de DOTY /149-150/. L'élimination des groupes esters benzyliques est réalisée suivant la procédure d'IDELSON *et al.* /151/. On fait barboter de l'acide bromhydrique gazeux dans une solution benzénique diluée (2%) de PBLG. L'acide poly-L-glutamique précipite. Il est lavé à l'acétone, dissout dans une solution saturée de bicarbonate de sodium et dialysé pendant 5 jours contre de l'eau distillée. Après lyophilisation on obtient un rendement de 80% environ de poly-L-glutamate de sodium (VIII), sous forme d'une masse blanche fibreuse et expansée. La mesure de viscosité dans NaCl 0,2 M à 25° /152-100/ indique un $\overline{DP} = 100$. Le nombre de coupures de la chaîne principale est donc très faible dans les conditions expérimentales de déblocage utilisées. L'élimination complète des groupes benzyles est vérifiée par l'absence d'absorption UV à 260 nm.

XI.4.b. Poly-N⁵ (3-hydroxypropyl)-L-glutamine (PHPG) (IX).

Ce polymère est obtenu à partir d'un échantillon de PBLG préparé selon le mode opératoire précédent avec un rapport monomère/initiateur = 200. La masse moléculaire de ce PBLG est 42 000 ($\overline{DP} = 191$) par viscosimétrie. L'aminolyse directe par le 3-amino-propanol a été réalisée selon une méthode modifiée par rapport à la procédure originale de LOTAN *et al.* /137) dans le but de réduire au minimum les coupures de la chaîne principale. 1 g de PBLG ($\overline{DP} = 191$) est lyophilisé dans 50 ml de dioxane. Le polymère très expansé obtenu est mis à gonfler dans 6 ml de dioxane anhydre à 75°C pendant 2 heures. A cette solution très visqueuse on ajoute sous agitation 10 ml de 3-amino-1-propanol goutte à goutte, afin de

précipiter le PBLG sous forme d'une fine suspension. L'ampoule est alors purgée par barbotage d'azote pendant 10 minutes, scellée et maintenue à 75°C pendant 20 heures. La poly N⁵ (3-hydroxypropyl) L-glutamine est isolée de la solution limpide par précipitation dans 200 ml d'acétone anhydre. Après filtration et lavage à l'ether, on achève la purification par dialyse pendant 5 jours à 4°C contre de l'eau distillée. Une lyophilisation fournit la PHPG sous forme de fibres blanches expansées et hygroscopiques. On conserve le polymère sur CaCl₂ à -30°C. La masse moléculaire est déterminée par viscosimétrie en solution aqueuse à 28°C. La calibration de LOTAN *et al.* /137/ fournit une valeur de 33 400 ($\overline{DP} = 180$). La comparaison de ce \overline{DP} avec celui du PBLG parent ($\overline{DP} = 191$) montre que l'aminolyse n'a pas provoqué de coupures décelables du squelette macromoléculaire. Une mesure d'absorption à 260 nm permet de vérifier que la débenzylation a été complète.

XI.4.c. Poly-L-lysine (PLL) (XII).

2,58 g (10^{-2} mole) de NCA de ϵ -trifluoroacétyl-L-lysine (X) sont dissouts dans 25 ml de DMF anhydre. Après addition de 10 mg (10^{-4} mole) de n-hexylamine, on laisse la polymérisation se poursuivre pendant 48 heures sous agitation. La poly N ϵ -trifluoroacétyl-L-lysine (PTFAL) est isolée par précipitation dans 200 ml d'eau (2g, 89%). Ce polymère est dissout dans 45 ml d'une solution 1 M de pipéridine dans le méthanol. Après deux heures d'agitation, on précipite la PTFAL sous forme d'une fine suspension par addition goutte à goutte d'une solution aqueuse 1 M de pipéridine (30 ml). On maintient 48 heures sous agitation à 20°C. La solution limpide est dialysée contre de l'eau distillée pendant 5 jours à 5°C. L'élimination de la pipéridine est accélérée par addition de 10 g de résine Dowex 50 W au compartiment extérieur. Il est impératif d'opérer à 5°C pour prévenir la précipitation de la poly-L-lysine sous forme de feuillets β . La purification est achevée par dialyse contre HCl 10^{-3} M. Une aliquote de la solution est prélevée au préalable pour la mesure de viscosité. Le polymère est obtenu sous forme de chlorhydrate (hemihydrate) par lyophilisation et stocké à -30°C sur CaCl₂. La masse moléculaire moyenne est obtenue par mesure de la viscosité spécifique d'une solution aqueuse à 1% de PLL sous forme de bromhydrate à 25°C /153/ Les valeurs de \overline{DP} obtenues sont comprises entre 125 et 140 selon les échantillons.

XI.4.d. Poly-L-histidine (PLH) (XV) /146/.

Le chlorhydrate du NCA de im-1-benzyl-L-histidine (XIII) est suspendu dans du dioxane et traité par exactement un équivalent de triéthylamine. La solution devient limpide et un précipité de chlorhydrate de triéthylammonium se forme rapidement. Après filtration, on ajoute 0,01 équivalent d'hexylamine pour initier la polymérisation. Celle-ci se produit avec dégagement de CO_2 et précipitation graduelle de la poly im-2-benzyl-L-histidine. Après 24 heures sous agitation le polymère est isolé par filtration (88%) lavé au dioxane et séché sous vide à 60°C .

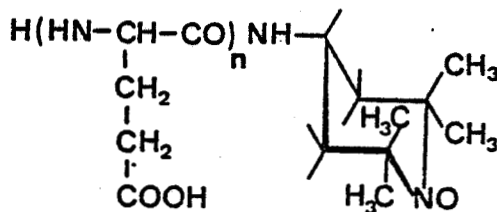
La débenzylation est effectuée par le sodium dans NH_3 liquide à -50°C /147/. Après dialyse contre $\text{HCl } 10^{-3} \text{ M}$, la poly-L-histidine isolée par lyophilisation (rendement de 67%) est conservée à -30°C sur silicagel. Une estimation de la masse moléculaire a été faite par filtration sur gel selon la méthode de MIYAKATE *et al.* /154/. Une colonne (2x28 cm) de Sephadex G75 équilibrée par un tampon $\text{LiCl/HCl } 0,5 \text{ M pH} = 2,0$ est calibrée par du bleu Dextran ($\text{MM} = 2 \cdot 10^6$) du cytochrome C ($\text{MM} = 12\,400$) et de l'ovalbumine ($\text{MM} = 44\,800$). La détection est effectuée à 210 nm. Le passage de la poly-L-histidine se traduit par un pic relativement fin correspondant à $\overline{\text{DP}} = 67$. L'analyse de la courbe d'éluion /154/ conduit à un rapport $\overline{\text{M}}_{\text{W}}/\overline{\text{M}}_{\text{N}} = 1,21 \pm 0,8$ indiquant une polydispersité assez faible.

XI.5. SYNTHÈSE DE POLYPEPTIDES MARQUÉS PAR DES RADICAUX NITROXYDES.

XI.5.a. PLGA-CP Acide poly-L-glutamique marqué par un radical TEMPO à l'extrémité C-terminale de la chaîne principale.

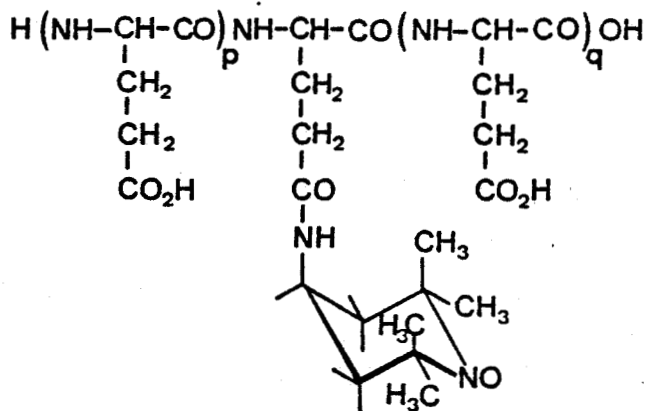
Le NCA de L-glutamate de méthyle est polymérisé dans le chlorure de méthylène, la TEMPO-amine étant utilisée comme initiateur dans la proportion molaire de 1/200 par rapport au monomère. Le poly-L-glutamate de méthyle marqué (PMLG-CP) est isolé par précipitation dans l'éthanol absolu. L'élimination des groupes méthyls est réalisée par saponification. Une solution à 5% de PMLG-CP dans le dioxane est traitée par deux équivalents (en groupes esters) de soude éthanolique 1 M. Le sel de sodium du PLGA-CP précipite. Au bout de 48 heures il est isolé par filtration et dialysé pendant

10 jours contre de l'eau distillée. Le rendement global est de 50%. Une mesure de viscosité en solution aqueuse /155/ indique un \overline{DP} de 67 confirmé par la détermination du nombre de radicaux libres par RPE.



PLGA-CP

XI.5.b. PLGA-CL (XXI). Acide poly-L-glutamique marqué par un radical TEMPO sur une chaîne latérale.

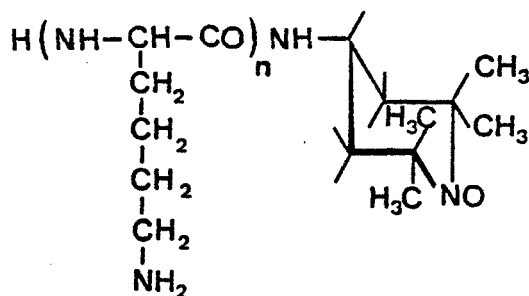


PLGA-CL

Nous avons utilisé comme agent de couplage une carbodiimide hydrosoluble : la CMC:[1-cyclohexyl-3(2 morpholino-ethyl) carbodiimide metho-p-toluène sulfonate de sodium] (XVII) /156/. Le schéma réactionnel est représenté sur la figure XI.5.

Une solution de 450 mg de PLGA ($\overline{DP} = 100$) soit $3 \cdot 10^{-3}$ équivalents COOH, dans 15 ml d'eau est ajustée à pH = 5. Après addition de 15 mg ($3 \cdot 10^{-5}$ mole) de CMC (XVII) et de 10 mg ($6 \cdot 10^{-5}$ mole) de TEMPO-amine le milieu réactionnel est porté à pH = 4,75 et incubé à 37°C pendant 6 heures. Après trois fois 3 jours de dialyse contre successivement de l'acide acétique 0,05 N, du bicarbonate de sodium 0,1 N et de l'eau distillée le PLGA est isolé par lyophilisation (507 mg, 96%) sous forme de sel de sodium. Le taux de marquage est de 1% (par RPE) soit statistiquement un radical TEMPO par molécule de PLGA-CL.

XI.5.c. PLL-CP. Poly-L-lysine marquée par un radical TEMPO à l'extrémité C-terminale de la chaîne principale.



PLL-CP

La synthèse est identique à celle de la poly-L-lysine non marquée (paragraphe XI.4.c) en remplaçant l'hexylamine par 17 mg (10^{-4} mole) de TEMPO-amine. Les degrés de polymérisation mesurés par RPE sur la PTFAL-CP intermédiaire et sur PLL-CP sont respectivement de 146 et 138. Le déblocage par la pipéridine ne provoque donc ni coupure de chaîne principale ni délétion de radicaux. Ces valeurs

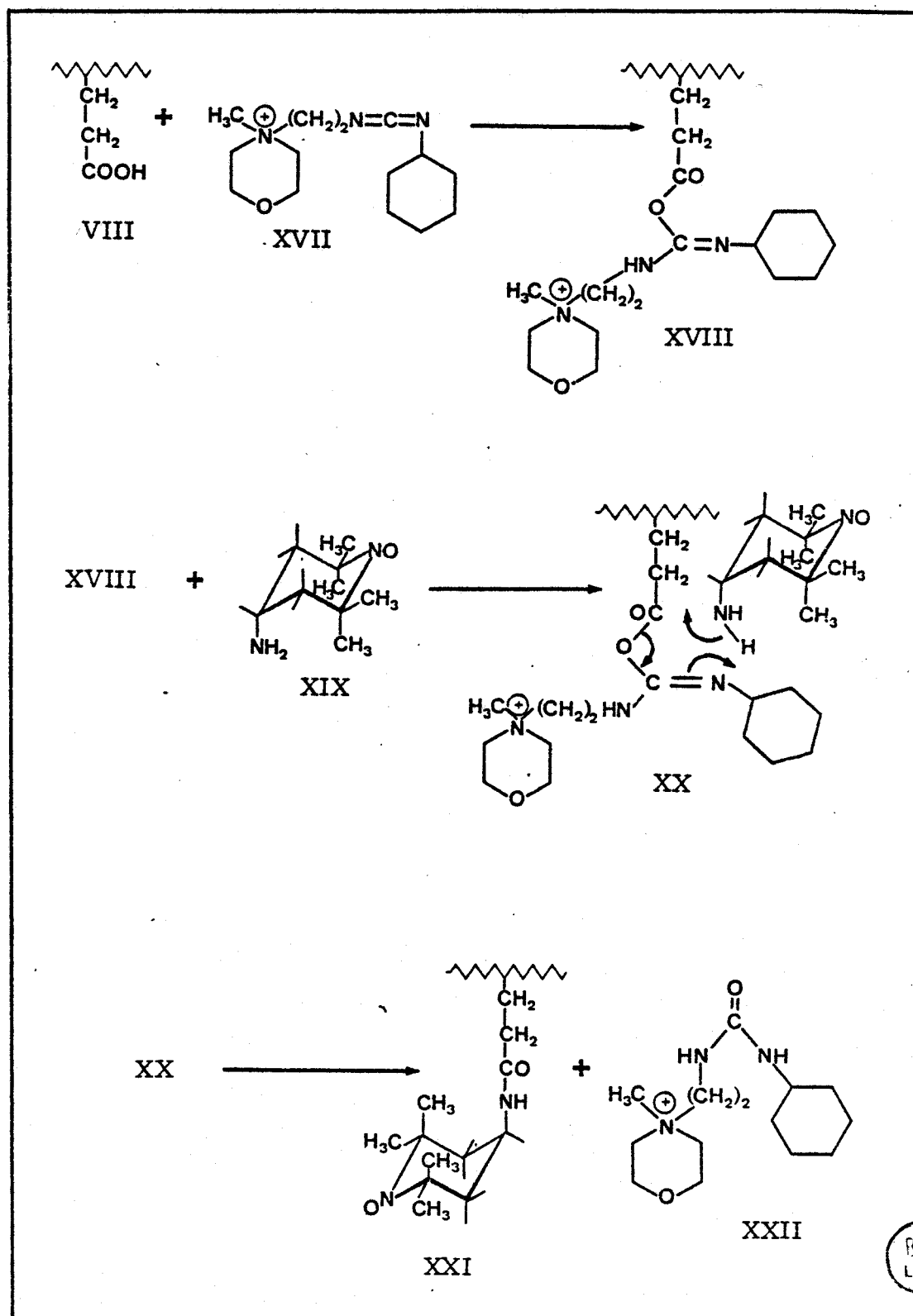
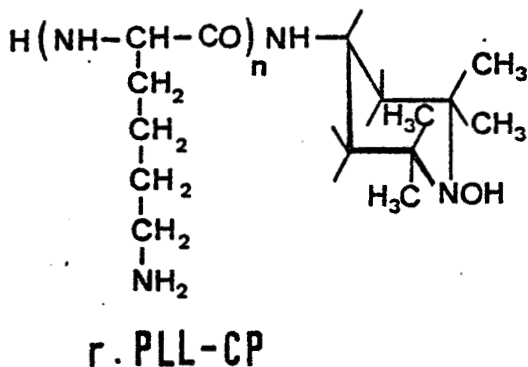


Figure XI.5. Principe de la méthode de marquage d'une chaîne latérale du PLGA par un radical TEMPO.

BUS
LILLE

sont en bon accord avec celles déterminées par viscosimétrie sur la PLL diamagnétique.

XI.5.d. Analogie diamagnétique de PLL-CP. r-PLL-CP.



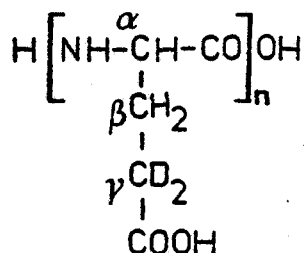
La réduction du radical TEMPO est effectuée par traitement de la PLL-CP par 2 équivalents (exprimés en groupes TEMPO) d'une solution aqueuse fraîchement préparée d'ascorbate de sodium 0,1 N. La disparition du paramagnétisme est suivie par RPE. Elle est pratiquement instantanée. Les signaux des CH₃ du groupe TEMPO réduit sont visibles sur le spectre ¹H de r-PLL-CP à 250 MHz (voir la figure V.4).

L'intégration des raies de l'initiateur permettant une estimation sûre du $\overline{DP} / 157 /$, nous avons obtenu une valeur de 140 en très bon accord avec les résultats de RPE avant réduction.

Tous les polypeptides marqués sont conservés à -30°C sur tamis moléculaires 3 Å et soude caustique afin d'éviter la perte de paramagnétisme électronique en présence de vapeurs acides.

XI.6. DEUTERATIONS SELECTIVES.

XI.6.a. PLGAY γ d₂



PLGA $\gamma\gamma$ d₂

L'acide L-glutamique est sélectivement deutéré en position γ par la méthode classique /158/ modifiée comme suit : 6 g d'acide L-glutamique (recristallisé dans D₂O) sont mis en suspension dans 40 ml de DC1 6N (99,5% D) dans une ampoule de verre. Après dégazage sous vide le contenu est lentement porté à 70°C. La solution limpide obtenue est maintenue à 105-108°C pendant 5 jours. L'excès de DC1 est éliminé par évaporations successives en présence d'eau. Le résidu solide repris dans 30 ml d'eau est ajusté à pH = 3,3 par de la pyridine. Après addition de 2 volumes d'éthanol on obtient 5,8 g (96%) d'acide L-glutamique $\gamma\gamma$ d₂. La rotation spécifique est identique à celle du composé de départ. Le spectre RMN à 250 MHz (Fig. XI.6.b) indique un taux de deutération voisin de 95%. Dans les conditions utilisées on n'observe pas de β -deutération comme c'est le cas avec les β -amino-acides /159/.

La polymérisation est effectuée de façon analogue à celle du PLGA normal. Le taux d'échange sur le PLGAY γ d₂ est identique à celui du monomère. La masse moléculaire déduite des mesures de viscosité correspond à $\overline{DP} = 95$.

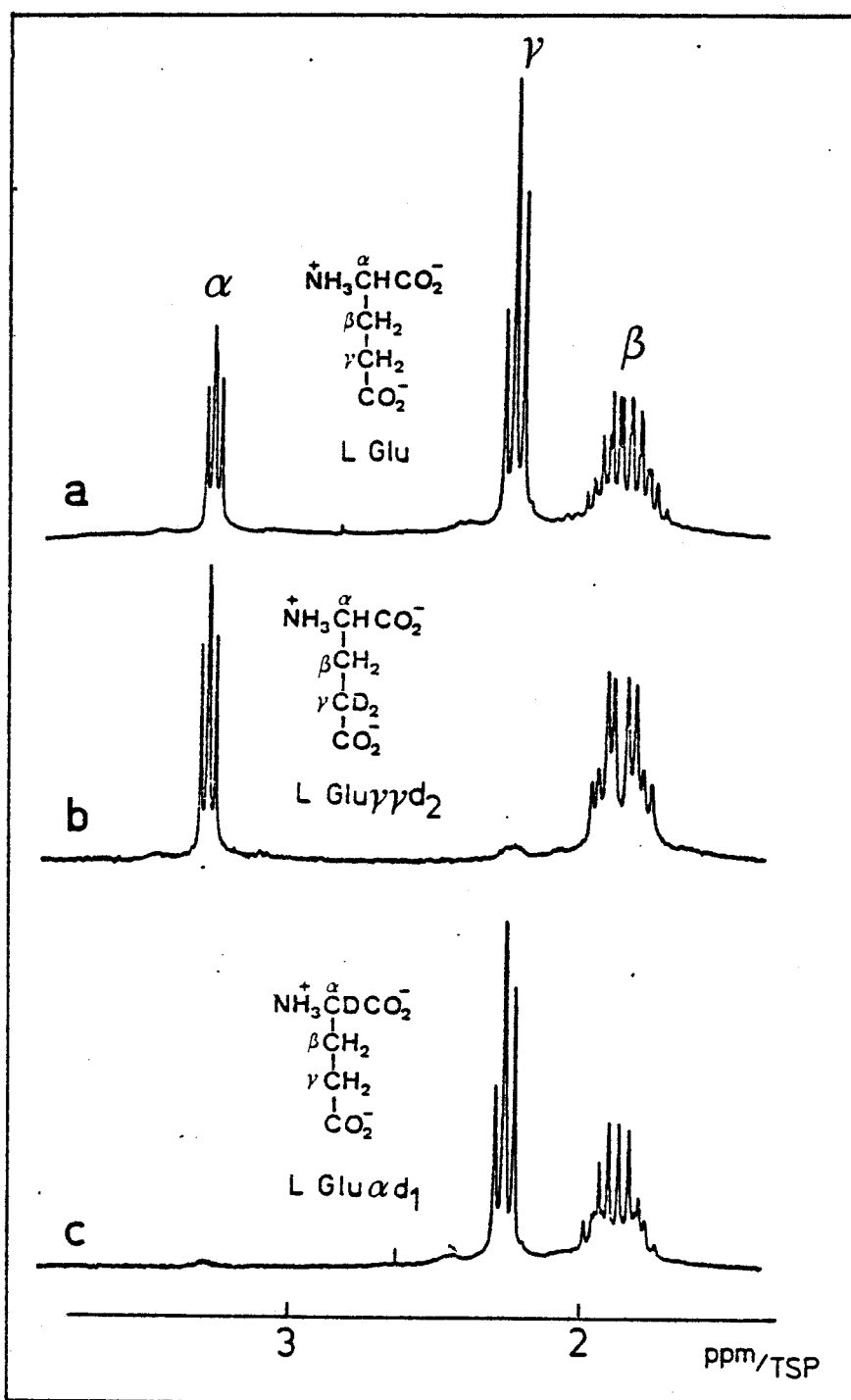


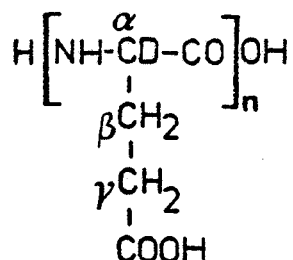
Figure XI.6. Spectres RMN ^1H à 250 MHz des dérivés deutérés de l'acide L-glutamique.

a : Acide L-glutamique 10^{-2} M pH = 7,0.

b : Acide L-glutamique $\gamma\gamma\text{d}_2$ 10^{-2} M pH = 7,4.

c : Acide L-glutamique αd_1 10^{-2} M pH = 6,9.

XI.6.b. PLGA α d₁

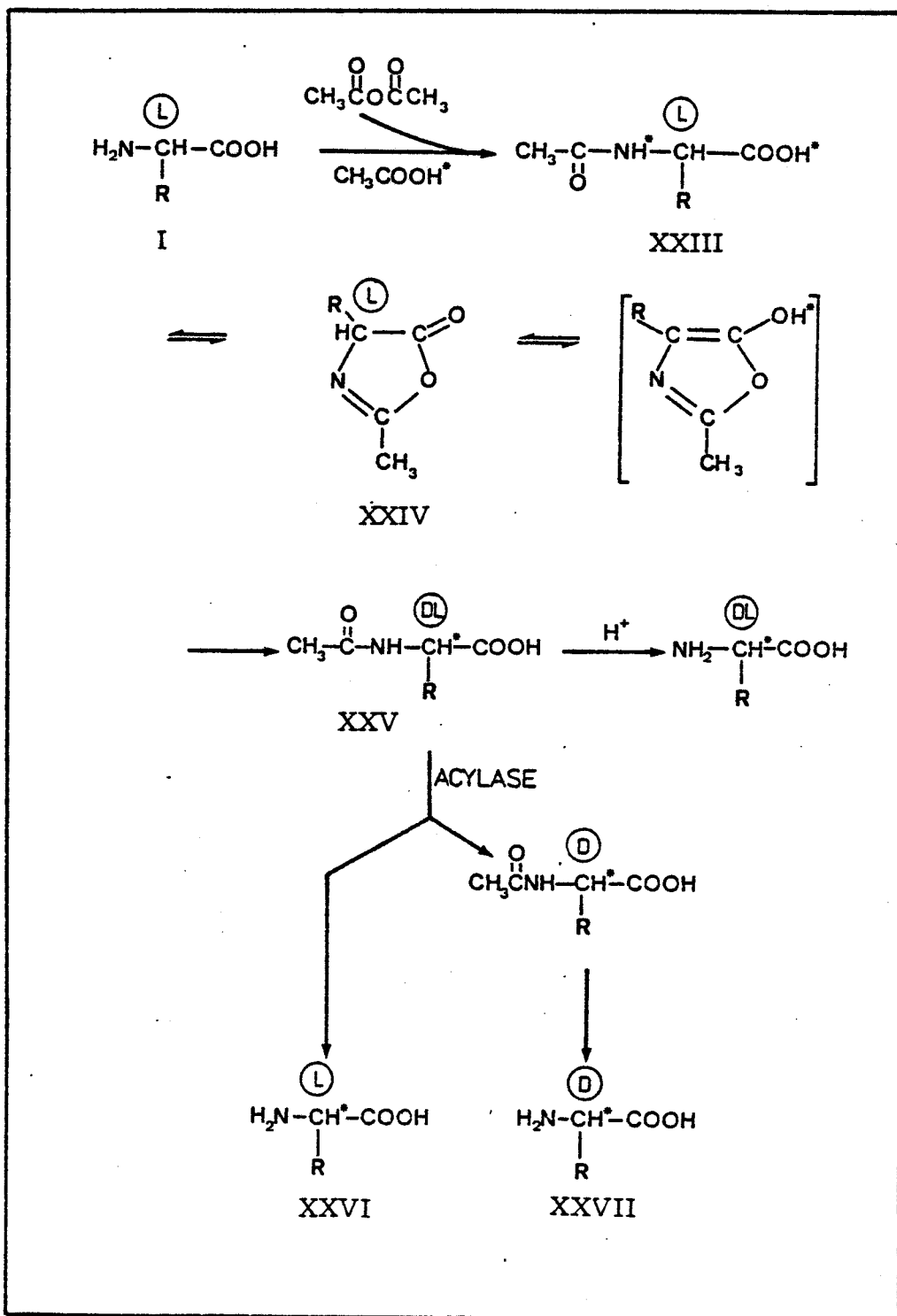


PLGA α d₁

Nous avons été amenés à mettre au point une méthode d' α -deutération de l'acide L-glutamique qui s'est avérée applicable à la grande majorité des α -amino-acides /160/ et extensible à la tritiation. Une technique similaire bien qu'expérimentalement plus complexe a été récemment proposée par HRUBY *et al.* /167/. Le principe général est schématisé par la figure XI.7.

L' α -amino-acide est acétylé par l'anhydride acétique dans l'acide acétique marqué par l'isotope souhaité. Par chauffage en présence d'un excès d'anhydride, le N-acétyl amino-acide (XXIII) se déshydrate pour former l'azlactone correspondante (XXIV). L'équilibre tautomérique de ce composé conduit à une racémisation avec incorporation de H* en position α .

Le N-acétyl amino-acide racémique marqué en α (XXV) peut alors être résolu directement en les deux antipodes optiques de l' α -amino-acide par action d'une enzyme, par exemple l'acylase I. Nous décrirons ici le mode opératoire appliqué à l'acide-L-glutamique. A part quelques modifications qui seront signalées par la suite cette technique peut être appliquée directement à la grande majorité des α -amino-acides.



3115
LILLE

Figure XI.7. Principe du marquage sélectif des amino-acides en position α par un isotope de l'hydrogène. (H^* représente ^2H ou ^3H).

i) Racémisation et deutération. N-acétyl dl-glu α_1

3,8 g ($2 \cdot 10^{-2}$ moles) d'acide L-glutamique (préalablement recristallisé dans D_2O) sont dissouts dans 20 ml de CH_3COOD à ébullition. (CH_3COOD est préparé par hydrolyse d'anhydride acétique par D_2O). Après addition goutte à goutte de 2 équivalents d'anhydride acétique on porte 2 minutes à ébullition. La solution est refroidie rapidement et concentrée à sec. Afin d'améliorer le taux de deutération l'huile résiduelle peut être traitée à nouveau selon le même schéma en utilisant cette fois un seul équivalent d'anhydride acétique. Le N-acétyl α -amino-acide racémique α -deutééré peut être isolé par recristallisation (dans l'eau pour le dérivé de L-glu). En général on l'utilise directement pour l'étape ultérieure. L' α -amino-acide racémique α -deutééré peut être obtenu à ce niveau par hydrolyse du dérivé acétylé pendant 2 heures à 100° dans un excès de HCl 2N.

ii) Résolution enzymatique.

5 g (25 mmoles) de N-acétyl dl-glu α_1 sont dissouts dans 200 ml d'eau et ajustés à pH = 7 par de l'ammoniaque concentrée. On ajoute alors 13 mg d'acylase I (nous avons utilisé de l'acylase Sigma dont l'activité est de 1080 UI/mg). Après dispersion de l'enzyme, on laisse incuber 24 heures à $37^\circ C$.

L'enzyme est dénaturée par addition de 5 ml d'acide acétique glacial et chauffage à $60^\circ C$ pendant 10 minutes. Le précipité est éliminé par filtration sur de la célite contenant 5% de charbon actif. Après concentration à sec à l'évaporateur rotatif de la solution acidifiée le résidu est extrait par de l'éthanol aqueux à 60% (v/v). La fraction insoluble est recristallisée dans l'eau bouillante. On obtient ainsi 1,8 g (95%) d'acide L-glutamique α_1 dont le pouvoir rotatoire est identique à celui de l'acide de départ. Le spectre RMN 1H (Fig. XI.6.c) indique un taux d'échange d'au moins 95% exclusivement en position α . La solution alcoolique contient le N-acétyl-D-glutamate α_1 et du chlorure d'ammonium. Il permet donc d'obtenir l'acide D-glutamique α_1 par hydrolyse acide.

La polymérisation de L-glu α_1 est conduite de façon analogue à celle du composé non deutéré. Le polymère obtenu possède un \overline{DP} de 110. Le taux d'échange en position α est identique à celui du monomère indiquant que le procédé de polymérisation ne provoque pas de racémisation.

iii) Remarques sur la méthode d' α deutération.

La technique a été appliquée à différents α -amino-acides. Le tableau XI.1 regroupe les résultats obtenus :

Amino acide	Rendement en dérivé acétylé (%)	Taux de deutération*	Rendement en dl-amino-acide- α_1
Ala	89	0,96	100
Val	94	0,98	100
Leu	96	0,97	100
nor Leu	96	0,98	98
Met	90	0,97	91
Thr	93	0,89	92
Pro	98	0,96	96
Glu	100	0,96	95
Asp	83	0,08	30
Phe	97	0,93	91
Tyr	91	0,92	90
His	92	0,92	90
Trp	90	0,94	88
Lys	73	0,15	21

* après deux cycles.

Tableau XI.1. Résultats d' α deutération de divers α -amino-acides.

Les résultats sont pratiquement comparables pour tous les α -amino-acides étudiés à l'exception de l'acide aspartique et de la lysine qui ne réagissent que très lentement. La préparation de L-Asp α_1 peut d'ailleurs être réalisée plus facilement par action de la transaminase spécifique sur l'acide oxaloacétique en milieu deutéré /162/. Enfin l'hydrolyse des dérivés acétylés du tryptophane doit être effectuée par H_2SO_4 1 N pour éviter la dégradation du noyau indole en milieu chlorhydrique.

- Dans le cas des amino-acides hydroxylés (sérine, thréonine, tyrosines) ou diaminés (lysine, ornithine, etc .) il est nécessaire d'ajouter un équivalent supplémentaire d'anhydride acétique pour acétyler ces fonctions ou d'utiliser un dérivé sélectivement bloqué.

- La durée de réaction (2 minutes) est un paramètre très important. En effet, parallèlement à l' α -deutération il se produit un échange beaucoup plus lent sur le groupe acétyl. Ce phénomène parasite revient à enrichir le solvant en 1H et peut donc conduire à une baisse du taux de deutération en position α pour les durées de réaction importantes. Cette remarque est illustrée par la figure XI.8. La valeur de 2 minutes paraît donc être optimale.

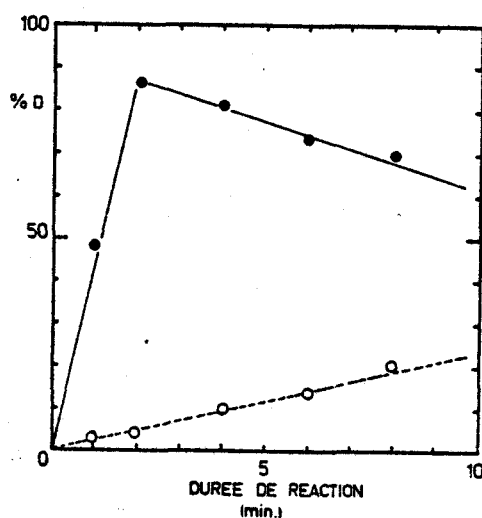
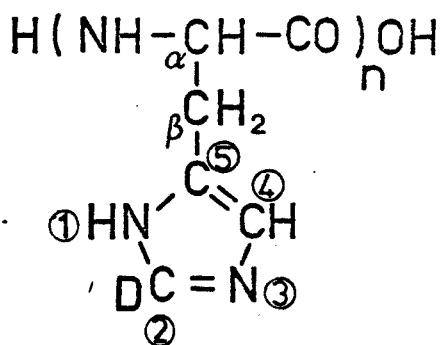


Figure XI.8. Influence de la durée de réaction sur les taux de deutération en α (●) et sur l'acétyl (○) dans le cas de l'acide glutamique.

- La méthode présentée ici est très rapide et conduit à des rendements importants. De plus le faible coût des matières premières permet de l'appliquer à grande échelle. On peut par exemple utiliser des α -amino-acides racémiques comme composés de départ, la pureté optique originelle n'ayant pas d'importance. Enfin, il est possible de recycler le N-acétyl D amino-acide α_1 non utilisé pour une préparation ultérieure.

- Les conditions de résolution enzymatique doivent toutefois être adaptées à l'acide-amino considéré en particulier en ce qui concerne la quantité d'enzyme et le temps d'incubation. Ces paramètres sont connus et tabulés /163/.

XI.6.c. im-2d₁-PLH



im2 d₁ PLH

La labilité du proton en position 2 de l'imidazole est bien connue /164/. La deutération sélective est obtenue par chauffage d'une solution 0,5 M de poly-L-histidine à pD = 6 dans D₂O pendant 1 heure à 85-90°C. La cinétique d'échange est suivie par RMN du proton. Un taux de deutération de 100% est atteint dans ces conditions. Après acidification à pH = 3 le polymère est isolé par lyophilisation.

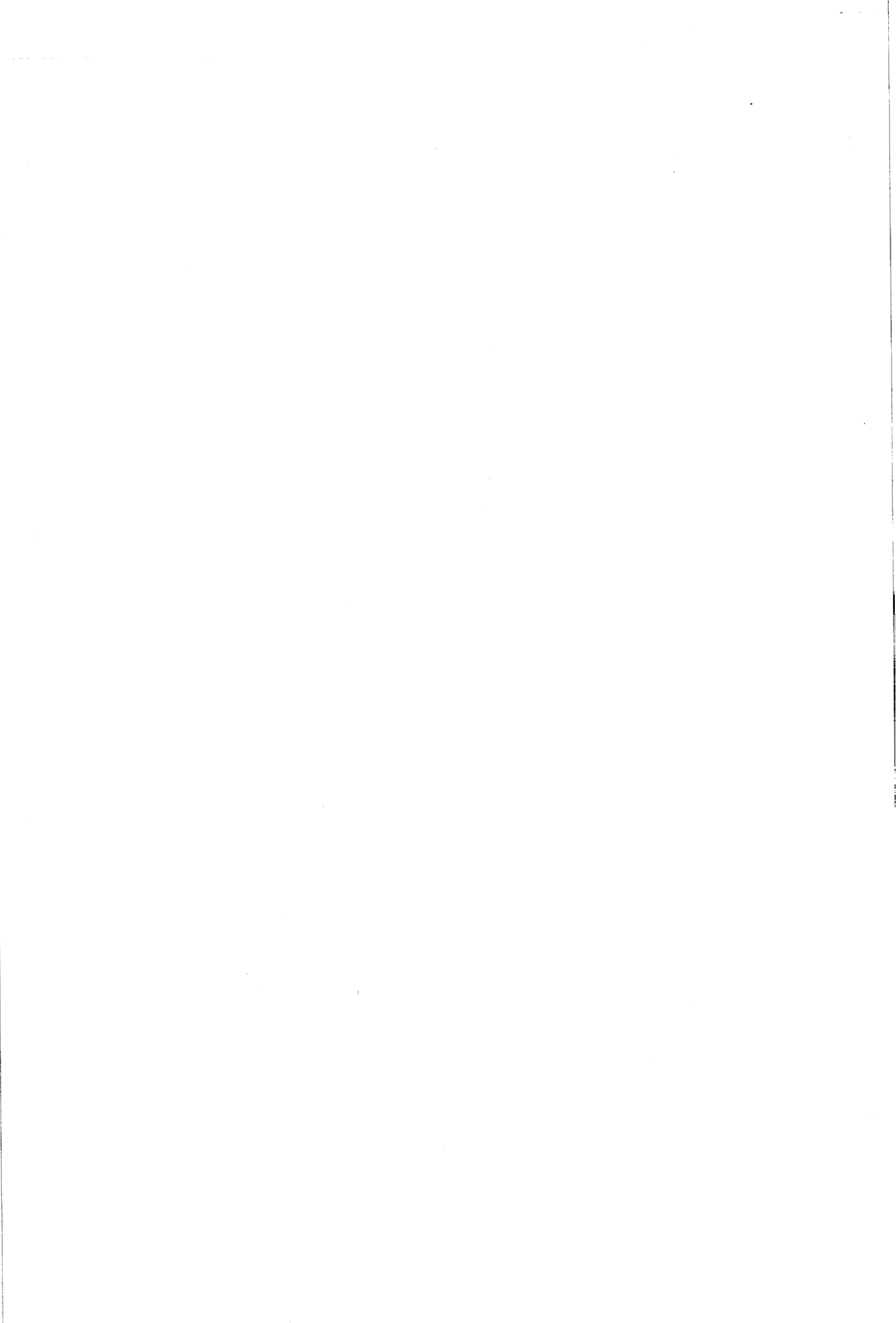
XI.7. PREPARATION DES ECHANTILLONS.

Les solutions destinées à la RPE sont préparées dans H₂O. Par contre pour la RMN de ¹³C et de ¹H il faut disposer de solutions dans D₂O exemptes de contaminants paramagnétiques tels que les ions de transition ou l'oxygène. Le polymère est dissout dans D₂O (99,8% D) et traité à pH ≈ 7 par une petite quantité de résine chélatante (Chelex 100) destinée à séquestrer les ions métalliques bi et trivalents, donc en particulier les impuretés paramagnétiques telles que Mg²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, etc. Après élimination de la résine le filtrat est ajusté au pH désiré par NaOD ou DCl concentrés et lyophilisé. Avant utilisation la quantité requise de polymère est pesée et dissoute dans D₂O à 99,8% D et 99,95% D pour respectivement les mesures de RMN de ¹³C et de ¹H. L'oxygène dissout est alors éliminé par un lent barbotage d'azote sec directement dans le tube de mesure pendant 5 à 10 minutes.

Pour la RMN du deutérium on travaille bien sûr dans H₂O. Pour supprimer la raie résiduelle de HDO naturelle on peut lyophiliser le polymère dans H₂O et le redissoudre dans de l'eau appauvrie en deutérium. Ce processus est pratiquement indispensable pour les polymères α-deutérés. Les caractéristiques des divers appareils de RMN et RPE utilisés sont regroupés dans le tableau XI.2. Ils sont tous munis d'un système de régulation thermique permettant de maintenir l'échantillon à une température donnée à ± 1°C près.

Appareil	Type d'expérience	Mode d'opération	Observables	H ₀ (kG)	ν ¹³ C (MHz)	ν ¹ H (MHz)	ν ² H (MHz)	ν _{e⁻} (GHz)
Varian CTF 20	RMN	TF	¹³ C	18,8	20,0	-	-	-
Varian XL 100	RMN	TF	multi noyaux	23,5	25,2	100	15,4	-
Brucker WH 90	RMN	TF	multi noyaux	21,1	22,63	90,02	13,80	-
CAMECA TSN 250	RMN	TF	¹ H, ¹³ C	58,7	62,86	250	-	-
Varian E 9	RPE	balayage continu de H ₀	électron	3,2	-	-	-	9,1

Tableau XI.2. Caractéristiques des différents appareils de RMN et RPE utilisés.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - G.D. FASMAN, "Poly- α -amino-acids" Marcel Dekker New York, 1967.
- 2 - H. NEUMANN, N. SHARON et E. KATCHALSKI, Nature (1962) 195, 1002.
- 3 - W.G. MILLER, J. Am. Chem. Soc. (1961) 83, 259-65.
- 4 - S. FUCHS et M. SELA, Biochem. J. (1964) 93, 566-72.
- 5 - C.B. ANFINSEN, M. SELA et J.P. COOKE, J. Biol. Chem. (1962) 237, 1825-31.
- 6 - A.H. MEHLER et A. BANK, J. Biol. Chem. (1963) 238, 2888-89.
- 7 - R.A. DWEK, "Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry" Clarendon Press, Oxford 1973.
- 8 - E.M. BRADBURY et C. CRANE-ROBINSON, Nature (1968) 220, 1079-84.
- 9 - O. CONVERT, J.H. GRIFFIN, C. DIBELLO, P. NICOLAS et P. COHEN, Biochemistry (1977) 16, 5061-64.
- 10 - P.K. JEFFERS, W. Mc SUTHERLAND et R.G. KHALIFAH, Biochemistry (1972) 17, 1305-12.
- 11 - J. APPLEQUIST et J.L. BRESLOW, J. Am. Chem. Soc. (1963) 85, 2869-79.
- 12 - G.D. FASMAN, C. LINDBLOW et E. BODENHEIMER, Biochemistry (1964) 3, 155-68.
- 13 - M. SELA et L.A. STEINER, Biochemistry (1963) 2, 416-20.
- 14 - F.J. JOUBERT, N. LOTAN et H.A. SCHERAGA, Biochemistry (1970) 9, 2197-2211.
- 15 - A. de VRIES, A. SCHWAGER et E. KATCHALSKI, Biochem. J. (1951) 49, 10-17.
- 16 - S.E. KORNGUTH, M.A. STAHMANN et G.W. ANDERSON, Exptl. Cell. Res. (1961) 24, 484-86.

- 17 - H. CONRAD-DAVIES, L. SMITH et A. WASSERMAN, *Biochim. Biophys. Acta* (1964) 85, 238-46.
- 18 - E.E. DELLERT et M.A. STAHMANN, *Nature* (1955) 176, 1028.
- 19 - M.I. DOLIN, *J. Biol. Chem.* (1962) 237, 1626-33.
- 20 - M. IZAWA, W.G. ALLFREY et A.E. MIRSKY, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1963) 49, 544-51.
- 21 - M. TSUBOI, K. AMTSUO et P.O.P. T'SO, *J. Mol. Biol.* (1966) 15, 256-58.
- 22 - A. NEVO, A. de VRIES et A. KATCHALSKY, *Biochim. Biophys. Acta* (1959) 33, 120.
- 23 - D. MAZIA, G. SCHATTEN et W. SALE, *J. Cell. Biol.* (1975) 66, 198-200.
- 24 - E. PEGGION, A. COSANI, M. TEBOJEVICH et L. ROMANIN-JACUR, *J.C.S. Chem. Comm.* (1974) 314-316.
- 25 - S. BEYCHOK, M.N. PFLUMM et J.E. LEHMANN, *J. Am. Chem. Soc.* (1965) 87, 3990-96.
- 26 - C.G. OVERBERGER et H. MAKI, *Macromolecules* (1970) 3, 220-23.
- 27 - J.H. HOGGLE et R.E. SCHIRMER, "The Nuclear Overhauser Effect" Academic Press, New York 1971.
- 28 - C. CHACHATY, J.P. QUAEGEBEUR et T. YASUKAWA, *Chem. Phys. Letters* (1978) 59, 293-97.
- 29 - A. TSUTSUMI, J.P. QUAEGEBEUR et C. CHACHATY, *Molec. Phys.* (1979) 38, 1717-35.
- 30 - R.S. NORTON, A.O. CLOUSE, R. ADDLEMAN et A. ALLERHAND, *J. Am. Chem. Soc.* (1977) 99, 79-83.
- 31 - K. WUTHRICH, "NMR in Biological Research" American Elsevier 1976.
- 32 - H.H. MANTSCH, H. SAITÔ et I.C.P. SMITH, "Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", J.W. EMSLEY, J. FEENEY et L.H. SUTCLIFFE Eds. Pergamon Press Londres 1977.
- 33 - D.J. WILBUR, R.S. NORTON, A.O. CLOUSE, R. ADDLEMAN et A. ALLERHAND, *J. Am. Chem. Soc.* (1976) 98, 8250-54.
- 34 - B. BLICHARKA, H.G. HERTZ et H. VERSMOLD, *J. Mag. Res.* (1979) 33, 531-40.
- 35 - T.L. JAMES, G.B. MATSOW et J.D. KUNTZ, *J. Am. Chem. Soc.* (1978) 100, 3590-94.
- 36 - D. SHAW, "Fourier Transform NMR Spectroscopy" Elsevier, Amsterdam 1976.

- 37 - H.Y. CARR et E.H. PURCELL, Phys. Rev. (1954) 94, 630-35.
- 38 - I. SOLOMON, Phys. Rev. (1955) 99, 559-65.
- 39 - K. AKASAKA, T. IMOTO, S. SHIBITA et H. HATANO, J. Mag. Res. (1975) 18, 328-41.
- 40 - B. PERLY, G. LANGLET et C. CHACHATY, Biochim. Biophys. Acta (1980) 628, 161-73.
- 41 - C. CHACHATY, B. PERLY, A. FORCHIONI et G. LANGLET, Biopolymers (1980) 19, 1211-39.
- 42 - A. ABRAGAM, "Les Principes du Magnétisme Nucléaire" Presses Universitaires de France, 1961.
- 43 - J.P. BEHR et J.M. LEHN, J. Am. Chem. Soc. (1976) 98, 1743-47.
- 44 - "Advances in Nuclear Quadrupole Resonance". J.A.S. SMITH Ed., Vol. 3, Heyden, Londres 1978.
- 45 - N. BLOEMBERGEN, E.M. PURCELL et R.V. POUND, J. Chem. Phys. (1948) 37, 679-83.
- 46 - J. SCHAFER, Macromolecules (1973) 6, 882-88.
- 47 - G. HERMANN et G. WEILL, Macromolecules (1975) 8, 171-76.
- 48 - D.E. WOESSNER, J. Chem. Phys. (1962) 37, 647-54.
- 49 - D.E. WOESSNER, J. Chem. Phys. (1962) 36, 1-4.
- 50 - D. DODDRELL, V. GLUSHKO et A. ALLERHAND, J. Chem. Phys. (1972) 56, 3683-83.
- 51 - A. ALLERHAND, D. DODDRELL et R. KOMOROSKY, J. Chem. Phys. (1971) 55, 189-98.
- 52 - R.E. LONDON et J. AVITABILE, J. Am. Chem. Soc. (1978) 100, 7159-65.
- 53 - R.J. WITTEBORT et A. SZABO, J. Chem. Phys. (1978) 69, 1722-36.
- 54 - D. GHESQUIERE, BUU BAN et C. CHACHATY, Macromolecules (1977) 10, 745-52.
- 55 - J.G. GILMAN, Biochemistry (1979) 18, 2273-79.
- 56 - D.E. WOESSNER, J. Chem. Phys. (1965) 42, 1855-59.
- 57 - D.E. WOESSNER, B.J. SHOWDEN et G.H. MEYER, J. Chem. Phys. (1969) 50, 719-21.
- 58 - A. TSUTSUMI, Molec. Phys. (1979) 37, 111-127.
- 59 - D. WALLACH, J. Chem. Phys. (1967) 47, 5258-68.

- 60 - R.E. LONDON et J. AVITABILE, J. Chem. Phys. (1976) 65, 243-50.
- 61 - G.C. LEVY, D.E. AXELSON, R. SCHWARZ et J. HOCHMANN, J. Am. Chem. Soc. (1978) 100, 410-24.
- 62 - Y.K. LEVINE, N.J.M. BIRDSALL, A.G. LEE, J.C. METCALFE, P. PARTINGTON et G.C.K. ROBERTS, J. Chem. Phys. (1974) 60, 2890-99.
- 63 - R.E. LONDON et J. AVITABILE, J. Am. Chem. Soc. (1977) 99, 7765-76.
- 64 - T. YASUKAWA, D. GHESQUIERE et C. CHACHATY, Chem. Phys. Letters (1977) 45, 279-82.
- 65 - D. GHESQUIERE, A. TSUTSUMI et C. CHACHATY, Macromolecules (1979) 12, 775-83.
- 66 - A. TSUTSUMI et C. CHACHATY, Macromolecules (1979) 12, 429-35.
- 67 - F.A. BOVEY, "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy" Academic Press, New York 1969.
- 68 - K.D. KOPPLE, C.R. WILEY et P. TANSKI, Biopolymers (1973) 12; 627-40.
- 69 - K.G.R. PACHLER, Spectrochimica Acta (1964) 20, 581-87.
- 70 - A.J. FISCHMAN, H.R. WYSSBROD, W.C. AGOSTA et D. COWBURN J. Am. Chem. Soc. (1978) 100, 54-63.
- 71 - J.R. LYERLA, B.H. BARBER et M.H. FREEDMAN, Can. J. Biochem. (1973) 51, 460-64.
- 72 - H. SAITÔ et I.C.P. SMITH, Arch. Biochem. Biophys. (1973). 158, 154-63.
- 73 - P.K. GLASCOE et L.A. LONG, J. Phys. Chem. (1960) 64, 188-90.
- 74 - J.J. LED et S.B. PETERSEN, J. Mag. Res. (1979) 33, 603-17.
- 75 - K. NAGAYAMA, F. TODA et N. UHEYAMA, Biopolymers (1975) 14, 2489-2506.
- 76 - R. Di BLASI et A.S. VERDINI, Biopolymers (1974) 13, 2209-25.
- 77 - E.M. BRADBURY, C. CRANE-ROBINSON et H.W.E. RATTLE, Polymer (1970) 11, 277-83.
- 78 - E.M. BRADBURY, P. CARY et C. CRANE-ROBINSON, Macromolecules (1972) 5, 581-89.
- 79 - M. GOODMAN, F. TODA et N. UHEYAMA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1973) 70, 331-33.
- 80 - H.J. LADER, R.A. KOMOROSKI et L. MANDELKERN, Biopolymers (1977) 16, 895-905.

- 81 - "Spin Labelling" L.J. BERLINER Ed. Academic Press, New York 1976.
- 82 - B.H. ROBINSON, L.R. DALTON, L.A. DALTON et A.L. KWIRAM, Chem. Phys. Letters (1974) 29, 56-64.
- 83 - R.C. PERKINS, Jr., T. LIONEL, B.H. ROBINSON, L.A. DALTON et L.R. DALTON, Chem. Phys. (1976) 16, 393-404.
- 84 - A.I. VISTNES, J. Mag. Res. (1978) 29, 495-507.
- 85 - J.E. BENTON et R.M. LYNDEN-BELL, J.C.S. Faraday Transactions II. (1975) 71, 807-11.
- 86 - S.P. VAN, G.B. BIRRELL et O.H. GRIFFITH, J. Mag. Res. (1974) 15, 444-59.
- 87 - D. THOMAS et H.M. Mc CONNELL, Chem. Phys. Letters (1974) 25, 470-75.
- 88 - V.A. LIVSHITS, J. Mag. Res. (1976) 24, 307-13.
- 89 - D. KIVELSON, J. Chem. Phys. (1960) 33, 1094-1102.
- 90 - T.I. STONE, T. BUCKMAN, P.L. NORDIO et H.M. Mc CONNELL, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1965) 54, 1010.
- 91 - S.A. GOLDMAN, G.V. BRUNO, C.F. POLNASZEK et J.H. FREED, J. Chem. Phys. (1972) 56, 716-21.
- 92 - E.L. WEE et W.G. MILLER, J. Phys. Chem. (1973) 77, 182-89.
- 93 - P. DOTY, A. WADA, J.T. YANG et E.R. BLOUT, J. Polym. Sci. (1953) 23, 851.
- 94 - M. DAoust, M. CHOQUETTE et N. HODUC, Biopolymers (1976) 15, 2059-79.
- 95 - R.G. BRYANT, J. Am. Chem. Soc. (1967) 89, 2486-2504.
- 96 - C. PRICE, F. HEATLEY, T.J. HOLTON et P.A. HARRIS, Chem. Phys. Letters (1977) 49, 504-7.
- 97 - P.J. FLORY, "Statistical Mechanics of Chain molecules", Interscience, New York 1969.
- 98 - A. ALLERHAND et E. OLDFIELD, Biochemistry (1973) 12, 3428-33.
- 99 - Y. HIRAI, T. ITO et Y. IMAMURA, Bull. Chem. Soc. Japan (1978) 51, 677-81.
- 100 - B.R. JENNINGS, G. SPACH et J.M. SCHUSTER, Biopolymers (1968) 6, 635-52.
- 101 - J. APPLEQUIST et P. DOTY, "Polyamino-acids, Polypeptides and Proteins" M.A. STAHMANN Ed., Madison 1962.

- 102 - D.E. CARSTROM, W.G. MILLER et R.G. BRYANT, J. Phys. Chem. (1973) 77, 2759-70.
- 103 - M. MORCELLET et C. LOUCHEUX, Biopolymers (1976) 15, 1257-61.
- 104 - M. MORCELLET et C. LOUCHEUX, Biopolymers (1978) 17, 593-604.
- 105 - G.E. PERMANN et E. KATCHALSKI, J. Am. Chem. Soc. (1962) 84, 452-59.
- 106 - B.I. HUNT et J.G. POWLES, Proc. Phys. Soc. (1966) 88, 513-22.
- 107 - B. VALEUR, L. MONNERIE et J.P. JARRY, J. Polym. Sci., Polym. Phys. (1975) 13, 675-79.
- 108 - A.A. JONES et W.H. STOCKMAYER, J. Polym. Sci., Polym. Phys. (1977) 15, 847-52.
- 109 - T.M. CONNOR, Trans. Faraday Soc. (1964) 60, 1574.
- 110 - D. GHESQUIERE, Rapport C.E.A. R-4935 (1978).
- 111 - R.M. FUOSS et J.G. KIRKWOOD, J. Am. Chem. Soc. (1941) 63, 385.
- 112 - K.S. COLE et R.H. COLE, J. Chem. Phys. (1941) 9, 341-48.
- 113 - A.E. TONELLI et F.A. BOVEY, Macromolecules (1970) 3, 410-411.
- 114 - D.A. TORCHIA et J.R. LYERLA Jr., Biopolymers (1974) 13, 97-114.
- 115 - J.E. ANDERSON, K.J. LIV et R. ULLMAN, Disc. Faraday Soc. (1970) 49, 257-67.
- 116 - A. ALLERHAND et R.K. HAISTONE, J. Chem. Phys. (1972) 56, 3718-20.
- 117 - F. HEATLEY - Polymer (1975) 16, 493-97.
- 118 - G. NAVON et A. LANIR, J. Mag. Res. (1972) 8, 144-48.
- 119 - A.G. MARSHALL, P.G. SCHMIDT et D.D. SYKES, Biochemistry (1972) 11, 3875.
- 120 - J. PILAR, J. LABSKY, J. KALAL et J.H. FREED, J. Phys. Chem. (1979) 83, 1907-14.
- 121 - "Molecular Structures and dimensions", Vol. A1 International Union of Crystallography ; 1972. ISBN 906046 088X.
- 122 - A. TSUTSUMI, B. PERLY, A. FORCHIONI et C. CHACHATY, Macromolecules (1978) 11, 977-86.
- 123 - B. PERLY, C. CHACHATY et A. TSUTSUMI, J. Am. Chem. Soc. (1980) 102, 1521-28.
- 124 - B. PERLY, Y. CHEVALIER et C. CHACHATY, Soumis pour publication à Macromolecules.

- 125 - Y.P. MYER, *Macromolecules* (1969) 2, 624-34.
- 126 - Y.K. LEVINE, P. PARTINGTON et G.C.K. ROBERTS, *Molec. Phys.* (1973) 25, 497-504.
- 127 - D. GHESQUIERE, C. CHACHATY, BUU BAN et C. LOUCHEUX, *Makrom. Chem.* (1976) 177, 1601-5.
- 128 - A. DARKE et E.G. FINER, *Biopolymers* (1975) 14, 441-56.
- 129 - D.R. WOODHOUSE, W. DERBYSHIRE et P. LILLFORD, *J. Mag. Res.* (1975) 19, 267-80.
- 130 - D.W. URRY, T.L. TRAPANE et M.A. KHALED, *J. Am. Chem. Soc.* (1978) 100, 7744-46.
- 131 - M. CHIEN, G.T. SAMULSKI et C.G. WADE, *Macromolecules* (1973) 6, 638-45.
- 132 - D.G.H. BALLARD et C.H. BAMFORD, *Proc. Roy. Soc., Serie A* (1954) 223, 495-520.
- 133 - M. SZWARC, *Adv. Polym. Sci.* (1965) 4, 31-50.
- 134 - R.E. MYLUND et W.G. MILLER, *Biopolymers* (1964) 2, 131-34.
- 135 - K. NAGAYAMA et S. OKADA, *Polym. J.* (1973) 5, 97-101.
- 136 - E.R. BLOUT et R.H. KARLSON, *J. Am. Chem. Soc.* (1956) 78, 941-46.
- 137 - N. LUPU-LOTAN, A. YARON, A. BERGER et M. SELA, *Biopolymers* (1965) 3, 625-40.
- 138 - J. NOGUCHI, S. TOKURA et N. NISHI, *Die Angew. Makrom. Chem.* (1972) 22, 107-32.
- 139 - G.D. FASMAN, M. IDELSON et E.R. BLOUT, *J. Am. Chem. Soc.* (1961) 83, 709-12.
- 140 - M. SELA, R. ARNON et I. JACOBSON, *Biopolymers* (1963) 1, 517-525.
- 141 - E. SCHALLENBERG et M. CALVIN, *J. Am. Chem. Soc.* (1955) 77, 2779-83.
- 142 - M. HAUPTSCHHEIN, C.S. STOKES et E.A. NODIFF, *J. Am. Chem. Soc.* (1972) 74, 4005-10.
- 143 - V. du VIGNEAUD et O.K. BEHRENS, *J. Biol. Chem.* (1937) 117, 27-31.
- 144 - W.D. FULLER, M.S. VERLANDER et M. GOODMAN, *Biopolymers* (1976) 15, 1869-71.
- 145 - O. SCHALES et S.S. SCHALES, *J. Biol. Chem.* (1941) 140, 879-81.

- 146 - K.S. NORDLAND, G.D. FASMAN, E. KATCHALSKI et E.R. BLOUT, Biopolymers (1963) 1, 277-94.
- 147 - A. PATCHORNIK, A. BERGER et E. KATCHALSKI, J. Am. Chem. Soc. (1957) 79, 5227-30.
- 148 - B.G. OVERELL et V. PETROW, J. Chem. Soc. (1955) 232.
- 149 - P. DOTY, J.H. BRADBURY et A.M. HOLTZER, J. Am. Chem. Soc. (1956) 78, 947-54.
- 150 - N. HODUC, Can. J. Chem. (1978) 56, 1569-74.
- 151 - M. IDELSON et E.R. BLOUT, J. Am. Chem. Soc. (1958) 80, 4631-42.
- 152 - A. WADA, Molec. Phys. (1960) 3, 409-16.
- 153 - A. YARON et A. BERGER, Biochim. Biophys. Acta (1963) 69, 397-99.
- 154 - R. MIYATAKE et J. KUMANOTANI, Makrom. Chem. (1976) 177, 2749-57.
- 155 - S.P. RAO et W.G. MILLER, Biopolymers (1973) 12, 835-37.
- 156 - L.J. LIN et J.F. FOSTER, Anal. Biochem. (1975) 63, 485.
- 157 - J.A. FERRETTI et B.W. NINHAM, Macromolecules (1970) 3, 30-33.
- 158 - A.C. MURRAY et D.L. WILLIAMS, "Organic Synthesis with Isotopes" Vol. IV, Interscience, New York 1972 ; page 1302.
- 159 - V.P. KUMAREV et G.A. ALMANOV, Russ. J. Chem. (1975) 49, 806.
- 160 - B. PERLY, Brevet français 78-05504.
- 161 - D.A. UPSON et V.J. HRUBY, J. Org. Chem. (1977) 42, 2330-32.
- 162 - E. GOUT, S. CHENE, C. BEGUIN et J. PELMONT, Biochem. J. (1978) 171, 719-23.
- 163 - J.P. GREENSTEIN et M. WINITZ, "Chemistry of the amino-acids" Vol. 3, J. Wiley, 1961.
- 164 - J.L. MARKLEY, Accounts of Chemical Research (1975) 8, 70-80.

