

50376
1981
25-1
N° d'ordre : 510

50376
1981
25-1

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Michel BATAILLE

**SYNTHÈSE ET ETUDE CONFORMATIONNELLE^N
PAR R.M.N.
DE TETRAPEPTIDES CONTENANT LA PROLINE**



Soutenue le 23 février 1981 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury	Président	M. A. LABLACHE-COMBIER
	Rapporteurs	MM. C. CHACHATY C. LOUCHEUX M. PTAK
	Examineurs	MM. G. BISERTE J. BRIZON

A JACQUELINE, MA FEMME.

*En reconnaissance de sa patience, de son soutien
et en témoignage de ma profonde affection.*

A LAURENT ET A SEBASTIEN, MES ENFANTS.

Avec toute ma tendresse.

Monsieur C. LOUCHEUX, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille a bien voulu m'accueillir dans son Laboratoire. Je tiens à lui adresser le témoignage de ma reconnaissance pour le travail qu'il m'a confié et à le remercier pour l'intérêt qu'il lui a constamment porté.

Monsieur A. LABLACHE-COMBIER, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques et Directeur de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, a bien voulu me faire l'honneur de présider le Jury de cette thèse. Je tiens à lui exprimer mes remerciements respectueux.

Monsieur M. PTAK, Professeur à l'Université d'Orléans, a bien voulu me faire l'honneur d'être Rapporteur. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour les conseils qu'il m'a prodigués. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Monsieur C. CHACHATY, Directeur du Laboratoire de RMN haute résolution du C.E.N. de Saclay m'a accueilli dans son Laboratoire et m'a fait l'honneur d'être Rapporteur. Qu'il veuille bien accepter mes remerciements respectueux.

Monsieur G. BISERTE, Professeur à l'Université du Droit et de la Santé et Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille m'a fait l'honneur, malgré ses nombreuses occupations, de juger ce travail. Qu'il veuille bien accepter ma déférente gratitude.

Monsieur J. BRIZON, Maître de Conférences à l'Université de Mons et Chargé de Recherches à UCB-Christiaens Bioproducts, a bien voulu me faire l'honneur de faire partie de ce Jury. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes remerciements respectueux.

Que Madame M.H. LOUCHEUX, Maître de Recherches au CNRS veuille bien accepter mes remerciements respectueux pour l'intérêt qu'elle a manifesté lors de la réalisation de ce travail.

La synthèse des peptides a été réalisée en collaboration avec Monsieur B. HECQUET. Je tiens à le remercier et à lui témoigner mon amitié.

Que Madame C. GARBAY et Monsieur B. PERLY veuillent accepter mes remerciements amicaux pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans l'enregistrement des spectres RMN et les fructueuses discussions que nous avons pu avoir.

Mademoiselle A. OLIVIER a réalisé avec soin et minutie la dactylographie de cette thèse et Madame SAINLEGER en a effectué l'impression. Qu'elles soient sincèrement remerciées.

Que Monsieur J.M. BERNARD soit assuré de mon amitié et que mes camarades de Laboratoire trouvent ici l'assurance de ma très grande sympathie.

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

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

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P.GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A.LEBRUN.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M.MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale

M.	BOUGHON Pierre	Algèbre
M.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M.	CELET Paul	Géologie Générale
M.	COEURE Gérard	Analyse
M.	CONSTANT Eugène	Electronique
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOCT Jacques	Génie Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

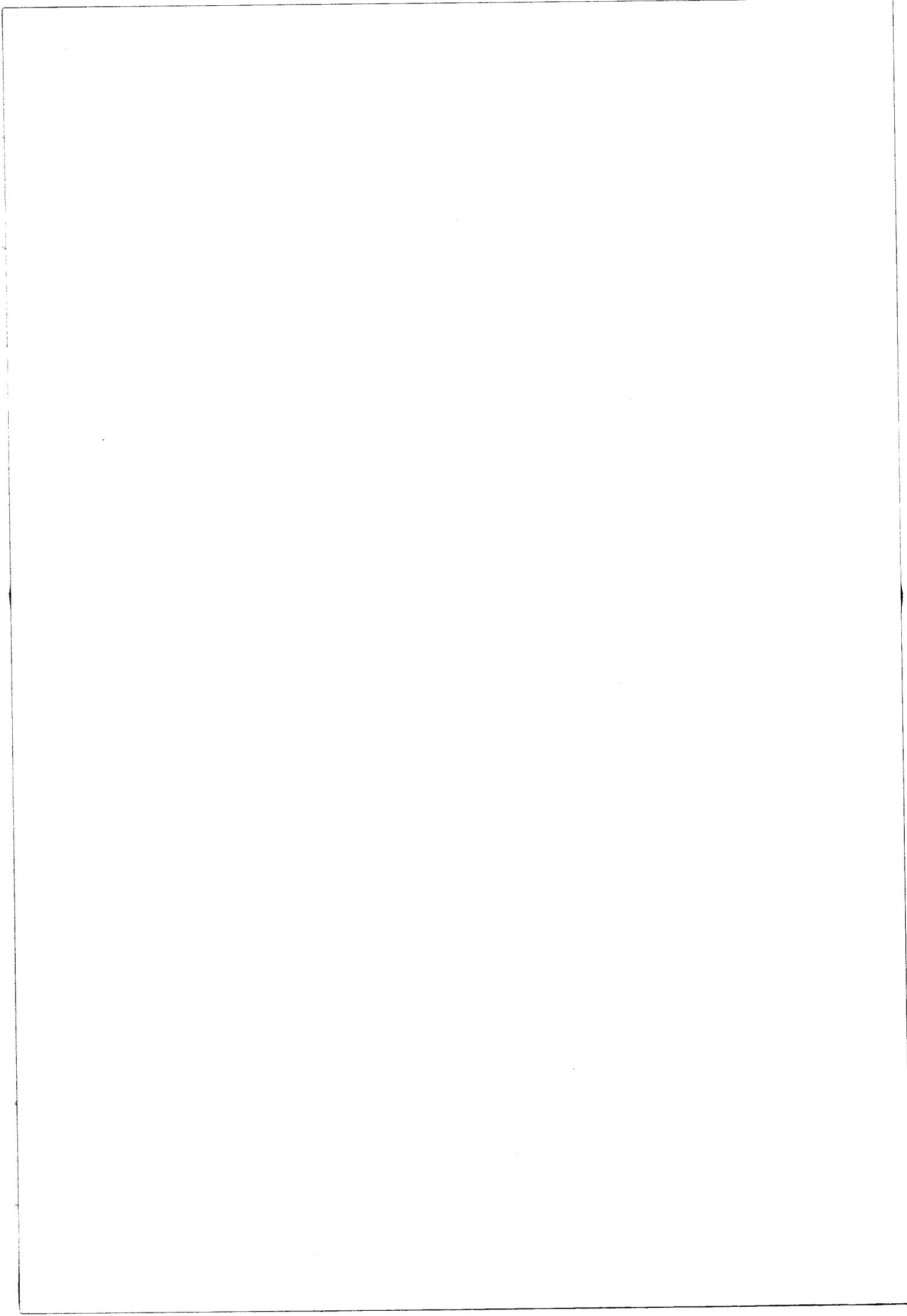
PROFESSEURS - 2ème Classe

M.	AL FAKIR Sabah	Algèbre
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
Mme	BATTIAU Yvonne	Géographie
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BOBE Bernard	Sciences Economiques
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M.	CHAPOTON Alain	Electronique

M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertzienne
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mle LEGRAND Denise	Algèbre
Mle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKÉ Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M ^{lle} MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M ^{me} N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^{lle} PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{lle} SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

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



Au cours des dernières années, de très nombreux travaux sur les peptides sont apparus dans la littérature ce qui dénote l'intérêt que biologistes, pharmacologistes, chimistes et physico-chimistes portent à cette famille de composés qui peuvent avoir une activité hormonale ou neurotransmettrice.

Parmi les objectifs poursuivis, l'un des principaux est d'essayer de relier l'activité biologique d'un peptide à sa conformation. A ce propos, on peut citer l'exemple de la Met-enképhaline (pentapeptide) connue pour ses propriétés analgésiques et dont la molécule présente une forme voisine de celle de la molécule de morphine.

Des informations sur la structure tridimensionnelle des peptides peuvent être obtenues soit par des méthodes théoriques : le calcul conformationnel, soit par la mise en oeuvre de techniques expérimentales :

- Radiocristallographie X
- Spectroscopie (IR, Raman, RMN, fluorimétrie)

Autour de ce thème, l'analyse conformationnelle des oligopeptides, une petite équipe s'est constituée dans le Laboratoire de Chimie Macromoléculaire. Elle s'est fixée comme but dans un premier temps de synthétiser des peptides modèles et d'étudier leur conformation par deux techniques expérimentales : la RMN et la fluorimétrie : on peut en effet espérer que ces deux techniques sont des moyens efficaces pour aborder dans un deuxième temps le problème du comportement dynamique des peptides.

Pour débiter dans ce domaine, les peptides cycliques sont intéressants : leur structure spatiale est relativement rigide mais ils ont déjà été étudiés d'une manière intensive. Aussi, nous avons choisi de nous intéresser à des séquences linéaires et en particulier, à celles susceptibles d'adopter des conformations repliées.

En effet, des études par RX de protéines globulaires ont mis en évidence des repliements à 180° des chaînes

principales faisant participer 4 amino-acides consécutifs ($i, i+1, i+2, i+3$). Ces repliements sont connus sous le nom de courbes β , β turn, β bend... La chaîne principale se replie autour des résidus $i+1$ et $i+2$ et selon les valeurs des angles dièdres de ces deux résidus, 10 types de repliements de structure sont connus. Parmi ceux-ci, deux apparaissent plus fréquemment : le β_I et le β_{II} .

Les calculs théoriques de Venkatachalam ont permis de préciser les valeurs des angles de torsion :

	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
β_I	- 60°	- 30°	- 90°	0°
β_{II}	- 60°	+ 120°	+ 80°	0°

Ces valeurs permettent de rapprocher le proton amide du résidu $i+3$ du carbonyle du premier résidu, et en conséquence, une liaison hydrogène intramoléculaire peut s'établir et stabiliser la conformation repliée.

La littérature signale que les valeurs les plus probables de l'angle ψ du résidu proline sont voisines de - 40° et + 130° et la structure rigide du cycle pyrrolidine de ce résidu impose à l'angle ϕ d'être voisin de - 60°.

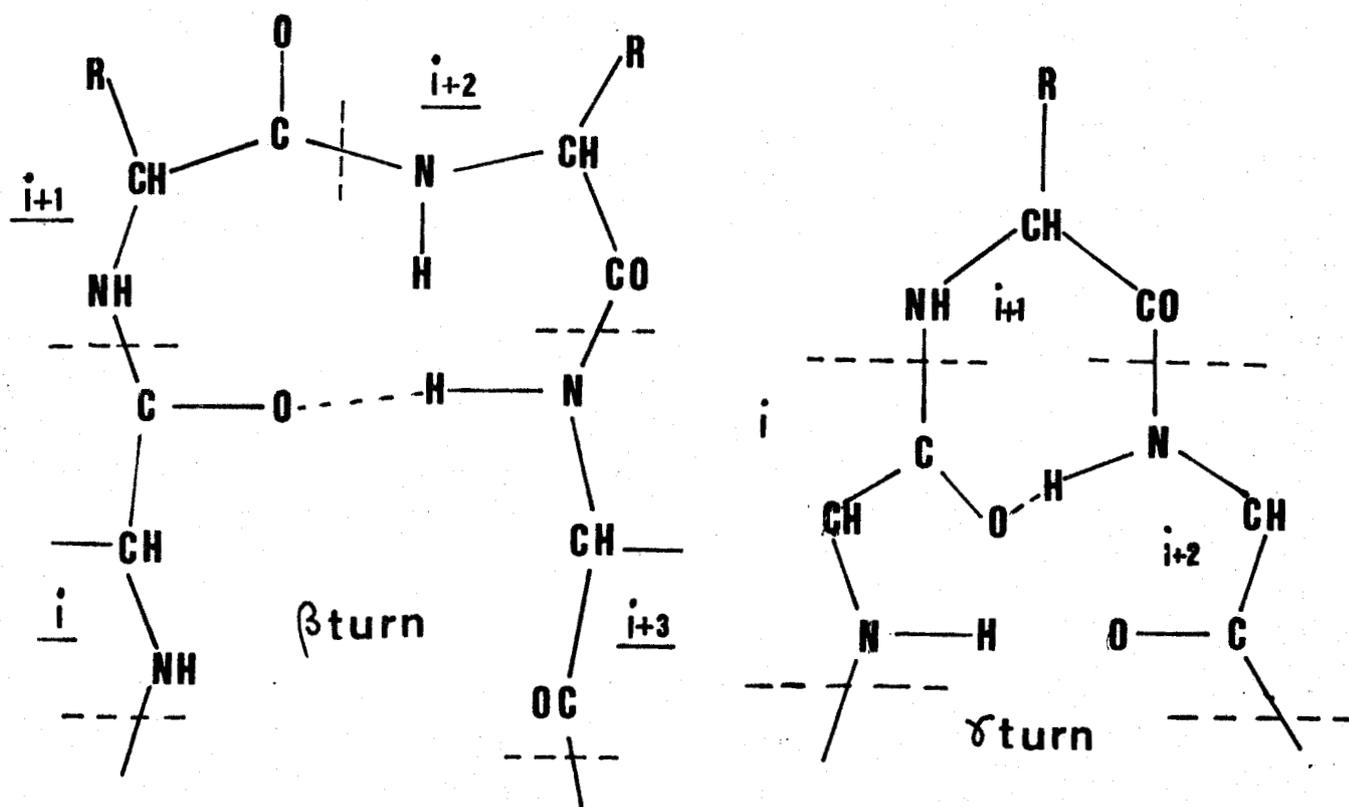
Les valeurs des angles dièdres de la proline sont donc très voisines de celles que doit adopter le résidu $i+1$ des repliements évoqués ci-dessus.

Aussi, on voit tout l'avantage qu'il y a à étudier une séquence qui contient le résidu proline en seconde position. La forte potentialité de cet amino-acide à engendrer le repliement β a été mise en évidence par de nombreuses études, en particulier, celles de Marraud et coll. d'une part et de Fermandjian et coll. d'autre part.

Mais très récemment, à la suite de l'étude conformationnelle d'un heptapeptide cyclique naturel (peptidolipin NA), Ptak et coll. ont montré que le résidu proline peut aussi

participer à un autre type de repliement : le γ turn. Le repliement γ met en jeu 3 résidus consécutifs ($i, i+1, i+2$) et il est stabilisé par une liaison hydrogène entre le proton amide du premier résidu et le carbonyle du résidu $i+2$.

Une représentation très schématique des repliements β et γ est donnée ci-dessous.

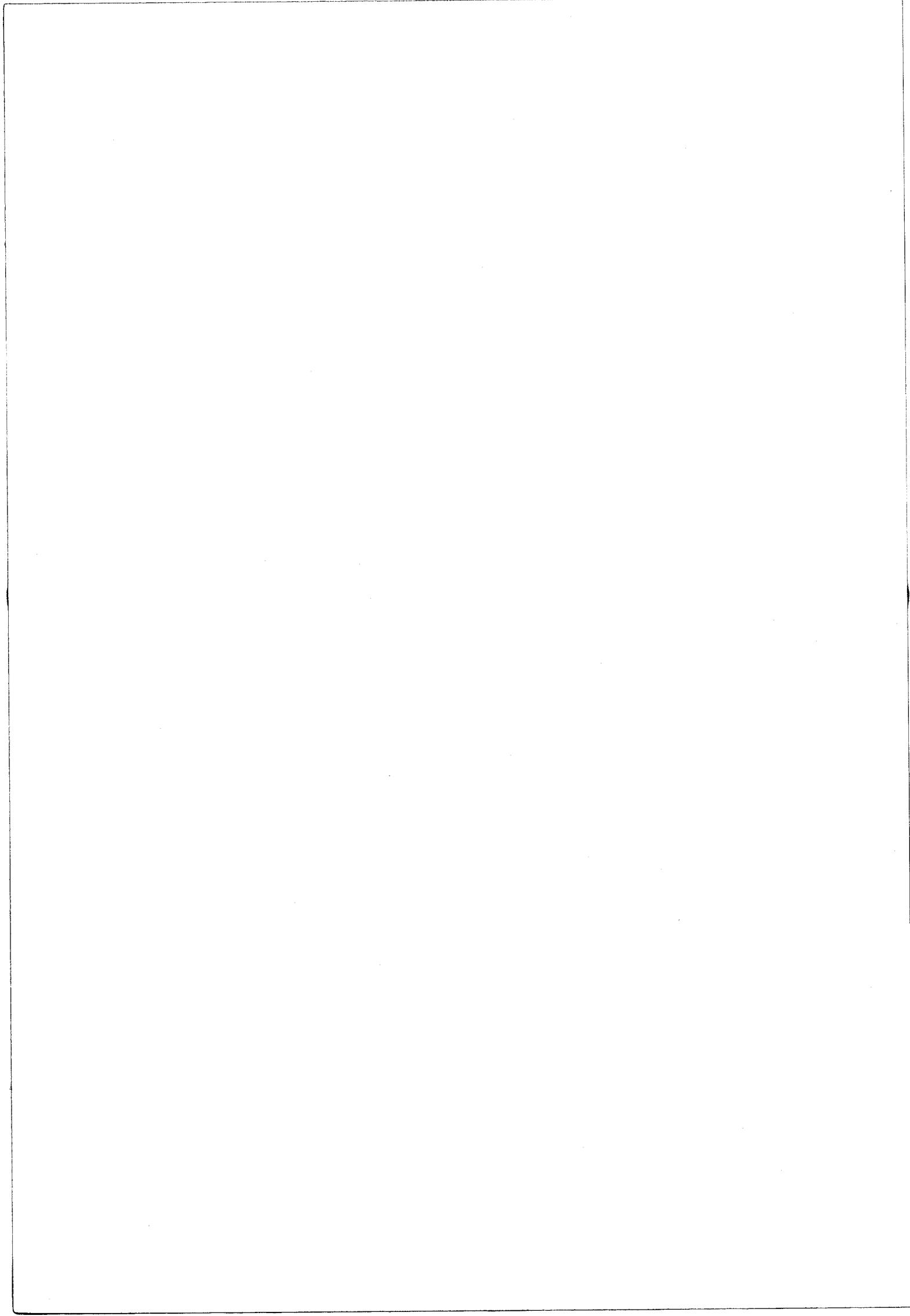


× Compte tenu du centre d'intérêt que nous avons choisi, des tétrapeptides modèles ont été synthétisés : ils contiennent tous le résidu proline en position 2.

Après avoir décrit les synthèses de nos dérivés, les résultats RMN vont être présentés et interprétés. Ils se rapportent essentiellement aux trois séquences suivantes :

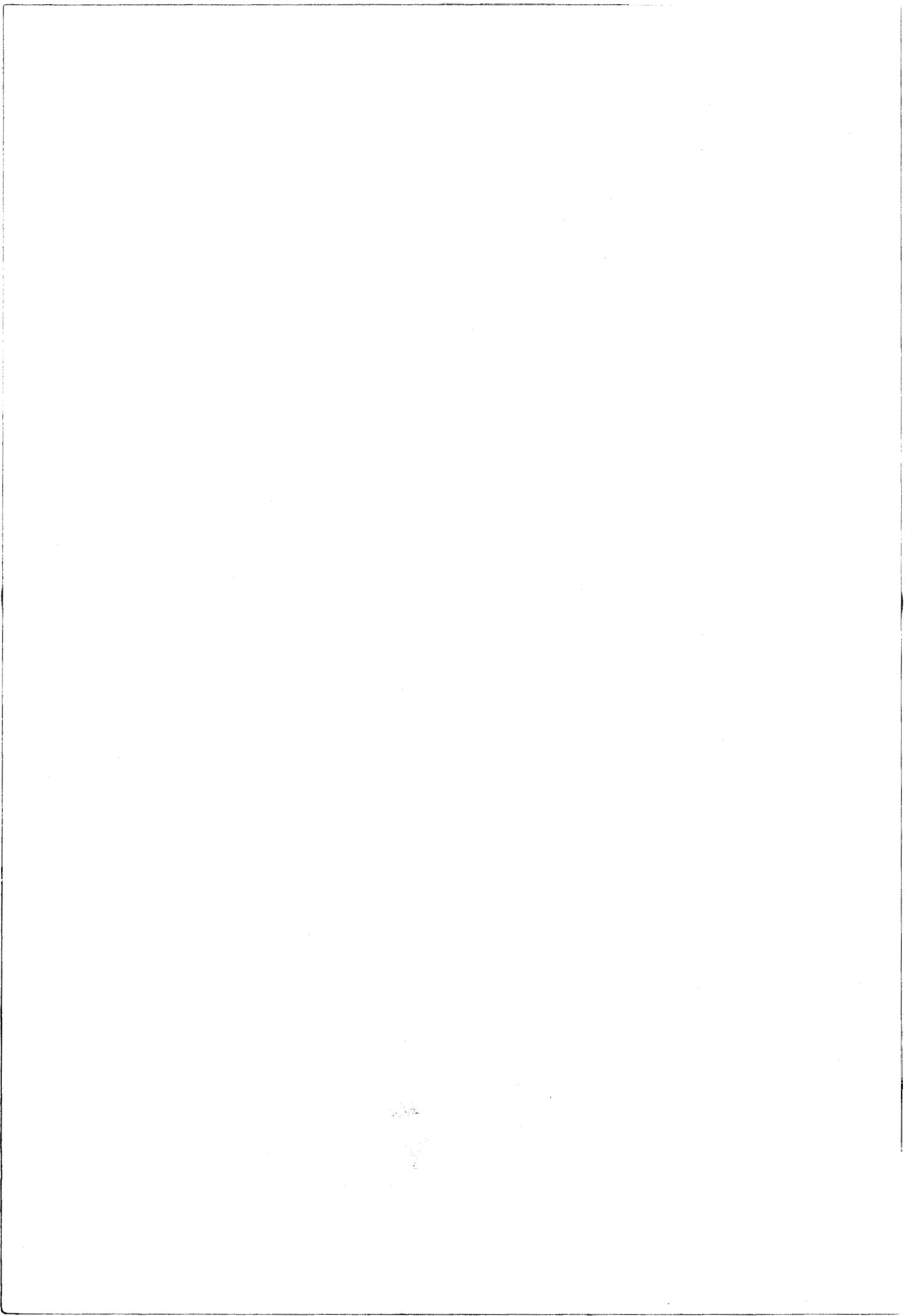
Tyr Pro Gly Gly, Gly Pro Tyr Gly et Gly Pro Gly Tyr.

D'autres modèles ont également été étudiés pour résoudre certains problèmes apparus en cours d'interprétation des résultats RMN. Ils seront précisés au fur et à mesure de la présentation.



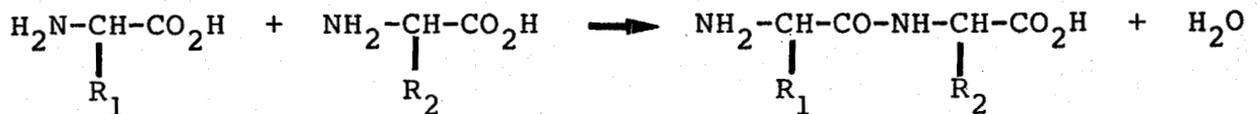
C H A P I T R E I

S Y N T H E S E



A - GENERALITES

La synthèse peptidique consiste à faire réagir les α amino-acides pour former une liaison amide selon le schéma :



Cette synthèse comporte 3 étapes principales :

1 - la protection.

Le caractère au moins bifonctionnel des acides aminés nécessite l'inactivation des fonctions non impliquées dans le couplage.

2 - la synthèse .

Les α amino-acides, à l'état naturel, sont peu réactifs : l'activation de l'une des fonctions s'avère indispensable.

3 - la purification.

Le grand nombre de processus chimiques mis en oeuvre au cours d'une synthèse a pour conséquence l'accumulation de produits secondaires qu'il faut éliminer.

Parmi tous les peptides synthétisés au laboratoire, nous ne décrirons que la synthèse de ceux pour lesquels des études physico-chimiques ont été entreprises. Il s'agit de :

Tyr	Pro	Gly	Gly	
Gly	Pro	Tyr	Gly	
Gly	Pro	Gly	Tyr	
Phe	Pro	Gly	Gly	
Gly	Pro	Ala	Gly	
Gly	Pro	Tyr	Gly	Ala

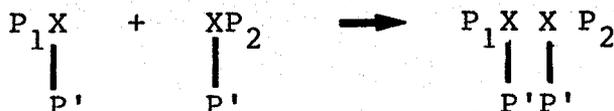
Les trois premiers d'entre eux ont été réalisés en collaboration avec Bernard HECQUET.

Les résidus porteurs d'une chaîne latérale sont de configuration L.

Nous allons décrire les choix des groupements protecteurs et des méthodes de synthèse que nous avons été amenés à faire pour mener à son terme cette partie du travail.

I - GROUPES PROTECTEURS

Si on désire réaliser la synthèse d'un homotripeptide (XXX), après protections des fonctions latérales (P'), des extrémités N et C terminales (P₁ et P₂), on condense deux molécules d' α amino-acides selon :



La mise en place du 3ème résidu X se fera après déprotection de l'une ou l'autre des extrémités. Le choix du groupement protecteur va donc dépendre non seulement de la spécificité de son introduction, mais surtout de sa capacité à être éliminé dans des conditions opératoires que ne perturbent pas les autres protections.

Compte tenu du très grand nombre de groupes N protecteurs connus, il est souvent plus facile de trouver un groupe N protecteur qui réponde aux conditions précédentes : c'est surtout pour cette raison que la synthèse se fait par condensation d'un α amino-acide sur l'extrémité N terminale du peptide en cours de croissance.

Trois types de protections ont dû être introduits : latérale, carboxylique et amine.

Les 2 premières resteront en place en principe jusqu'à la fin de la synthèse.

a - protection latérale

Cinq acides aminés ont été utilisés : glycine, alanine, phénylalanine, proline et tyrosine. Seul le dernier doit être protégé sur sa fonction phénol : on bloque souvent celle-ci à l'état d'éther de benzyle (1) en faisant réagir en milieu basique le bromure correspondant.

La déprotection (2) peut se faire selon deux méthodes :

- 1 - Coupure par HBr dans l'acide trifluoracétique (TFA).
- 2 - Hydrogénolyse sur Pd déposé sur charbon.

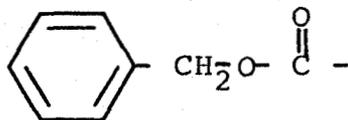
L'inconvénient de la première méthode, c'est qu'elle peut conduire à l'alcoylation du noyau aromatique de la tyrosine par le groupe benzyle libéré.

La seconde méthode, plus douce, a retenu notre attention, d'autant plus qu'elle permet aussi de régénérer les fonctions acides carboxyliques au départ de leurs esters benzyliques.

b - protection de la fonction amine

Deux groupes sont les plus fréquemment utilisés : le benzyloxycarbonyle (Z) et le tertibutyloxycarbonyle (t.Boc).

- Le benzyloxycarbonyle



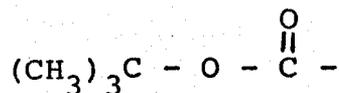
est introduit sur la fonction amine par la réaction du chlorure de benzyloxycarbonyle sur l' α amino-acide (3).

Méthodes de déprotection :

- 1 - Coupure par HBr dans l'acide acétique
- 2 - Hydrogénolyse catalytique (Pd/C)

Aucune de ces deux méthodes n'est compatible avec la protection latérale de la tyrosine : le groupe Z a donc été écarté.

- le tertibutyloxycarbonyle (4)



est mis en place par action en milieu basique de l'azide de tertibutyle (5) sur l' α amino-acide.

Les rendements sont généralement bons (70 à 80 %). La déprotection se fait par voie acide à 0° en utilisant soit HCl 4 N dans le dioxanne ou bien le TFA pur. La récupération du peptide déprotégé se fait par précipitation dans l'éther éthylique sec dans lequel les trifluoroacétates d'amine sont parfois solubles ce qui est un inconvénient majeur. Aussi il vaut mieux utiliser l'acide chlorhydrique 4 N bien que les chlorhydrates obtenus soient plus hygroscopiques, surtout ceux dérivant d' α amino-acides substitués à l'azote.

Comme en fin de compte, le groupe t.Boc nous a donné dans l'ensemble satisfaction, nous l'avons retenu comme groupe N protecteur.

c - protection de la fonction carboxylique

Il s'agit pratiquement toujours de transformer la fonction acide carboxylique en ester d'alkyle (méthyle, éthyle ou tertibutyle) ou en ester de benzyle.

Les esters de méthyle ou d'éthyle sont obtenus en faisant passer un courant d'acide chlorhydrique sec (6) dans une solution alcoolique d' α amino-acide ou par action du chlorure de thionyle (7).

La déprotection se fait par saponification.

L'alcool benzylique est beaucoup moins réactif que le méthanol. Nous avons cependant obtenu d'excellents rendements en ester benzylique en utilisant comme catalyseur l'acide paratoluènesulfonique (8) et en éliminant l'eau d'estérification par distillation de l'azéotrope eau - benzène.

Une méthode utilisant l'acide polyphosphorique comme catalyseur et déshydratant (9) conduit aussi à des rendements acceptables.

Les esters obtenus, et en particulier ceux dérivant de la méthode à l'acide paratoluènesulfonique donnent des émulsions lors des lavages basiques des produits de la synthèse peptidique. Aussi il est souhaitable avant d'utiliser ces esters de pratiquer l'échange de l'anion paratoluène sulfonate par l'anion chlorure (10).

La déprotection des esters de benzyle peut se faire bien sûr par saponification, mais l'intérêt de leur utilisation réside dans la régénération de la fonction acide carboxylique par hydrogénolyse sur Pd. Il est donc possible par cette dernière méthode de déprotéger à la fois l'extrémité C terminale, mais aussi comme cela a été signalé plus haut, d'enlever la protection latérale de la tyrosine.

La protection par les esters méthyliques a été choisie pour l'étude R.M.N. des peptides protégés : la contribution des protons du groupe méthyle de l'ester au spectre est simple (un singulet), contrairement à celle des protons de la protection benzyle qui peuvent interférer avec les protons aromatiques et benzyliques de la tyrosine.

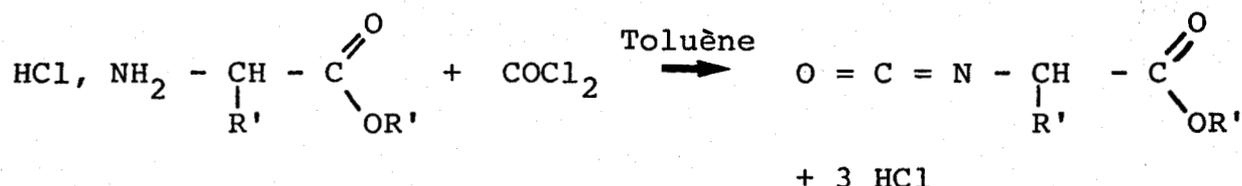
Il est possible d'accéder aux peptides libres en saponifiant d'abord la fonction ester méthylique, puis en procédant à une coupure acide du groupe N protecteur (t. Boc). Mais il est bien connu que la saponification peut parfois s'accompagner de racémisation (11), ce qu'il faut coûte que coûte éviter. Aussi avons-nous recommencé toutes nos synthèses en utilisant comme protection ester du résidu C terminal, le groupe benzyle qui a été hydrogénolysé en fin de synthèse.

II - REACTIONS DE COUPLAGE

On peut en théorie activer soit la fonction amine, soit la fonction acide carboxylique, mais c'est essentiellement cette dernière qui est activée. L'activation doit préserver la pureté optique des résidus à coupler.

a - activation de la fonction amine

La seule méthode que l'on pratique encore consiste à transformer l'ester de l' α amino-acide (sous forme chlorhydrate généralement) en son isocyanate (12) selon :



L'utilisation du phosgène et l'existence de réactions secondaires importantes (surtout avec la glycine) ont fortement réduit son champ d'application.

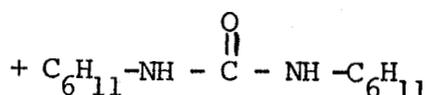
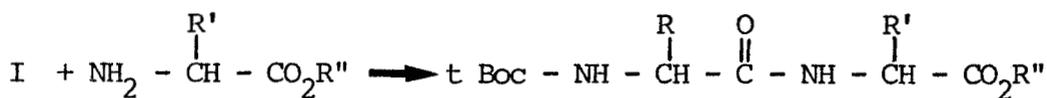
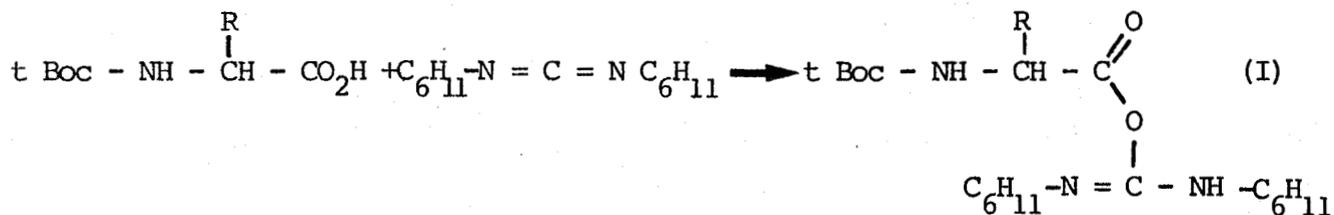
b - activation de la fonction acide carboxylique

Parmi les méthodes introduites depuis plusieurs décades, seules les méthodes à l'azide (13) et aux anhydrides mixtes (14) (15) sont encore utilisées. Elles présentent l'avantage considérable de ne pas nécessiter de C protection, ce qui est très utile pour la synthèse de peptides contenant les résidus acide aspartique ou acide glutamique.

L'introduction, vers 1955 par Hess et coll. (16), d'un nouveau réactif, le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) a complètement modifié l'approche de la synthèse peptidique (17).

Trois méthodes expérimentales utilisant le DCC sont pratiquées :

1 - Les α amino-acides, convenablement protégés, en solution dans le chloroforme (ou le diméthylformamide) sont couplés en présence de DCC selon le schéma suivant :

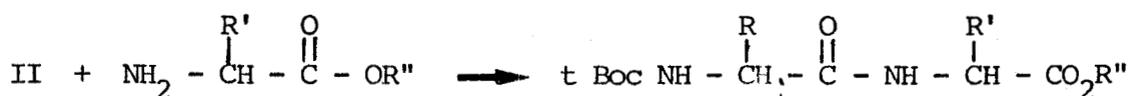
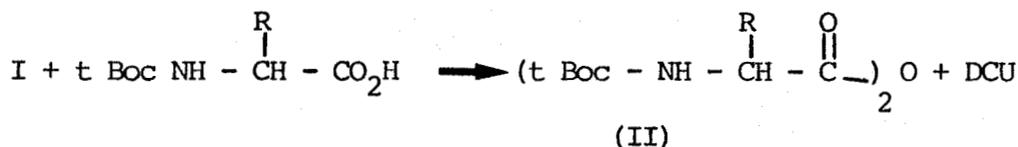
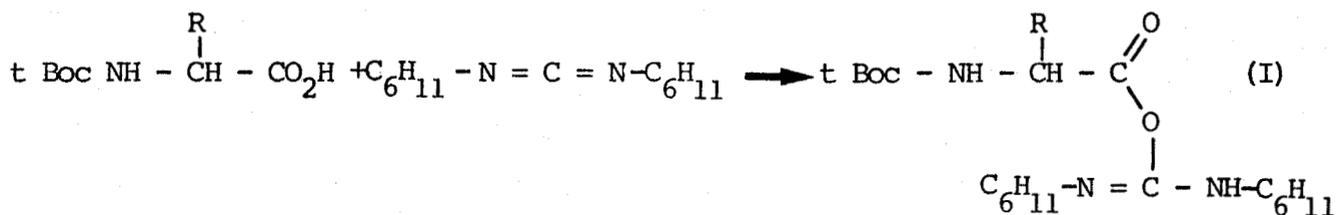


dicyclohexylurée (D.C.U.)

La D.C.U. est insoluble dans le chloroforme.

2 - Alors que dans la méthode précédente, les deux réactifs à coupler sont introduits en même temps que la DCC, il existe une seconde méthode dans laquelle seul l' α amino-acide N protégé (t. Boc) est mis en présence de DCC pour donner un anhydride symétrique (non isolable) qui est ensuite aminolysé.

L'ensemble du processus peut se résumer selon les équations chimiques qui suivent.



3 - La troisième méthode consiste à utiliser la DCC pour transformer l' α amino-acide N protégé en un ester dont la caractéristique essentielle est de porter un groupe fortement attracteur d'électrons ce qui facilite l'aminolyse par le résidu à coupler.

Cette méthode, plus longue et parfois aussi plus délicate, possède cependant un avantage considérable : les esters intermédiaires sont cristallisables ce qui permet de purifier.

On couple par cette technique l'ortho ou le para nitrophénol (18) l'hydroxysuccinimide (19)...

Le couplage de deux acides aminés par le DCC n'est pas la solution "miracle" aux problèmes nombreux de la synthèse peptidique, il y a aussi des inconvénients :

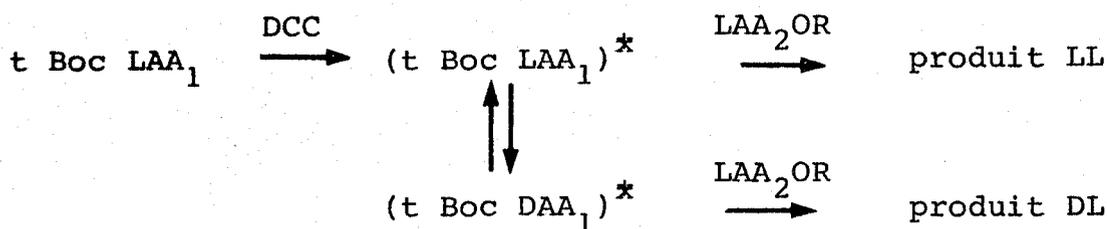
1 - L'acide aminé peut au lieu de se condenser sur le carbone central de la DCC se coupler sur l'atome d'azote ce qui conduit à la formation de N acylurée qui n'est pas aminolysable (16 b).

2 - Les risques de racémisation sont plus élevés. Certains auteurs ont proposé de les limiter en effectuant la synthèse en présence d'hydroxybenzotriazole (HOBt) (20, 21).

Nous avons testé pour nos synthèses, les différentes méthodes utilisant la DCC. Nous n'avons pas noté de différence suffisamment importante pour la pureté et les rendements en peptide formé au départ de chacune de ces méthodes. Aussi, nous avons choisi la plus simple à mettre en oeuvre : la méthode directe.

Remarque

La racémisation est en fin de compte l'un des problèmes fondamentaux de la synthèse peptidique : elle peut intervenir depuis l'introduction des groupes protecteurs jusqu'aux réactions de couplages et de déprotections. Nous ne souhaitons pas faire ici une revue exhaustive de ce problème, mais seulement attirer l'attention sur l'avantage qu'il y a à effectuer les réactions de couplage en utilisant des concentrations élevées en réactifs. En effet, si on se réfère au schéma suivant,



(LAA₁ et DAA₁ sont les inverses optiques de l'acide aminé AA₁)
on constate que si la racémisation (au niveau de l'espèce active) est monomoléculaire, le couplage est quant à lui bimoléculaire, d'où l'avantage à effectuer les couplages en milieu concentré.

III - TECHNIQUES EXPERIMENTALES DE LA SYNTHÈSE

Le choix des groupements protecteurs et des méthodes de couplages étant fait, il faut maintenant réaliser la synthèse.

a - *méthode en phase liquide*

La méthode la plus ancienne et cependant la plus pratiquée encore est celle dite de la "phase liquide". Elle consiste tout simplement à effectuer les réactions de couplage dans des solvants organiques et à purifier les intermédiaires par des lavages acides (élimination de l'excès de NH₂-AA₂-OR) et basiques (élimination de l'excès de t Boc AA₁).

Avantages

- 1 - Simplicité de mise en oeuvre
- 2 - Possibilité de synthétiser des quantités importantes de produits

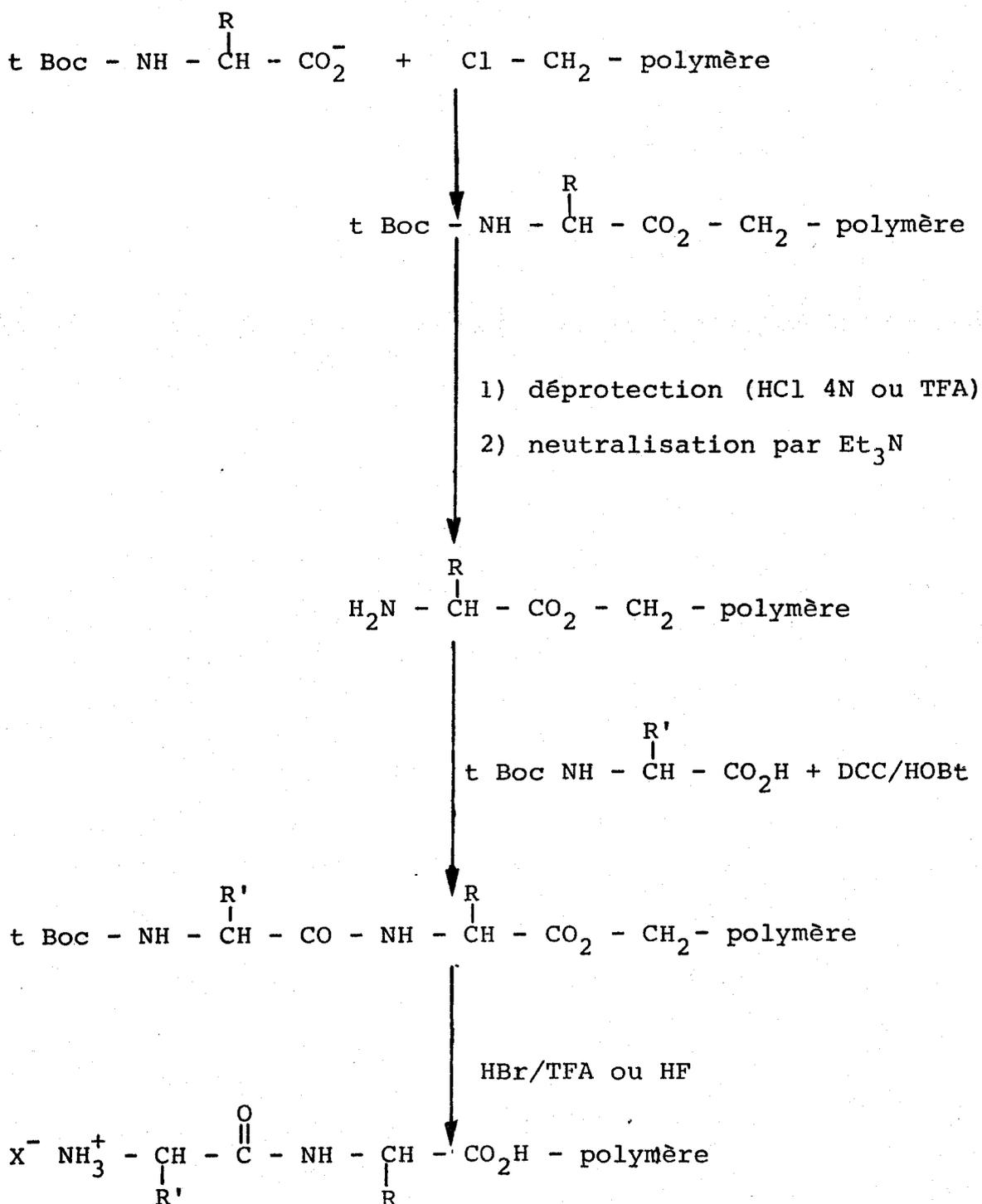
Inconvénient

Les produits secondaires s'accumulent.

b - méthode de Merrifield

Merrifield (22) a proposé d'utiliser une résine constituée de polystyrène réticulé par 1 à 2 % de divinylbenzène et partiellement chlorométhylé. C'est une résine qui gonfle dans les solvants organiques et sur laquelle on greffe le résidu C terminal du peptide à synthétiser.

La synthèse selon Merrifield dite de la "phase solide" peut se résumer selon le schéma ci-dessous.



En fin de synthèse, le peptide est décroché de la résine par traitement acide (le plus fréquemment) : HF anhydre ou HBr dans le TFA.

La répétitivité des opérations à effectuer et l'utilisation du support solide permettent de réaliser la synthèse du peptide à l'aide d'appareils automatiques.

Avantages de la méthode

- 1 - Les réactifs non couplés sont éliminés par simple lavage ce qui permet d'aboutir à des peptides de haute pureté
- 2 - Les interventions se limitent à des contrôles du taux de couplage et à veiller au bon fonctionnement de l'automate.

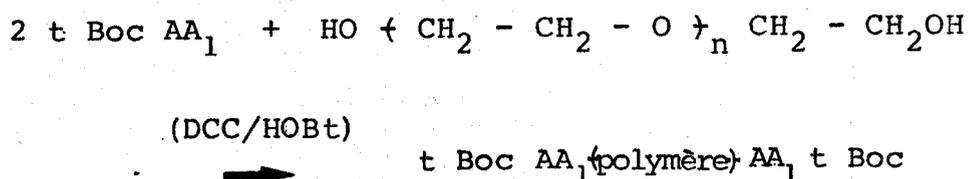
Inconvénients

- 1 - C'est une méthode onéreuse tant par le matériel qu'elle nécessite que par les faibles quantités de peptides qu'on peut synthétiser dans un cycle d'opérations
- 2 - La microporosité du support limite parfois les possibilités d'accroissement de la chaîne peptidique, aussi souvent synthétise-t-on des morceaux de taille moyenne par cette méthode que l'on couple ensuite en phase liquide.

c - méthode de Bayer (23)

L'idée essentielle de cette méthode est de s'allier les avantages de la phase liquide pour les réactions de couplages et ceux de la phase solide pour les purifications. Le polymère utilisé est un polyéthylèneglycol qui est soluble dans les solvants utilisés pour les couplages (chloroforme, DMF...) mais insoluble dans l'éther éthylique : on peut donc éliminer les produits non couplés par simple filtration. Le schéma de la

synthèse est très voisin de celui de la phase solide : dans un premier temps, on accroche un premier acide aminé sur le polymère selon :



Ensuite on enlève les protections t.Boc et on peut coupler alors un second résidu.

Cette méthode paraît dans son principe très intéressante, mais en pratique, le couplage du premier acide aminé (estérification) est très long (plusieurs jours parfois) et ceci d'autant plus que la masse molaire du polymère est élevée. De plus la précipitation par l'éther éthylique donne parfois des huiles et alors la méthode est mise en défaut.

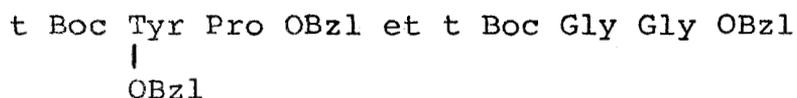
Au laboratoire, les trois techniques (phase liquide, solide et de Bayer) ont été expérimentées par l'un ou l'autre d'entre nous. La méthode de Bayer a échoué (résidu huileux), la méthode de Merrifield a donné un produit de haute pureté mais en quantité trop peu importante. Nous avons donc eu recours à la méthode classique de la phase liquide qui a permis de préparer des quantités suffisantes de peptides pour les études physico-chimiques.

IV - STRATEGIE DE LA SYNTHÈSE

Jusqu'à ce point de l'exposé, l'accroissement de la taille du peptide a été décrit par une méthode récurrente : chaque étape consistant à additionner un résidu. En fait, la stratégie de la synthèse peut être différente : des fragments peuvent être obtenus séparément, puis réunis. Cette solution présente deux avantages :

- 1 - Elle permet d'optimiser les rendements vis-à-vis de l'extrémité C terminale.
- 2 - La technique de purification que nous avons choisie repose sur la différence de masse des produits à séparer : elle sera d'autant plus efficace que les masses sont différentes, ce qui est le cas dans la méthode des fragments.

La limite de ce mode de synthèse est clairement mise en évidence par un exemple : pour effectuer la synthèse par fragments de Tyr Pro Gly Gly, il faut préparer :



Ensuite, on doit enlever la protection ester de benzyle de la proline : la saponification est à déconseiller (risques de racémisation), l'hydrogénolyse touche à la protection latérale de la tyrosine. Aussi pour cet exemple, la méthode par fragments n'est pas utilisable.

V - PURIFICATION

Les réactions secondaires, les couplages incomplets, l'utilisation de la méthode en phase liquide expliquent le besoin d'une purification efficace en fin de synthèse.

La chromatographie sur alumine ou sur gel de silice n'a pas donné de bons résultats.

Par contre, la filtration sur gel (Sephadex) a permis de bonnes séparations. Trois types de gel ont été utilisés : G 10 ou G 15 pour purifier les peptides libres et LH 20 pour les peptides protégés.

L'électrophorèse préparative a aussi donné une excellente purification, mais les quantités traitées étaient trop faibles pour que la technique soit retenue.

B - DESCRIPTION DES SYNTHESSES

Avant de donner quelques détails sur les synthèses réalisées, nous allons décrire les méthodes analytiques qui ont permis de mener à son terme cette partie du travail.

I - TECHNIQUES ANALYTIQUES

L'analyse chromatographique sur couches minces (gel de silice Merck) des peptides protégés a été un auxiliaire précieux. Elle a permis de vérifier la pureté des produits de départ, l'évolution des réactions de couplage et de déprotection des extrémités N terminales.

L'éluant retenu est composé de chloroforme, de méthanol et d'acide acétique (85/10/5).

En ce qui concerne les peptides libres, ils sont élués après dépôt sur papier Whatman n° 1 par un mélange pyridine butanol 1, eau (35/30/30).

La révélation des chromatogrammes se fait par pulvérisation de ninhydrine (en solution dans le méthanol), suivie d'un chauffage à 100°. Les peptides protégés doivent être préalablement traités par des vapeurs d'HCl avant pulvérisation (pour libérer la fonction amine).

La pureté des peptides (après séparation sur gel Sephadex) a été vérifiée par chromatographie sur papier et par électrophorèse (à 2 pH : 6,4 et 1,9).

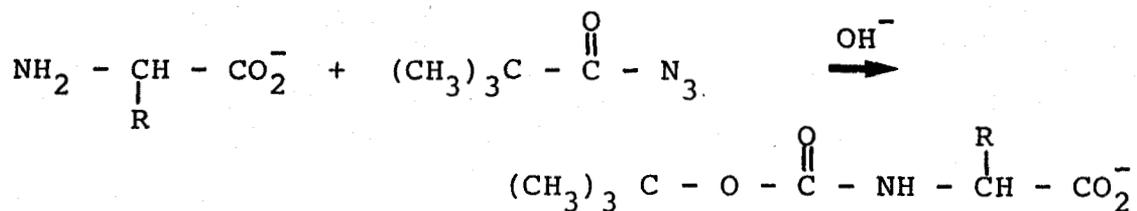
II - PREPARATION DES INTERMEDIAIRES REACTIONNELS

a - *protection de la chaîne latérale de la tyrosine*

Le groupement benzyle est introduit selon la méthode décrite dans la littérature.

b - tertibutyloxycarbonyl amino-acide

On les prépare par action de l'azide de tertibutyle (24) sur l' α amino-acide selon :



Nous avons préparé de cette manière : t Boc Gly, t Boc Pro, t Boc Phe, t Boc Ala, t Boc Tyr (OBzl).

En règle générale, ces synthèses ne présentent pas de difficultés sauf celles de t Boc Phe (25 a) et t Boc Tyr (OBzl) (25 b) qu'il est difficile de précipiter à l'éther de pétrole.

c - esters de benzyle et de méthyle

1 - Esters de benzyle

Tous les acides aminés ont été transformés en esters benzyliques par la méthode azéotropique (8), par la méthode à l'acide polyphosphorique (9) ou bien encore pour certains d'entre eux par la méthode du chlorure de thionyle (7).

2 - Esters de méthyle

Ces esters ont été obtenus par des méthodes déjà bien décrites (6).

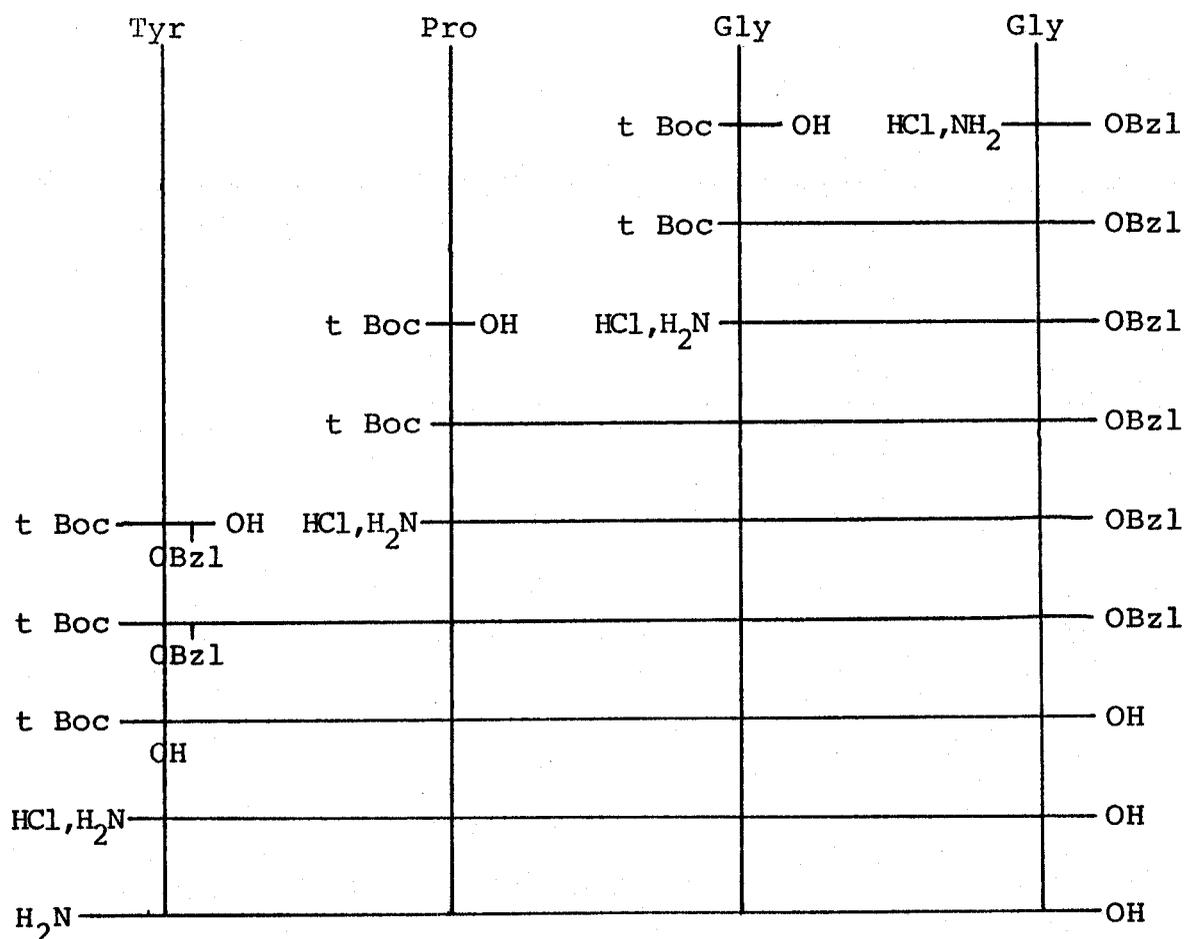
Remarque : Les estérifications ne sont jamais complètes; pour purifier les esters nous avons modifié les méthodes de préparations décrites dans la littérature. Après synthèse de l'ester, nous avons mis en solution dans le minimum d'eau, après neutralisation par K_2CO_3 , on sature avec NaCl et on extrait par 2 fois 50 cc d'éther éthylique et 2 fois 50 cc d'acétate d'éthyle : l'acide aminé non estérifié reste ainsi dans l'eau.

Après séchage sur $MgSO_4$, le solvant est évaporé. On reprend le résidu huileux par de l'éther éthylique sec et on fait passer un courant d'HCl sec. Le chlorhydrate de l'ester d'acide aminé précipite, il est filtré, repris par le méthanol et on reprecipite à l'éther sec.

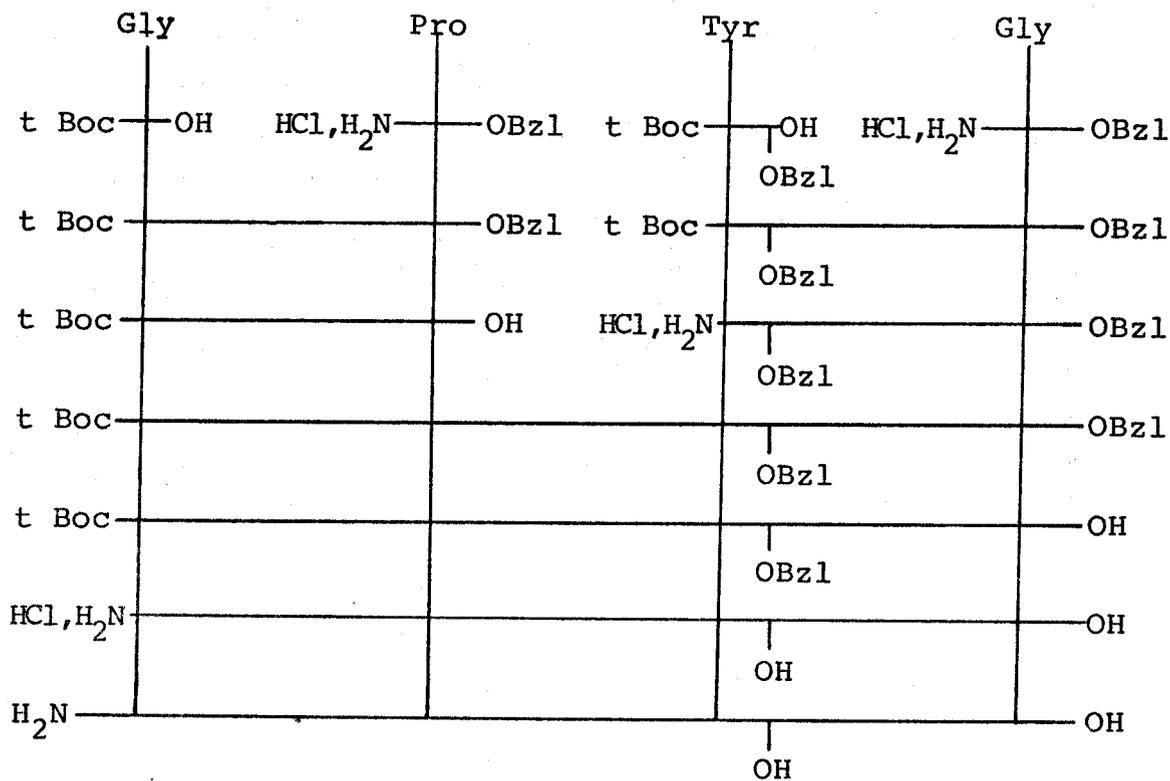
III - SCHEMAS DE SYNTHÈSE DE NOS PEPTIDES

Nous ne décrivons qu'une méthode par peptide synthétisé : soit celle du pas à pas, soit celle des fragments :

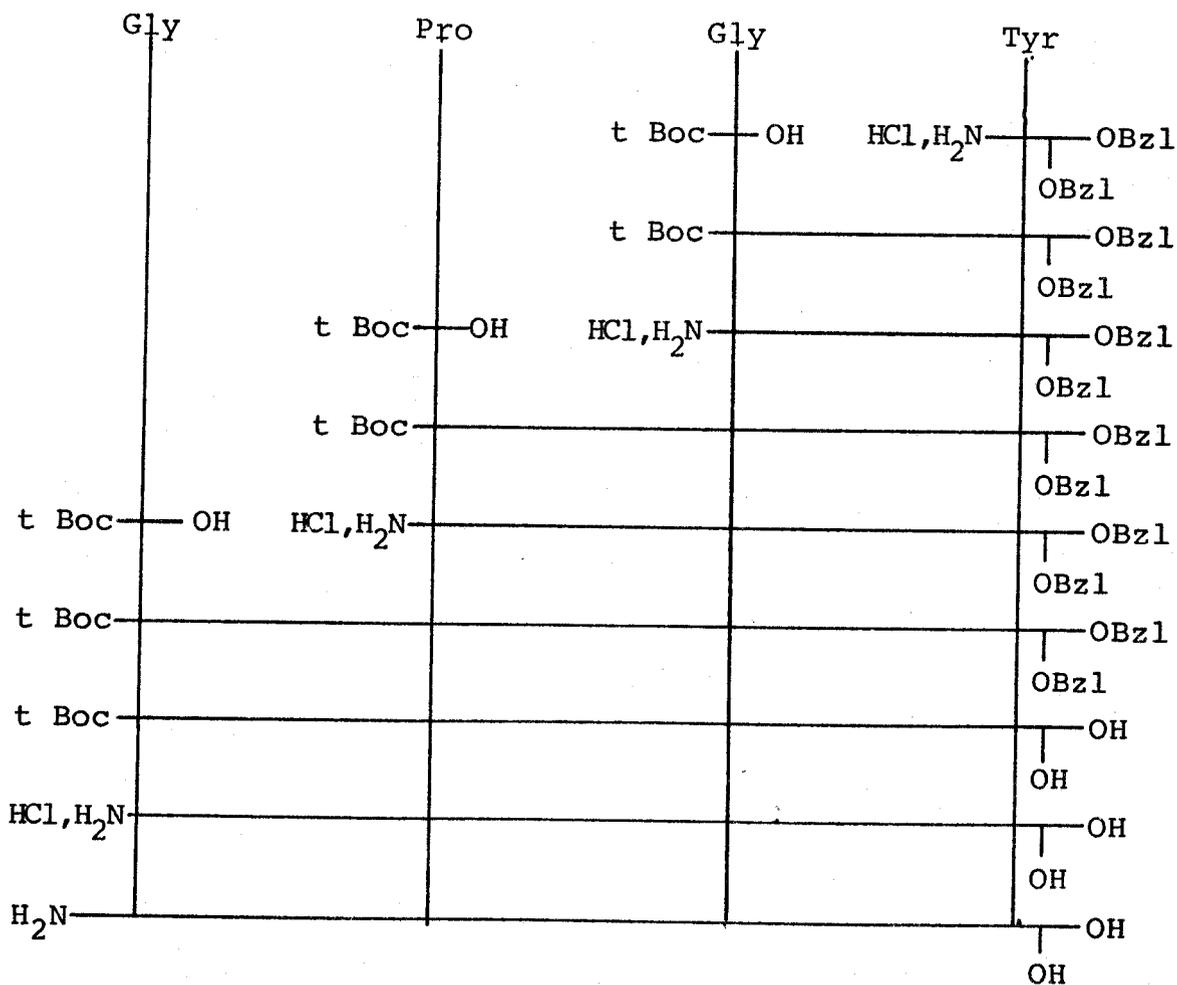
a - Tyr Pro Gly Gly



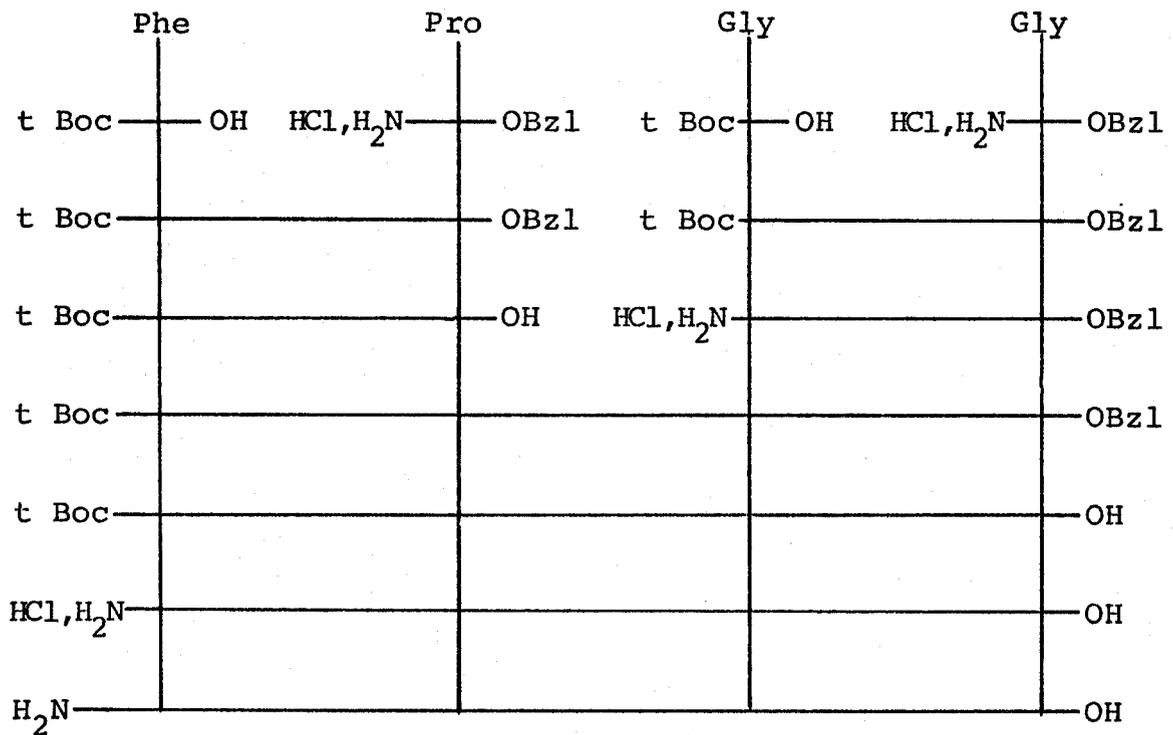
b - Gly Pro Tyr Gly



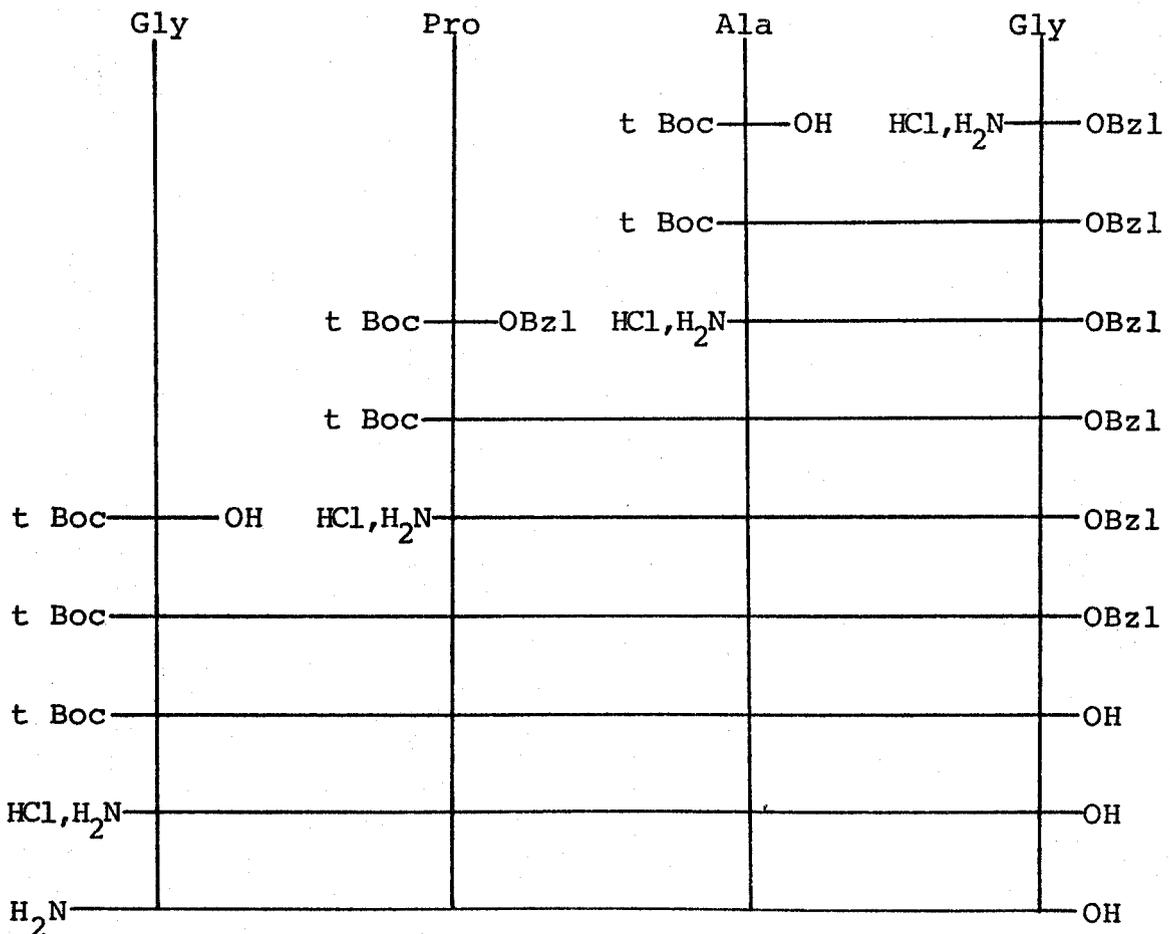
c - Gly Pro Gly Tyr



d - Phe Pro Gly Gly



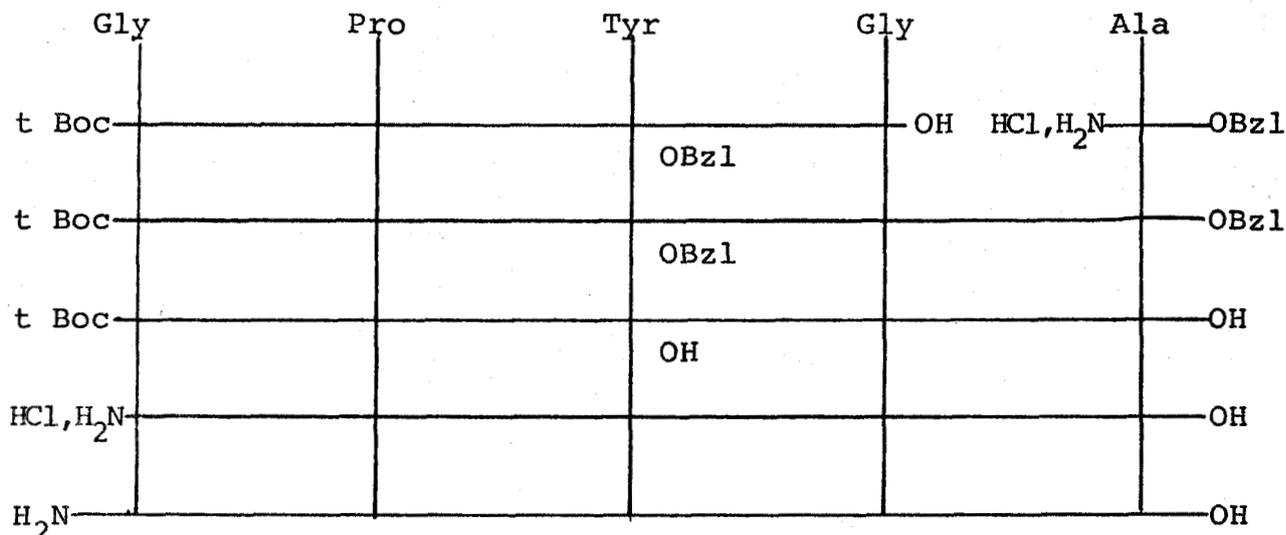
e - Gly Pro Ala Gly



f - Gly Pro Tyr Gly Ala

(t Boc Gly Pro Tyr Gly OH est obtenu selon b)

OBzl



IV - DESCRIPTION D'UNE SYNTHÈSE

Décrire toutes nos synthèses serait long et fastidieux. Aussi nous nous contenterons de préciser le mode opératoire suivi pour l'une d'entre elles, par exemple Tyr Pro Gly Gly.

Nous indiquerons la procédure à suivre pour accéder au dérivé protégé (t Boc peptide methyl ester) et nous préciserons également celle qui permet d'aboutir au peptide libre (sous forme zwitterion).

- t Boc Gly Gly OCH₃ (I)

4,15 g de HCl, Gly OCH₃ ($3,3 \cdot 10^{-2}$ mole) sont mis en suspension dans 50 cc de chloroforme. Après avoir neutralisé par 4,6 cc de triéthylamine, on ajoute 5,25 g de t Boc glycine ($3 \cdot 10^{-2}$ mole). La solution est refroidie à 0°C et on introduit alors 7,1 g de DCC ($3 \cdot 10^{-2}$ mole). Après 4 heures de réaction, 700 mg de DCC sont encore ajoutés (au total $3,3 \cdot 10^{-2}$ DCC sont utilisés). On laisse réagir pendant 12 heures. Après réaction, on filtre la dicyclohexylurée (D.C.U.). Le filtrat est alors lavé par 50 cc de chacune des solutions suivantes (HCl 1 %, H₂O, NaHCO₃ 5 %, puis H₂O).

Séché sur $MgSO_4$, la phase organique est ensuite évaporée, le résidu huileux est alors traité par 30 cc d'acétate d'éthyle, le reste de DCU et de chlorhydrate de triéthylamine précipite. On filtre et on évapore le solvant.

- HCl, Gly Gly OCH_3 (II)

Le résidu huileux précédent réagit à 0° avec 50 cc d'HCl 4 N dans le dioxanne. L'isobutylène et le gaz carbonique provenant de la coupure du groupe N protecteur (t Boc) se dégagent. Au bout de 30 minutes, le dioxanne est évaporé. La masse huileuse récupérée est reprise par le méthanol et on fait précipiter dans l'éther sec.

On obtient 4,6 g HCl Gly Gly OCH_3 (Rdt global : 85 %).

- t Boc Pro Gly Gly OCH_3 (III)

$1,7 \cdot 10^{-2}$ mole de HCl Gly Gly OCH_3 (3,05 g) neutralisé par 2,35 cc de triéthylamine réagissent dans 30 cc de chloroforme avec 3,25 g de t Boc Proline ($1,5 \cdot 10^{-2}$ mole) (on introduit 3,7 g de DCC et 2,05 g de HOBT).

- HCl Pro Gly Gly OCH_3 (IV)

Le résidu huileux provenant de (III) est traité par 40 cc HCl 4 N dans le dioxanne pendant 15 minutes. Après évaporation à froid du dioxanne, on reprend au méthanol. La précipitation dans l'éther éthylique fournit une masse pâteuse; après 2 heures d'agitation énergique, cette masse se disperse, il faut alors filtrer très rapidement car le chlorhydrate obtenu est très hygroscopique.

Masse obtenue 3,2 g (Rdt global 74 %).

- t Boc Tyr (OBzl) Pro Gly Gly OCH_3 (5)

On condense $0,95 \cdot 10^{-2}$ mole de t Boc Tyr OBzl et le chlorhydrate IV en appliquant la méthode I.

Le produit lavé et séché précipite dans l'éther de pétrole.

Le rendement est de 62 %.

- t Boc Tyr Pro Gly Gly OCH₃ (VI)

700 mg de palladium à 10 % déposé sur charbon sont mis en suspension dans 5 cc de méthanol. Le catalyseur est réduit pendant 20 à 30 minutes, on introduit alors 2 g de t Boc Tyr (OBzl) Pro Gly Gly O CH₃. La débenzylation de la chaîne latérale de la tyrosine est achevée en 2 heures (on suit la réaction par CCM et par consommation d'hydrogène).

Le catalyseur est écarté par filtration, le solvant est évaporé. On reprend le résidu par le dichlorométhane et on termine par une précipitation dans l'éther de pétrole. L'hydrogénolyse est pratiquement quantitative.

Tous les peptides protégés respectivement sur les extrémités N et C terminales par les groupes t Boc et ester méthylique peuvent être obtenus en suivant ce mode opératoire; il y a bien sûr quelques problèmes particuliers ici et là dus pour l'essentiel à des difficultés de précipitation d'intermédiaires ou bien alors dus à la nature fortement hygroscopique de certains chlorhydrates.

Comme nous l'avons précisé antérieurement, les peptides libres ont été obtenus par l'intermédiaire de protection benzylique de l'extrémité C terminale. Nous allons donc simplement décrire la méthode pour passer au zwitterion à partir de t Boc Gly Pro Tyr (OBzl) Gly OBzl par exemple.

- t Boc Gly Pro Tyr Gly OH (VII)

3 g de t Boc Gly Pro Tyr (OBzl) Gly OBzl en solution dans 20 cc de dioxanne (récemment percolé sur alumine) sont réduits par 1,1 g de Pd 10 % / Charbon.

Après filtration et évaporation, on précipite le peptide dans l'éther de pétrole (rendement 90 %).

- $\text{CF}_3 \text{CO}_2\text{H}$, NH_2 Gly Pro Tyr Gly OH (VIII)

1,7 g de t Boc Gly Pro Tyr Gly OH réagissent à 0° avec 15 cc de TFA. Après 30 minutes, on ajoute de l'éther sec refroidi, le trifluoracétate d'amine précipite. On filtre et on reprend le filtrat par le méthanol. On termine par une précipitation dans l'éther éthylique sec (Rdt : 85 %).

- NH_2 Gly Pro Tyr Gly OH (IX)

400 mg de produit (VIII) sont purifiés sur une colonne de Séphadex G 15 (2,5 cm x 80 cm).

L'éluat est traité par 8 à 10 cm³ de résines échangeuses d'ions Dowex 1 x 2 (contre ion acétate). On laisse quelques minutes, on filtre, on rince abondamment la résine, on lyophilise.

Masse récupérée 235 mg (Rdt = 73 %).

La nature zwitterionique du peptide a pu être vérifiée lors de l'étude de l'influence du pH sur les spectres RMN proton.

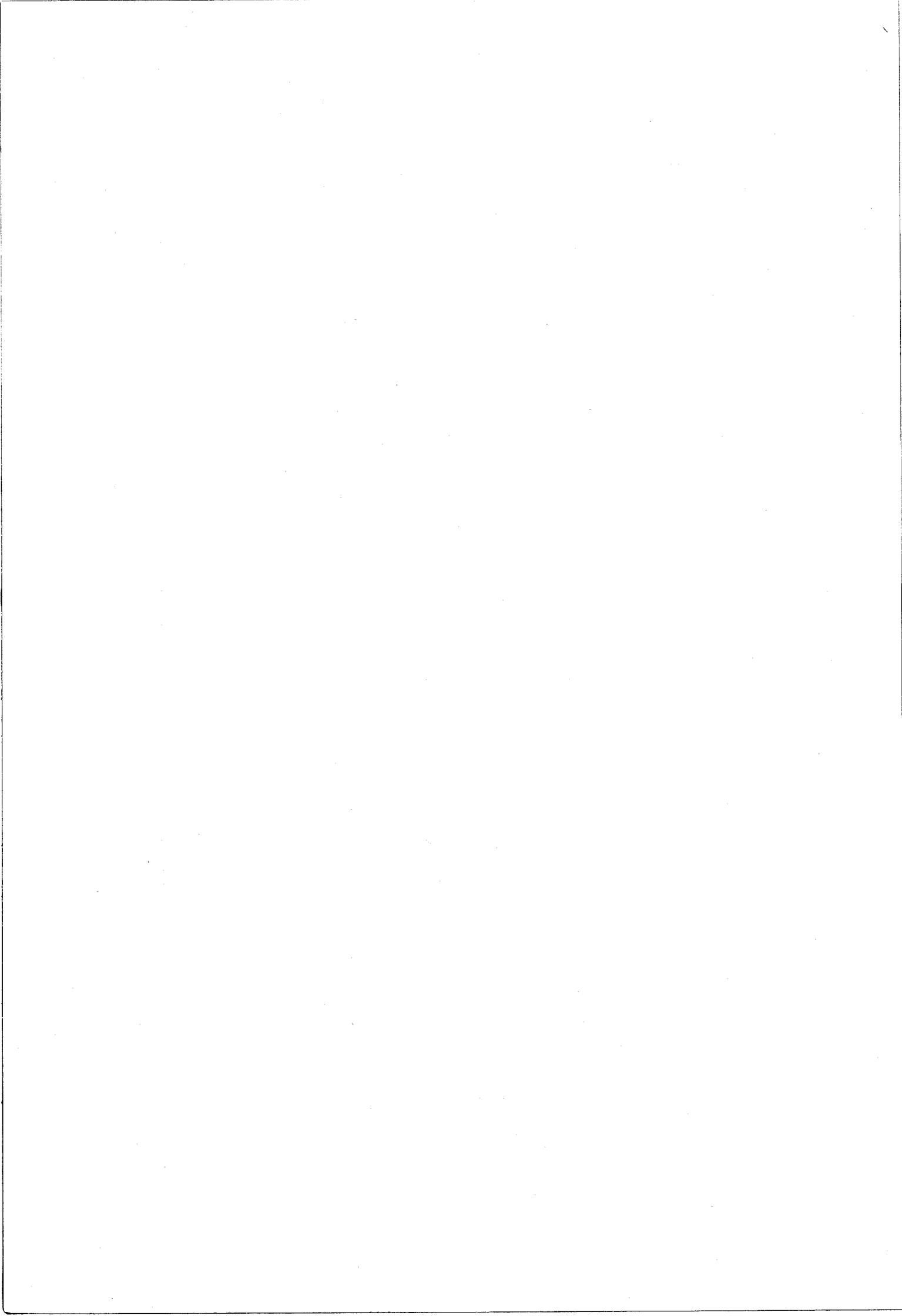
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE I

- (1) E. WÜNSCH, G. FRIES et A. ZWICK
Ber. (1958) 91, 542.
- (2) J.M. STEWART et J.D. YOUNG
Solid phase peptide synthesis (1969) 23.
- (3) M. BERGMAN et L. ZERVAS
Ber. (1932) 65, 1192.
- (4) F.C. Mc KAY et N.F. ALBERTON
J. Am. Chem. Soc. (1957) 79, 4686.
- (5) L.A. CARPINO
J. Am. Chem. Soc. (1957) 79, 4427.
- (6) N. IZUMIYA, S.C. FU, S.M. BIRNBAUM et J.P. GREENSTEIN
J. Biol. Chem. (1953) 205, 221.
- (7) R.A. BOISSONAS, S. GUTTMAN, P.A. JACQUEMOND et J.P. WALLER
Helv. Chem. Acta (1955) 38, 1491.
- (8) L. ZERVAS, M. WINITZ et J.P. GREENSTEIN
J. Org. Chem. (1957) 22, 1515.
- (9) B.F. ERLANGER et R.M. HALL
J. Am. Chem. Soc. (1954) 76, 5781.
- (10) H.K. MILLER et H.J. WAELSCH
J. Am. Chem. Soc. (1952) 74, 1092.
- (11) J.A. Mc LAREN
Australian J. Chem. (1958) 11, 360.
- (12) a - S. GOLDSCHMITT GOLDSCHMITT
Angew. Chem. (1950) 62, 538.
b - S. GOLDSCHMITT et M. WICK
Z. Naturforsch (1950) 5b, 170.
c - S. GOLDSCHMITT et M. WICK
Ann. Chem. (1952) 575, 217.
- (13) T. CURTIUS et E. LAMBOTTI
J. Prakt. Chem. (1904) 70, 109.

- (14) R.A. BOISSONAS
Helv. Chim. Acta (1951) 34, 874.
- (15) J.R. VAUGHAN Jr et R.L. OSATO
J. Am. Chem. Soc. (1952) 74, 676.
- (16) a - G.P. HESS et J.C. SCHEEHAN
J. Am. Chem. Soc. (1955) 77, 1067.
b - J.C. SCHEEHAN, M. GOODMAN et G.P. HESS
J. Am. Chem. Soc. (1956) 78, 1367.
- (17) B. ERRICKSON, et R.B. MERRIFIELD
Proteins (1976) 2, 349.
- (18) M. BODANSZKI
Acta Chem. Acad. Sci. Hung. (1956) 10, 335.
- (19) E. WÜNSCH et F. DREES
Ber. (1966) 99, 110.
- (20) W. KOENIG et R. GEIGER
Ber. (1970) 103, 788.
- (21) D.S. KEMP et M. TRANGLE
Tetrahedron Letters (1974) 2695.
- (22) R.B. MERRIFIELD
J. Am. Chem. Soc. (1963) 85, 2149.
- (23) M. MUTTER, R. UHMANN et E. BAYER
Justrus Liebigs Ann Chem. (1975) 901.
- (24) E. SCHNABEL
Justrus Liebigs Ann. Chem. (1967) 188.
- (25) a - G.W. ANDERSON et A.C. Mc GREGOR
J. Am. Chem. Soc. (1957) 79, 6180.
b - R. SCHWYZER, P. SIEBA et H. KASPELER
Helv. Chem. Acta (1959) 42, 2622.

CHAPITRE II

GENERALITES



A - METHODE ET TECHNIQUES RMN

I - ANALYSE CONFORMATIONNELLE ET RMN

L'empêchement de rotation autour des liaisons simples donne lieu à l'isomérisation rotationnelle.

L'étude de cette forme d'isomérisation est d'approche délicate : les énergies d'interconversion sont faibles et le nombre de rotamères en équilibre est parfois important.

Pour les peptides, les rotations peuvent se faire autour des liaisons simples $N-C_{\alpha}$, $C_{\alpha}-CO$ et celles des chaînes latérales. En conséquence un peptide peut exister sous de très nombreuses conformations.

Le but de l'analyse conformationnelle est de préciser si la molécule présente des conformations préférentielles et dans ce cas d'essayer de les définir par l'intermédiaire des valeurs des angles de torsion autour des liaisons simples.

La spectroscopie RMN permet d'aborder le problème posé. Le proton ayant un moment magnétique élevé, il est très facile de détecter sa résonance, c'est une des raisons qui nous ont conduit à entreprendre l'analyse de la conformation de nos modèles par la RMN de ce noyau.

Après avoir analysé le spectre du peptide, nous disposons de 2 types de paramètres : les déplacements chimiques et les constantes de couplage. En faisant varier les conditions expérimentales (effet de température, de solvant), les comportements spécifiques des déplacements chimiques des protons amides peuvent être analysés en terme d'inaccessibilité (protection stérique du proton amide ou sa participation à une liaison hydrogène), ce qui permet de faire l'hypothèse d'une structure organisée.

Les valeurs des couplages 3J entre le proton amide et celui porté par le carbone α sont reliées par une relation de type Karplus aux valeurs des angles de torsion autour des liaisons $N-C_{\alpha}$.

Ces couplages permettent par conséquent de définir la conformation préférentielle de la molécule de peptide.

Cette méthodologie de l'analyse conformationnelle des peptides par RMN sera appliquée à nos dérivés :

- Dans un premier temps, nous essayerons d'établir la nature flexible ou structurée de nos modèles.

- Dans une seconde étape, si une conformation préférentielle est retenue, des valeurs des angles de torsion autour des liaisons N-C_α seront proposées.

II - ACQUISITION DES SPECTRES

a - appareillage

Les peptides possèdent fréquemment des acides aminés de même nature, les constantes d'écran correspondantes sont alors très voisines. Aussi pour obtenir des spectres RMN exploitables, il est absolument indispensable d'utiliser des spectromètres possédant des aimants très puissants pour que la fenêtre spectrale soit élargie.

Les spectres protons présentés dans ce travail ont été réalisés sur deux appareils :

- 1 - WH 270 BRUKER (Laboratoire de Chimie Organique Université Paris V. Travail effectué en collaboration avec Mme C. GARBAY).
- 2 - TSN 250 CAMECA (Laboratoire Dr. CHACHATY - C.E.A. Travail effectué en collaboration avec M. B. PERLY.

Les spectres ¹³C présentés ont été enregistrés sur WP 80 WH 270 ou CFT 20.

Tous ces spectromètres travaillent en onde pulsée. Cette technique est indispensable en ¹³C (la faible teneur en cet isotope et la valeur peu élevée du rapport gyromagnétique rendent obligatoire l'accumulation des spectres). Pour le proton, cette technique permet d'obtenir des spectres avec de très faibles quantités de produits (en une heure, on peut obtenir un spectre à partir d'une solution 3 mM).

Sans vouloir entrer dans des détails techniques, il faut cependant préciser qu'en RMN pulsé, l'information spectrale est obtenue à partir d'un interférogramme correspondant au phénomène de retour à l'équilibre de l'aimantation des noyaux. L'excitation de ceux-ci ayant été obtenue par l'application du pulse électromagnétique.

Les interférogrammes sont transformés en données numériques et stockés dans les mémoires du calculateur avant traitement par transformée de Fourier.

b - Techniques d'acquisition

Pour les spectres ^{13}C , la méthode classique a été utilisée : suppression des couplages hétéronucléaires proton - ^{13}C par la technique de l'irradiation large bande des protons.

En ce qui concerne le proton, les spectres réalisés avec le DMSO d_6 , le CDCl_3 ne posent pas de problèmes. Par contre, l'utilisation de trifluoroéthanol non deutérié et d' H_2O demande la mise en oeuvre d'une technique de suppression de ligne de solvant.

Nous avons choisi le "gated homonuclear decoupling" dont le principe est le suivant :

dans un premier temps, la raie à supprimer est irradiée pendant quelques secondes, tout de suite après on prend le spectre (pulse et acquisition).

L'irradiation d'un proton du solvant pendant un temps suffisamment long devant son temps de relaxation a pour conséquence d'orienter dans toutes les directions de l'espace les spins individuels : l'aimantation globale est donc nulle.

III - ANALYSE DES SPECTRES

a - attribution

En ^{13}C , les données bibliographiques (2) (3) (4) et la comparaison de nos spectres entre eux permettent d'identifier la plupart des résonnances.

En ce qui concerne le proton, les signaux de résonance se situent dans 3 domaines de fréquences caractéristiques :

6 à 8 ppm : protons amides et aromatiques

3,5 à 5,5 ppm : protons portés par le carbone α
des acides aminés

0 à 3,5 ppm : protons β de la tyrosine, β proline...

La comparaison des fréquences obtenues pour les protons du peptide avec celles des protons des acides aminés constitutifs ne permet pas en général d'attribuer sans ambiguïté les signaux des protons amides et α : les structures primaire et secondaire peuvent modifier les constantes d'écran. Seuls les protons des chaînes latérales peuvent être identifiés sans trop de problèmes à partir de leur déplacement chimique et de la multiplicité du signal (5). Ils servent alors de point de départ pour la mise en oeuvre d'une technique de découplage.

b - analyse des spectres

Le calcul théorique des énergies de transition entre les états de spin établit des relations entre les paramètres spectraux (δ et J) et les valeurs des fréquences des raies qui constituent les multiplets des noyaux couplés.

Si les différences de déplacements chimiques sont beaucoup plus grandes que les constantes de couplages ($\Delta\delta > 5 J$), les équations se simplifient et montrent que les déplacements et les constantes de couplage sont directement accessibles par des mesures sur le spectre (on appelle souvent ce type d'exploitation des spectres, une analyse au premier ordre).

Dans le cas contraire, seul le traitement mathématique permet d'obtenir les paramètres spectraux. Lorsque le système de noyaux couplés dépasse 3, le recours à l'analyse par ordinateur est indispensable.

Pour chacune des situations précédentes, on a l'habitude de parler respectivement de systèmes faiblement ou fortement couplés. Pople a proposé de représenter un système de noyaux couplés par des lettres de l'alphabet voisines pour les systèmes fortement couplés et éloignées pour les autres : les spectres ABC et AMX vont alors correspondre à des systèmes de 3 spins fortement et faiblement couplés.

Dans la suite de l'exposé, il sera souvent fait référence à ce type de nomenclature, en particulier des systèmes AB et ABX permettent de décrire la plupart des acides aminés utilisés.

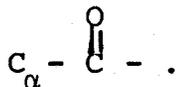
B - CONFORMATION D'UN PEPTIDE

Un peptide est constitué d'une chaîne principale (qui contient des liaisons amides) et de chaînes latérales.

Définir la structure d'un peptide, c'est donner l'ensemble des valeurs des angles dièdres, ω , ϕ , ψ , χ , qui sont représentés sur la figure ci-dessous.

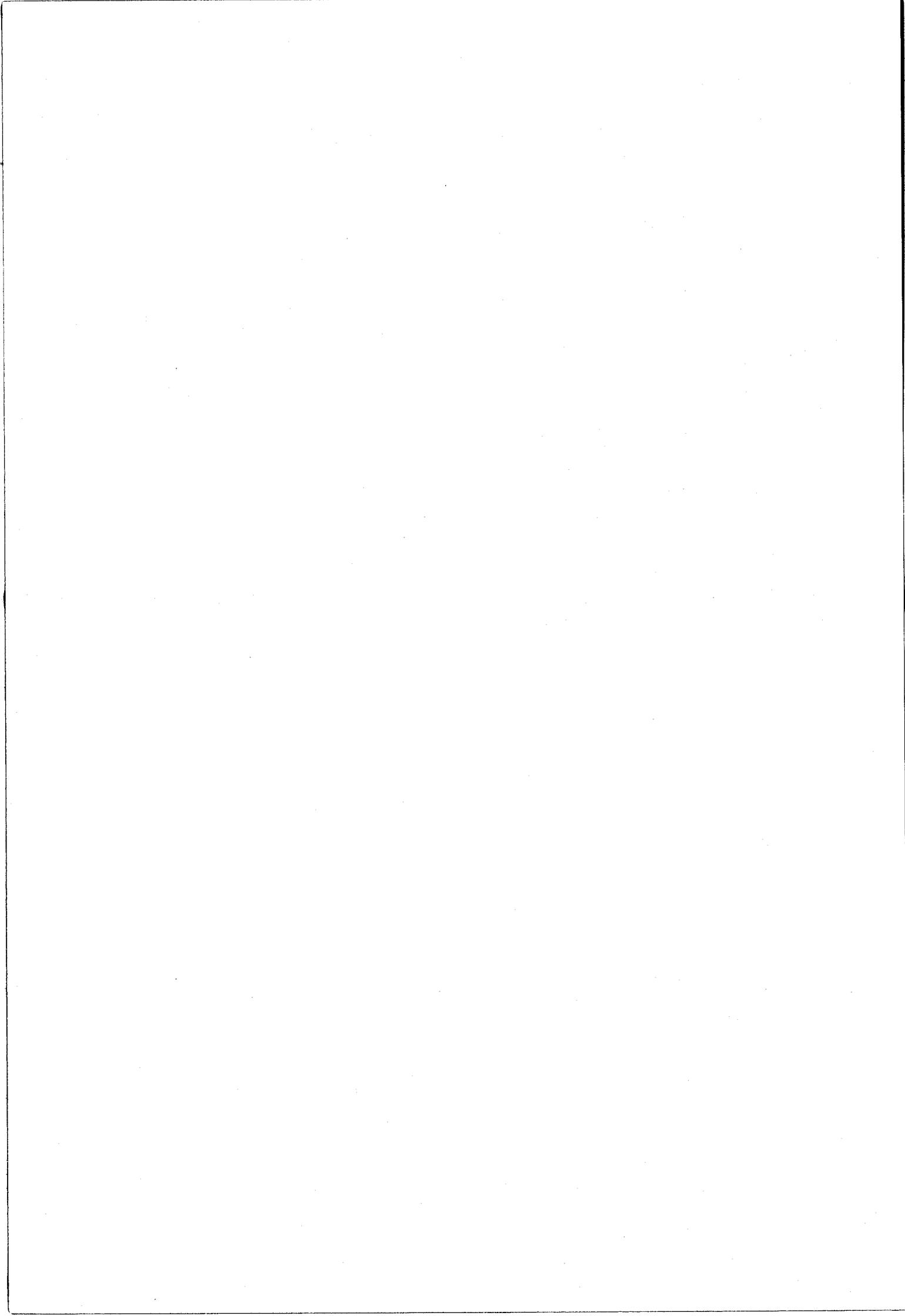
La mésomérie entre le carbonyle et le doublet de l'atome d'azote impose à l'angle ω de prendre soit la valeur 0° ou soit la valeur 180° , la première n'est rencontrée que pour les acides aminés substitués à l'azote (proline, sarcosine...). Quand la valeur est de 180° , on parlera d'isomère trans et pour 0° , d'isomère cis; ainsi les liaisons peptidiques seront en général trans sauf pour des modèles contenant la proline où l'isomérisation cis-trans se rencontre.

La chaîne principale d'un peptide est donc représentée par un ensemble de plans s'orientant l'un par rapport à l'autre par rotation autour des liaisons simples N - C_α et



BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE II

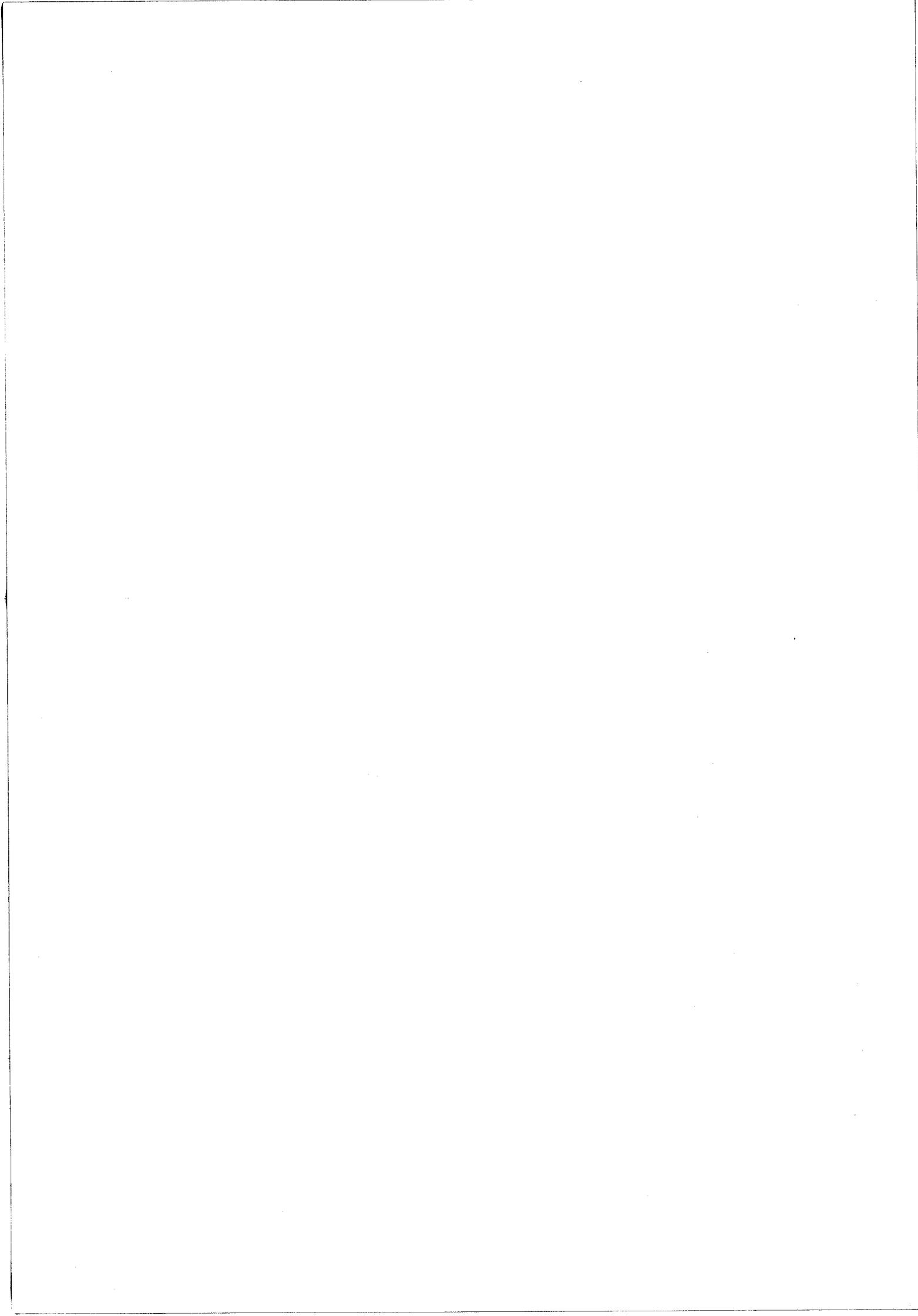
- (1) E.D. BECKER
High Revolution NMR - Academic Press (1969) 17.
- (2) C. GRATHWOHL et K. WÜTHRICH
J. Magn. Res. (1974) 13, 217-225.
- (3) M. CHRISTL et J.D. ROBERTS
J. Am. Chem. Soc. (1972) 94, 4565-4573.
- (4) R. RICHARG et K. WÜTHRICH
Biopolymers (1978) 17, 2133-2143.
- (5) W.A. GIBBONS, H. ALMS, R.S. BOCKMAN et H.R. WYSSBROD
Biochemistry (1972) 11, 1721-1725.



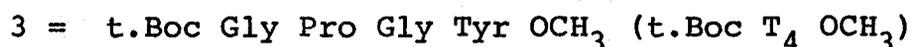
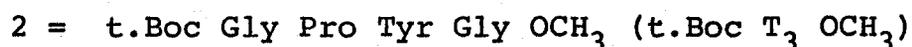
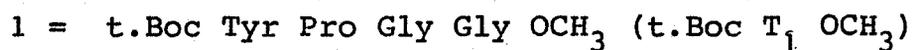
C H A P I T R E I I I

ETUDE CONFORMATIONNELLE DES PEPTIDES PROTEGES

EN SOLUTION DANS LE DMSO



Nous avons commencé l'étude de la conformation de nos peptides par celle des tétrapeptides contenant un résidu proline en position 2, un résidu tyrosine en position variable (1, 3 ou 4), le reste étant constitué par des résidus glycine :



Le DMSO a été retenu comme solvant pour cette première étude. Son utilisation, très souvent rapportée dans la littérature pour l'étude conformationnelle des peptides (par RMN), s'explique par deux avantages essentiels :

1 - Il ne donne pas lieu à des réactions d'échange avec les protons mobiles des peptides (amide et hydroxyle). Les signaux RMN de tous les protons sont donc obtenus sur le spectre, et en théorie, tous les paramètres (déplacements chimiques et constantes de couplage) peuvent être déterminés.

2 - C'est un solvant suffisamment polaire pour ne pas donner lieu à la formation d'agrégats aux concentrations habituellement choisies pour les études RMN.

Marraud et coll. (1) ont estimé qu'en deçà d'une solution 0,2 molaire, l'agrégation est peu importante dans ce solvant. Nos spectres protons ont été réalisés avec des concentrations de l'ordre de 0,05 molaire, ceci représente une condition favorable pour s'affranchir des phénomènes d'auto-association des molécules de peptides.

Nous allons présenter et analyser pour chaque modèle :

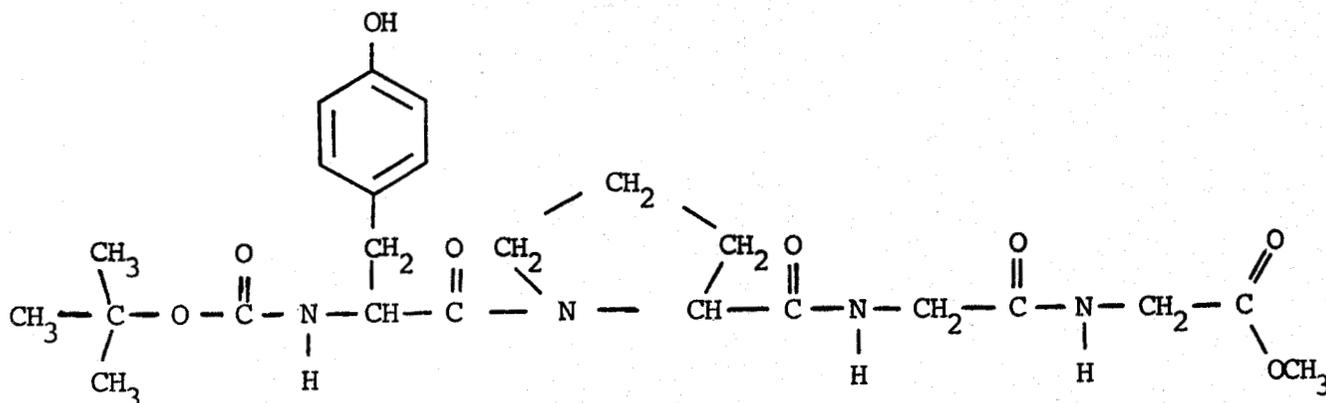
1 - le spectre proton et l'influence de la température sur les déplacements chimiques des protons amides et sur la distribution des rotamères latéraux de la tyrosine.

2 - Le spectre ^{13}C .

L'interprétation de certaines données expérimentales nécessite l'introduction de quelques définitions qui seront données au fur et à mesure de la présentation des résultats.

Nous terminerons ce chapitre par une discussion générale dont les objectifs seront de présenter les problèmes spécifiques des peptides contenant un résidu proline (isomérisation cis-trans), d'utiliser les résultats des effets de température pour l'analyse conformationnelle et de préciser les limites de la méthode RMN.

I - t.Boc Tyr Pro Gly Gly OCH₃ (t.Boc T₁ OCH₃)



A - RMN PROTON

1 - Spectre (I) et paramètres

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage de t.Boc T₁ OCH₃ sont rassemblés dans le Tableau 1.

2 - Discussion

a - Les expériences de découplage ont permis d'attribuer les signaux du spectre de t.Boc T₁ OCH₃ sauf ceux de Gly 3 et Gly 4 (protons amides et α). Pour résoudre ce problème, deux méthodes ont été utilisées :

. Les déplacements chimiques obtenus pour les protons α des deux résidus glycine de t.Boc T₁ OCH₃ ont été comparés à celui du H_α de Gly 4 du dérivé t.Boc T₃ OCH₃.

Si on appelle "Gly A" et "Gly B" les protons α de t.Boc T₁ OCH₃ respectivement situés à bas champ et à haut champ , nous avons :

Résidu	δ ppm	J (Hz)
Tyr 1	HN : 6,93 H $_{\alpha}$: 4,30 H $_{\beta_1}$: 2,81 H $_{\beta_2}$: 2,58 H $_{ar}$: 7,07 et 6,65 HO : 9,18	${}^3J_{HNC_{\alpha}H} = 8,5$ ${}^3J_{\alpha\beta_1} = 3,9$ ${}^3J_{\alpha\beta_2} = 10,2$ ${}^2J_{\beta_1\beta_2} = 14,15$
Pro 2	H $_{\alpha}$: 4,30 H $_{\beta \gamma} \approx 1,8 - 1,9$ H $_{\delta}$: 3,55	
Gly 3	HN : 8,25 H $_{\alpha}$: 3,71	$\Sigma {}^3J_{HNC_{\alpha}H} = 12$ ${}^3J_{HNC_{\alpha}H} = 5,6$
Gly 4	H - N : 8,15 H $_{\alpha}$: 3,87	$\Sigma {}^3J_{NHC_{\alpha}H} = 12$ ${}^3J_{HNC_{\alpha}H} = 5,6$
(CH $_3$) $_3$ C - - O - CH $_3$	1,30 3,61	



TABLEAU 1

Déplacements chimiques et constantes de couplage de

t.Boc T $_1$ OCH $_3$:

c = 0,05 mole/l T = 30°C réf. TMS

Gly 4 (t.Boc T₃ OCH₃) = 3,83 ppm

Gly A (t.Boc T₁ OCH₃) = 3,87 ppm

Gly B (t.Boc T₁ OCH₃) = 3,71 ppm

La comparaison des valeurs ci-dessus permet de proposer de situer les protons α Gly 4 (de t.Boc T₁ OCH₃) à bas champ (3,87 ppm). L'attribution des protons amides peut alors être faite à l'aide d'expériences de découplage, on obtient :

NH Gly 4 = 8,15 ppm

NH Gly 3 = 8,25 ppm

La méthode mise en oeuvre pour attribuer les protons des glycines suppose que les déplacements chimiques ne dépendent que de leur position dans la séquence peptidique, mais cette méthode peut être mise en échec si des conformations spécifiques existent pour les dérivés comparés.

Or l'interprétation des effets de température décrits plus loin nécessite que l'attribution soit sans équivoque; aussi il a été nécessaire de confirmer le résultat par la mise en oeuvre de la méthode qui suit.

. La comparaison des déplacements chimiques des H_α Gly de t.Boc T₁ OCH₃ et t.Boc T₁ OH a été envisagée : les déplacements chimiques du signal H_α Gly 3 de l'un et l'autre dérivés doivent être peu modifiés contrairement à ce qui doit être observé pour les H_α des résidus Gly 4.

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 2.

dérivé	δ (signal bas champ)	δ (signal haut champ)
t.Boc T ₁ OCH ₃	3,87	3,71
t.Boc T ₁ OH	3,76	3,71

TABLEAU 2

Déplacements chimiques des protons α Gly 3 et Gly 4 de t.Boc T₁ OCH₃ et t.Boc T₁ OH.

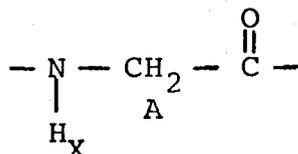
Pour les deux dérivés, on observe un signal à $\delta = 3,71$ ppm, c'est celui qui correspond aux protons α Gly 3.

La déméthylation de l'extrémité C terminale fait passer le signal de 3,87 ppm (t.Boc T₁ OCH₃) à 3,76 ppm (t.Boc T₁ OH) : c'est celui des protons α de Gly 4.

Le glissement vers les hauts champs du signal H _{α} Gly 4, quand on passe de t.Boc T₁ OCH₃ à t.Boc T₁ OH, traduit une augmentation de la densité d'électrons au voisinage des protons α : ce résultat expérimental est bien en accord avec la plus grande polarité de la liaison OH par rapport à la liaison O - CH₃.

Les deux méthodes mises en oeuvre ont abouti à proposer les mêmes attributions pour les protons α des résidus glycine.

b - Les protons α Gly 3 et Gly 4 donnent des singulets (spectre I) alors qu'ils correspondent à la partie A₂ d'un spectre A₂X (si les 2 H _{α} sont équivalents) :



et devraient donner des doublets. L'effet de couplage du proton amide avec les protons α est donc supprimé. L'hypothèse d'un échange rapide du proton NH avec ceux de l'eau résiduelle contenue dans le DMSO a été vérifiée en enregistrant un spectre avec des échantillons de DMSO de très haute pureté : les doublets attendus ont bien été observés ($^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}} = 5,6$ Hz).

3 - Effet de température

a - protons amides

Parmi les méthodes employées pour les études conformationnelles par RMN des peptides en solution, celle de l'effet de la température sur les déplacements chimiques des

protons NH est très utilisée. Elle permet de distinguer les protons amides protégés ou accessibles aux molécules de solvant.

Nous préciserons dans la seconde partie du chapitre les données bibliographiques et l'utilisation des résultats apportés par cette méthode.

Les déplacements chimiques des protons NH du dérivé t.Boc T₁ OCH₃ obtenus en faisant varier la température (20° à 80°) ont été reportés sur la figure I.

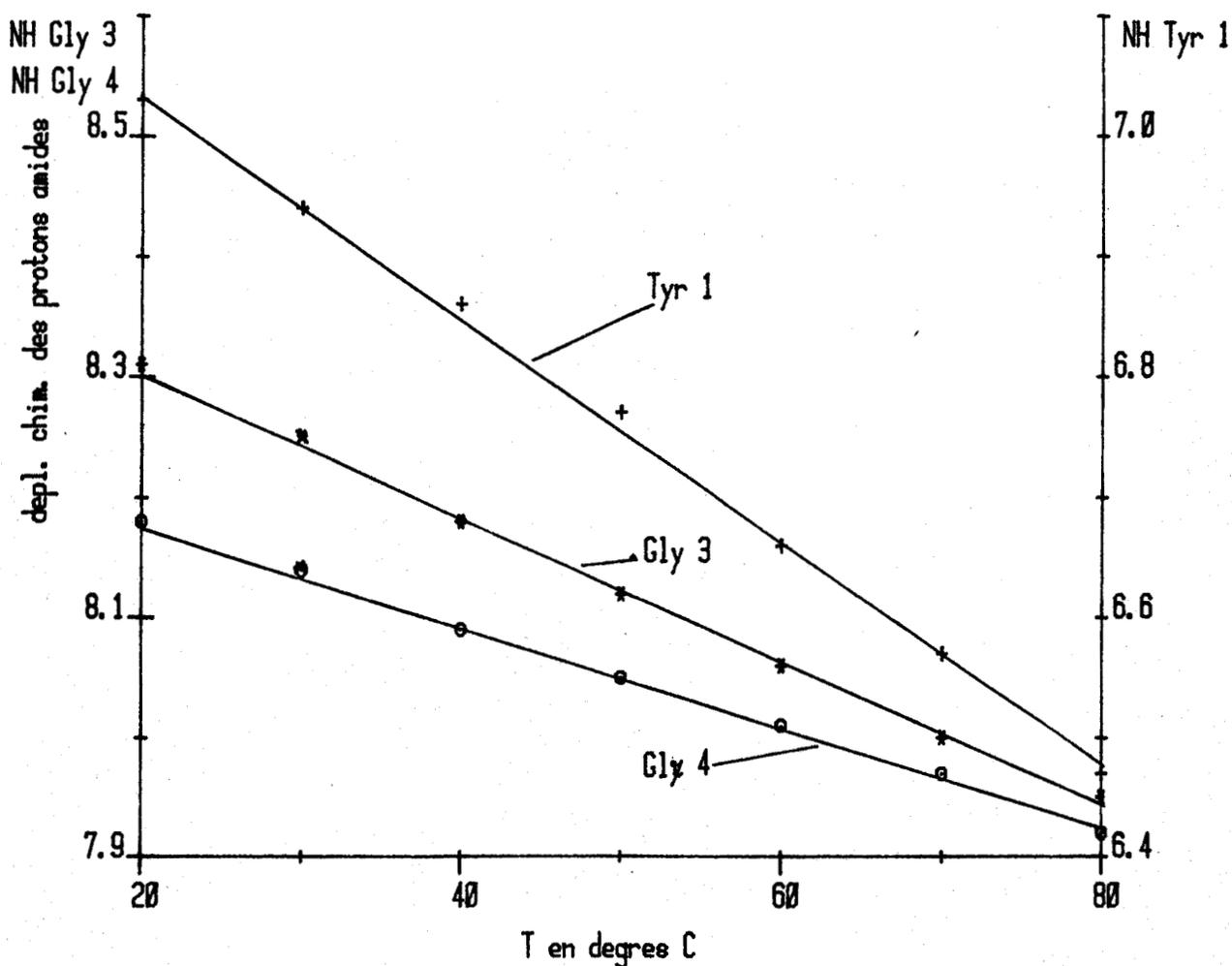


FIGURE I

Variations des déplacements chimiques des protons NH de t.Boc T₁ OCH₃ lors de l'effet de température.

Les résultats obtenus permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Tous les signaux des protons amides glissent vers les hauts champs quand la température s'élève.
- Les variations linéaires observées permettent de caractériser chacune d'entre elles par son "coefficient de température" reporté dans le tableau 3.

NH Tyr 1	$-9,3 \cdot 10^{-3}$ ppm/°
NH Gly 3	$-6,0 \cdot 10^{-3}$ ppm/°
NH Gly 4	$-4,2 \cdot 10^{-3}$ ppm/°

TABLEAU 3

*Coefficients de température des protons amides
de t.Boc T₁ OCH₃*

Les valeurs des coefficients de température (tableau 3) montrent que des deux protons amides Gly 3 et Gly 4, celui appartenant au résidu en 4ème position est un peu moins sensible à l'effet de température que celui du 3ème résidu.

b - distribution des rotamères de la tyrosine

Nous avons représenté sur la figure II, les projections de Newman (par rapport à la liaison C_αC_β tyrosine) des trois orientations possibles de la chaîne latérale (seules les formes décalées plus stables sont envisagées ; elles sont souvent désignées par tg⁻, tg⁺, g⁺ g⁻).

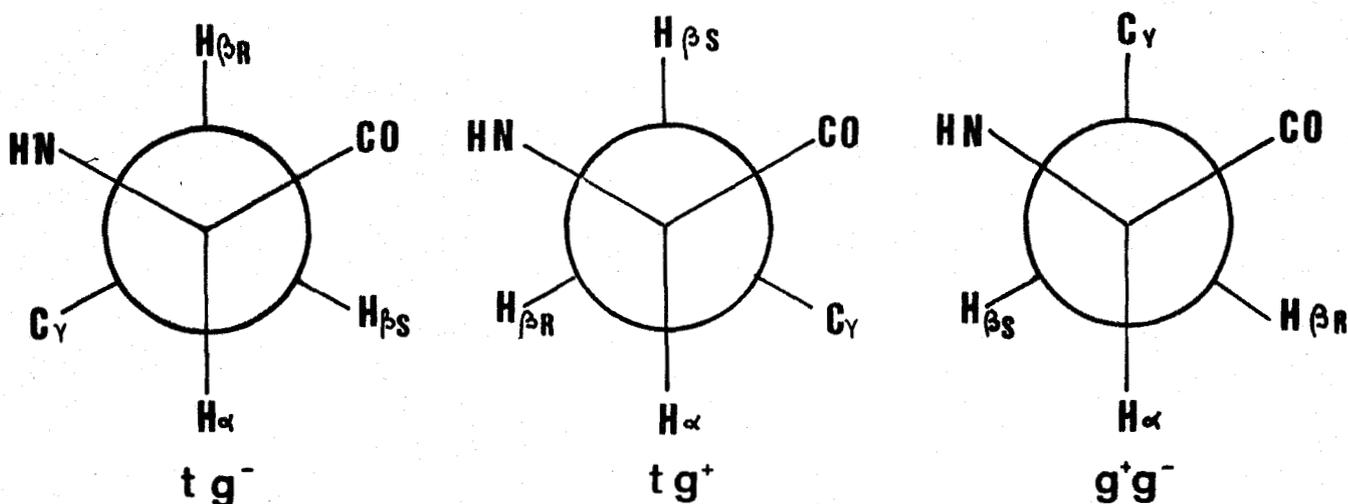


Figure II

Définitions des rotamères le long de l'axe $C_{\alpha}C_{\beta}$ tyrosine

Les protons $H_{\beta R}$ et $H_{\beta S}$ correspondent respectivement aux protons β tyrosine de configuration absolue R et S.

Le rotamère tg^{-} replie le phényle de la chaîne latérale de la tyrosine vers l'extrémité N terminale alors que le tg^{+} l'oriente vers l'extrémité C terminale.

A partir des valeurs des constantes de couplage entre protons α et β du résidu tyrosine, il est possible de calculer les proportions des 3 rotamères. Plusieurs relations sont disponibles dans la littérature, mais les plus utilisées sont celles de Pachler (2) et de Feeney(3).

Certains auteurs ont proposé de décrire l'orientation de la chaîne latérale d'un résidu par la valeur moyenne de l'angle χ_1 , angle de torsion autour de $C_{\alpha}C_{\beta}$ (dièdre $NC_{\alpha}C_{\beta}C_{\gamma}$). On peut alors utiliser les relations proposées par Kopple (4) ou par Wuthrich (5).

Comme on envisage plutôt des comparaisons des distributions de populations des chaînes latérales selon la séquence, les conditions expérimentales... il suffit de choisir l'une ou l'autre des relations et de l'appliquer à l'ensemble des données. Nous avons choisi celles de Pachler qui

apparaissent plus fréquemment dans la littérature. La proportion de chacun des rotamères est obtenue par application des formules suivantes :

$$tg^+ \text{ (ou } tg^-) = \frac{J_g - J_{\alpha\beta_1}}{J_g - J_t}$$

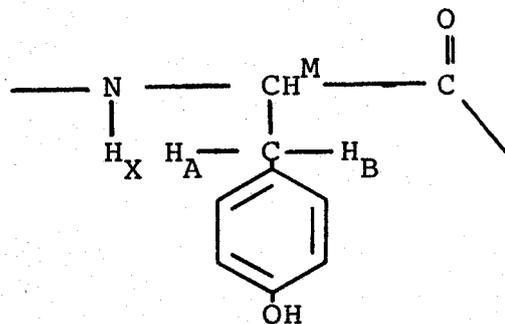
$$tg^- \text{ (ou } tg^+) = \frac{J_g - J_{\alpha\beta_2}}{J_g - J_t}$$

$$g^+g^- = 1 - (tg^+ + tg^-)$$

Dans ces expressions, J_g et J_t sont les constantes de couplage entre le proton α et les protons β correspondant à une conformation dans laquelle un proton β est gauche par rapport au proton α , alors que l'autre proton β est trans.

Pachler propose d'attribuer à J_g 2,6 Hz et à J_t 13,6 Hz.

Les deux constantes de couplage ${}^3J_{\alpha\beta}$ du résidu tyrosine peuvent être extraites du massif des protons β , mais pour se faire, il faut accepter une hypothèse simplificatrice. En effet, le spectre proton de la tyrosine est dans la notation de Pople de type ABMX:



et en toute rigueur les constantes ${}^3J_{\alpha\beta}$ ne peuvent être obtenues qu'après une analyse mathématique fort complexe. Mais compte tenu de la résolution spectrale et des valeurs des constantes de couplage longue distance, on peut considérer que les couplages du proton amide avec les protons β ne

conduisent qu'à un élargissement des raies correspondantes. Aussi, on peut admettre en première approximation que les protons β tyrosine correspondent aux deux protons AB d'un système ABX (X étant alors le proton α) et alors on peut pratiquer l'analyse du massif des protons β par la procédure classique.

L'exploitation du spectre AB des protons β tyrosine de *t*.Boc T_1 OCH_3 (Figure III) montre que le proton bas champ (β_1 , $\delta = 2,81$ ppm) est moins couplé au proton α que le proton haut champ (β_2 , $\delta = 2,58$ ppm) ($J_{\alpha\beta_1} = 3,9$; $J_{\alpha\beta_2} = 10,2$).

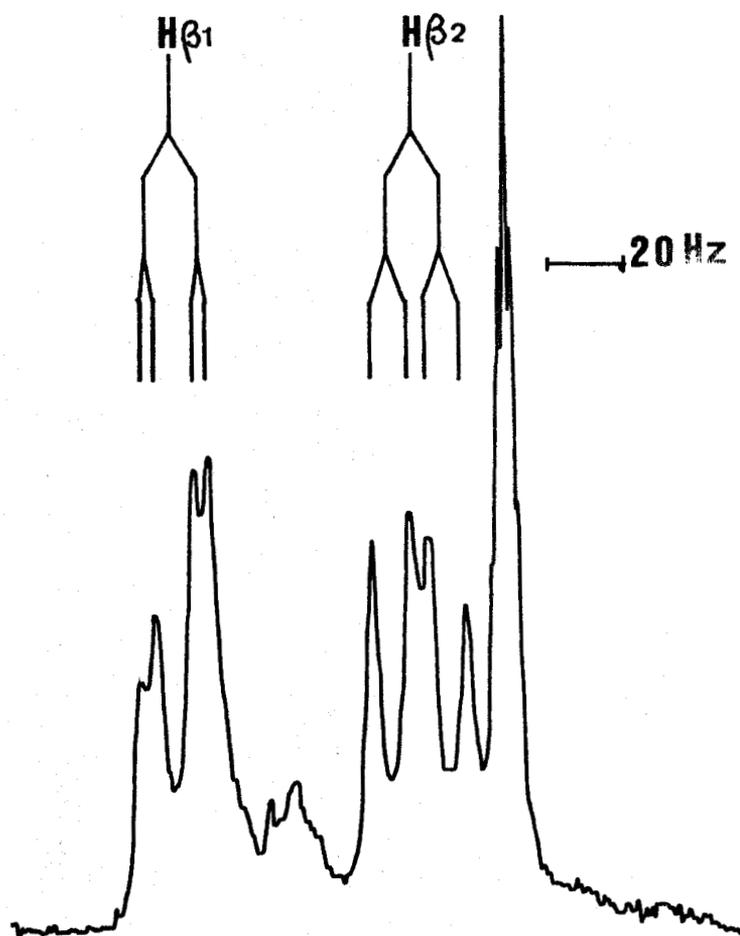


FIGURE III

Massifs des protons β Tyrosine de *t*.Boc T_1 OCH_3 .

Toute proportion gardée, le proton β_2 est plus fréquemment dans une conformation trans par rapport au proton α (rappelons que s'il l'était toujours, on aurait $J_{\alpha\beta_2} = 13,6$ Hz).

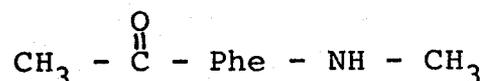
Si le proton β_2 est de configuration absolue R, il est aisé en se référant aux schémas de la figure II de constater que l'orientation est plutôt tg^- (ou tg^+ si β_2 est de configuration absolue S).

Mais l'information concernant les configurations absolues des protons β_1 et β_2 tyrosine ne peut pas être extraite du spectre présenté, aussi sans autre donnée, les deux solutions sont à envisager ($\beta_2 = \beta_R$ ou $\beta_2 = \beta_S$). Ceci conduit à une ambiguïté qui a été présentée par Roberts et Jardetszki (6) comme l'un des problèmes majeurs rencontrés lors d'études conformationnelles par RMN des peptides en solution.

Heureusement, la littérature signale que pour certains dérivés, les configurations absolues des protons β_1 (bas champ) et β_2 (haut champ) ont pu être précisées. Ceci a été fait par deux méthodes très différentes dans leur principe.

1 - Wüthrich et coll. (7) en utilisant l'effet de courant de cycle du phényle de la tyrosine du dérivé $CF_3CO \cdot Gly \ Ala \ Tyr \ Gly \ OCH_3$ (solvant DMSO) ont établi que la chaîne latérale du résidu aromatique se replie préférentiellement vers l'extrémité N terminale (tg^-). Ceci impose aux protons β_1 et β_2 d'adopter les configurations S et R respectivement.

2 - En deutérant sélectivement la position S du carbone β de la chaîne latérale de



ou de dérivés voisins, deux groupes de chercheurs japonais (8) (9) ont montré que les protons β_1 et β_2 sont respectivement de configurations S et R quand les peptides sont en

solution dans des solvants polaires (D M S O, D₂O) mais le résultat contraire est rencontré pour les solvants apolaires (CDCl₃, CD₂Cl₂...).

Pour les solutions de peptides dans le DMSO, il faut constater l'analogie des conclusions des deux approches.

Aussi nos résultats RMN seront exploités sur la base des conclusions de la littérature. Cependant, nous établirons dans un chapitre ultérieur que certaines de nos données expérimentales permettent de confirmer les attributions proposées.

Les massifs des protons β tyrosine de t.Boc T₁ OCH₃ ont été analysés et les distributions des populations de rotamères en fonction de la température sont reportés sur la figure IV.

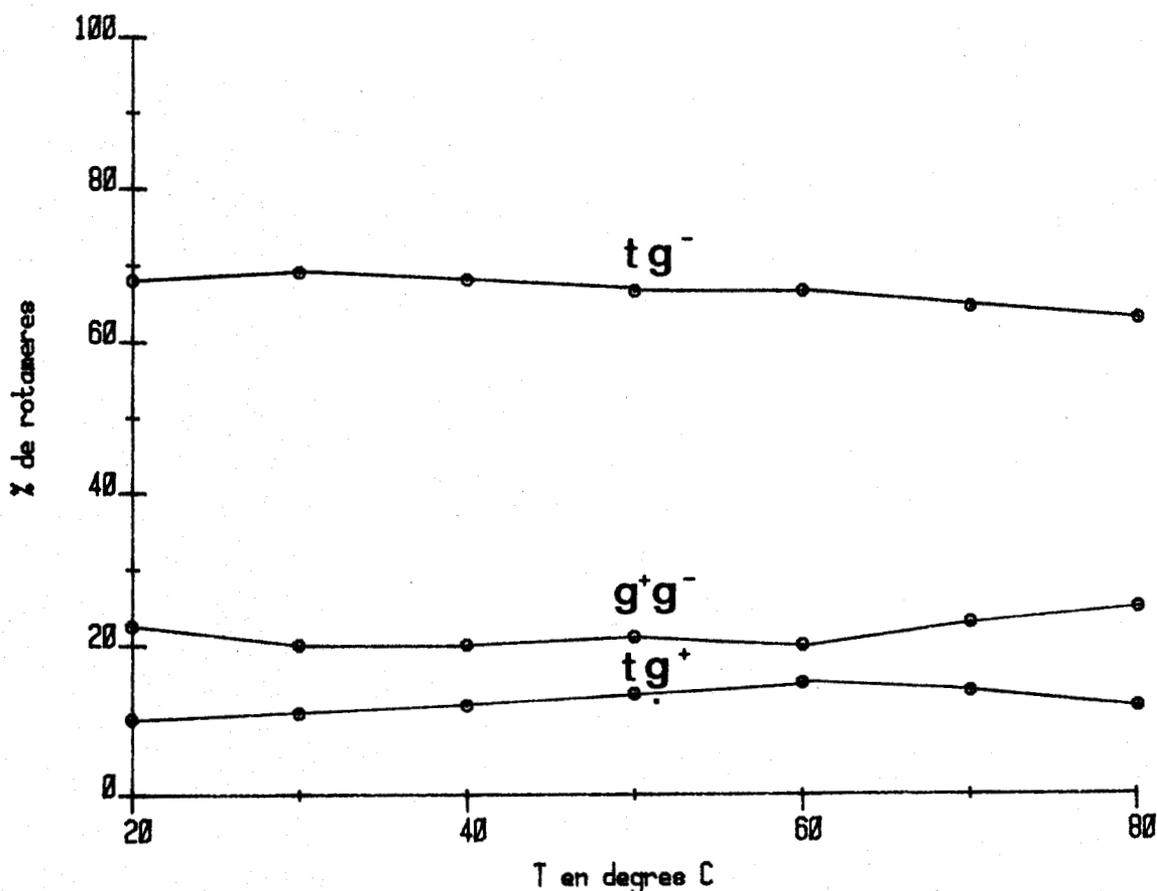


FIGURE IV

Distributions des rotamères latéraux de la tyrosine de t.Boc T₁ OCH₃ en fonction de la température.

Deux remarques sont à faire à propos des résultats :

- 1 - le rotamère tg^- est le plus abondant, à 20°, il représente 68 % de l'ensemble des produits.
- 2 - l'élévation de la température ne modifie que très peu la répartition des populations.

B - RMN ^{13}C (SPECTRE II, REALISE SUR CFT20).

Dans les peptides contenant le résidu proline, on observe souvent l'isomérisation cis - trans de la liaison amide X - Pro.

En RMN du proton, il est parfois difficile d'attribuer les signaux spécifiques de chaque isomère, par contre en RMN du ^{13}C , les résonnances des carbones β et γ des formes cis et trans donnent 4 signaux bien repérés qui apparaissent sur les spectres dans l'ordre suivant (10):



Les effets de relaxation étant du même ordre de grandeur pour les signaux cis et trans de chaque carbone, les intensités relatives donnent une mesure directe des populations de chaque isomère.

L'analyse du spectre ^{13}C de t.Boc T₁ OCH₃ permet de dresser le tableau 4 où figurent les déplacements chimiques et les intensités des raies $C\beta$ et $C\gamma$.

Les valeurs du rapport cis/trans calculées au départ de chaque carbone donnent des résultats identiques et montrent que l'isomère majoritaire est l'isomère trans.

	δ	intensité	cis/trans
C_{β} cis	31,19	17	9,3 %
C_{β} trans	28,71	182	
C_{γ} trans	24,62	175	9,1 %
C_{γ} cis	21,50	16	

TABLEAU 4

Déplacements chimiques et intensités des signaux
 C_{β} , C_{γ} Pro de t.Boc T₁ OCH₃ (réf TMS)

La différence des déplacements chimiques des carbones β et γ du résidu proline permet d'obtenir la valeur moyenne de l'angle ψ Pro. En effet, Siemion (11-12) a montré que la différence des déplacements chimiques des raies correspondant à C_{β} , C_{γ} Pro varie linéairement avec la valeur du dièdre (C_{β} C_{α} C'O). Cet angle est noté θ sur la figure V.

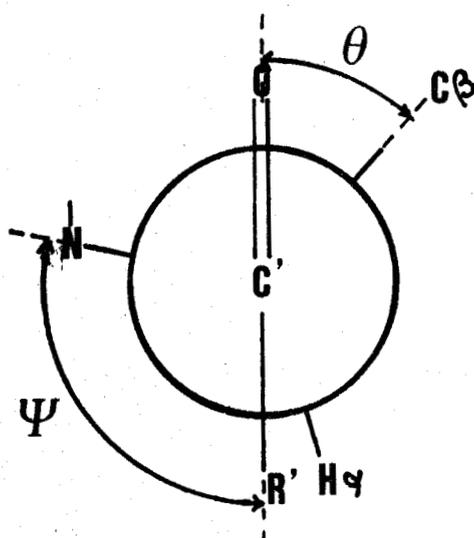


FIGURE V

Définition de l'angle θ d'après Siemion (11)

Les relations suivantes ont été proposées :

- isomère cis $\Delta\delta_{\beta\gamma} = 0,081 |\theta| + 2,47$

- isomère trans $\Delta\delta_{\beta\gamma} = 0,036 |\theta| + 0,73$

θ et ψ Pro sont reliés par $\theta = \psi - 60$.

En ce qui concerne notre dérivé, l'application des formules ci-dessous donnent :

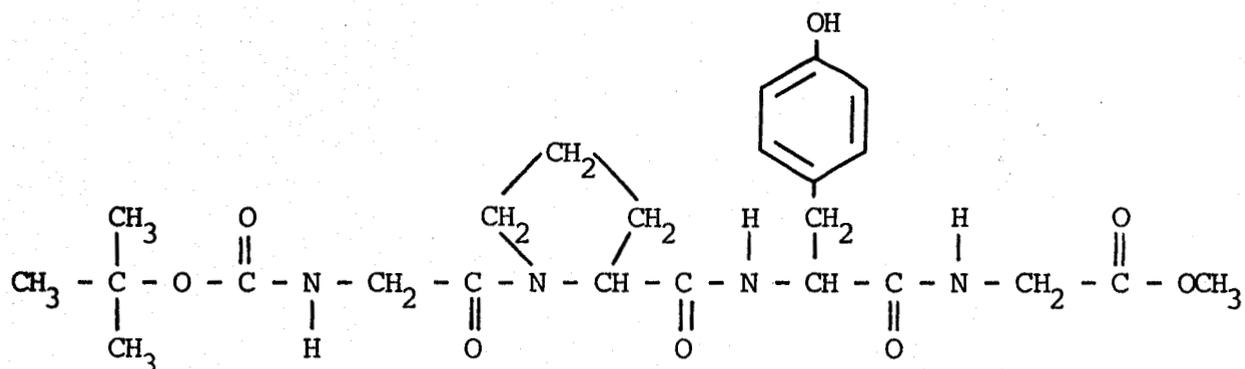
- isomère trans $\Delta\delta = 4,1$ ppm ce qui correspond à 2 valeurs possibles de ψ Pro :

- 30° , + 150°

- isomère cis $\Delta\delta = 9,8$ ppm ce qui donne aussi :

- 30° , + 150°

II - t.Boc Gly Pro Tyr Gly OCH₃ (t.Boc T₃ OCH₃).



A - RMN PROTON

1 - Spectre (III) et paramètres

Les paramètres spectraux de t.Boc T₃ OCH₃ (réf TMS) sont rassemblés dans le tableau 5.

2 - Discussion

Tous les signaux ont pu être attribués. En particulier, les résonances spécifiques des résidus glycine 1 et 4 peuvent être facilement repérées. Il est en effet connu que le proton NH voisin d'un groupement t.Boc est fortement blindé (13), le signal correspondant est situé dans la région des protons aromatiques.

Les protons amides des résidus tyrosine 3 et glycine 4 donnent des signaux distincts pour les isomères cis et trans, ce dernier est le plus abondant, c'est ce qui sera montré par le spectre ¹³C.

Résidus	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	HN = 6,71 H_{α} = 3,77	$\Sigma^3 J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}} = 11,5$ $^3 J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}} = 5,7$
Pro 2	H_{α} = 4,24 (4,35) H_{β_1} = 1,88 $H_{\beta_2}, H_{\gamma} \sim 1,70$ H_{δ} = 3,50	$J_{\alpha\beta_1} = 8$ $J_{\alpha\beta_2} = 2$
Tyr 3	HN = 7,86 (8,24) H_{α} = 4,41 (4,52) H_{β_1} = 2,98 (2,94) H_{β_2} = 2,83 (2,91) H_{ar} = 6,64 - 7,0 HO = 9,14 (9,11)	$^3 J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}} = 8,7$ $^3 J_{\alpha\beta_1} = 4,8$ $^3 J_{\alpha\beta_2} = 9,6$ $^2 J_{\beta_1\beta_2} = 14,2$
Gly 4	HN = 8,07 (8,28) H_{α} = 3,83	$^3 \Sigma J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}} = 11,5$ $^3 J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}} = 5,7$
$(\text{CH}_3)_3\text{C}-$	1,38	
$-\text{O}-\text{CH}_3$	3,64	



TABLEAU 5

Paramètres spectraux de *t*.Boc T_3 OCH_3 (réf TMS).
Les valeurs entre parenthèses correspondent aux paramètres spectraux de l'isomère *cis* (minoritaire)

Les protons H_{α} Gly 1 et 4 apparaissent ici encore sous forme de singulets. Ceci traduit l'équivalence magnétique des deux protons α de chaque résidu glycine d'une part et l'échange rapide des protons amides d'autre part, ceci a déjà été évoqué pour $t.Boc T_1 OCH_3$.

Les signaux H_{α} Pro des isomères cis et trans se présentent sous forme de quadruplets (fig.VI).

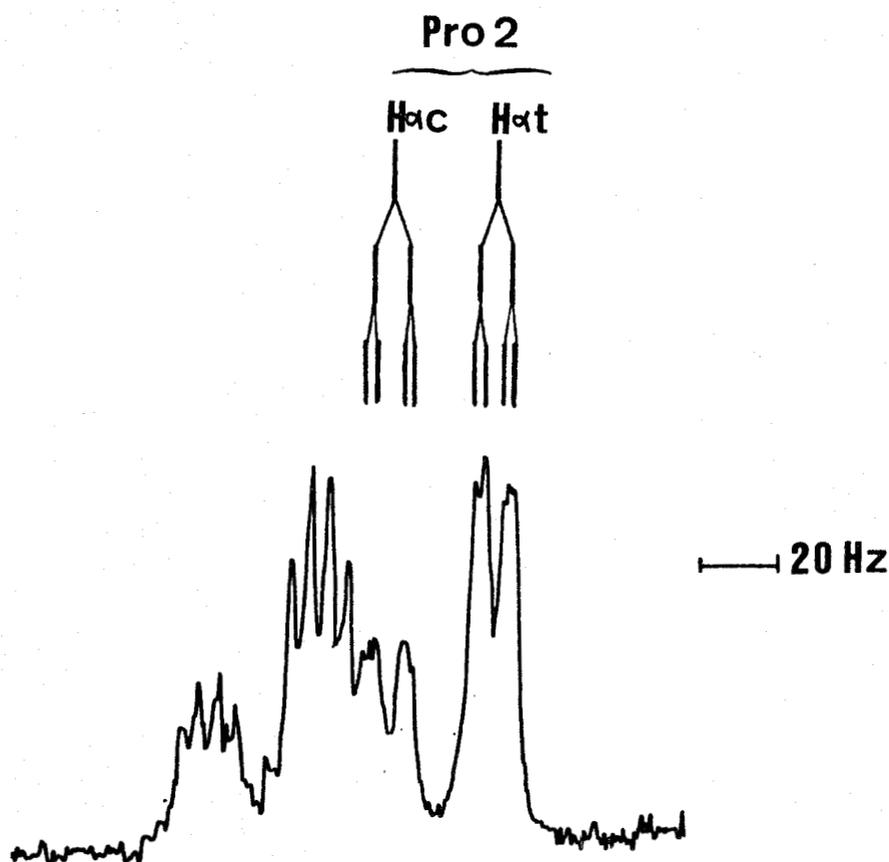


FIGURE VI
Massifs des protons H_{α} Pro et Tyr de $t.Boc T_3 OCH_3$
(isomères cis et trans)

Une analyse au premier ordre montre que pour chaque cas, les constantes de couplage du proton α et des protons β du résidu proline sont de 8 Hz et 2 Hz.

Pour l'isomère cis, ces valeurs sont en accord avec celles rapportées dans la littérature (14).

En ce qui concerne l'isomère trans, certains auteurs (14) (15) obtiennent des valeurs de $^3J_{\alpha\beta}$ Proline de 8-9 Hz et 5-6 Hz, mais très récemment (16) des valeurs de 8 Hz et 3 Hz ont été trouvées à propos de l'étude de Z Gly Pro Leu Gly et des formes cationique et anionique de cette séquence (dans le DMSO).

Les valeurs des constantes $^3J_{\alpha\beta}$ permettent d'apporter des informations sur la conformation du cycle pyrrolidine du résidu proline.

Plusieurs relations (17 - 18) entre les valeurs $^3J_{\alpha\beta}$ et les angles (Fig. VII) ($H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}H_{\beta 1}$) et ($H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}H_{\beta 2}$) sont connus.

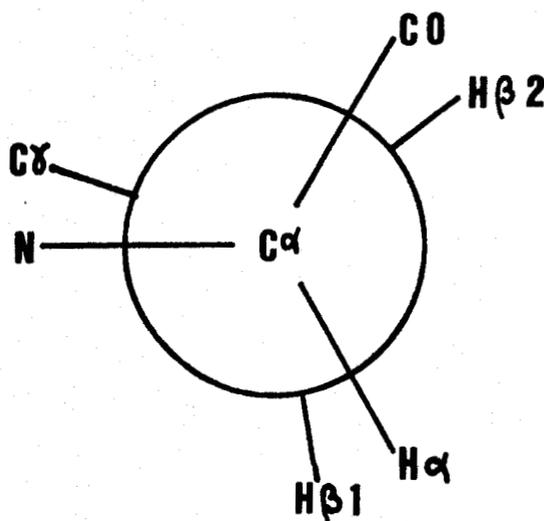


FIGURE VII

Représentation de Newman autour de C α C β Proline

Notre choix s'est porté sur les relations déjà utilisées par Torchia lors de l'étude de la polyproline II (15) et par Ellenberger et coll. pour l'étude de la conformation de la proline en fonction du pH (19) :

$$J_{HH} = A \cos^2 \chi + B \quad (0 < \chi < 90)$$

$$J'_{HH} = A' \cos^2 \chi' + B \quad (90 < \chi' < 180)$$

$$A = 8,5 \text{ Hz} \quad A' = 10,5 \text{ Hz} \quad B = 1,4 \text{ Hz}$$

J_{HH} et J'_{HH} sont les valeurs des constantes de couplage entre les protons α et β , χ et χ' sont les valeurs des angles ($H_{\alpha} C_{\alpha} C_{\beta} H_{\beta_1}$) et ($H_{\alpha} C_{\alpha} C_{\beta} H_{\beta_2}$).

L'application de ces relations pour les constantes trouvées, 8 Hz et 2 Hz, donne comme valeurs des angles, 28° et 78° .

En théorie, plusieurs modèles peuvent être construits, mais parmi ceux-ci, les solutions qui imposent à l'angle de torsion autour de $C_{\alpha} C_{\beta}$ de prendre des valeurs élevées sont à écarter car elles imposent au cycle pyrrolidine de fortes tensions internes. Il faut en outre que l'angle de valence des protons $\beta_1 \beta_2$ soit voisin de 120° de sorte qu'un seul modèle admettant les solutions 28° et 78° soit retenu : il est représenté sur la figure VIII.

Il ressort de l'examen de la figure VIII que le cycle pyrrolidine adopte la conformation endo (le carbonyl et le carbonyle de la proline sont d'un même côté par rapport au plan $NC_{\alpha} C_{\beta}$).

Des conclusions analogues ont été présentées par Toma et coll (16) pour l'étude de Z Gly Pro Leu Gly.

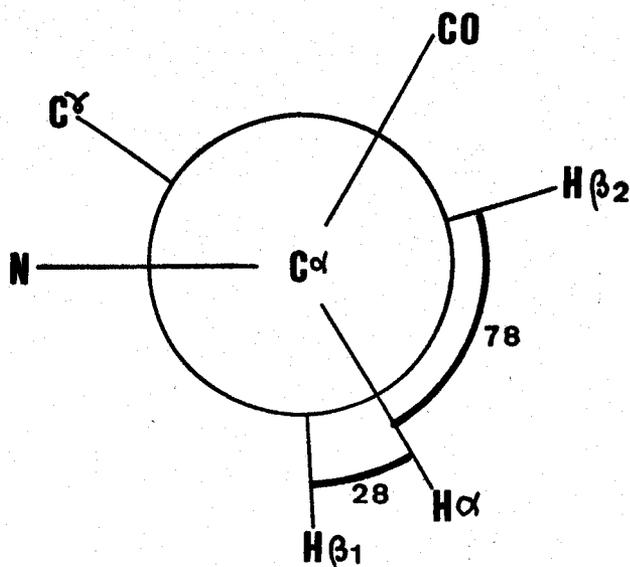


FIGURE VIII

Représentation des angles dièdres $H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}H_{\beta_1}$ et $H_{\alpha}C_{\alpha}C_{\beta}H_{\beta_2}$
du résidu proline de *t.Boc T₃ OCH₃*

Ces auteurs ont d'ailleurs développé un point de vue intéressant : il semble qu'il existe une corrélation entre la conformation du cycle pyrrolidine, la structure de la chaîne principale et la valeur de ϕ Pro.

En effet, les résultats des études RX de (pBr) Z Gly Pro Leu Gly, Z Gly Pro Leu Gly Pro et (OBr) Z Gly Leu Gly Pro montrent :

- 1 - que le cycle de la proline en 2ème position n'adopte pas de conformation privilégiée.
- 2 - que tous les dérivés ci-dessus possèdent une structure organisée : ils se replient autour de la séquence Pro₂ Leu₃ (β turn).
- 3 - que l'angle ϕ Pro₂ est de -62° .

Par contre, pour le résidu Pro situé à l'extrémité C terminale des modèles mentionnés ci-dessus, ainsi que pour Z Gly Pro et Z Gly Pro Leu, il apparaît :

- 1 - que le cycle pyrrolidine adopte la conformation endo.
- 2 - que les résidus proline en position 5 ne sont pas engagés dans des repliements de structure.
- 3 - que l'angle ϕ Pro est de -70° .

A l'appui de ces remarques, il faut signaler que Madison (20) a montré que pour ϕ Pro = -60° , le cycle de la proline est en interconversion rapide entre les formes endo et exo (l'autre conformère stable du cycle pyrrolidine) et qu'en conséquence il n'adopte pas de conformation privilégiée; par contre si ϕ Pro s'écarte de -60° , des contraintes au niveau du cycle apparaissent et se traduisent par une rigidification de celui-ci. Sous réserve de vérifier ces corrélations par l'étude d'autres modèles, il serait intéressant d'utiliser l'état de la conformation du cycle pyrrolidine pour obtenir des informations sur la structure de la séquence Pro X. En ce qui concerne notre peptide on pourrait alors avancer l'hypothèse d'une structure non repliée autour de Pro₂ Tyr₃.

3 - Variation de température

Les déplacements chimiques des protons NH des isomères cis et trans ont pu être suivis de 20° à 80° (Fig. IX). Les droites obtenues permettent de calculer les coefficients de température (Tableau 6).

Résidu	Isomère cis	Isomère trans
Gly 1		$-7,8 \cdot 10^{-3}$
Tyr 3	$-6,3 \cdot 10^{-3}$	$-5,2 \cdot 10^{-3}$
Gly 4	$-4,8 \cdot 10^{-3}$	$-4,2 \cdot 10^{-3}$

TABLEAU 6

Coefficients de températures (ppm/ $^\circ$) des protons amides
de t.Boc T₃ OCH₃

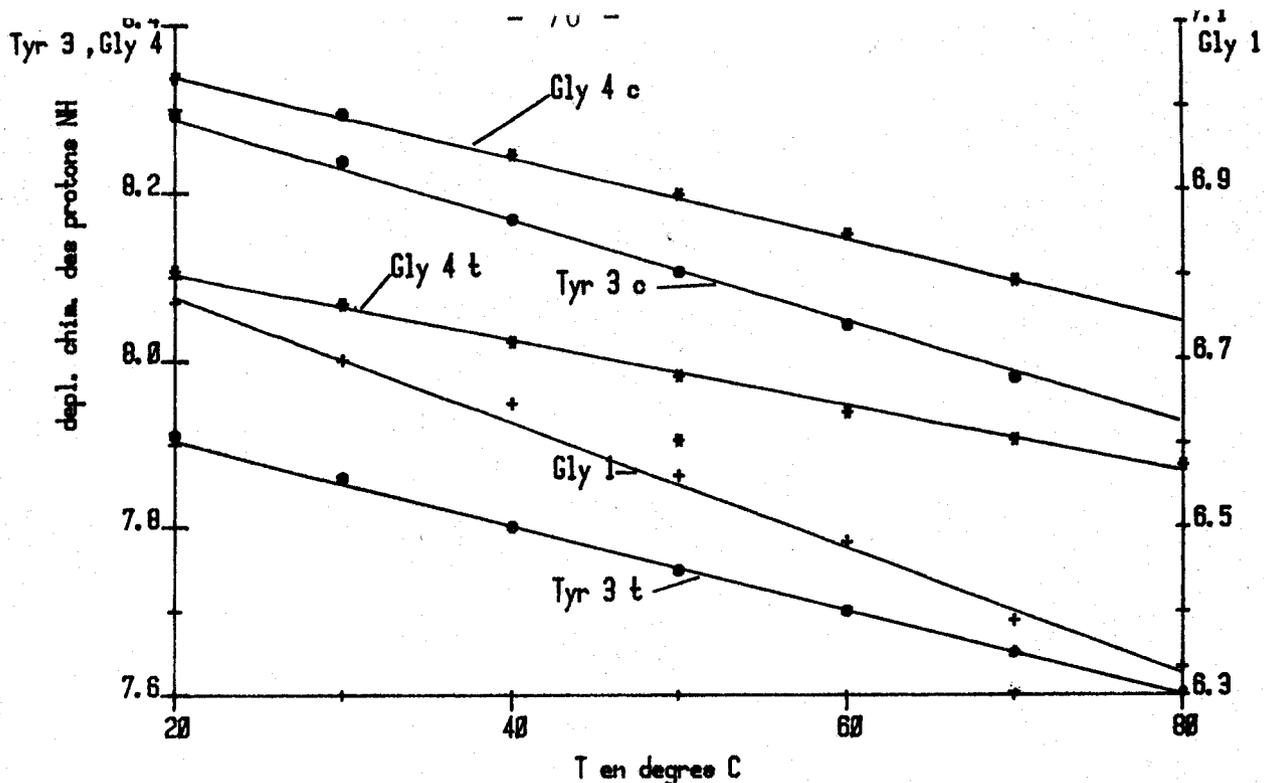


FIGURE IX

Variations des déplacements chimiques des protons NH de *t.Boc T₃ OCH₃* lors de l'effet de température.

L'examen des valeurs du tableau 6 indique que quel que soit l'isomère, le proton NH du résidu glycine 4 est un peu moins sensible à la température que le proton amide de la tyrosine (3ème résidu).

4 - Distribution des populations de rotamères

L'analyse du massif des protons β de la tyrosine et l'application des relations de Pachler permettent d'obtenir les populations des rotamères de la chaîne latérale de ce résidu pour chaque isomère (cis et trans). Les résultats sont reportés dans le tableau 7.

Les valeurs obtenues (Tableau 7) confirment l'orientation préférentielle du phényle vers l'extrémité N terminale et montrent que la nature de la liaison amide (cis et trans) n'a pas d'influence sur la distribution.

	trans	cis
tg ⁻	63	64
tg ⁺	20	18
g ⁺ g ⁻	17	18

TABLEAU 7

Distribution des populations de rotamères de la tyrosine de *t*.Boc T₃ OCH₃ (20°)

B - RMN ¹³C (SPECTRE IV REALISE SUR WH 270)

Le spectre ¹³C de *t*.Boc T₃ OCH₃ permet de connaître les proportions d'isomères cis et trans et la valeur moyenne de l'angle ψ Pro.

Les paramètres spectraux (des carbones β et γ) qui permettent d'obtenir ces informations sont reportés dans le tableau 8.

	δ ppm	intensité du signal	cis/trans
β cis	31,7	35	0,46
β trans	28,5	76	
γ trans	24,1	80	0,40
γ cis	21,8	32	

TABLEAU 8

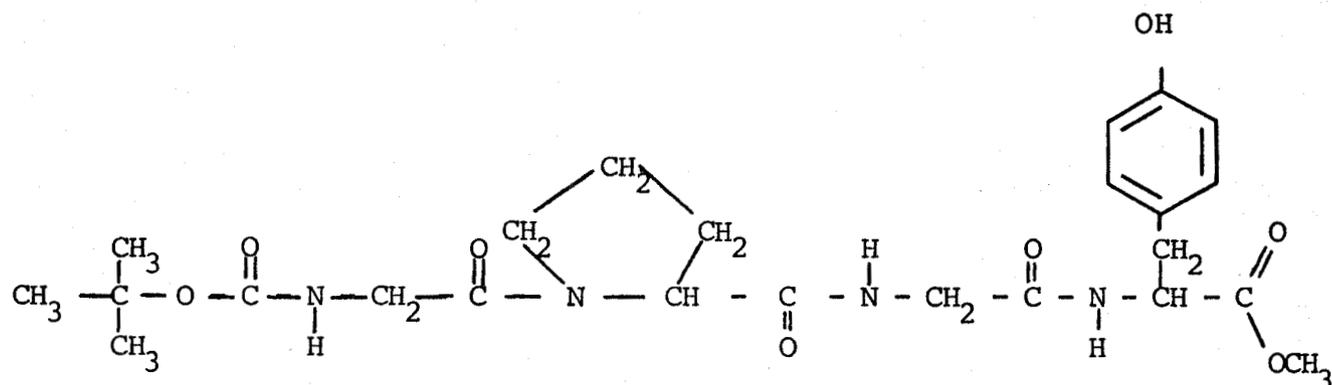
Déplacements chimiques et intensités des signaux des carbones β et γ de *t*.Boc T₃ OCH₃

La valeur 0,40 du rapport cis/trans est certainement plus proche de la réalité que 0,46 : la mesure de l'intensité du signal C_{β} trans est peu précise en raison du recouvrement partiel avec le signal du CH_3 du groupe t.Boc.

Les relations de Siemion (11) permettent de proposer pour les angles ψ Pro :

isomère trans	$\Delta\delta_{\beta\gamma} = 4,4$ ppm	ψ Pro = - 40, + 160°
isomère cis	$\Delta\delta_{\beta\gamma} = 9,9$ ppm	ψ Pro = - 30, + 150°

III - t.Boc Gly Pro Gly Tyr OCH₃ (t.Boc T₄ OCH₃)



A - RMN PROTON

1 - Spectre (V) et paramètres spectraux

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage de t.Boc T₄ OCH₃ (réf TMS) sont rassemblés dans le tableau 9.

2 - Discussion

Les résonnances des protons α des résidus glycine 1 et 3 des isomères cis et trans apparaissent sur le spectre (V) à des fréquences très voisines : le massif est trop complexe pour que des expériences de découplage permettent des attributions précises.

Les protons amides cis et trans donnent des signaux séparés, le spectre ¹³C précisera que l'isomère majoritaire est ici encore l'isomère trans.

Résidus	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	HN = 6,60 H $_{\alpha}$ \approx 3,7	$\Sigma^3 J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}} = 11,5$
Pro 2	H $_{\alpha}$ = 4,25 (4,40) H $_{\beta\gamma}$ \approx 1,9 H $_{\delta}$ = 3,50	
Gly 3	HN = 8,18 (8,29) H $_{\alpha}$ \approx 3,7	$\Sigma^3 J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}} = 11,5$
Tyr 4	HN = 8,02 (8,29) H $_{\alpha}$ = 4,40 H $_{\beta_1}$ = 2,88 H $_{\beta_2}$ = 2,82 H $_{\text{ar}}$ = 6,6 et 6,97 OH = 9,18 (9,21)	$\Sigma^3 J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}} = 7$ $^3 J_{\alpha\beta_1} = 6,1$ $^3 J_{\alpha\beta_2} = 8,5$ $^2 J_{\beta_1\beta_2} = 14,1$
(CH $_3$) $_3$ C	1,31 (1,35)	
O - CH $_3$	3,55 (3,58)	

BHS
LILLE

TABLEAU 9

Déplacements chimiques et constantes de couplage de
t.Boc T $_4$ OCH $_3$ (réf TMS)
c = 0,045 mole/l T = 33°C

3 - Variations de température

a - protons NH

La figure X rend compte des variations des déplacements chimiques des protons NH observées lors de l'étude de l'effet de température. Seuls les signaux de l'isomère trans ont pu être suivis.

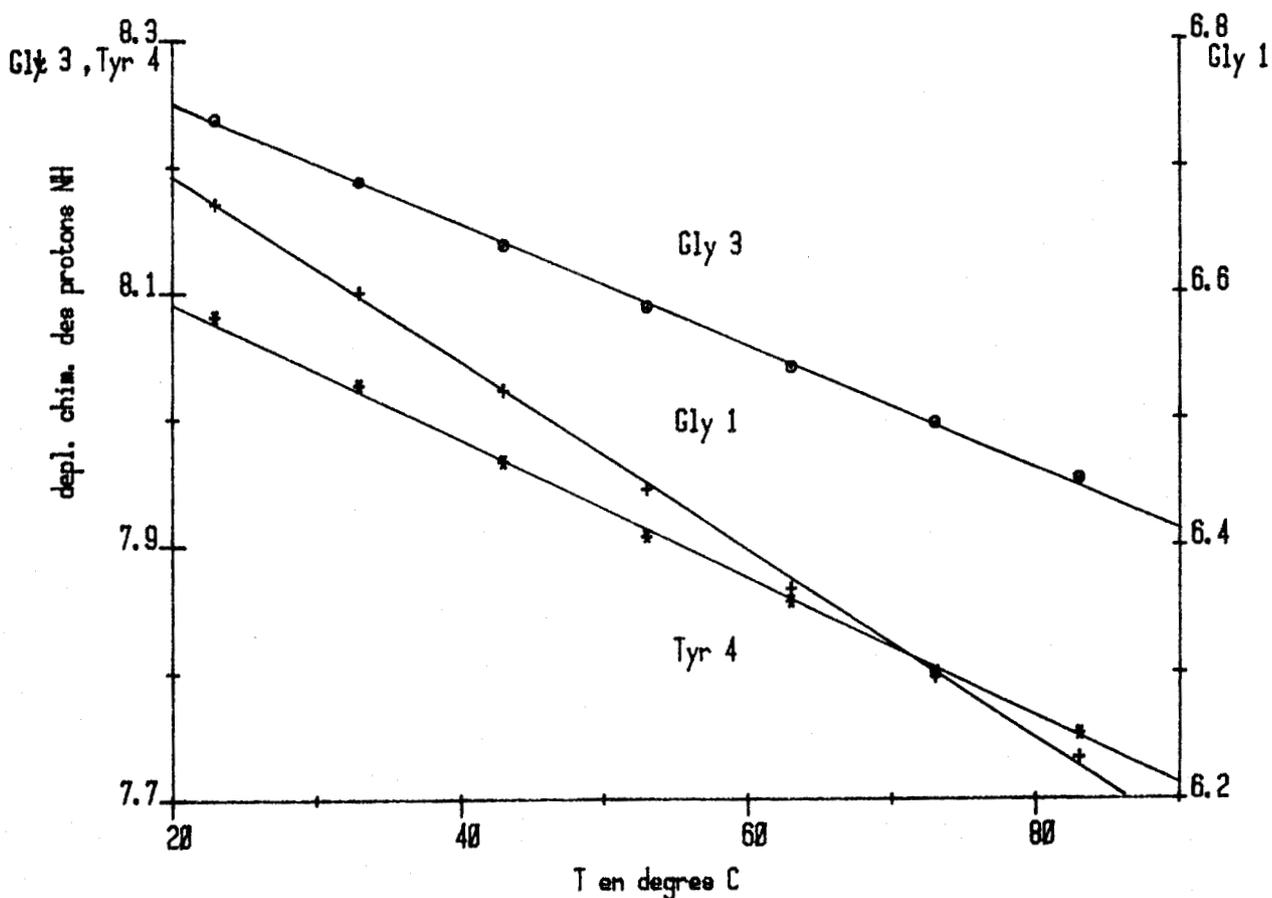


FIGURE X

Variations des déplacements chimiques des protons NH de *t.Boc T₄ OCH₃* lors de l'effet de température.

Les coefficients de température extraits de la figure X sont reportés dans le tableau 10.

Contrairement aux résultats rapportés pour les 2 peptides précédents (*t.Boc T₁ OCH₃* et *t.Boc T₃ OCH₃*), les coefficients de température des protons NH des 3ème et 4ème résidus (glycine et tyrosine) sont pratiquement les mêmes.

Résidu	Pente ppm %
Gly 1	$- 7,5 \cdot 10^{-3}$
Gly 3	$- 5,1 \cdot 10^{-3}$
Tyr 4	$- 5,6 \cdot 10^{-3}$

TABLEAU 10

Coefficients de température des protons amides de *t*.Boc T₄ OCH₃

b - distribution des rotamères

La distribution des populations de rotamères de la chaîne latérale de la tyrosine a été suivie en fonction de la température (Figure XI).

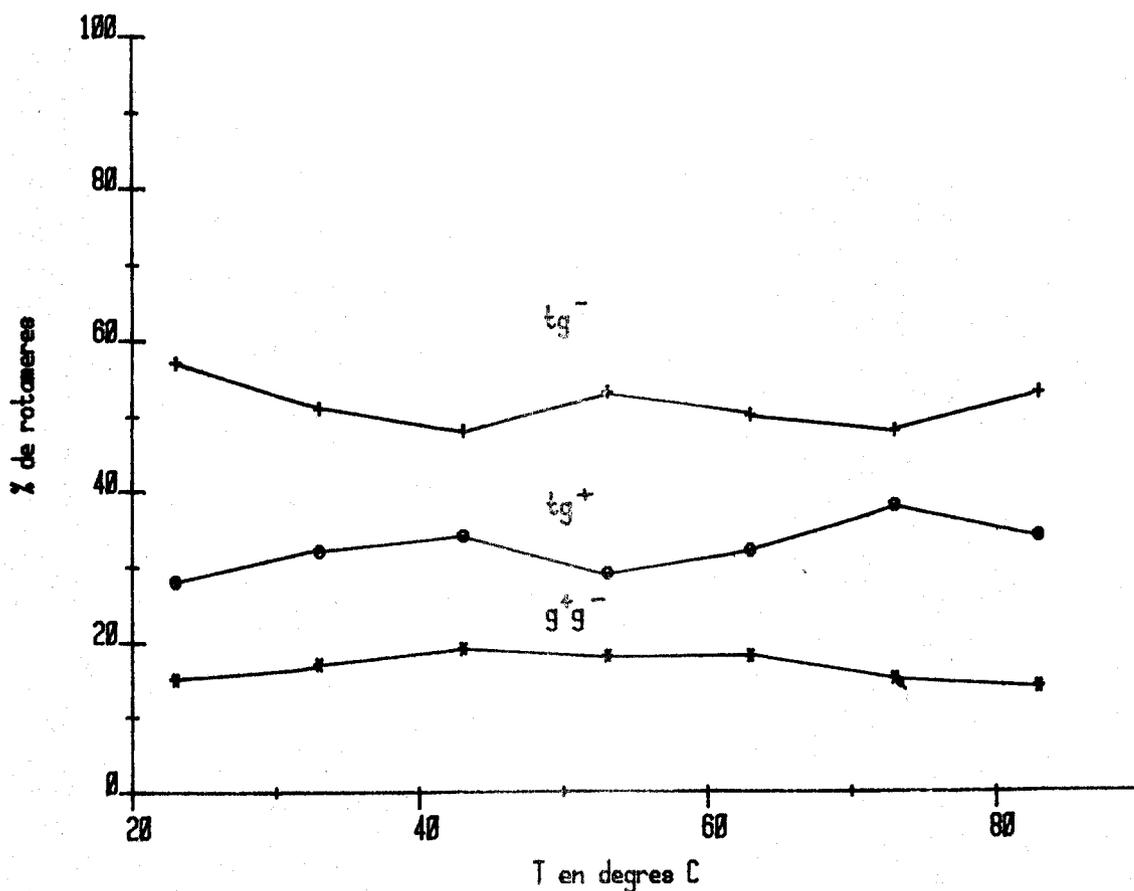


Figure XI

Distributions des rotamères latéraux de la tyrosine de *t*.Boc T₄ OCH₃ lors de l'effet de température



L'orientation tg^- est encore préférentielle, mais par rapport aux deux dérivés précédemment décrits, elle diminue de 10 % au profit de l'orientation tg^+ .

Comme pour $t.Boc T_1 OCH_3$, la température n'a pas d'influence marquée sur la distribution.

B - RMN ^{13}C (SPECTRE (VI) REALISE SUR BRÜKER WP80)

Les quantités relatives des isomères cis et trans (autour de Gly Pro) et les valeurs des angles ψ Pro sont ici encore obtenues par l'intermédiaire des déplacements chimiques et des intensités des signaux des carbones β et γ (tableau 11).

	δ (ppm)	intensité du signal	cis/trans
β cis	31,5	6,5	0,28
β trans	28,6	24	
γ trans	23,9	27	0,28
γ cis	21,6	7,5	

TABLEAU 11

Déplacements chimiques et intensités des signaux des carbones β et γ de $t.Boc T_4 OCH_3$.

La différence des déplacements entre les carbones β et γ est de 9,9 ppm pour l'isomère et de 4,7 ppm pour la forme trans. Ceci correspond aux valeurs suivantes des angles ψ Pro.

Isomère cis : - 30°, + 150°

Isomère trans : - 40°, + 160°

Les études par RMN du proton et du ^{13}C de nos trois peptides protégés, en solution dans le DMSO, permettent de tirer quelques conclusions.

1 - Les signaux des carbones β et γ du résidu proline ont montré que l'isomère trans est en quantité plus abondante et que les valeurs possibles de ψ Pro sont voisines de -30° à -50° et $+150^\circ$ à $+160^\circ$.

2 - Les coefficients de température des protons amides du 4ème résidu de t.Boc $\text{T}_1 \text{OCH}_3$ et t.Boc $\text{T}_3 \text{OCH}_3$ sont légèrement inférieurs à ceux obtenus pour les protons NH du 3ème résidu; mais pour t.Boc $\text{T}_4 \text{OCH}_3$, les coefficients de température des protons NH des 3ème et 4ème résidus sont pratiquement les mêmes.

3 - La chaîne latérale de la tyrosine est orientée préférentiellement vers l'extrémité N terminale et la distribution n'est que très peu influencée par l'élévation de température.

DISCUSSION GENERALE

I - ISOMERIE CIS-TRANS DE LA LIAISON AMIDE X - Pro

En raison d'interactions stériques entre la chaîne latérale de la proline et le squelette peptidique la liaison amide X-Pro peut exister sous 2 formes isomères (Figure XII).

- cis $\omega = 0^\circ$
- trans $\omega = 180^\circ$

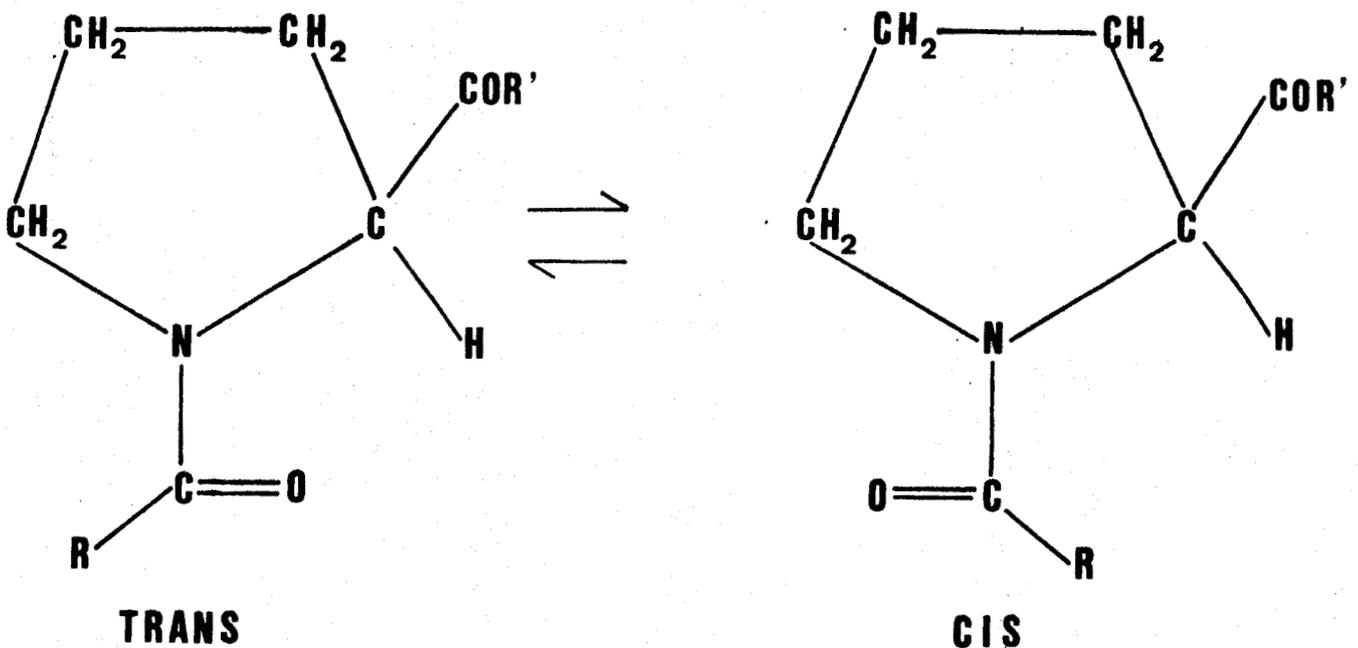


FIGURE XII

*Isomères cis et trans de la liaison amide de
la séquence X - Pro*

La plupart des protéines natives sont de conformation trans (21) alors que dans les oligopeptides, un mélange d'isomères est souvent obtenu (22). Aussi, à propos de la dénaturation-renaturation des protéines, des hypothèses (23) (24) sur le rôle de l'isomérisation cis-trans X-Pro ont été avancées.

Des études cinétiques (25) et thermodynamiques (26) ont permis d'établir la valeur de l'énergie d'activation pour l'interconversion des formes cis et trans, elle est de l'ordre de 80 kJ : cette valeur correspond à un équilibre lent vis-à-vis de l'échelle de temps de la RMN, c'est ce qui permet l'étude séparée de chaque isomère.

L'étude cinétique de l'isomérisation demande de pouvoir obtenir l'un des isomères à l'état pur ou tout au moins un mélange des deux formes dans un rapport suffisamment différent de l'équilibre thermodynamique pour que les résultats puissent être suffisamment précis. Nous n'avons pu remplir aucune de ces conditions, aussi une étude cinétique de l'isomérisation de nos modèles n'a pas été envisagée.

Les valeurs des rapports cis/trans obtenus ont cependant pu être analysées à partir de la méthode proposée par Wüthrich et coll (27-28). Ces auteurs ont proposé d'exprimer le rapport cis/trans en terme de différence d'énergie libre standard ΔG° et d'exprimer cette dernière sous la forme de deux contributions :

$$\Delta G^{\circ} = \Delta G^{\circ}_{\text{X-Pro}} + \Delta G^{\circ}_{\text{conformationnel}}$$

L'idée fondamentale qui a conduit à la relation précédente repose sur quelques hypothèses qu'il faut préciser.

Le terme $\Delta G^{\circ}_{\text{X-Pro}}$ correspond à un rapport d'isomères qui sont décrits l'un et l'autre par un ensemble statistique des valeurs des angles dièdres (conformation désordonnée).

La littérature fournit des valeurs de ΔG°_{X-Pro} . Il suffit donc de comparer le ΔG° obtenu pour le peptide étudié à la valeur de référence correspondante ΔG°_{X-Pro} . Si le ΔG° expérimental est voisin du ΔG°_{X-Pro} , il est probable que le peptide n'est pas structuré.

Si le ΔG° expérimental ne correspond pas au ΔG°_{X-Pro} , la différence observée est exprimée par le terme ΔG° conformationnel. Une hypothèse est alors avancée par les auteurs : l'un ou l'autre des isomères (ou les deux) possède une conformation privilégiée qui stabilise l'un ou l'autre isomère.

Les premières difficultés rencontrées dans l'application de la méthode tiennent à la nature protégée de nos dérivés : les données bibliographiques concernent surtout des peptides libres et peu de dérivés protégés. Il faut donc dans un premier temps, établir des critères de fiabilité des comparaisons envisagées.

Les données bibliographiques (27-28) et nos résultats sont reportés dans le tableau 12.

Peptide	% cis selon Wuthrich (27-28)	% cis notre travail
$^{+}NH_3L$ Ala Pro OH	10	
Z L Ala Pro OH	10	
Z L Ala Pro L Ala OCH ₃	11	
$^{+}NH_3$ Gly Pro OH	25	
$^{+}NH_3$ L Phe Pro OH	10	
t.Boc T ₁ OCH ₃ (Tyr-Pro)		9
t.Boc T ₃ OCH ₃ (Gly-Pro)		28
t.Boc T ₄ OCH ₃ (Gly-Pro)		22

TABLEAU 12

Pourcentage d'isomère cis

Dans la seconde colonne, les valeurs de la littérature de ΔG°_{X-Pro} sont exprimées en pourcentage d'isomère cis et dans la troisième colonne, nous avons reporté les valeurs de ΔG° obtenues pour nos 3 dérivés (traduites aussi en pourcentage de cis).

Les trois premiers dérivés montrent :

1 - que l'introduction d'un groupe N protecteur n'a pas d'influence sur le rapport cis/trans.

2 - que l'allongement de la chaîne et l'introduction du groupe ester de méthyle donnent encore la même quantité d'isomère cis.

En conséquence, comparer le ΔG°_{X-Pro} de $^{+}NH_3$ Gly - Pro OH aux deux peptides protégés contenant la séquence Gly - Pro paraît assez justifié.

Ne disposant pas des valeurs ΔG°_{X-Pro} pour la séquence L Tyr - Pro, nous comparerons t.Boc T₁ OCH₃ à L Phe - Pro.

En ce qui concerne t.Boc T₃ OCH₃ et t.Boc T₄ OCH₃, les quantités d'isomères cis sont respectivement de 28 % et 22 %, elles sont proches de celles attendues de conformations statistiques (25 %). Une observation analogue peut être faite pour la valeur obtenue pour t.Boc T₁ OCH₃ (9 %) et les valeurs correspondant à des conformations statistiques pour les peptides contenant la séquence L Phe - Pro (10 %).

En suivant les hypothèses de Wüthrich et coll. (27-28), il semble donc que pour l'essentiel, nos trois dérivés adoptent des conformations peu organisées.

Il faut cependant introduire à ce niveau de l'exposé une réserve quant à l'application de la méthode qui vient d'être utilisée. Dans la suite de l'exposé, nous présenterons des résultats qui mettent en évidence l'existence de conformations privilégiées pour nos dérivés lorsque ceux-ci seront sous forme zwitterionique; on pourra en corrélation montrer que les rapports cis/trans sont nettement différents de ceux attendus de conformations désordonnées, mais seulement pour

deux des trois modèles étudiés. Aussi d'autres arguments doivent être développés pour préciser la structure des modèles protégés, c'est ce qui sera fait dans le prochain paragraphe.

A côté de l'isomérisie cis-trans, il faut signaler que des travaux théoriques ont permis d'obtenir les valeurs les plus probables de l'angle ψ du résidu proline : elles sont de -35° et $+125^\circ$ selon Tonelli (29) ou de -40° et $+160^\circ$ d'après Venkatachalam (30) et Schéraga (31).

A ces valeurs (-35° , -40° et $+125^\circ$, $+160^\circ$) correspondent des rotamères stables notées respectivement cis' et trans' (Figure XIII) (rotation autour de $C_\alpha C'$ Pro)

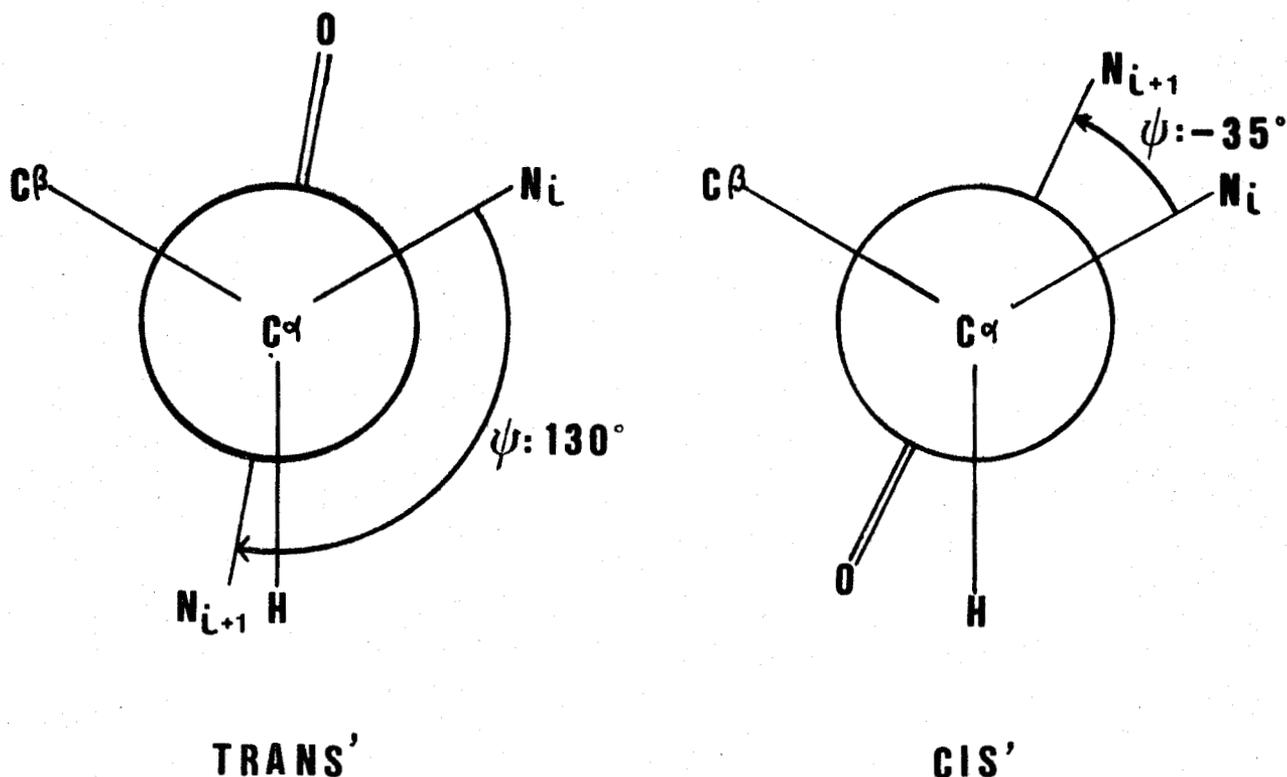


FIGURE XIII

Représentation des rotamères cis' et trans' de la proline.

Du point de vue expérimental, Roques et coll. (25) n'ont pas pu obtenir de signaux spécifiques (en RMN ^{13}C) des formes cis' et trans', même à très basse température (-70°). Ces auteurs ont alors estimé que l'énergie d'activation de l'isomérisation cis', trans' est inférieure à 10 kcal.

Par contre, en choisissant un modèle cyclique, c(Pro Gly) $_2$, pour lequel l'énergie d'activation est plus élevée, Deber et coll. (32) ont pu mettre en évidence chacun des deux conformères.

II - ANALYSE CONFORMATIONNELLE ET EFFET DE TEMPERATURE

L'analyse conformationnelle des peptides se propose de fournir les valeurs des angles de torsion (ϕ , ψ , χ) autour des liaisons simples.

L'accès aux valeurs des angles ψ (rotation autour de $\text{C}_\alpha\text{C}'$) demande la mise en oeuvre de la RMN de l'azote 15, ce qui nécessite l'utilisation de produits enrichis. Dans le cadre de ce travail, cette étude n'a pas été envisagée.

Les valeurs des angles dièdres (χ) des chaînes latérales sont plus fréquemment exprimées en distributions de populations et on doit souvent se limiter aux valeurs obtenues pour la rotation autour de $\text{C}_\alpha\text{C}_\beta$. Ceci a déjà été évoqué plus haut.

Il reste donc à préciser les méthodes utilisées pour accéder aux valeurs des angles ϕ (rotation autour de NC_α).

A partir des travaux de Karplus (33) des relations empiriques entre $^3\text{J}_{\text{HNC}_\alpha\text{H}}$ et l'angle ($\text{HNC}_\alpha\text{H}$) (souvent noté θ) ont été proposées (34-37). Les diagrammes correspondant à certaines d'entre elles ont été reportés sur la figure XIV.

L'angle θ est relié à l'angle ϕ par $\theta = |\phi - 60|$. Nous avons utilisé pour tous les résultats de la suite de l'exposé les conventions adoptées par l'IUPAC (38) : la valeur de ϕ est nulle quand CO_i et CO_{i-1} sont éclipsés et le sens positif est celui représenté sur le schéma.

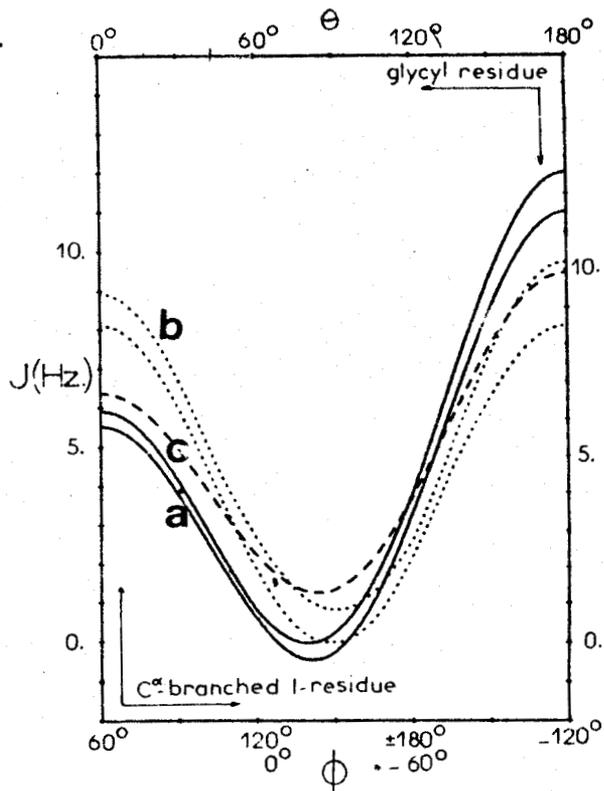
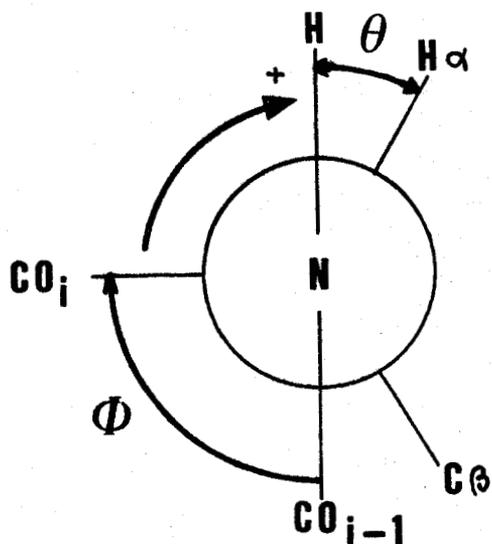


FIGURE XIV

Représentation de l'angle $HNC_\alpha H$ (θ) et des diagrammes des relations ${}^3J = f \theta$ selon :

(a) : Marraud et coll. (36) (b) Bystrov et coll. (34)

(c) Ramachadran et coll. (35).

L'examen des diagrammes présentés montre que dans certains domaines de valeurs, les écarts entre les diverses corrélations peuvent être importants. En particulier, il apparaît pour $\theta \approx 0^\circ$ et 180° un très net désaccord entre les courbes ${}^3J = f(\theta)$ proposées par Marraud et coll. (36) et celles de Bystrov et coll. (34).

Certains résultats de travaux théoriques (39-40) montrent que la relation de Marraud est mieux adaptée. Il faut pourtant signaler que très nombreuses études conformationnelles sont basées sur la relation de Bystrov, publiée antérieurement. A côté de ce problème du choix de la corrélation à utiliser, il faut aussi préciser qu'une constante 3J inférieure à 5 Hz (pour la relation de Marraud) donne 2 valeurs possibles de l'angle θ et en tenant compte de la relation $\theta = |\phi - 60|$, déjà pour un seul résidu, 4 valeurs de ϕ vont satisfaire aux paramètres spectraux.

De plus, une constante 3J peut correspondre à deux situations conformationnelles très différentes :

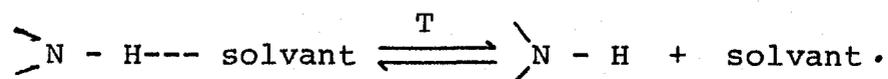
1 - Si la structure est peu flexible, l'angle ϕ (ou les angles ϕ) qui est extrait de l'une ou l'autre des corrélations va bien représenter l'état de la conformation.

2 - Si la structure est flexible et comme les énergies d'activation autour des liaisons simples sont peu élevées, l'angle ϕ va prendre pendant le temps de la prise de l'information RMN toute une série de valeurs. La constante de couplage mesurée sur le spectre ne va être que celle qui correspond à la valeur moyenne de l'angle ϕ de l'ensemble des structures.

En conséquence, proposer une ou plusieurs structures possibles à partir des seules valeurs des constantes $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}}$ n'a pas de sens. On ne peut se servir de celles-ci pour proposer des valeurs possibles des angles ϕ que si on a pu établir que le peptide possède une conformation préférentielle.

Pour mettre en évidence l'existence d'une conformation stable, plusieurs méthodes sont pratiquées : effet de température, effet de solvant, effet de concentration, transfert de saturation... On cherche par la mise en oeuvre de ces méthodes, à mettre en évidence des comportements spécifiques de certains protons amides du peptide. Les résultats sont analysés en termes de plus ou moins grande accessibilité aux molécules de solvant.

Les modifications des déplacements chimiques des protons amides induites par l'élévation de température sont d'un usage très fréquent. Introduite par Kopple et coll. (41, 42), cette méthode repose sur le déplacement de l'équilibre proton solvaté, proton libre lorsqu'on chauffe :



Les résultats obtenus par cette méthode peuvent être interprétés sur la base de deux situations extrêmes.

1 - Le proton amide est très accessible aux molécules de solvant, l'augmentation de la température dissocie le complexe de solvation, en conséquence le blindage au niveau

du proton amide augmente et le signal RMN se déplace vers les champs plus élevés.

2 - Si le proton amide est peu accessible (protégé par son environnement ou engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire) alors l'augmentation de la température n'a qu'une influence très limitée sur le déplacement chimique du proton NH concerné. La méthode a été appliquée avec succès aussi bien pour des solvants bons solvatants des protons amides (DMSO) que pour des solvants plus acides (H_2O , TFE).

Et même, la littérature (43) signale que pour le chloroforme, peu solvant des protons NH, les résultats de l'effet de température permettent de tirer des conclusions en accord avec celles issues d'autres approches.

Les variations des déplacements chimiques des protons NH en fonction de la température sont souvent linéaires, mais elles peuvent être parfois plus complexes (44, 45) : elles sont alors interprétées en termes de modifications conformationnelles induites par la température(44)

En ce qui concerne les variations linéaires, les valeurs(absolues) des coefficients de température supérieurs à $- 6.10^{-3}$ ppm/° correspondent à des protons exposés au solvant, celles inférieures à $- 2.10^{-3}$ ppm/° à des protons NH protégés.

Les valeurs intermédiaires peuvent correspondre à des protons partiellement protégés ou à des équilibres entre conformations où le proton moyenne un environnement protégé et exposé.

D'autres valeurs ont été proposées par Urry (44) pour prendre en compte le rôle particulier de chaque solvant (tableau 13).

Les valeurs proposées par Urry s'intègrent assez bien parmi les valeurs présentées plus haut, mais il faut signaler que selon cet auteur, les coefficients de température des protons NH protégés peuvent être un peu plus élevés ($- 3.10^{-3}$ ppm/° au lieu de $- 2.10^{-3}$ ppm/°).

	DMSO	MeOH	TFE	H ₂ O
proton exposé	- 5,3	- 7,5	- 7,6	-
proton protégé	- 3,4	- 3	- 4	- 4,5

TABLEAU 13

Coefficients de température ($\times 10^3$ ppm/°) d'après Urry (44)

La méthode de l'effet de température a donné des résultats particulièrement démonstratifs lors de l'étude conformationnelle de dérivés cycliques (46). La rigidité de ces modèles maintient bien l'inaccessibilité des protons NH tournés vers l'intérieur du cycle.

Les résultats des effets de température obtenus pour nos trois peptides sont rassemblés dans le tableau 14.

$\Delta\delta/\Delta t$ ($\times 10^3$ ppm/°)	t.Boc T ₁ OCH ₃	t.Boc T ₃ OCH ₃	t.Boc T ₄ OCH ₃
NH 1er résidu	- 9,3	- 7,8	- 7,5
NH 3ème résidu	- 6,0	C - 6,3 t - 5,2	- 5,1
NH 4ème résidu	- 4,2	C - 4,8 t - 4,2	- 5,6

TABLEAU 14

Coefficients de température de nos peptides

Pour les trois modèles, les valeurs élevées des coefficients de température du proton NH du premier résidu sont celles qui sont rapportées dans la littérature (13) pour un proton NH exposé au solvant et porté par un groupe t.Boc.

En ce qui concerne $t.\text{Boc } T_4 \text{ OCH}_3$, les coefficients des 3ème et 4ème résidus sont ceux qui caractérisent des protons accessibles aux molécules de solvant. Aucun de ces protons n'est placé dans un environnement qui le protège, et n'est pas non plus engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire. Aussi, un tel résultat est analysé comme caractéristique d'une conformation désordonnée, flexible.

Les protons du 3ème résidu de $t.\text{Boc } T_1 \text{ OCH}_3$ et $t.\text{Boc } T_3 \text{ OCH}_3$ possèdent des coefficients correspondant à des protons NH exposés et ceux du 4ème résidu à des protons très partiellement protégés. Pour interpréter ce résultat, il est intéressant de se référer aux travaux de Urry et coll. (13). Ces auteurs ont étudié le dérivé $t.\text{Boc Val Pro Gly Val Gly OCH}_3$ dans plusieurs solvants dont le DMSO. Ils ont conclu à l'existence d'une structure repliée de type β autour des résidus proline 2 et glycine 3 (Figure XV).

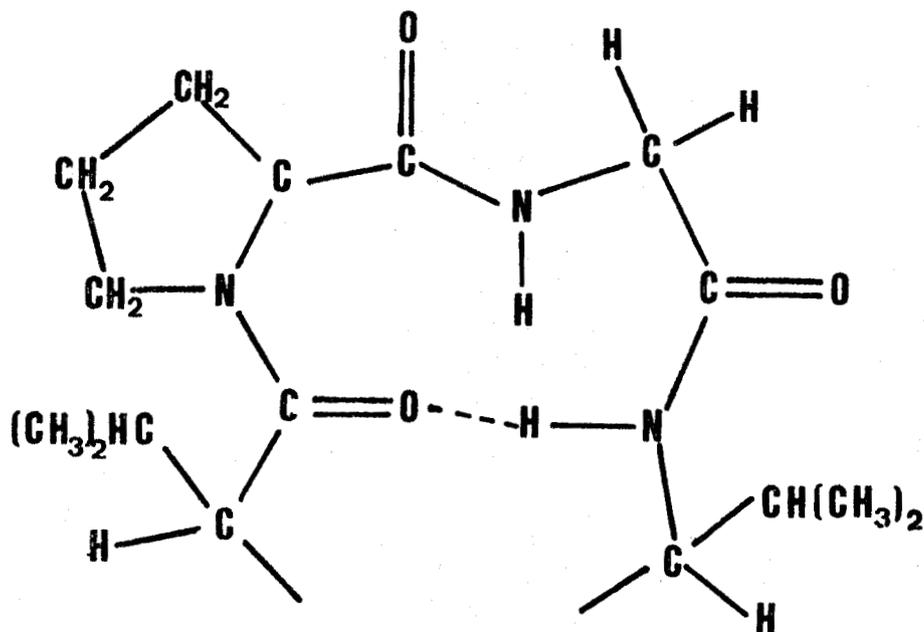


FIGURE XV

Représentation de la structure repliée de $t.\text{Boc Val Pro Gly Val Gly OCH}_3$ d'après Urry et coll. (13)

L'analogie de nos modèles et de celui de Urry et coll. est évidente, protections N et C terminales identiques, et surtout présence de la proline en position 2 dont on connaît la forte potentialité à engendrer le repliement β (47). Les valeurs plus faibles des coefficients des protons NH des 4ème résidus de nos dérivés seraient alors la conséquence de l'établissement d'une liaison hydrogène entre le proton amide du 4ème résidu et le carbonyle de la glycine en I.

Mais compte tenu des valeurs des coefficients des protons NH des 4ème résidus ($- 4.10^{-3}$ ppm/°) de nos modèles, ce repliement n'a pas un poids statistique prépondérant, il est plutôt l'indice d'une tendance à la structuration qu'il serait intéressant d'exalter, soit en changeant de solvant car le DMSO est un trop bon solvant des protons amides et ne favorise pas l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires, ou soit en créant des charges de signes opposés aux deux extrémités de la chaîne peptidique pour favoriser des interactions "tête queue" qui pourront éventuellement stabiliser la forme repliée.

C'est ce qui sera fait dans les prochains chapitres.

La méthode de l'effet de température a donc permis de montrer que, pour l'essentiel, nos modèles sont peu organisés.

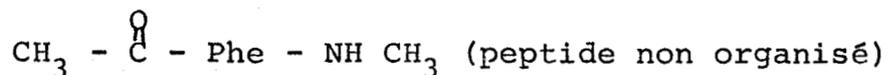
III - DISTRIBUTION DES POPULATIONS DE ROTAMERES DE LA CHAÎNE LATÉRALE DE LA TYROSINE

Nous avons montré que les distributions de populations tg^- , tg^+ et g^+g^- sont peu influencées par l'élévation de la température. Ce résultat a déjà été observé et les hypothèses qui ont été proposées pour l'interpréter sont strictement opposées.

Jones et coll. (48) estiment que l'organisation de la chaîne latérale reflète celle de la chaîne principale et qu'en conséquence l'insensibilité de la distribution lors de l'effet de température caractérise une chaîne principale organisée.

En se basant sur le fait qu'à 80°, les protéines sont pour la plupart dénaturées, Wüthrich (7) pense que dans le cadre de l'hypothèse de Jones, cette température est bien suffisante pour perturber la structure de la chaîne principale si elle est organisée et en conséquence celle de la chaîne latérale. Or il n'en est rien, aussi Wüthrich propose d'attribuer l'insensibilité de la distribution lors de l'effet de température à l'existence d'une conformation statistique de la chaîne principale, c'est-à-dire à un ensemble de structures en interconversion rapide pour lesquelles l'augmentation de la température n'apporte qu'une modification très limitée à la "structure moyenne" du peptide.

A l'appui de cette hypothèse, il faut signaler que l'effet de la température sur la distribution des rotamères latéraux de la phénylalanine de



est également très limitée.

En suivant les conclusions de Wüthrich, il s'avère que les résultats obtenus pour nos dérivés montrent que la chaîne principale est non organisée.

CONCLUSION

La discussion a permis de présenter les problèmes spécifiques des peptides contenant le résidu proline:isoméries cis - trans et cis' - trans'.

Les rapports cis/trans obtenus ont été analysés au moyen de données de la littérature et ont abouti, sous certaines conditions, à proposer pour nos trois modèles l'hypothèse de conformations non ordonnées.

La méthode de l'effet de la température sur les déplacements chimiques des protons amides a été décrite. Les résultats obtenus par sa mise en pratique pour nos dérivés confirment l'hypothèse précédente.

Enfin, l'attention a été attirée sur les conditions d'utilisation des paramètres RMN (essentiellement les $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}}$) pour accéder aux valeurs des angles de torsion ϕ .

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE III

- (1) G. BOUSSARD, M. MARRAUD et A. AUBRY
Biopolymers (1979) 18, 1297-1331.
- (2) K.G.R. PACHLER
Spectrochim. Acta (1964) 20, 581-587.
- (3) J. FEENEY
J. of Magn. Res. (1976) 21, 473-478.
- (4) K.D. KOPPLE, G.R. WILEY et R. TAUKE
Biopolymers (1973) 12, 627-636.
- (5) A. DE MARCO, M. LLINAS et K. WUTHRICH
Biopolymers (1978) 17, 617-636.
- (6) G.C.K. ROBERTS et O. JARDETSZKI
Adv. Protein Chem. (1970) 24, 460-463.
- (7) K. WUTHRICH et A. DE MARCO
Helv. Chim. Acta (1976) 59, 2228-2235.
- (8) M. KAINOSHO et K. AJISAKA
J. Am. Chem. Soc. (1975) 97, 5630-5631.
- (9) J. KOBAYASHI, U. NAGAI, T. HIGASHIJIMA et T. MIYAZAWA
Biochem. Biophys. Acta (1979) 577, 195-206.
- (10) D.E. DORMAN et F.A. BOVEY
J. Org. Chem. (1973) 38, 2379-2382.
- (11) I.Z. SIEMION, T. WIELAND et K.H. POOK
Angew. Chem. (1975) 14, 702-703.
- (12) I.Z. SIEMION
Org. Magn. Res. (1976) 8, 432-435.
- (13) D.W. URRY, W.D. CUNNINGHAM et T. OHNISHI
Biochemistry (1974) 13, 609-615.
- (14) D.J. PATEL
Biochemistry (1973) 12, 667-676.
- (15) D.A. TORCHIA
Macromolecules (1971) 4, 440-442.

- (16) F. TOMA, H. LAM THANH, F. PIRIOU, M.C. HEINDL,
K. LINTNER et S. FERMANDJAN
Biopolymers (1980) 19, 781-804.
- (17) C.M. DEBER, D.A. TORCHIA et E.R. BLOUT
J. Am. Chem. Soc. (1971) 93, 4893-4897.
- (18) M.T. CUNG, M. MARRAUD et J. NEEL
10th Prague I.U.P.A.C. Microsymposium on Macromolecules
(1972) - Conformation and structure of polymers
Abstracts Prague C 3.
- (19) L. POGLIANI, M. ELLENBERGER et J. VALAT
Org. Magn. Res. (1975) 7, 61-71.
- (20) V. MADISON
Biopolymers (1977) 16, 2671-2692.
- (21) R. HUBER et W. STEIGEMANN
FEBS Letters (1974) 48, 235-236.
- (22) R. DESLAURIERS et I.C.P. SMITH
Top. Carbon 13 NMR Spectrosc. (1976) 2, 1.
- (23) J.F. BRANDTS, H.R. HALVERSON et M. BRENNAN
Biochemistry (1975) 14, 4953-4963.
- (24) J.F. BRANDTS, M. BRENNAN et L. LUNG-NAN
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1977) 74, 4178-4181.
- (25) B.P. ROQUES, C. GARBAY-JAUREGUIBERRY, S. COMBRISSE
et R. OBERLIN
Biopolymers (1977) 16, 937-944.
- (26) H.N. CHENG et F.A. BOVEY
Biopolymers (1977) 16, 1465-1472.
- (27) C. GRATHWOHL et K. WUTHRICH
Biopolymers (1976) 15, 2025-2041.
- (28) C. GRATHWOHL et K. WUTHRICH
Biopolymers (1976) 15, 2043-2057.
- (29) A.E. TONELLI
J. Am. Chem. Soc. (1973) 95, 5946-5949.

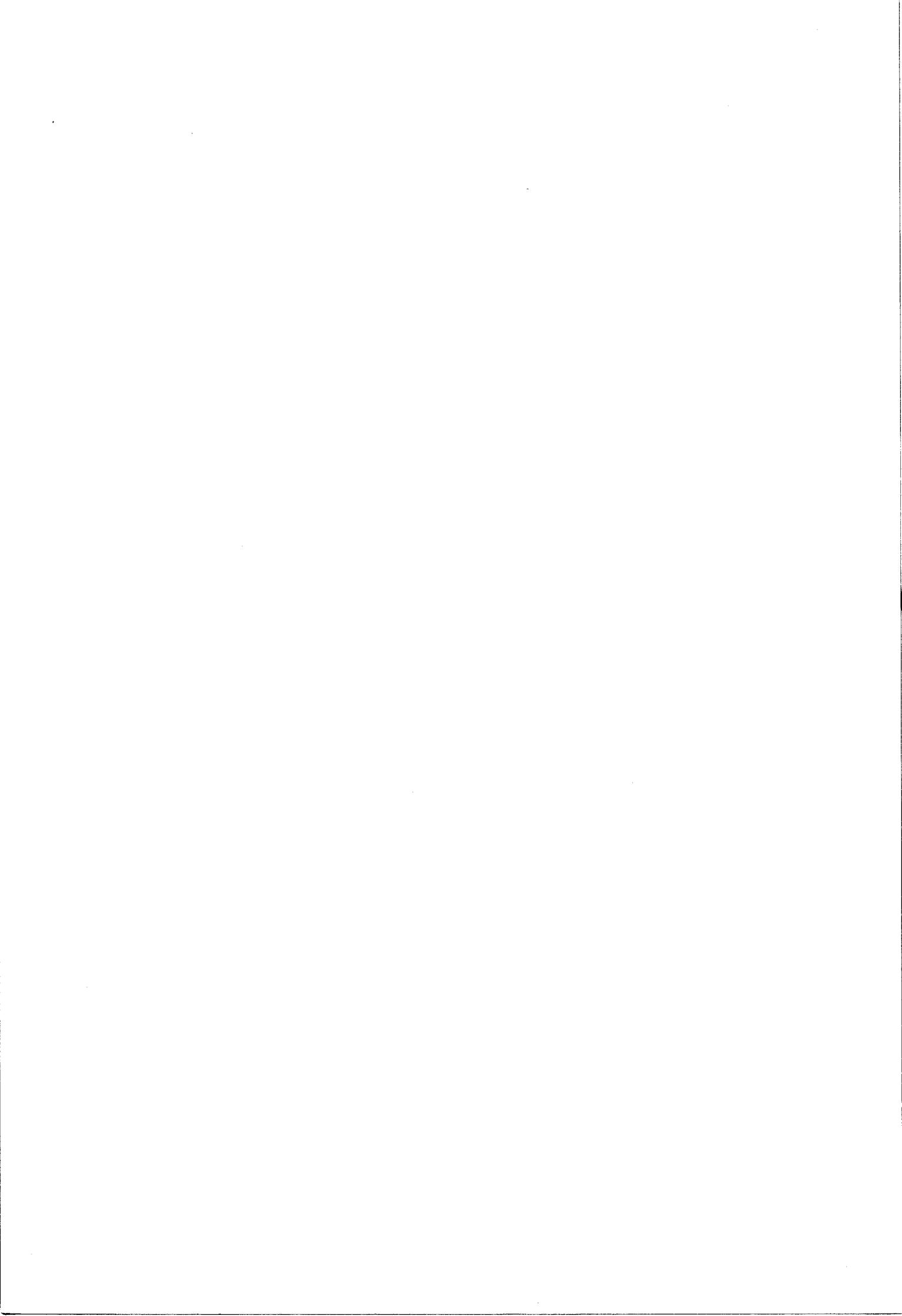
- (30) C.M. VENKATACHALAM, B.J. PRICE et S. KRIMM
Biopolymers (1975) 14, 1121-1132.
- (31) N. GO et H.S. SCHERAGA
Macromolécules (1970) 3, 188-194.
- (32) C.M. DEBER, E.T. FOSSEL et E.R. BLOUT
J. Am. Chem. Soc. (1974) 96, 4016-4017.
- (33) N.M. KARPLUS
J. Chem. Phys. (1959) 30, 10-18.
- (34) a - V.F. BYSTROV, S.L. PORTNOVA, V.T. TSETLIN, V.T. IVANOV
et YU. A. OVCHINNIKOV
Tetrahedron (1969) 25, 495-515
- b - V.F. BYSTROV, V.T. IVANOV, S.L. PORTNOVA,
T.A. BALASHOVA et YU. A. OVCHINNIKOV
Tetrahedron (1973) 29, 873-877.
- (35) G.N. RAMACHADRAN, R. CHANDRASEKARAN et K.D. KOPPLE
Biopolymers (1971) 10, 2113-2131.
- (36) M.T. CUNG, M. MARRAUD et J. NEEL
Macromolules (1974) 606-613.
- (37) A. DEMARCO, M. LLINAS et K. WUTHRICH
Biopolymers (1978) 17, 637-650.
- (38) I.U.P.A.C. - I.U.B. Commission on Biochemical Nomenclature
Biochemistry (1970) 9, 3471-3478.
- (39) M. BARFIELD et H.L. GEARHART
J. Am. Chem. Soc. (1973) 95, 641-643.
- (40) C. GIESSNER-PRETTRE
C.R. Acad. Sci., Série D, (1973) 276, 1405-1407.
- (41) K.D. KOPPLE, M. OHNISHI et A. GO
J. Am. Chem. Soc. (1969) 91, 4264-4272.
- (42) K.D. KOPPLE, M. OHNISHI et A. GO
Biochemistry (1969) 8, 4087-4095.

- (43) Md. A. KHALED, V. RENUGOPALAKRISHNAN et D.W. URRY
J. Am. Chem. Soc. (1976) 98, 7547-7553.
- (44) D.W. URRY, M.M. LONG
CRC Critical Reviews in Biochemistry (1976) 1-45.
- (45) M.C. FOURNIE-ZALUSKI, T. PRANGE, C. PASCARD et
B.P. ROQUES
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1977) 79, 1199-1206.
- (46) D.A. TORCHIA, S.C.K. WONG, C.M. DEBER et E.R. BLOUT
J. Am. Chem. Soc. (1972) 94, 616-620.
- (47) P.Y. CHOU et G.D. FASMAN
J. Mol. Biol. (1977) 115, 135-175.
- (48) C.R. JONES, W.A. GIBBONS et V. GARSKI
Nature (1976) 262, 779-782.

C H A P I T R E I V

ETUDE CONFORMATIONNELLE DE NOS PEPTIDES PROTEGES

EN SOLUTION DANS LE CHLOROFORME



Au chapitre précédent, les résultats de l'analyse conformationnelle de nos modèles, en solution dans le DMSO, ont été rapportés et discutés : les 3 dérivés adoptent, pour l'essentiel, des conformations désordonnées. Ceci est dû, en partie tout au moins, à la solvatisation des protons NH par le DMSO, ce qui défavorise l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires pouvant stabiliser la conformation du dérivé.

Aussi une étude conformationnelle des modèles dans un solvant peu solvatant des protons NH a été envisagée, notre choix s'est porté sur la chloroforme.

Aux concentrations nécessaires à l'obtention des spectres réalisés en onde continue, les peptides sont souvent agrégés dans le chloroforme (1) ; en conséquence, les signaux RMN sont parfois mal résolus et de plus les paramètres spectraux correspondent à des entités mal définies.

Mais depuis l'utilisation des spectromètres opérant en mode pulsé, des études systématiques d'analyse conformationnelle de peptides en solution dans le chloroforme ont été rapportées dans la littérature. En effet, ce mode d'acquisition permet d'obtenir des spectres à partir de solutions suffisamment diluées et ainsi d'intervenir sur l'état d'agrégation des molécules de peptides.

Nous allons successivement décrire et interpréter les spectres RMN proton de :

- 1 - t.Boc T₃ OCH₃
- 2 - t.Boc T₄ OCH₃
- 3 - t.Boc T₁ OCH₃

L'analyse conformationnelle de ces dérivés sera basée sur les résultats des variations des déplacements chimiques des protons NH obtenues par deux méthodes :

- 1 - Effet de concentration
- 2 - Effet de solvant.



I - t.Boc Gly Pro Tyr Gly OCH₃ (t.Boc T₃ OCH₃)

1 - SPECTRE RMN PROTON (VII) ET PARAMETRES SPECTRAUX

Les paramètres spectraux de t.Boc T₃ OCH₃ sont rassemblés dans le tableau 1.

Résidus	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	HN = 5,50 H _{α₁} = 3,80 H _{α₂} = -	³ J _{HNC_αH} ≈ 6
Pro 2	H _α = 4,42 H _{γβ} = 1,97 H _δ = 3,40	
Tyr 3	HN = 6,87 H _α = 4,72 H _{β₁} = 3,17 H _{β₂} = 2,98 H _{aromatique} = 7,0-6,71 HO = 7,37	³ J _{HNC_αH} = 8 ³ J _{αβ₁} = 5,3 ³ J _{αβ₂} = 8,4 ³ J _{β₁β₂} = 14,4
Gly 4	HN = 7,12 H _{α₁} = 4,16 H _{α₂} = 3,91	³ J _{HNC_αH_{α₁}} = 6,5 ³ J _{HNC_αH_{α₂}} = 4,5 ² J _{H_{α₁}H_{α₂}} = 18,1
(CH ₃) ₃ C	1,47	
- OCH ₃	3,75	

TABLEAU 1

Paramètres spectraux de t.Boc T₃ OCH₃
(solvant CDCl₃, C = 0,055 mole/l, réf. TMS)



2 - DISCUSSION

Toutes les résonnances ont pu être attribuées par des expériences de découplage total.

Le rapport des isomères cis et trans a été obtenu par comparaison des singulets des protons des groupes t.Boc. La quantité d'isomère cis n'est pour les conditions expérimentales présentes que de 4 %, alors qu'elle est de 28 % pour l'étude dans le D.M.S.O.

Par rapport à l'étude dans le D.M.S.O., les signaux des protons amides glissent vers les hauts champs (1 ppm environ), en accord avec la diminution de la solvation des protons concernés.

Les protons α des deux résidus glycines (1 et 4) sont inéquivalents, ils apparaissent sur le spectre présenté sous la forme d'une partie AB (octuplet) d'un spectre ABX (X est le proton amide). L'inéquivalence des protons d'un groupe méthylène est souvent analysée en terme de mouvements contraints (autour des liaisons simples) (2), qui interdisent aux deux protons concernés de décrire un même environnement magnétique.

Si l'intensité de l'inéquivalence est directement en relation avec la rigidité locale de la structure, encore faut-il pour qu'elle apparaisse que les protons soient situés dans un environnement où règne un gradient de champ qui met en relief la restriction du mouvement, et à ce propos, le rôle de l'effet d'anisotropie du phényle de la tyrosine a été mis en évidence (3).

L'équivalence des protons α Gly de ce dérivé a été observée lors de l'étude dans le DMSO, elle peut être mise en relation avec la structure désordonnée flexible qui a été proposée à partir des résultats des effets de température. Aussi l'inéquivalence observée pour l'étude dans le chloroforme suggère l'établissement d'une conformation préférentielle. Du point de vue pratique, l'inéquivalence des protons α permet

d'obtenir les couplages spécifiques du proton NH et des protons α Gly de configurations absolues R et S (Figure I).

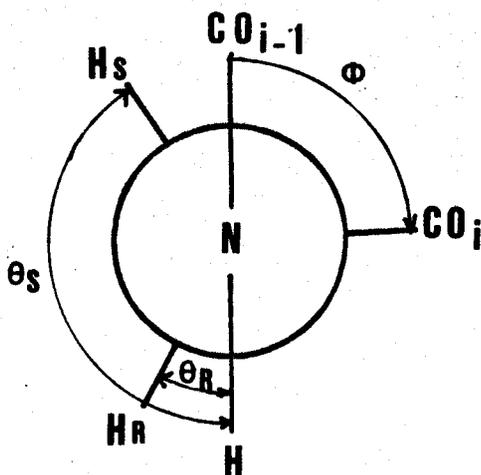


FIGURE I

Définitions des angles θ_R et θ_S du résidu glycine

A partir de la L phénylalaninylglycine sélectivement deutériée (sur le C_α Gly), Kainosho et coll. (4) ont montré que le signal du proton α Gly situé à bas champ correspond à celui du proton α de configuration S. Ceci a été confirmé par Marraud et coll. (5). Nos résultats seront exploités sur la base des attributions proposées par ces auteurs.

L'inéquivalence des protons α du résidu glycine permet par l'intermédiaire des constantes $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_S}$ et $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_R}$ de préciser les valeurs des angles dièdres θ_R et θ_S , ce qui limite considérablement le nombre de solutions pour l'angle ϕ du résidu Gly.

Le calcul de la distribution des populations de rotamères est fait par application des relations de Pachler(6). L'attribution des populations aux différentes conformations tg^- , tg^+ , g^+g^- demande, comme cela a déjà été discuté, de connaître les configurations absolues des protons situés à haut et bas champs sur le spectre. Kobayashi et coll. (7) ont montré

que, contrairement à ce qui est observé dans le DMSO, le proton β de configuration S est, dans le chloroforme, plus blindé que le proton β de configuration R. En tenant compte de ces données, on obtient :

$$tg^+ = 52 \%$$

$$tg^- = 24 \%$$

$$g^+g^- = 23 \%$$

Pour les conditions expérimentales présentes, le rotamère qui oriente vers l'extrémité C terminale est le plus peuplé. Si on confronte ces résultats à ceux obtenus dans le DMSO, on constate qu'en passant du DMSO à $CDCl_3$, la chaîne latérale de la tyrosine se réorganise et la population du conformère tg^+ augmente au détriment de celle du tg^- .

3 - ETUDE DE L'EFFET DE CONCENTRATION

a - protons amides

Lorsque deux molécules de peptides s'agrègent, elles le font sans doute par l'établissement d'une liaison hydrogène entre le C=O de l'une et le NH de l'autre, et la probabilité d'une telle liaison augmente en même temps que la concentration.

L'interaction entre le NH et le C=O provoque au niveau du proton amide, une diminution de la densité d'électrons : le proton amide se déblinde.

L'augmentation de la concentration en favorisant les interactions intermoléculaires va donc faire glisser vers les champs plus faibles les signaux des protons amides qui participent à ces associations. Par contre, les signaux des protons amides protégés ou engagés dans une liaison hydrogène intramoléculaire ne sont que peu perturbés par l'augmentation de la concentration.

En résumé, la méthode de l'effet de concentration permet de distinguer les protons accessibles des protons protégés (stériquement ou engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires).

Les résultats obtenus par la mise en pratique de cette méthode pour notre peptide sont reportés sur la figure II.

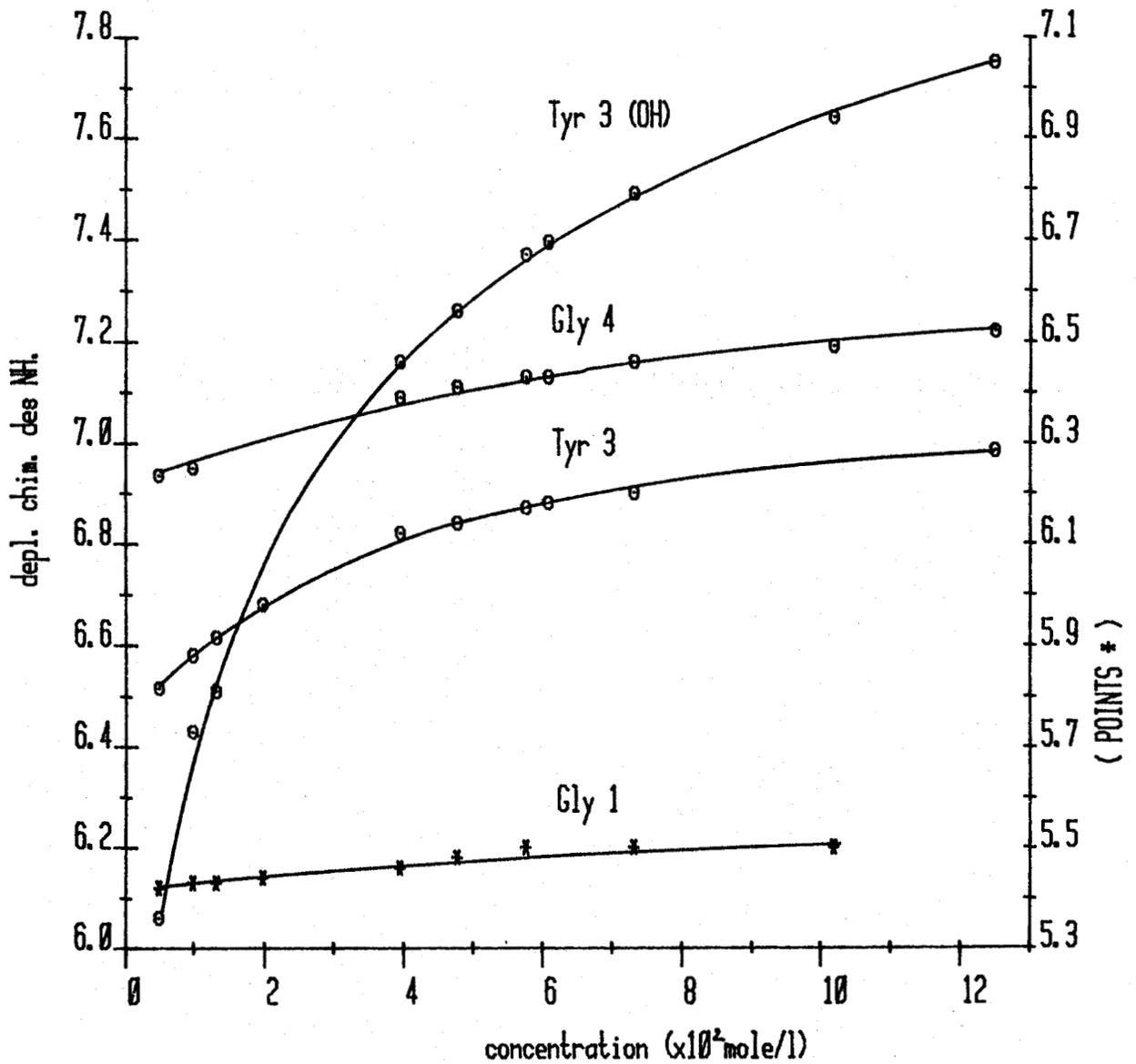


FIGURE II

Variation des déplacements chimiques des protons amides de t.Boc T₃ OCH₃ en fonction de la concentration

Les conclusions suivantes peuvent être tirées de l'examen de la figure II.

1 - Le proton NH du résidu Gly 1, peu perturbé par l'effet de concentration, est protégé.

2 - Le proton amide du résidu Tyrosine 3 est fortement déblindé quand la concentration croît : il est accessible.

3 - Le proton amide du résidu Glycine 4 a un comportement intermédiaire, il n'est que partiellement protégé.

Remarque : le déplacement chimique du proton hydroxyle est fort modifié par l'augmentation de la concentration : il participe à l'agrégation. Mais nous devons limiter notre interprétation aux seuls protons amides, car la nature chimique différente du groupe hydroxyle rend délicate une comparaison.

b - protons β tyrosine

La forme du massif des protons H_{β} Tyr subit de fortes modifications lors de l'étude de l'effet de concentration (Fig. III).

Alors que pour les concentrations les plus élevées, le spectre obtenu correspond à celui d'une partie AB d'un ABX, en milieu dilué, là où les molécules sont moins associées, un doublet est observé : il correspond à la partie A_2 d'un A_2X c'est-à-dire que les deux protons β sont magnétiquement équivalents.

L'interprétation de ce résultat sera développée plus loin.

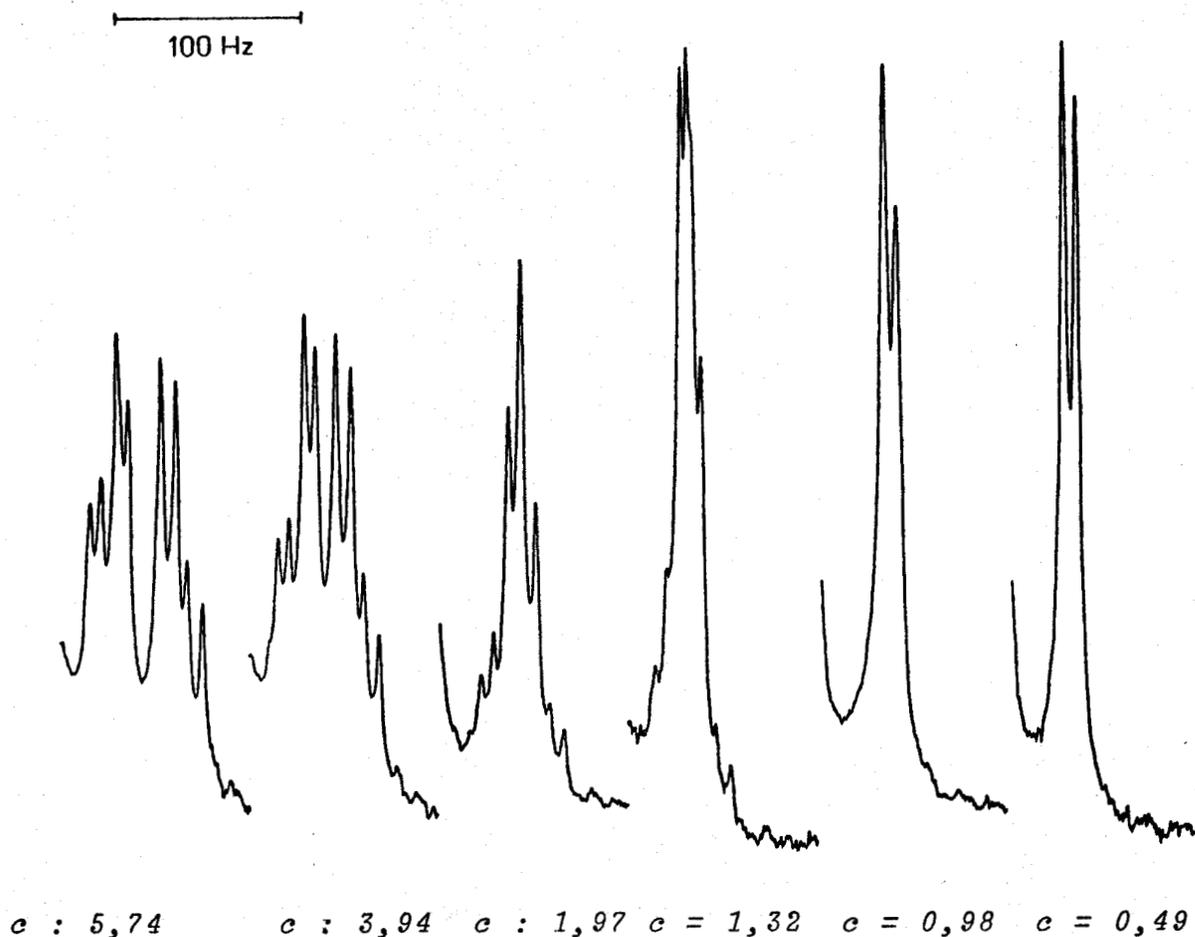


FIGURE III

Massifs des protons H_β Tyr de *t.Boc T₃ OCH₃* pour différentes concentrations en peptide ($\times 10^2$ mole/l.)

4 - EFFET DE SOLVANT

Le chloroforme est un solvant médiocre, alors que le DMSO est bien connu pour son aptitude à solvater les protons amides. Aussi les variations des déplacements chimiques de ces derniers lors de l'effet de solvant permettent d'obtenir des indications sur l'accessibilité. En particulier, de faibles quantités de DMSO doivent permettre un déblindage des protons NH bien accessibles alors que ceux qui sont protégés vont être peu sensibles. Une première complication pour l'application de la méthode apparaît : si les structures ne sont pas

les mêmes pour chaque solvant utilisé, l'analyse des résultats n'est pas toujours immédiate. Au fur et à mesure de la variation de la composition du milieu, les accessibilités peuvent être modifiées et en particulier, si un proton est peu accessible dans le chloroforme, il peut l'être davantage dans le DMSO pour lequel une conformation désordonnée des dérivés a été proposée.

La solution qui a été proposée pour tourner cette difficulté consiste à comparer les valeurs des déblindages de chacun des protons NH obtenus pour l'addition de faibles quantités de DMSO (inférieures à 10 %). On suppose alors que la conformation du modèle n'est pas perturbée par l'addition du solvant polaire.

Les variations des déplacements chimiques des protons amides de $t\text{-Boc T}_3\text{OCH}_3$ obtenues lors de l'effet de solvant CDCl_3 - DMSO sont représentées sur la figure IV.

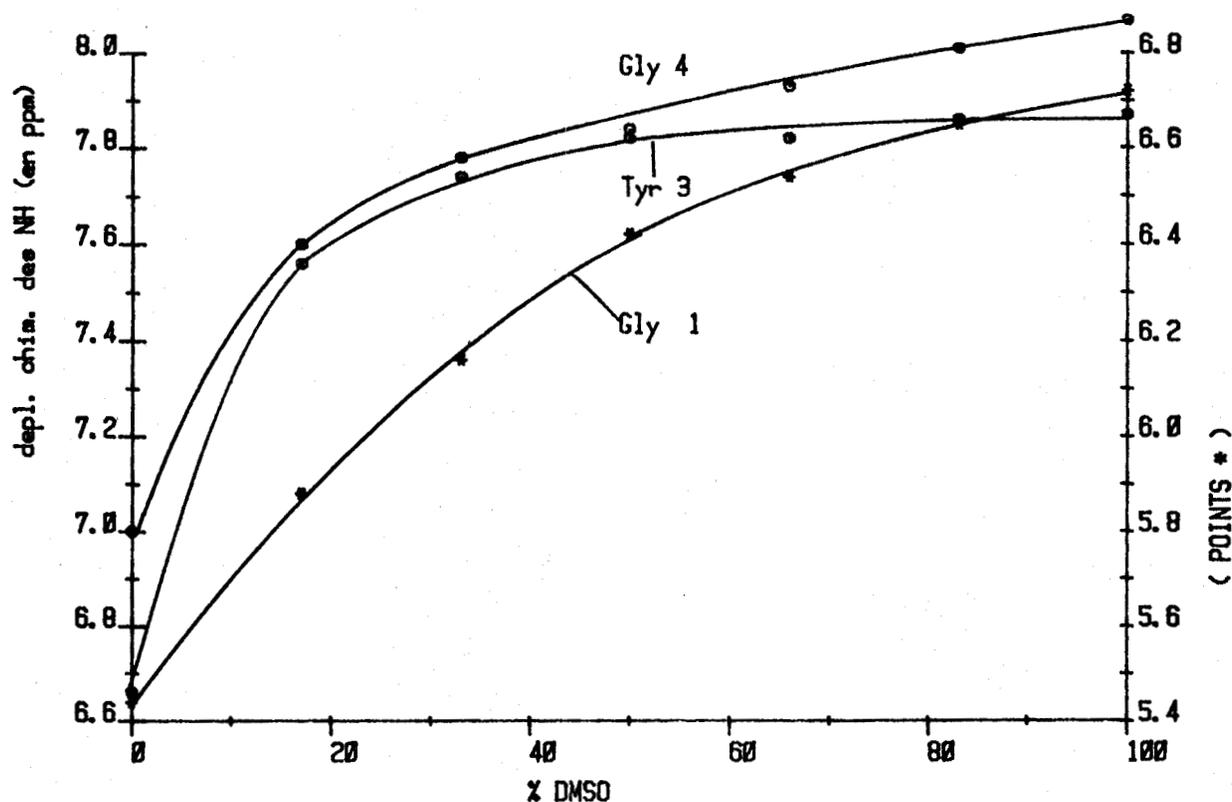


FIGURE IV

Variation des déplacements chimiques des protons amides de $t\text{-Boc T}_3\text{OCH}_3$ lors de l'effet de solvant CDCl_3 - DMSO ($c = 1,97 \cdot 10^{-2}$ mole/l)

Lors de la substitution du chloroforme par le DMSO, tous les protons NH se déblindent. Mais les courbes obtenues montrent que pour l'addition de 10 % de DMSO, le déblindage est de 0,3 ppm pour Gly 1, de 0,39 ppm pour Gly 4 et de 0,65 ppm pour Tyr 4.

En conséquence, il semble que dans le chloroforme le proton NH Gly 1 soit protégé, celui de Tyr 3 accessible et celui de Gly 4 partiellement accessible. Ces conclusions s'accordent bien avec celles de l'étude de l'effet de concentration.

5 - INTERPRETATION

a - *analyse du comportement du proton NH du résidu Gly 1*

Les effets de solvant et de concentration ont mis en évidence des comportements différents des déplacements chimiques des protons NH, en particulier, celui du résidu Tyr 3 est bien plus perturbé que celui du résidu Gly 1.

Les résultats ont été interprétés en terme d'accessibilité ou de protection des protons concernés.

Mais le proton NH Gly 1 est un proton uréthane ($R - O - CO - NH - R'$) et le proton NH Tyr 3 est un proton amide ($R - CO - NH - R'$).

Aussi les résultats peuvent être dus tout simplement à la différence de la nature chimique et par suite ne pas avoir d'implications conformationnelles.

Pour pouvoir utiliser les données expérimentales en vue de l'analyse conformationnelle, il faut en conséquence montrer qu'un proton uréthane se comporte comme un proton amide, et en particulier que l'on peut observer, sur d'autres dérivés, des variations de son déplacement chimique lors des effets de solvant et de concentration, ce qui met alors en évidence son accessibilité (et confirme sa protection pour notre modèle). Rappelons que les effets de température sur

les déplacements chimiques (pour les études dans le DMSO, chapitre III) ont montré un comportement analogue de tous les protons NH : tous les signaux, y compris celui du NH porté par le groupe t.Boc, glissent vers les hauts champs. D'autres arguments peuvent être extraits de la littérature. A propos de l'étude de t.Boc (Isoleucine)₄ OCH₃ (8) Goodman et coll. ont montré que l'augmentation de la concentration fait glisser vers les bas champs aussi bien les signaux des protons amides exposés (0,8 ppm) que celui du proton NH porté par le t.Boc (0,6 ppm). Ce dernier proton NH participe donc à l'association intermoléculaire. Son déblindage est analogue à celui obtenu pour les protons amides exposés, ce qui traduit sa bonne accessibilité. Pour notre modèle et compte tenu du résultat rapporté pour t.Boc (Isoleucine)₄ OCH₃, il apparaît que la faible influence de la concentration sur le déplacement chimique du proton NH Gly 1 traduit le peu d'accessibilité de celui-ci.

Un autre argument a été extrait des résultats obtenus par ces auteurs pour un autre dérivé : t.Boc (Méthionine)₇ OCH₃ (9). Il a été établi que l'addition de 2,5 % de DMSO à une solution de ce peptide fait glisser vers les bas champs le signal du proton NH du premier résidu de 1 ppm et celui des protons amides exposés de 0,2 ppm.

En ce qui concerne t.Boc T₃ OCH₃, le contraire est observé : l'addition de 10 % de DMSO perturbe davantage le déplacement chimique du proton amide de Tyr 3 (0,65 ppm) que celui du proton NH Gly 1 (0,3 ppm). Ce dernier est donc peu accessible aux molécules de DMSO.

De la comparaison de nos résultats et des données de la littérature, des conclusions peuvent alors être tirées :

1 - Malgré son caractère chimique légèrement différent de celui du proton amide, le proton NH du premier résidu se comporte comme un proton amide et les variations des déplacements chimiques obtenues pour les effets de concentration et de solvant peuvent être utilisées pour l'analyse conformationnelle.

2 - En conséquence, il apparaît que le proton NH de Gly 1 et dans une moindre mesure celui de Gly 4 sont peu accessibles. En suivant les hypothèses avancées dans la littérature pour exprimer l'inaccessibilité des protons amides, nous proposons de rendre compte de nos résultats par l'existence de deux liaisons hydrogène intramoléculaires faisant participer le proton NH de Gly 1 et celui de Gly 4, bien que pour ce dernier proton, la liaison soit sans doute moins forte.

b - conformation du peptide

Les liaisons hydrogène intramoléculaires imposent à la molécule de peptide d'adopter une structure privilégiée. L'application d'une des corrélations $^3J = f(\theta)$ permet de dresser le tableau 2 où figurent toutes les valeurs possibles de l'angle ϕ (nous avons choisi la relation de Marraud (10)).

résidus	θ	ϕ
Gly 1	H_S 10	70, 50
	130	- 170 - 70
Pro 2		- 60
Tyr 3	145	- 155, - 85
Gly 4	H_S 130	- 170, - 70
	25	85, 35
	H_R 125	- 65, - 175

TABLEAU 2

Valeurs possibles des angles ϕ de $t.Boc T_3 OCH_3$

Comme on peut construire un modèle en choisissant une valeur de Φ pour chaque résidu, le nombre de solutions est élevé, mais seules quelques unes vont satisfaire aux paramètres spectraux (3J) et permettre en même temps l'établissement des liaisons hydrogène intramoléculaires.

Si l'on sait quels sont les protons amides concernés par ces liaisons, a priori on ne connaît pas les carbonyles qui correspondent. Mais des hypothèses ont été avancées dans la littérature.

Shields et Mac Dowell (11) ont proposé à l'issue d'une étude IR de *t*.Boc Val Val Ala Gly OCH₃ une structure repliée autour de Val 2 Ala 3 (Figure V), stabilisée par l'établissement de deux liaisons hydrogène, qui induisent l'organisation des extrémités de la chaîne peptidique en "β sheet antiparalleles" (12).

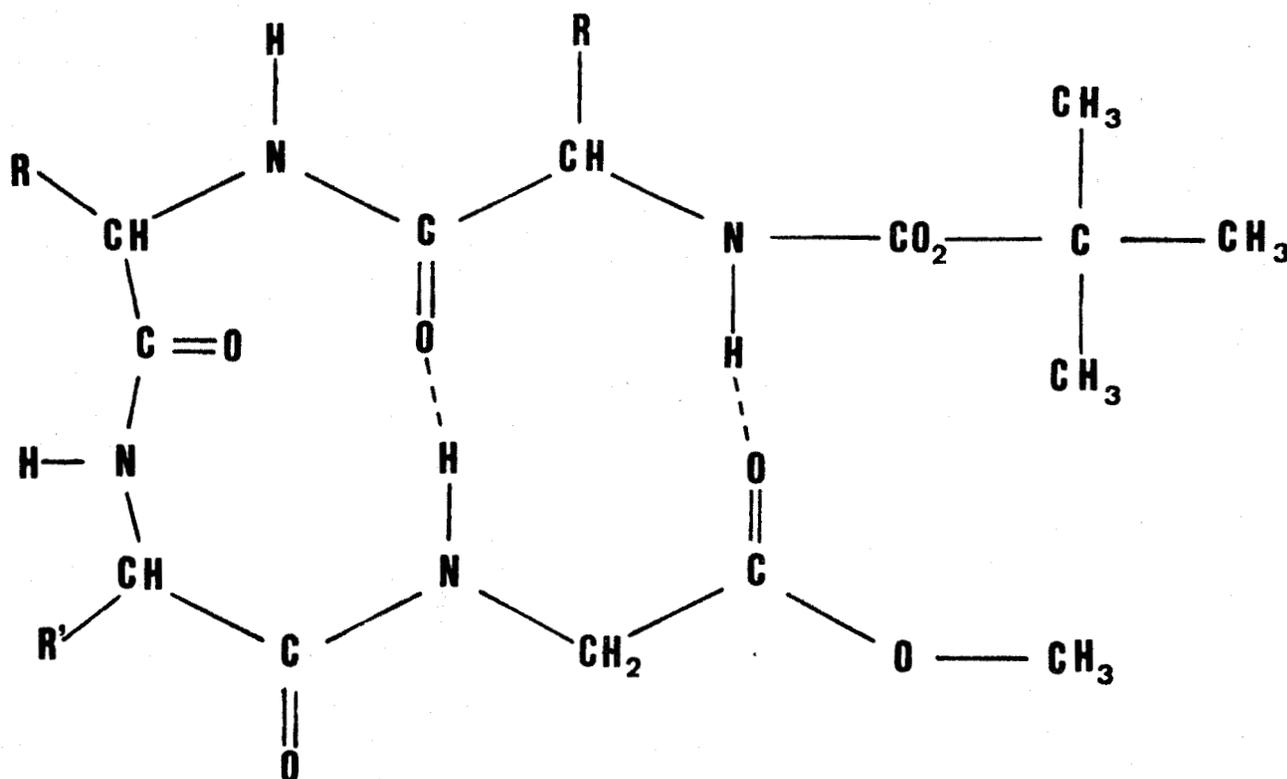
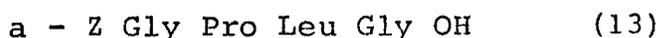


FIGURE V

Forme repliée de *t*.Boc Val Val Ala Gly OCH₃ proposée par SHIELDS et Mac DOWELL (11)

Des précisions ont aussi été apportées grâce à l'étude de la structure cristalline de :



Il a été établi que :

a - les 2 peptides sont organisés, leur chaîne principale se replie autour de Pro 2 Leu 3

b - les distances NH Gly 1... O = C Gly 4 et NH Gly 4 ... O=C Gly 1 permettent l'établissement de liaisons hydrogène (second modèle)

De plus, Urry et coll. (15) ont étudié par la RMN du ^{13}C des modèles de la tropoélastine (dérivé contenant le résidu proline en 2ème position). Ces auteurs ont mis en évidence le repliement de la structure autour de Pro_2X_3 et ont confirmé certaines données de l'étude cristallographique présentée ci-dessus, en particulier celles concernant la position des carbonyles impliquées dans les liaisons hydrogène intramoléculaires. Notre modèle possède aussi le résidu proline en seconde position, les liaisons hydrogène intramoléculaires concernent les mêmes protons NH que ceux rapportés dans la littérature (1er et 4ème résidus).

Aussi, l'hypothèse d'une structure repliée autour de Pro_2Tyr_3 est avancée.

Cette hypothèse ne permet pas aux angles ϕ de prendre toutes les valeurs proposées dans le tableau 2. Seules quelques unes permettent le repliement et par suite l'établissement des liaisons hydrogène intramoléculaires.

Les valeurs permises sont reportées dans le tableau 3 où figurent également celles obtenues pour l'étude RX de Z Gly Pro Leu Gly Pro OEt (14) en vue d'une comparaison.

	ϕ Gly 1	ϕ Pro	ϕ Tyr (RX : Leu)	ϕ Gly
Z Gly Pro Leu Gly Pro OEt (RX)	-95	-65	-105	+120
t.Boc T ₃ OCH ₃	-70, +170	-60	-85	+85, -170

TABLEAU 3

Valeurs de ϕ de t.Boc T₃ OCH₃ et de
Z Gly Pro Leu Gly Pro OEt

La littérature signale que plusieurs types de repliement sont possibles, mais deux sont nettement plus fréquents : le β_I et le β_{II} (16) (17). Chacun d'eux est caractérisé par les valeurs des angles dièdres des résidus $i+1$ et $i+2$ (Figure VI et tableau 4).

	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
β_I	- 60	- 30	- 90	0
β_{II}	- 60	+ 120	+ 80	0

TABLEAU 4

Valeurs des angles ϕ , ψ des repliements β_I et β_{II}

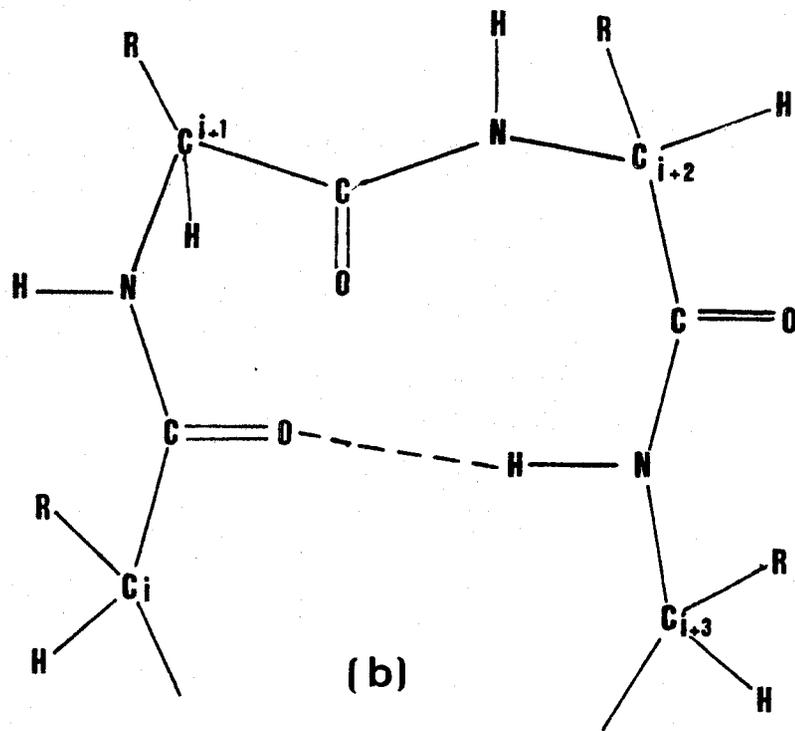
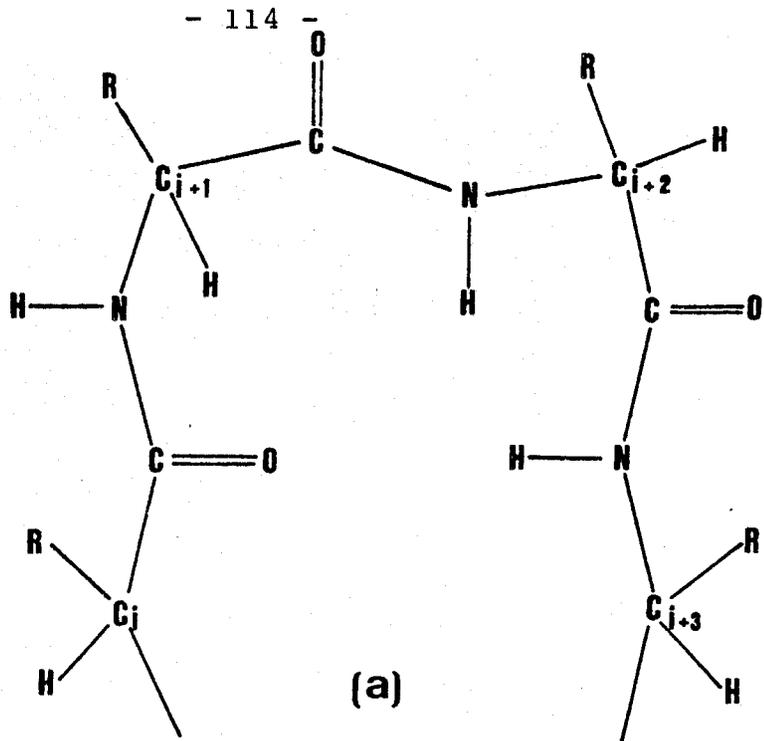


FIGURE VI

Représentation schématique des repliements β_I et β_{II}

a : β_{II} ; b : β_I



A chaque série de valeurs des angles correspond une structure qui possède une énergie conformationnelle minimum.

En ce qui concerne t.Boc Tyr₃ OCH₃, les valeurs des angles ϕ retenues sont $\phi_{\text{Pro}(i+1)} : - 60^\circ$ et $\phi_{\text{Tyr}(i+2)} = - 85^\circ$ elles sont très proches de celles qui sont nécessaires au repliement de type β_1 .

Les valeurs des angles ψ peuvent être extraites des cartes d'énergie conformationnelle, mais compte tenu des valeurs du tableau 4, ψ_{Pro} et ψ_{Tyr} sont respectivement voisins de $- 30^\circ$ et 0° (minimum d'énergie conformationnelle).

On peut donc proposer pour notre modèle un repliement autour de L Pro₂ L Tyr₃ selon le type β_1 (figure VII) le plus fréquemment rencontré dans les séquences LL (18a).

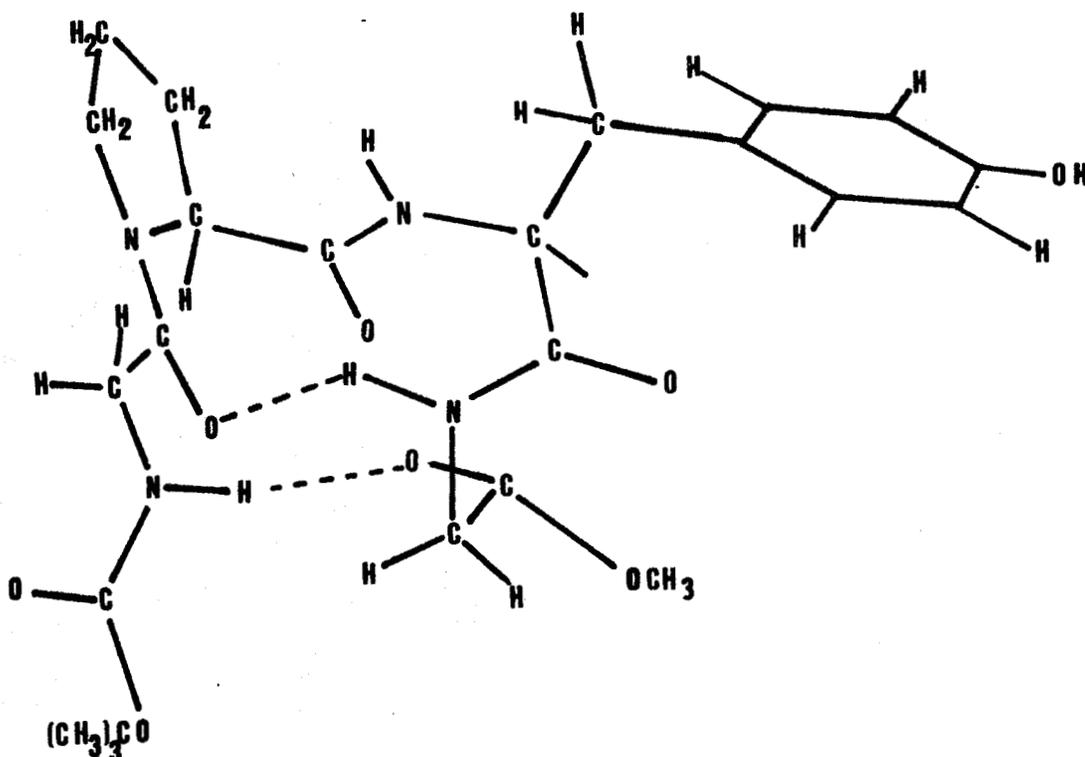


FIGURE VII

Représentation de la structure de t.Boc Gly Pro Tyr Gly OCH₃ en solution dans le chloroforme

D'autres informations peuvent être extraites des données RMN par l'application de la relation de Barfield et coll. (19). Ces auteurs ont établi par le calcul théorique une expression qui relie la valeur du couplage ${}^2J_{HH}$ des protons α du résidu glycine aux angles ϕ et ψ de ce résidu.

$${}^2J_{HH} = -13,91 - 1,55 \cos^2 \psi - 2,8 \cos^4 \psi + 4,65 \cos^2 \phi$$

Cette relation est plus commode à utiliser sous la forme du diagramme de la figure VIII.

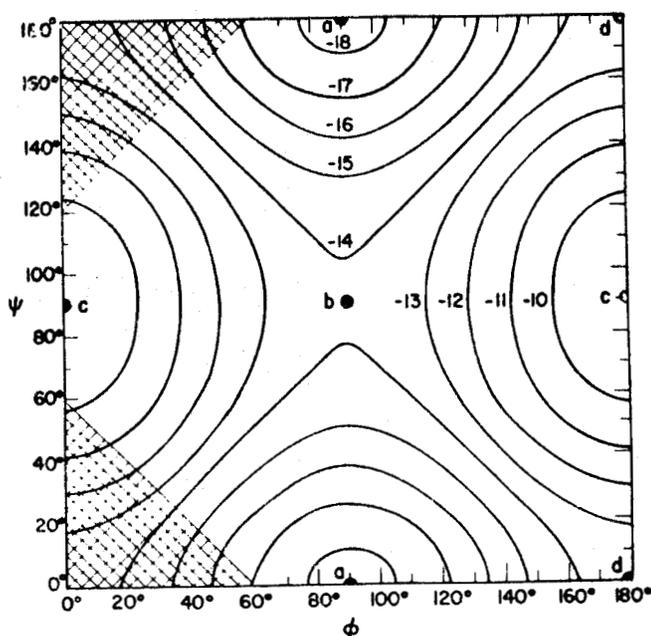


FIGURE VIII

Diagramme de Barfield (19)

Il est intéressant de noter qu'une valeur 2J de l'ordre de 18 Hz correspond à un domaine restreint des valeurs possibles des angles ϕ et ψ :

- $|\phi|$ est compris entre 80° et 100°
- $|\psi|$ ne peut prendre que des valeurs voisines de 0° ou 180°

En ce qui concerne notre dérivé, seul, le couplage géminial $^2J_{HH}$ de Gly 4 a pu être obtenu, il est de 18,1 Hz.

L'application de la relation de Barfield et coll. (19) donne pour ϕ_4 une valeur proche de 100° . Aussi parmi les valeurs qui avaient été retenues dans le tableau 3 (valeurs de ϕ), celle de $+85^\circ$ a l'avantage de satisfaire à la fois à la corrélation de Marraud (3J) et à celle de Barfield (2J). Cette valeur est assez proche de la valeur obtenue pour le résidu Gly 4 de Z Gly Pro Leu Gly Pro OEt ($\phi_{Gly 4} = +120^\circ$). Il faut cependant signaler que certains auteurs (20-21) sont en désaccord avec la relation de Barfield. Scheraga et coll. (20) estiment que cette relation est peu utilisable, en effet les valeurs de 2J qui apparaissent dans la littérature sont souvent de 16 à 18 Hz. En outre, les valeurs des angles ϕ et ψ de certains dérivés ont été proposées, l'application de la relation de Barfield donnent des constantes 2J qui sont parfois fort différentes des constantes expérimentales (21).

A l'issue de ce paragraphe quelques conclusions se dégagent :

- 1 - Les résultats des effets de solvant et de concentration sont utilisables pour l'analyse conformationnelle
- 2 - Le peptide étudié est replié autour de $Pro_2 Tyr_3$ selon le type β_I .

II - t.Boc Gly Pro Gly Tyr OCH₃ (t.Boc T₄ OCH₃)

1 - SPECTRE RMN PROTON (VIII) ET PARAMETRES

Les paramètres spectraux de t.Boc T₄ OCH₃ sont rassemblés dans le tableau 5.

Résidus	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	HN = 5,45 H _{α₁} = 3,96 H _{α₂} = -	Σ ³ J _{HNC H} = 11,5 ³ J _{HNC_α H_{α₁} = 5,9 ²J_{α₁α₂} = 17}
Pro 2	H _α = 4,41 H _β = 2,14 H _γ = 2,0 H _δ = 3,50 - 3,38	
Gly 3	HN = 7,36 H _{α₁} = 4,08 H _{α₂} = 3,62	² J _{α₁α₂} = 17,2 ³ J _{HNC_α H_{α₁} = 7,5 ³J_{HNC_α H_{α₂} = 4,5}}
Tyr 4	HN = 7,10 H _α = 4,80 H _{β₁} = 3,08 H _{β₂} = 2,99 H _{ar} = 6,72-6,94	³ J _{HNC_α H} = 7,7 ³ J _{αβ₁} = 5,5 ³ J _{αβ₂} = 6
t.Boc	1,42	
OCH ₃	3,73	

TABLEAU 5

Paramètres spectraux de t.Boc T₄ OCH₃
(solvant CDCl₃, c = 0,015 mole/l, réf. TMS)



2 - DISCUSSION

- La quantité d'isomère cis est négligeable : il n'apparaît pas sur le spectre de résonances additionnelles susceptibles de correspondre à cet isomère.

- Les protons α des résidus Gly 1 et Gly 3 sont magnétiquement inéquivalents, ceci peut être analysé en terme de mouvements contraints autour des liaisons simples.

L'attribution des signaux des protons α est basée sur les résultats de Kainosho et coll. (4), le signal du proton α_1 (à bas champ) est celui qui correspond au proton de configuration S.

- Le calcul des populations de rotamères de la chaîne latérale de la tyrosine a été fait à partir des relations de Pachler (6). L'attribution des valeurs trouvées aux conformères tg^- , tg^+ , g^+g^- est basée sur les positions relatives des signaux des protons β_S et β_R de la tyrosine (7).

Nous avons obtenu :

$$tg^+ = 32 \%$$

$$tg^- = 21 \%$$

$$g^+g^- = 47 \%$$

Les valeurs sont différentes de celles obtenues pour l'étude dans le DMSO. En particulier, la conformation tg^- est en nette diminution, et pour l'essentiel, au profit de l'orientation g^+g^- .

3 - EFFET DE CONCENTRATION

a - *protons amides (et hydroxyle)*

Les variations des déplacements chimiques des protons amides et hydroxyle en fonction de la concentration sont reportées sur la figure IX.

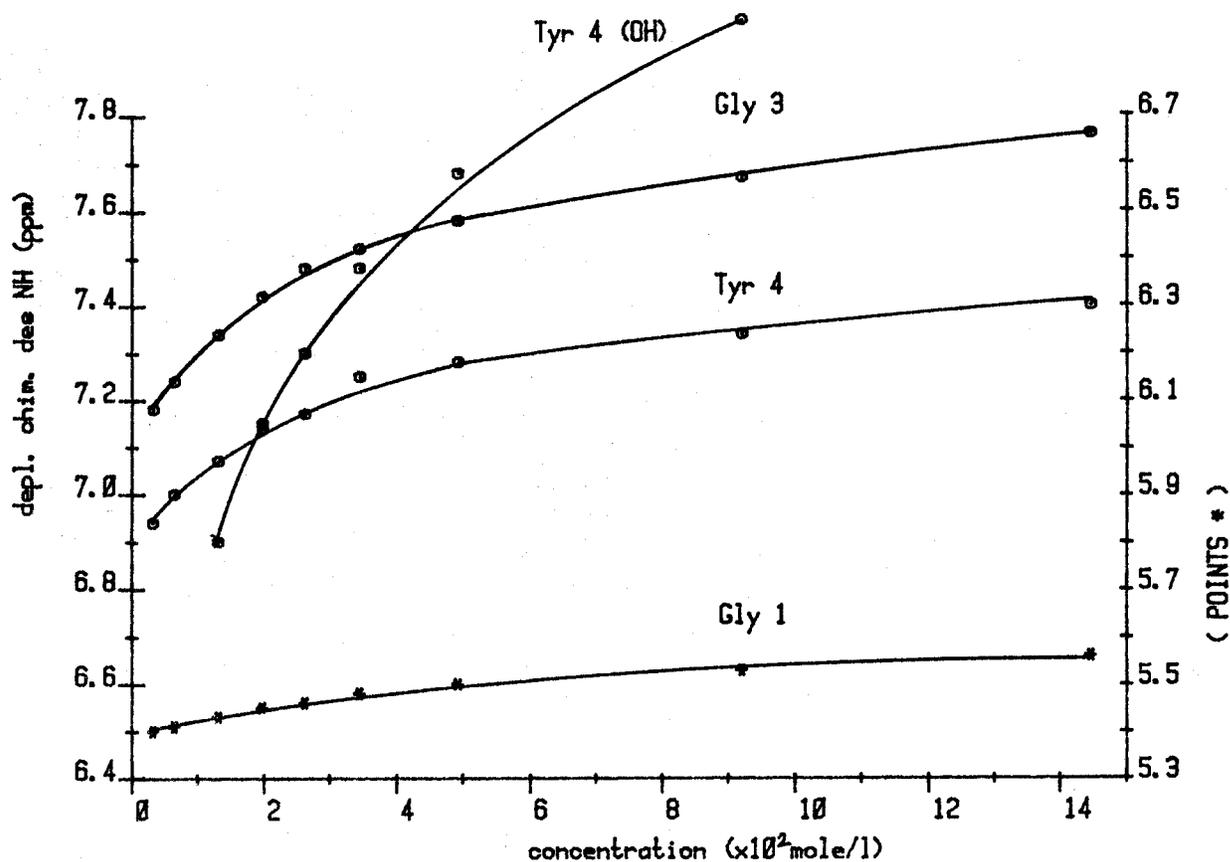


FIGURE IX

Variation des déplacements chimiques des protons amides de $t.\text{Boc } T_4 \text{ OCH}_3$ en fonction de la concentration

Le proton NH Gly 1 est peu sensible à l'augmentation de la concentration, il est peu accessible.

Les protons NH Gly 3 et Tyr 4 se déblindent quand la concentration augmente, ils participent à des liaisons hydrogène intermoléculaires : ils sont accessibles.

b - Protons β de la tyrosine

Contrairement à ce qui a été observé pour le dérivé précédemment décrit ($t.\text{Boc } T_3 \text{ OCH}_3$), dans le cas de $t.\text{Boc } T_4 \text{ OCH}_3$, le massif des protons H β tyrosine n'est que peu influencé par la concentration (Figure X).

Alors qu'aux faibles concentrations, les protons β tyrosine de t.Boc T₃ OCH₃ deviennent équivalents, dans le cas présent l'inéquivalence de ces protons persiste (octuplet AB d'un ABX).

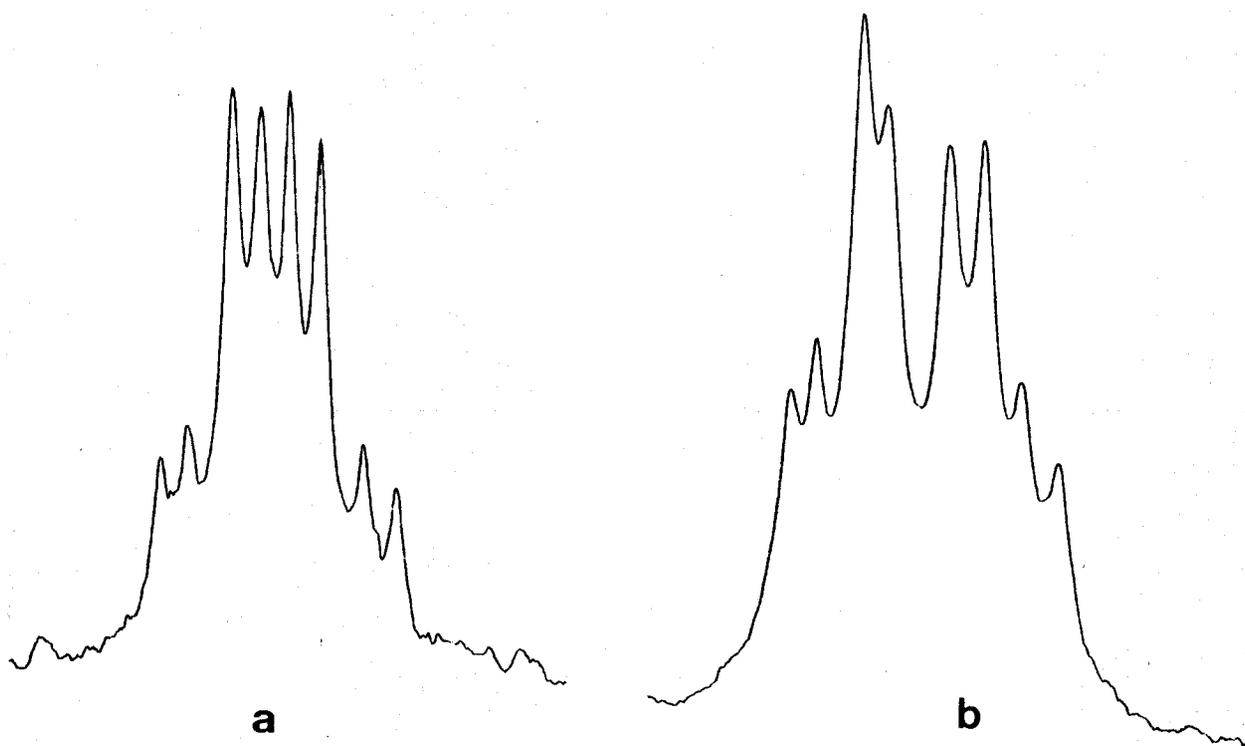


Figure X

Massifs des protons H_{β} Tyr de t.Boc T₄ OCH₃ pour deux concentrations :

$$a = 0,33 \cdot 10^{-2} \text{ mole/l}$$

$$b = 6,9 \cdot 10^{-2} \text{ mole/l}$$

4 - EFFET DE SOLVANT

Les déplacements chimiques des protons amides ont été suivis en fonction de la composition du solvant (DMSO, CDCl_3) (Figure XI).

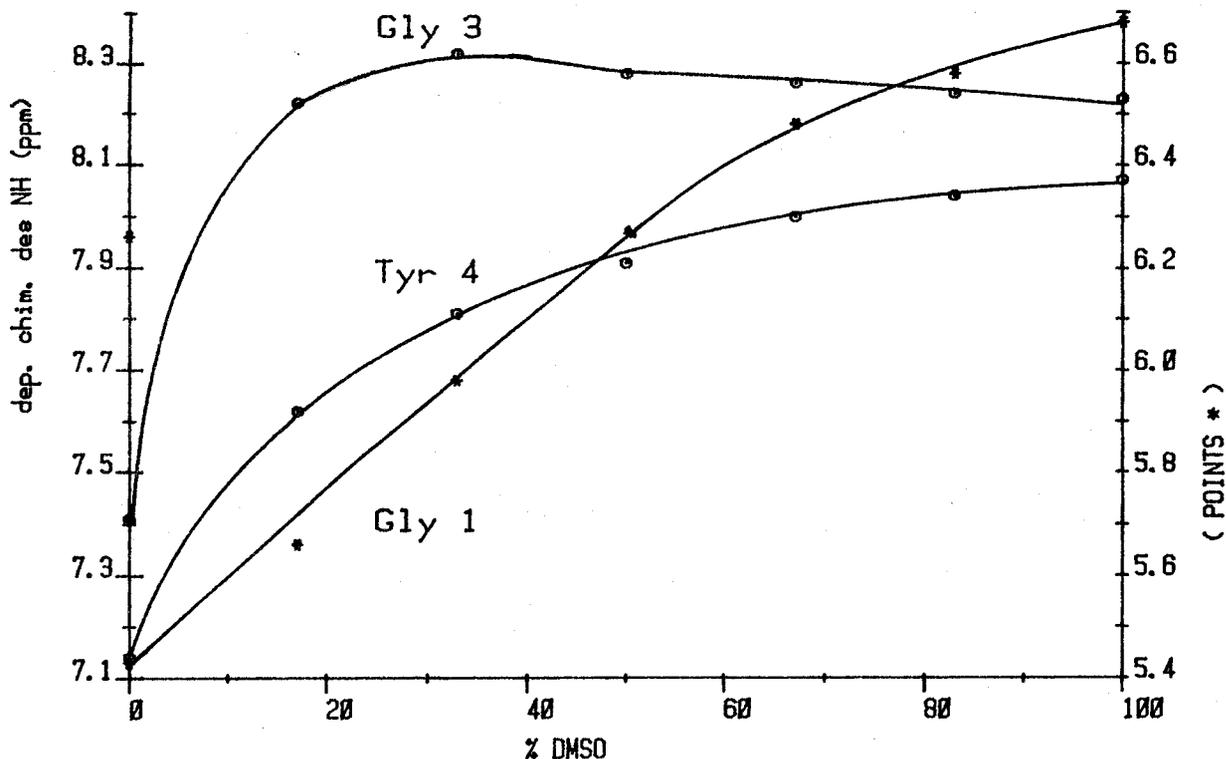


FIGURE XI

Variation des déplacements chimiques des protons amides de $t.\text{Boc T}_4 \text{OCH}_3$ lors de l'effet de solvant CDCl_3 -DMSO

$$(c = 1,97 \cdot 10^2 \text{ mole/l})$$

Tous les protons NH glissent vers les bas champs quand on ajoute du DMSO. Pour l'addition de 10 % de ce solvant, le proton NH, du résidu Gly 1 n'est déblindé que de 0,2 ppm, alors que celui du 3ème résidu (glycine) glisse de 0,6 ppm. En ce qui concerne le proton NH Tyr 4, le déblindage observé a une valeur intermédiaire : 0,35 ppm.

En résumé, les résultats de l'effet de concentration et de solvant montrent que la proton NH Gly 1 participe à une liaison hydrogène intermoléculaire et que le proton NH Gly 3 est exposé au solvant. Pour ce qui est du proton NH Tyr 4, si les résultats de l'effet de concentration correspondent à ceux attendus d'un proton accessible, les résultats de l'effet de solvant semblent traduire cependant une moins bonne accessibilité que celle du proton NH Gly 3.

Si ce proton NH Tyr 4 participe à une liaison hydrogène intramoléculaire, cette dernière doit être particulièrement faible.

5 - CONFORMATION DE NOTRE DERIVE

Des données bibliographiques sur la conformation de peptides qui contiennent la séquence Pro_2X_3 ont été présentées au paragraphe précédent (Etude de $t\text{-Boc T}_3\text{OCH}_3$) : elles peuvent également être utilisées pour $t\text{-Boc T}_4\text{OCH}_3$ et permettent de faire l'hypothèse d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le NH de Gly 1 et le carbonyle de Tyr 4.

Cette liaison stabilise la structure.

Les constantes de couplage 3J du proton amide et des protons α R et S du résidu Gly 3 donnent les valeurs des angles θ_R et θ_S :

$$^3J(S) = 7,5 \text{ Hz} \qquad \theta_S = 140^\circ$$

$$^3J(R) = 4,5 \text{ Hz} \qquad \theta_R = 25^\circ \text{ et } 120^\circ$$

Pour $\theta_S = 140^\circ$ et $\theta_R = 25^\circ$, l'angle ϕ_3 est de $+80^\circ$

Pour $\theta_S = 140^\circ$ et $\theta_S = 120^\circ$, l'angle ϕ_3 est de $+170^\circ$

(Figure XII).

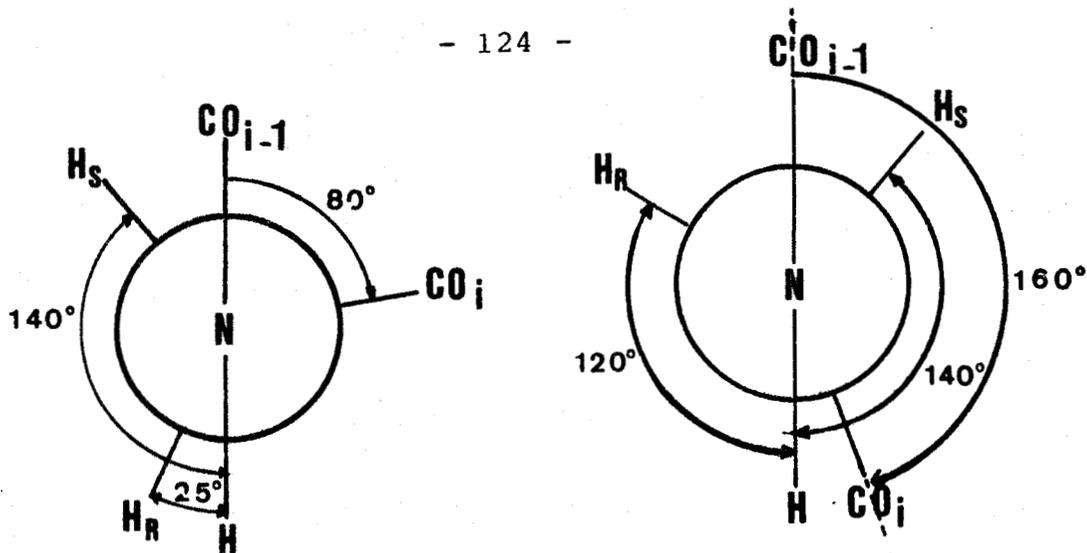


FIGURE XII

Représentation des 2 valeurs possibles de l'angle ϕ du résidu Gly 3 de *t.Boc T₄ OCH₃*

En prenant les deux valeurs probables de ψ Pro (-30° et $+120^\circ$) (22) et les deux valeurs possibles de ϕ Gly 3, quatre conformations de la séquence Pro₂ Gly₃ de notre dérivé sont obtenues.

Mais l'examen de modèles moléculaires (Dreiding) montre que seules les valeurs ϕ Gly = $+80^\circ$ et ψ Pro = $+120^\circ$ permettent un rapprochement suffisant de NH Gly 1 et CO Tyr 4 pour qu'une liaison hydrogène s'établisse.

Lors de l'étude de tétrapeptides contenant la séquence Pro₂ Gly₃, Marraud et coll. (5) ont obtenu comme valeurs des constantes 3J du résidu Gly 3 des valeurs analogues aux nôtres. Ils ont également retenu pour ψ Pro₂ et ϕ Gly₃ respectivement $+120^\circ$ et $+80^\circ$.

Le couplage $^2J_{HH}$ des deux protons α du résidu Gly 3 est de 17,2 Hz. Cette valeur correspond à un angle ϕ dont la valeur absolue est comprise entre 65° et 115° (diagramme de Barfield). L'angle ϕ Gly 3 proposé, $+80^\circ$ est bien dans le domaine permis.

En outre, ϕ Gly 3 = $+80^\circ$ et $^2J_{HH}$ Gly 3 = 17,2 Hz permettent d'obtenir à partir du diagramme de Barfield les valeurs possibles de ψ Gly 3 : $\pm 160^\circ$ et $\pm 20^\circ$.

Les valeurs proches de 180° sont moins probables, elles ne permettent pas l'établissement de la liaison hydrogène NH Gly 1..CO Tyr 4. Les valeurs retenues $\pm 20^\circ$ sont

voisines de celle qui a été proposée pour un dérivé contenant la séquence $\text{Pro}_2 \text{ Gly}_3$: t.Boc Val Pro Gly Val Gly Val OCH_3 (23) : les calculs conformationnels ont en effet permis de proposer pour ce peptide $\psi_3 = + 40^\circ$.

Les valeurs des angles dièdres de la séquence L Pro Gly de t.Boc $\text{T}_4 \text{ OCH}_3$ sont voisines de celles qui sont nécessaires pour obtenir un repliement de type β_{II} .

En effet nous avons retenu les valeurs suivantes :
 $\phi_{\text{Pro}_2} = - 60^\circ$, $\psi_{\text{Pro}_2} = + 120^\circ$, $\phi_{\text{Gly}_3} = + 80^\circ$, $\psi_{\text{Gly}_3} = \pm 20^\circ$

alors que les valeurs théoriques (16) du repliement β_{II} sont :

$$\phi_{i+1} = - 60^\circ, \psi_{i+1} = + 120^\circ, \phi_{i+2} = + 80^\circ, \psi_{i+2} = 0^\circ$$

Signalons que pour les séquences L Pro Gly, le repliement β_{II} est plus fréquent (18 b).

En ce qui concerne le résidu tyrosine en position 4, les valeurs de ϕ obtenues par l'application de la relation ${}^3\text{J} = f(\theta)$ sont de $- 80^\circ$ ou $- 160^\circ$. Le report de chacune d'elles sur les modèles montre que la valeur $- 80^\circ$ est peu probable, elle donne lieu à de fortes interactions stériques avec le reste de la molécule de peptide. Aussi la valeur $- 160^\circ$ est retenue, ceci est en accord avec la valeur de l'angle ϕ du résidu Val 4 proposée pour t.Boc Val Pro Gly Val Gly OCH_3 (23) ($\phi_{\text{Val } 4} = - 160^\circ$).

En résumé, les résultats des effets de concentration et de solvant ont permis de faire l'hypothèse de l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire faisant participer le proton NH de Gly 1, et qui conduit à stabiliser la conformation du peptide.

L'analyse des paramètres spectraux précise que la chaîne peptidique se replie autour de $\text{Pro}_2 \text{ Gly}_3$ selon le type β_{II} , le plus fréquent pour cette séquence.

III - t.Boc Tyr Pro Gly Gly OCH₃ (t.Boc T₁ OCH₃)

1 - SPECTRE RMN PROTON (IX) ET PARAMETRES

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont reportées dans le tableau 6.

Résidu	δ (ppm)	J Hz
Tyr 1	HN = 5,3	
	H _α = 4,75	³ J _{HNC_αH} = 8,5 Hz
	H _{β₁} = 3,14	³ J _{αβ₁} = 4,5 Hz
	H _{β₂} = 3,07	³ J _{αβ₂} = 9,5 Hz
	H _{ar} = 6,75 - 7,08	² J _{β₁β₂} = 14,5 Hz
	HO = 7,4	
Pro 2	H _α = 4,41	
	H _β = 2,06	² J _{αβ₁} = 8,5 Hz
	H _γ = 1,92	² J _{αβ₂} = 4,5 Hz
	H _δ = 3,35 - 3,76	
Gly 3	HN = 6,23	
	H _{α₁} = 3,90	Σ ³ J _{HNC_αH} = 11,5 Hz
	H _{α₂} = 3,86	
Gly 4	HN = 7,38	
	H = 3,95	Σ ³ J _{HNC_αH} = 11,5 Hz
(CH ₃) ₃ C	1,43	
OCH ₃	3,73	

TABLEAU 6

Paramètres spectraux de t.Boc T₁ OCH₃
(solvant CDCl₃ C = 0,015 mole/l réf. TMS)



2 - DISCUSSION

Toutes les résonnances ont pu être attribuées par la technique du découplage sauf celles des protons α et amides des résidus glycine 3 et 4. La comparaison des spectres t.Boc T₁ OCH₃ et de t.Boc T₁ OH n'a pas permis de conclure sur ce point : le spectre de t.Boc T₁ OH est mal résolu. Mais la variation de solvant DMSO - CDCl₃ permet de suivre chaque signal (qui avait bien été repéré dans le DMSO) et ainsi d'attribuer les signaux respectifs. Les résonnances dues à l'isomère cis n'ont pas été observées : ici encore la quantité d'isomère trans est en augmentation par rapport à celle observée pour l'étude dans le DMSO.

Les protons α Gly 3 sont peu inéquivalents ($\Delta\delta = 0,06$ ppm); ceux de Gly 4 sont équivalents.

Les calculs de distribution des rotamères latéraux de la tyrosine ont été faits par application des relations de Pachler (6) et les attributions (tg^- , tg^+ et g^+g^-) sont basées sur les positions relatives des signaux H _{β R} et H _{β S} de la tyrosine (7).

Les résultats (tableau 7) indiquent que le rotamère préférentiel est le tg^+ , par conséquent en passant du DMSO (où tg^- est majoritaire) au chloroforme, la chaîne latérale de la tyrosine modifie complètement son organisation.

tg^+	tg^-	g^+g^-
63	17	20

TABLEAU 7

Distribution des rotamères latéraux de la Tyrosine dans t.Boc T₁ OCH₃

3 - EFFET DE CONCENTRATION

Les déplacements chimiques des protons amides ont été suivis en fonction de la concentration (Figure XIII).

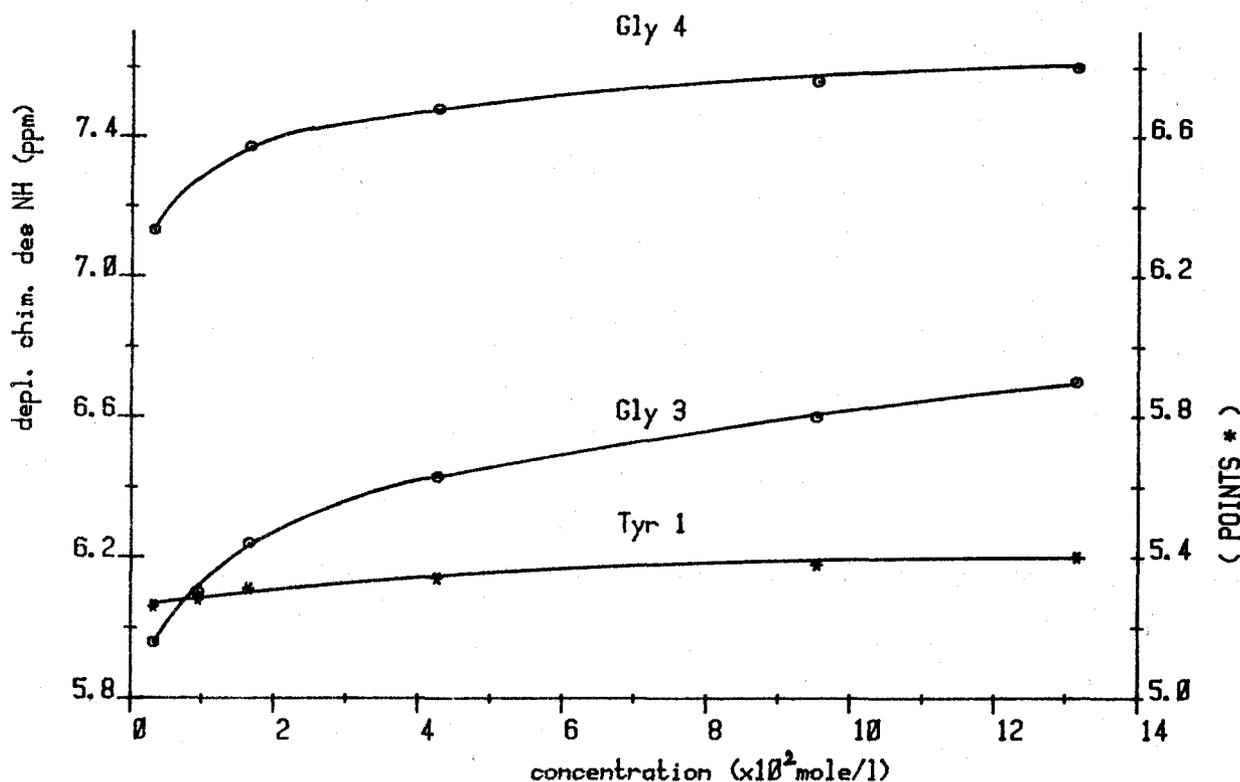


FIGURE XIII

Variation des déplacements chimiques des protons amides de *t.Boc T₁ OCH₃* en fonction de la concentration

Les protons amides des résidus Gly 3 et Gly 4 participent à des associations intermoléculaires, alors que celui le résidu tyrosine 1 reste peu perturbé ce qui permet de proposer sa participation à une liaison hydrogène intramoléculaire.

4 - EFFET DE SOLVANT

a - protons amides

Outre son intérêt pour l'attribution des résonances des protons α et amides de Gly 3 et Gly 4, l'effet de

solvant permet d'obtenir des informations sur l'accessibilité des protons amides. Les résultats sont reportés sur la figure XIV.

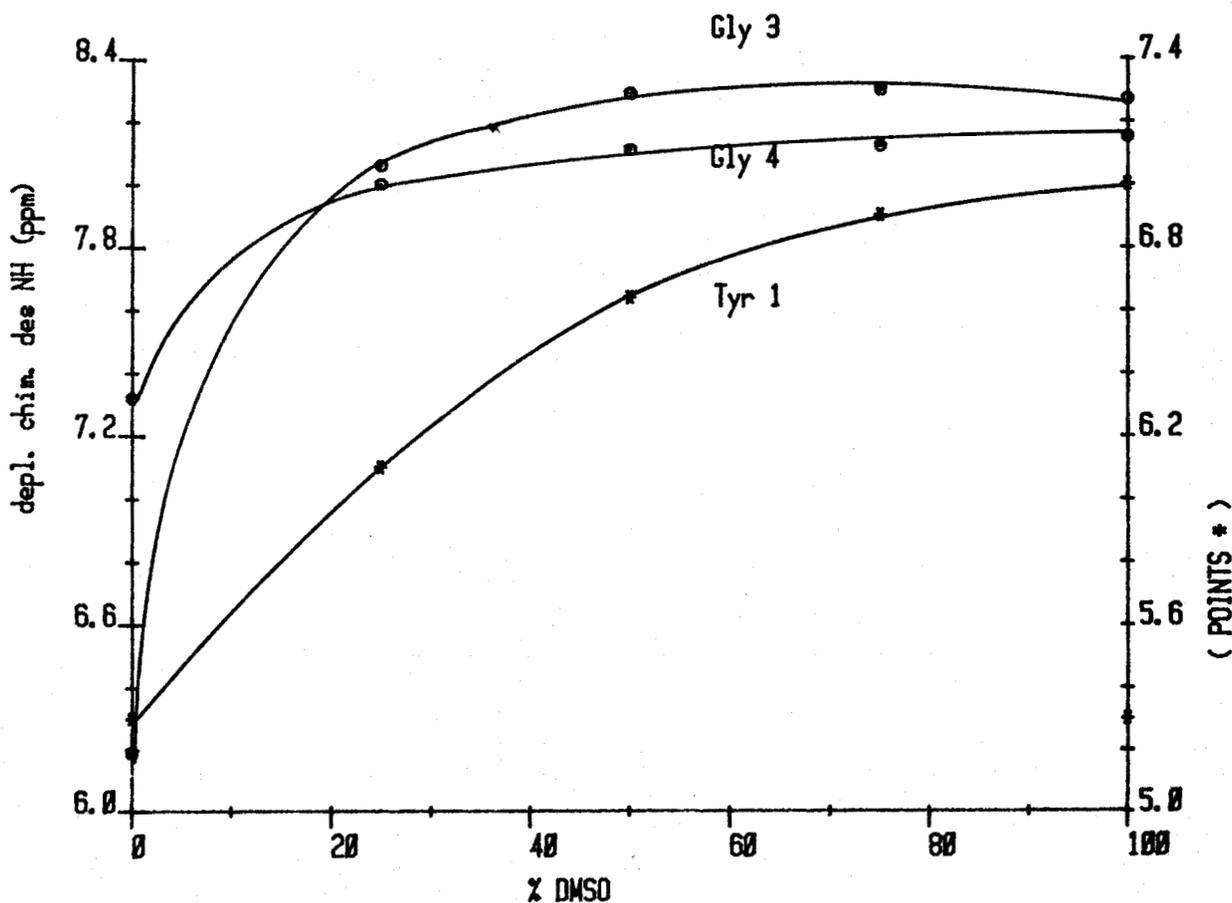


FIGURE XIV

Variation des déplacements chimiques des protons amides de *t.Boc T₁ OCH₃* lors de l'effet de solvant $CDCl_3 - DMSO$ ($c = 1,97 \cdot 10^{-2}$ mole/l)

De l'examen de cette figure, quelques conclusions peuvent être tirées :

1 - Tous les protons NH glissent vers les bas champs quand on introduit du DMSO. Mais pour l'addition de 10 % de ce solvant, le signal NH Tyr 1 ne glisse que de 0,3 ppm alors que celui de Gly 4 glisse de 0,6 ppm.

Ce résultat peut être interprété comme une moins bonne accessibilité du NH Tyr 1 et cette interprétation rejoint celle issue de l'étude de l'effet de concentration.

2 - Le déblindage observé sur le NH Gly 3 lors de l'effet de solvant est de 2,16 ppm alors que pour les 2 autres peptides décrits, des valeurs de l'ordre de 1 ppm sont observées. Aussi à côté de la solvation par le DMSO, un autre phénomène participe, il sera précisé plus loin.

b - distribution des populations de rotamères de la tyrosine

Il a été précisé au chapitre III que les constantes de couplage $^3J_{\alpha\beta}$ du résidu tyrosine permettent de calculer les populations des rotamères de la chaîne latérale, mais l'attribution des valeurs obtenues aux orientations tg^- , tg^+ , g^+g^- demande de savoir si le signal $H\beta$ Tyr situé à haut champ est celui du proton β_R ou celui du proton β_S .

Les valeurs des populations que nous avons proposées pour nos dérivés sont basées sur les résultats de Kobayashi et coll. (7)

- Dans le DMSO, le signal H_{β_S} est à bas champ par rapport à celui du H_{β_R}

- Dans le chloroforme, c'est le contraire, le proton β_S est plus blindé que le proton β_R .

Afin de confirmer nos résultats, il est nécessaire de vérifier que les attributions proposées par Kobayashi et coll. pour un modèle particulier ($CH_3 - \overset{O}{\parallel}C - Phe - NH - CH_3$) peuvent aussi s'appliquer aux protons β de nos dérivés.

Au chapitre VI, nos résultats expérimentaux vont permettre de montrer que pour le DMSO les signaux $H\beta$ Tyr situés à bas et haut champs sont respectivement ceux des protons H_{β_S} et H_{β_R} : ceci est en accord avec les résultats de la littérature (7).

Pour préciser les positions relatives des signaux H_{β} Tyr (R et S) pour les études dans le chloroforme, les massifs H_{β} Tyr obtenus lors de l'effet de solvant DMSO - $CDCl_3$ ont été analysés en se basant sur l'hypothèse suivante :

Quelle que soit la composition du mélange de solvants, le signal du proton β Tyr situé à bas champ est de configuration S (ceci est établi pour le DMSO).

Les populations des rotamères latéraux de la tyrosine peuvent alors être calculées, les valeurs sont reportées dans le tableau 8.

composition du mélange DMSO- $CDCl_3$	% tg^-	% tg^+	g^+g^-
100 % DMSO	67	11	21
50 % DMSO 50 % $CDCl_3$	60	14	26
25 % DMSO 75 % $CDCl_3$	44	31	25
12,5 % DMSO 87,5 % $CDCl_3$	35	40	25
100 % $CDCl_3$	63	17	20

TABLEAU 8

Distributions des rotamères de la tyrosine (t.Boc T₁ OCH₃) en fonction de la composition du mélange DMSO - $CDCl_3$

En allant du DMSO au chloroforme, la proportion de tg^- diminue au profit du tg^+ , mais entre 87,5 % et 100 % de $CDCl_3$, l'inverse est observé.

Nous estimons que cette discontinuité, liée à l'hypothèse ci-dessus, n'est pas cohérente. La répartition inverse ($tg^- = 17$ %, $tg^+ = 63$ %) est trouvée si dans $CDCl_3$ le

signal H_β situé à haut champ n'est pas celui du proton de configuration R, mais celui du proton S.

Cette solution, qui présente l'avantage de proposer pour les distributions des variations monotones, s'accorde bien avec les conclusions de la littérature (7).

5 - INTERPRETATION

a - *blindage excessif du proton NH Gly 3 obtenu lors de l'effet de solvant*

Un parallèle a été établi entre le fort blindage (2,1 ppm) observé sur le proton amide du résidu Gly 3 et l'augmentation de la population du rotamère tg^+ (lors de l'effet de solvant) qui oriente le phényle sur l'extrémité C terminale, c'est-à-dire vers le proton NH du résidu Gly 3.

L'hypothèse développée consiste à considérer que le courant de cycle du phényle est à l'origine du phénomène observé.

En effet, l'examen des modèles moléculaires montre que les positions relatives du centre du noyau aromatique et du proton NH Gly 3 ne dépendent que de ϕ Pro 2, de ψ Tyr 1 et de ψ Pro 2. ϕ_{Pro} est généralement pris égal à -60° (cycle pyrrolidine). En ce qui concerne la valeur de l'angle ψ du résidu précédent la proline, si pour la séquence Gly - Pro une valeur voisine de 180° est souvent retenue (24), par contre dans le cas d'un résidu porteur d'une chaîne latérale encombrante, il a été montré que $\psi = 180^\circ$ impose de fortes interactions stériques entre la chaîne latérale et les protons δ Pro de sorte que des valeurs de ψ voisines de 130° à 150° ont été proposées (25).

Après avoir positionné la chaîne latérale dans la conformation tg^+ et reporté la valeur de ψ Tyr ($\approx 130^\circ$ - 150°), on constate sur le modèle que pour ψ Pro = $+120^\circ$ (l'une des valeurs probables de ψ Pro (22)), le proton NH Gly 3 ne peut pas être soumis au courant de cycle de la tyrosine : la distance

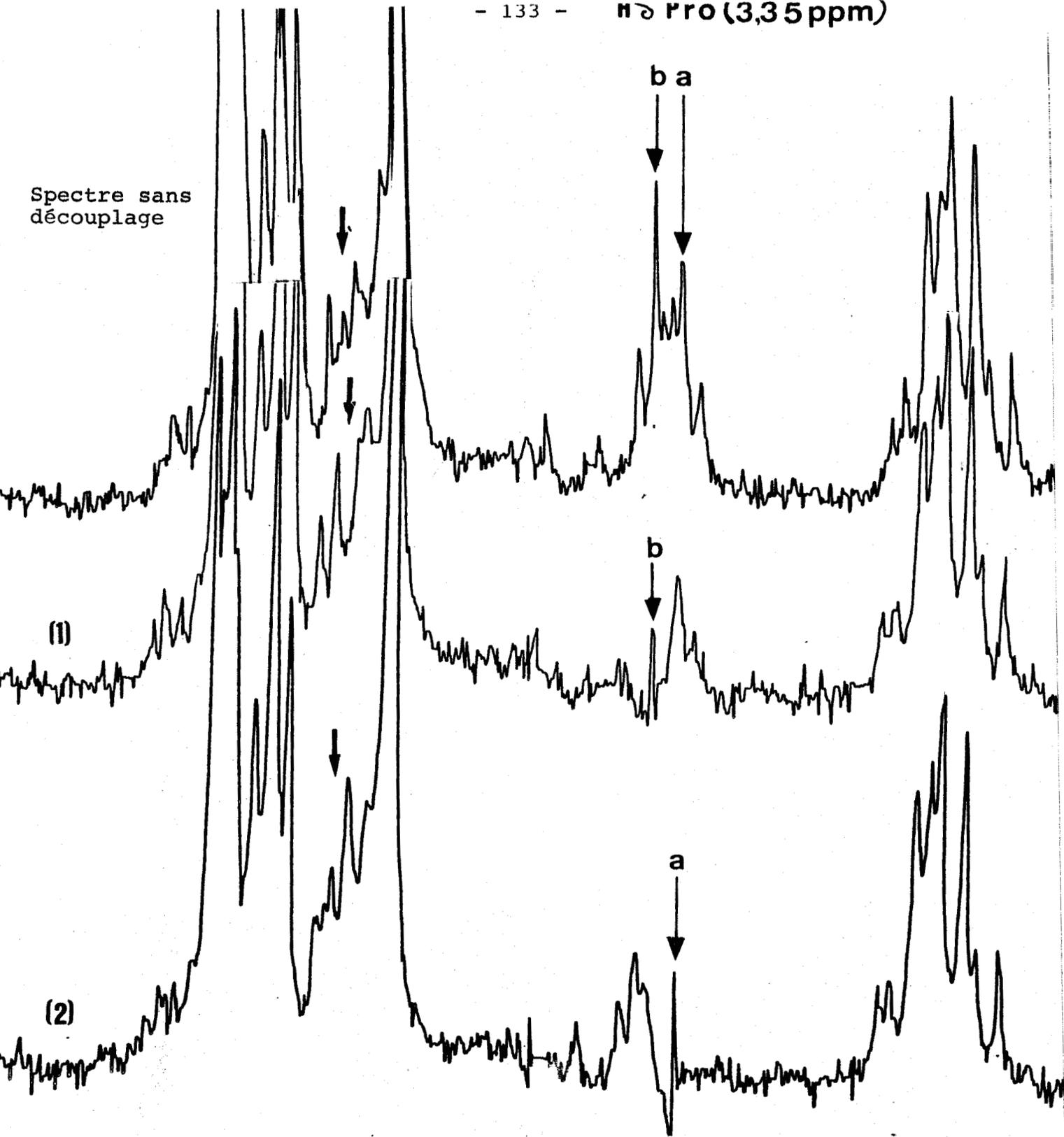


FIGURE XV

Expériences de découplage du proton δ Pro situé à 3,35 ppm
Les spectres (1) et (2) correspondent aux spectres acquis
dans les conditions d'irradiation suivantes :

(a) raie irradiée : $\delta = 3,38$ ppm

(b) raie irradiée : $\delta = 3,33$ ppm



est trop grande. Par contre, pour l'autre valeur probable de ψ Pro : -35° (22), la distance du phényle au proton NH Gly 3 permet de rendre compte du blindage observé.

Une autre donnée expérimentale a permis d'apporter des informations supplémentaires.

Le spectre de t.Boc T₁ OCH₃ montre que le signal attribué à H_δ Pro et situé à 3,35 ppm ne correspond qu'à un seul proton : des expériences de découplage, représentées sur la figure XV, permettent de penser que le second proton δ Pro est situé à 3,8 ppm environ.

La valeur $\delta = 3,35$ ppm est très voisine de celles obtenues pour les protons δ de t.Boc T₃ OCH₃ (3,40 ppm) et t.Boc T₄ OCH₃ (3,50 - 3,40 ppm), aussi le proton δ Pro de t.Boc T₁ OCH₃ situé à 3,8 ppm est déblindé. Si on retient l'hypothèse du courant de cycle pour exprimer nos résultats, les phénomènes observés sur NH Gly 3 et H_δ Pro 2 demandent que le proton amide soit situé dans le cône d'anisotropie du phényle et que le proton δ Pro soit proche du plan du noyau aromatique (26).

Le modèle moléculaire qui puisse satisfaire à ces conditions demande que la valeur moyenne de χ_2 (angle dièdre C_αC_βC_γC_δ de la chaîne latérale de la tyrosine) soit proche de zéro. Avec cette valeur de χ_2 , les deux protons β Tyrosine occupent des positions symétriques par rapport au plan du noyau aromatique. En conséquence, la différence des déplacements chimiques des 2 protons concernés doit être faible (27), c'est ce qui a été observé : $\Delta\delta = 0,07$ ppm.

b - conformation

La comparaison de nos résultats avec ceux de Urry (28) et de Kopple (24) rapportés pour des dérivés protégés de Val Pro Gly Gly semble une base intéressante de discussion.

Entre nos résultats et ceux de la littérature, un point commun existe, la participation du proton NH du premier résidu à une liaison hydrogène intramoléculaire, mais des différences apparaissent aussi.

1 - Kopple (24) a mis en évidence une liaison hydrogène faisant intervenir le NH Gly 4, alors que pour notre peptide, ce n'est pas le cas.

2 - L'inéquivalence H_{α} Gly observée par Urry (28) et analysée en termes de mouvements contraints est dans notre cas faible pour Gly 3 et nulle pour Gly 4.

Si nous pouvons comme ces auteurs proposer pour notre modèle une structure repliée stabilisée par une liaison hydrogène intramoléculaire NH Tyr 1...CO Gly 4, il n'est pas évident de rendre compte de l'absence de celle qui implique le NH Gly 4.

Cette différence de comportement est d'autant plus étonnante que les dérivés sont très voisins, les chaînes latérales Valine et Tyrosine présentent un encombrement similaire. Il est possible que la présence d'un noyau aromatique soit un élément à prendre en compte : il faudrait alors reprendre cette étude après avoir synthétisé des modèles dans lesquels le résidu tyrosine aura été préalablement hydrogéné.

Les couplages 3J entre le proton NH et les protons α R et S des résidus Gly 3 et Gly 4 n'ont pas pu être obtenus et par conséquent les angles ϕ correspondants ne peuvent être déterminés : il n'est donc pas possible de préciser le type de repliement.

Pour t.Boc Val Pro Gly Gly OCH₃, Urry a proposé un repliement de type β_{II} ce qui nécessite que ψ Pro soit de + 120° (16). Mais il faut rappeler qu'au paragraphe précédent, pour commenter le blindage anormal de NH Gly 3 lors de l'effet de solvant, nous avons été amené à retenir comme valeur de ψ Pro, - 35°. Il apparaît donc que notre peptide existe sous d'autres conformations que celle rapportée pour la séquence Val Pro Gly Gly, mais l'absence d'informations spectrales ne permet pas d'analyser plus avant notre dérivé.

IV - ISOMERIE CIS - TRANS

Pour le chloroforme, les proportions d'isomère cis sont en régression en comparaison de celles obtenues pour les études dans le DMSO.

Les résultats peuvent être interprétés à l'aide des travaux théoriques de Schéraga et Zimmerman (29). Ces auteurs ont montré que parmi les facteurs qui agissent sur le rapport cis/trans, l'un des plus importants consiste en l'interaction électrostatique entre l'oxygène du carbonyle précédant la proline et le carbone du groupe C = O de ce résidu (Figure XVI).

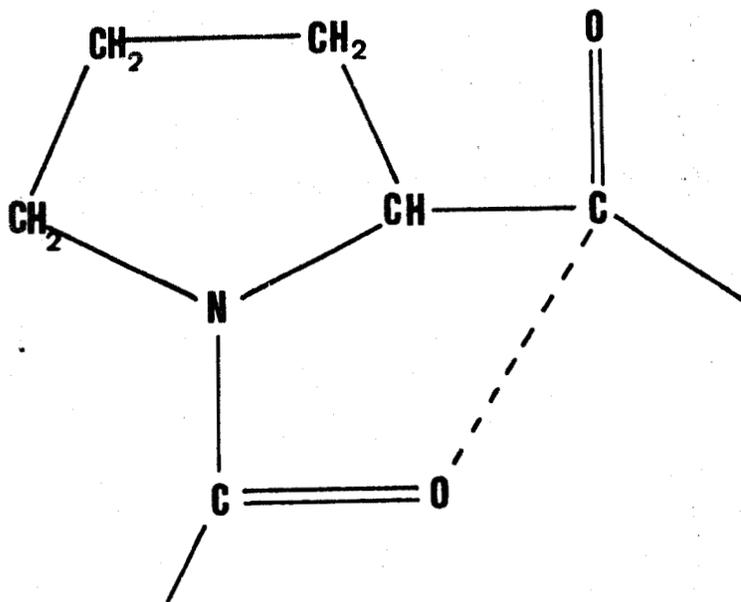


FIGURE XVI

Interaction électrostatique stabilisatrice de l'isomère trans de la séquence X - Pro selon Zimmerman et Schéraga (29)

Cette interaction stabilise la forme trans et ne joue pas pour l'isomère cis, on peut alors prévoir que la substitution d'un solvant polaire (DMSO) par un solvant peu polaire (CDCl₃) va accroître la force d'interaction électrostatique et se traduire par conséquent par une augmentation de la quantité d'isomères trans.

C'est effectivement ce qui a été observé pour nos modèles et c'est aussi ce qui est décrit dans la littérature pour d'autres dérivés (30).

V - PROTONS β TYROSINE

Les variations de l'inéquivalence des protons β Tyrosine en fonction de la concentration diffèrent selon la position de ce résidu dans la séquence peptidique (Figure XVII).

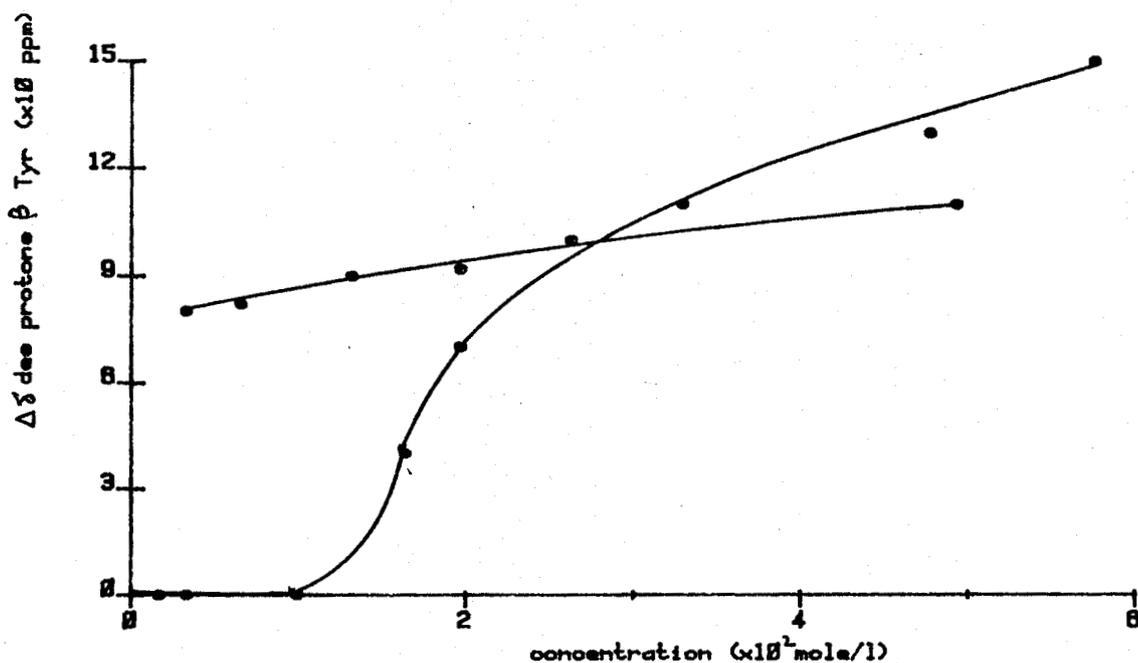


FIGURE XVII

Inéquivalence des protons β Tyr de $t.Boc T_3 OCH_3$ et de $t.Boc T_4 OCH_3$ en fonction de la concentration

De l'examen de la figure XVII, deux remarques peuvent être faites :

1 - Les deux protons β Tyr de $t.Boc T_3 OCH_3$ sont équivalents à faible concentration en peptide.

2 - Au-delà d'une concentration de 0,01 mole/l de peptide, l'inéquivalence des deux protons β Tyr de $t.Boc T_3 OCH_3$ apparaît et elle augmente plus vite que celle des deux protons β Tyr de $t.Boc T_4 OCH_3$.

Pour proposer une interprétation, il faut d'abord déterminer les facteurs qui doivent être pris en compte pour exprimer le blindage spécifique de chaque proton β Tyrosine.

Si l'on s'en tient à l'hypothèse que seuls les voisins immédiats participent, trois éléments peuvent être retenus (Figure XVIII)

- Les 2 cônes d'anisotropie des carbonyles (ceux de la tyrosine et du résidu précédent)

- le courant de cycle du phényle (26)

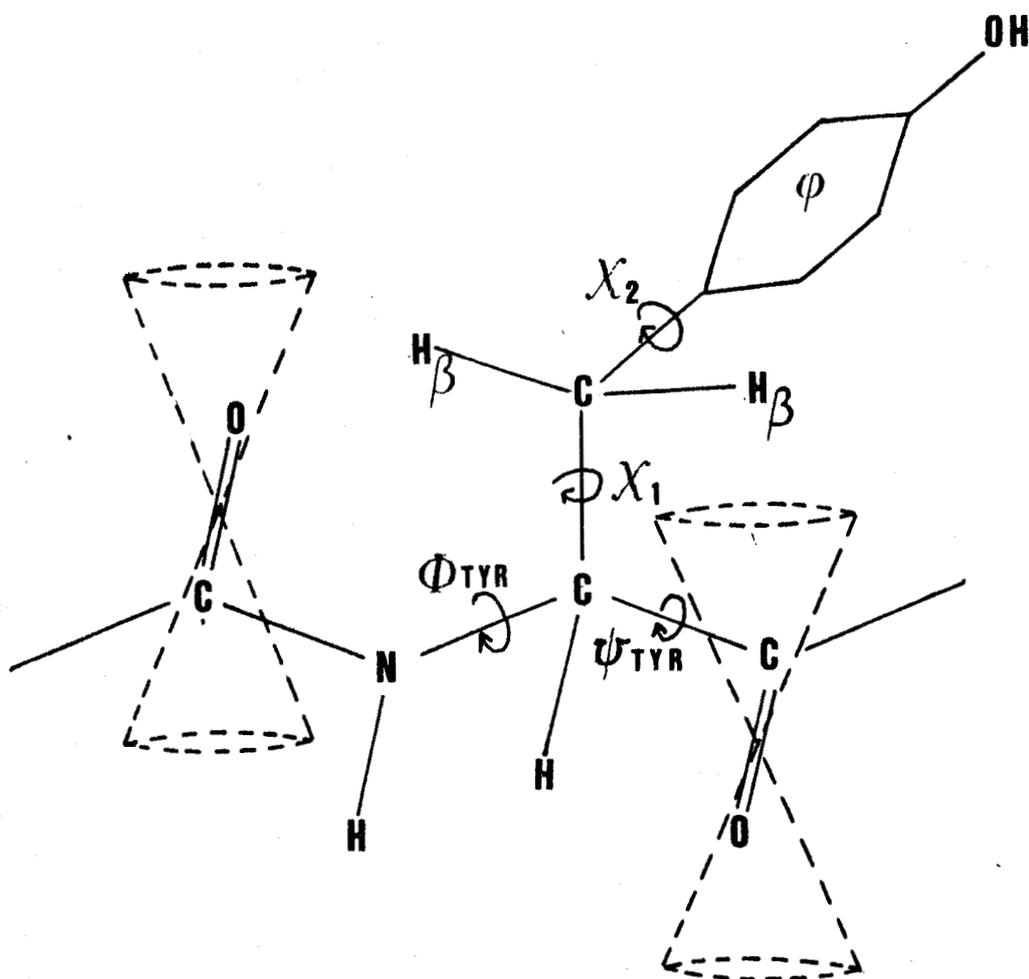


FIGURE XVIII

Représentation des éléments d'anisotropie voisins
des protons β Tyr

Les positions relatives des protons β_1 et β_2 vis-à-vis des carbonyles sont fonction des trois angles ϕ Tyr, ψ Tyr et χ_1 (Fig. XVIII).

L'effet du courant de cycle ne dépend que de χ_2 (Fig. XVIII). Aussi, l'environnement magnétique de chaque proton β dépend de quatre paramètres, la participation spécifique de chacun d'eux est bien difficile à exprimer.

Mais en présence d'un mouvement rapide (autour de $C_\alpha C_\beta$ et $C_\beta C_\gamma$ Tyrosine) chaque proton β Tyr va balayer un même espace pendant le temps de la prise de l'information RMN.

L'hypothèse du mouvement rapide est donc proposée pour exprimer l'équivalence des protons β Tyr de t.Boc T₃ OCH₃ à faible concentration. Le passage d'un système de protons équivalents à un système de protons inéquivalents (Fig. XVII) lorsque la concentration augmente peut alors s'expliquer par la formation d'agrégats qui ralentissent le mouvement de la chaîne latérale (effets stériques). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cherché à obtenir des informations sur la variation de la vitesse du mouvement de la chaîne latérale de la tyrosine en fonction de la concentration. La méthode RMN utilisée fréquemment pour accéder à la connaissance de la constante de temps du mouvement consiste à mesurer le temps de la relaxation longitudinale (T_1).

Nous ne voulons pas dans notre exposé développer l'aspect expérimental et les traitements théoriques qu'il faut mettre en oeuvre dans ce genre d'études. Nous nous limiterons à préciser quelques points nécessaires à la compréhension de cette partie du travail.

Après avoir absorbé de l'énergie électromagnétique, le noyau retourne à son état initial en cédant à son environnement le plus proche son excès d'énergie : c'est la relaxation spin-réseau (ou longitudinale). Sa cinétique est caractérisée par une constante de temps : T_1 . Pour le ¹³C, la relaxation se fait par l'intermédiaire des protons portés par le carbone. Par contre, en relaxation du proton, le retour à

l'équilibre suit des processus beaucoup plus complexes et en pratique les résultats sont peu exploitables, sauf dans le cas d'un proton du groupe méthylène où l'essentiel de la relaxation est assuré par le proton géminé (31).

Comme l'étude par relaxation du proton demande des temps d'accumulation des spectres bien plus courts que celle du ^{13}C l'étude du mouvement de la chaîne latérale de la tyrosine a été faite par l'intermédiaire de l'étude de la relaxation des protons β tyrosine.

Les résultats obtenus ont montré que les variations de T_1 en fonction de la concentration sont trop faibles pour que l'hypothèse du mouvement rapide de la chaîne latérale puisse être retenue.

Une seconde hypothèse est alors proposée : les 2 protons β Tyr de t.Boc T_3 OCH_3 (à faible concentration) sont équivalents car ils sont situés l'un et l'autre dans une région où le gradient du champ magnétique est faible.

Dans cette éventualité, au moins deux conditions doivent être remplies :

1 - Les cônes d'anisotropie des carbonyles doivent être orientés de telle sorte que leur action sur les protons β Tyr soit peu importante.

2 - L'effet du courant de cycle du phényle sur chaque proton β Tyr est le même. Ceci est possible si la vitesse de rotation autour de $\text{C}_\beta\text{C}_\gamma$ Tyr (χ_2) est élevée ou si $\chi_2 = 0^\circ$ ou 90° (les protons β Tyr adoptent alors des positions symétriques par rapport au plan du phényle).

Sur ce second point, nous n'avons pas d'informations qui permettent de choisir l'une ou l'autre des solutions.

En ce qui concerne les cônes d'anisotropie des carbonyles, il faut se rappeler qu'une conformation repliée de type β_1 a été proposée pour le dérivé. L'examen du modèle correspondant montre que les protons β Tyr sont éloignés des cônes des carbonyles, surtout quand la chaîne latérale de ce résidu est dans la conformation tg^+ (52 %). C'est sans doute l'un des éléments qui permet de rendre compte de l'équivalence observée.

CONCLUSION

Les effets de concentration et de solvant sur les déplacements chimiques des protons NH de nos modèles ont été étudiés.

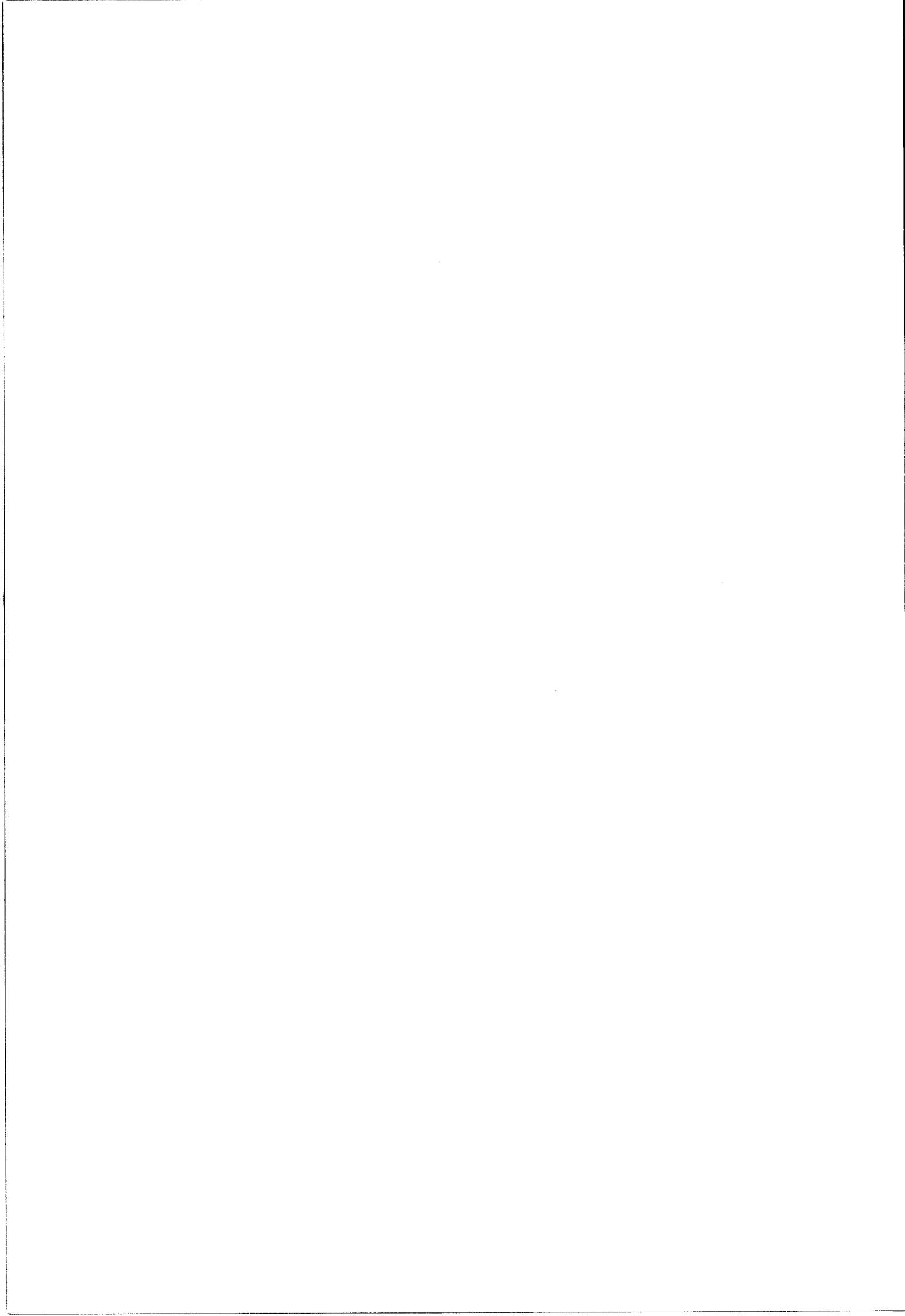
A partir de données de la littérature et des conclusions de nos résultats, une hypothèse est proposée : la conformation de la chaîne principale de nos dérivés est repliée autour de la séquence Pro₂ X₃, la stabilité étant assurée par au moins une liaison hydrogène intramoléculaire entre le proton amide du premier résidu et le carbonyle du 4ème.

Les constantes de couplage sont analysées au moyen des relations de type de Karplus. Les angles dièdres ϕ obtenus conduisent à proposer un repliement de type β_I pour le modèle t.Boc T₃ OCH₃ et de type β_{II} pour t.Boc T₄ OCH₃ ce qui est conforme aux données bibliographiques. En ce qui concerne t.Boc T₁ OCH₃, le manque d'informations spectrales ne permet pas de préciser le type de repliement de la structure.

L'analyse des massifs des protons β tyrosine de t.Boc T₁ OCH₃ permet de montrer, en accord avec les résultats de la littérature, qu'en passant du DMSO au CDCl₃, les signaux H $_{\beta R}$ et H $_{\beta S}$ inversent leur position relative sur le spectre.

L'effet de courant de cycle du phényle de la tyrosine est proposé pour exprimer le blindage excessif observé sur le proton amide du résidu Gly 3 lors de l'effet de solvant.

Enfin, le passage pour les protons β Tyr de t.Boc T₃ OCH₃, d'un système de 2 protons inéquivalents n'est sans doute pas dû pour l'essentiel à une modification de la vitesse de rotation autour de la liaison C $_{\alpha}$ C $_{\beta}$ Tyr.



BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE IV

- (1) M.T. CUNG, M. MARRAUD et J. NEEL
Biopolymers (1977) 16, 715-729.
- (2) a - J. DALE et K. TITLESTAD
Chem. Comm. (1969) 656-659.
b - L.G. PEASE, C.M. DEBER et E.R. BLOUT
J. Am. Chem. Soc. (1973) 95, 258-260.
- (3) M.J.O. ANTEUNIS
Tetrahedron Letters (1977) 18, 1535-1538.
- (4) M. KAINOSHO, K. AJISAKA, M. KAMISAKU et A. MURAI
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1975) 64, 425-432.
- (5) G. BAUSSARD, M. MARRAUD et A. AUBRY
Biopolymers (1979) 18, 1297-1331.
- (6) K.G. PACHLER
Spectrochim. Acta (1964) 20, 581-587.
- (7) J. KOBAYASKI, U. NAGAI, T. HIGASHIHIMA et T. MIYAZAWA
Biochem. Biophys. Acta (1970) 577, 195-206.
- (8) M. GOODMAN, N. UEYAMA, F. NAIDER et G. GILSON
Biopolymers (1975) 14, 915-925.
- (9) M. GOODMAN, A.A. RIBEIRO et F. NAIDER
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1978) 75, 4647-4651.
- (10) M.T. CUNG, M. MARRAUD et J. NEEL
Macromolécules (1974), 606-613.
- (11) a - J.E. SHIELDS et S.T. Mc DOWELL
J. Am. Chem. Soc. (1967) 89, 2499-2450.
b - J.E. SHIELDS, S.T. Mc DOWELL, J. PAVLOS et G.R. GRAY
J. Am. Chem. Soc. (1968) 90, 3549-3555.
- (12) R. SCHWYZER
Ciba Found. Symp. Amino-Acids Peptides Antimetabol. Activity (1958) 171, 1958.
- (13) T. UEKI, T. ASHIDA, M. KAKUDO, Y. SASADA et Y. KATSUBE
Nature (1967) 216, 1205-1207.

- (14) T. UEKI, S. BANDO, T. ASHIDA et M. KAKUDO
Acta. Cryst. (1971) B 27, 2219-2231.
- (15) D.W. URRY et M.M. LONG
CRC Critical Reviews in Biochemistry (1976) 1-45.
- (16) C.M. VENKATACHALAM
Biopolymers (1968) 6, 1425-1436.
- (17) J.L. CROWFORD, W.N. LIPSCOMB et C.G. SCHELLMAN
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1973) 70, 538-542.
- (18) a - S.S. ZIMMERMAN et H.A. SCHERAGA
Biopolymers (1977) 16, 811-843.
b - P.Y. CHOU et G.D. FASMAN
J. Mol. Biol. (1977) 115, 135-175.
- (19) M. BARFIELD, V.J. HRUBY et J.P. MERALDI
J. Am. Chem. Soc. (1976) 98, 1308-1313.
- (20) E.R. STIMSON, Y.C. MEINWALD et H.A. SCHERAGA
Biochemistry (1979) 18, 1661-1671.
- (21) D.A. TORCHIA, A. DICORATO, S.C.K. WRONG, C.M. DEBER
et E.R. BLOUT
J. Am. Chem. Soc. (1972) 94, 609-615.
- (22) A.E. TONELLI
J. Am. Chem. Soc. (1973) 95, 5946-5948.
- (23) V. RENOGOPALAKRISHNAN, Md. Abu KHALED et D.W. URRY
J. Chem. Soc. Perkins Trans. II (1978) 111-119.
- (24) K.D. KOPPLE, A. GO et D.R. PILIPAUSKAS
J. Am. Chem. Soc. (1975) 97, 6830-6838.
- (25) a - A. DIAMANI et P. DE SANTIS
Nature (1970) 226, 542-543.
b - B. MAIGRET, B. PULLMAN et J. CAILLET
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1970) 40, 808-813.
- (26) E.D. BECKER
High Resolution NMR, Academic Press (1969) 78.
- (27) K.D. KOPPLE, A. GO, T.J. SCHAMPER et C.S. WILCOX
J. Am. Chem. Soc. (1973) 95, 6090-6096.

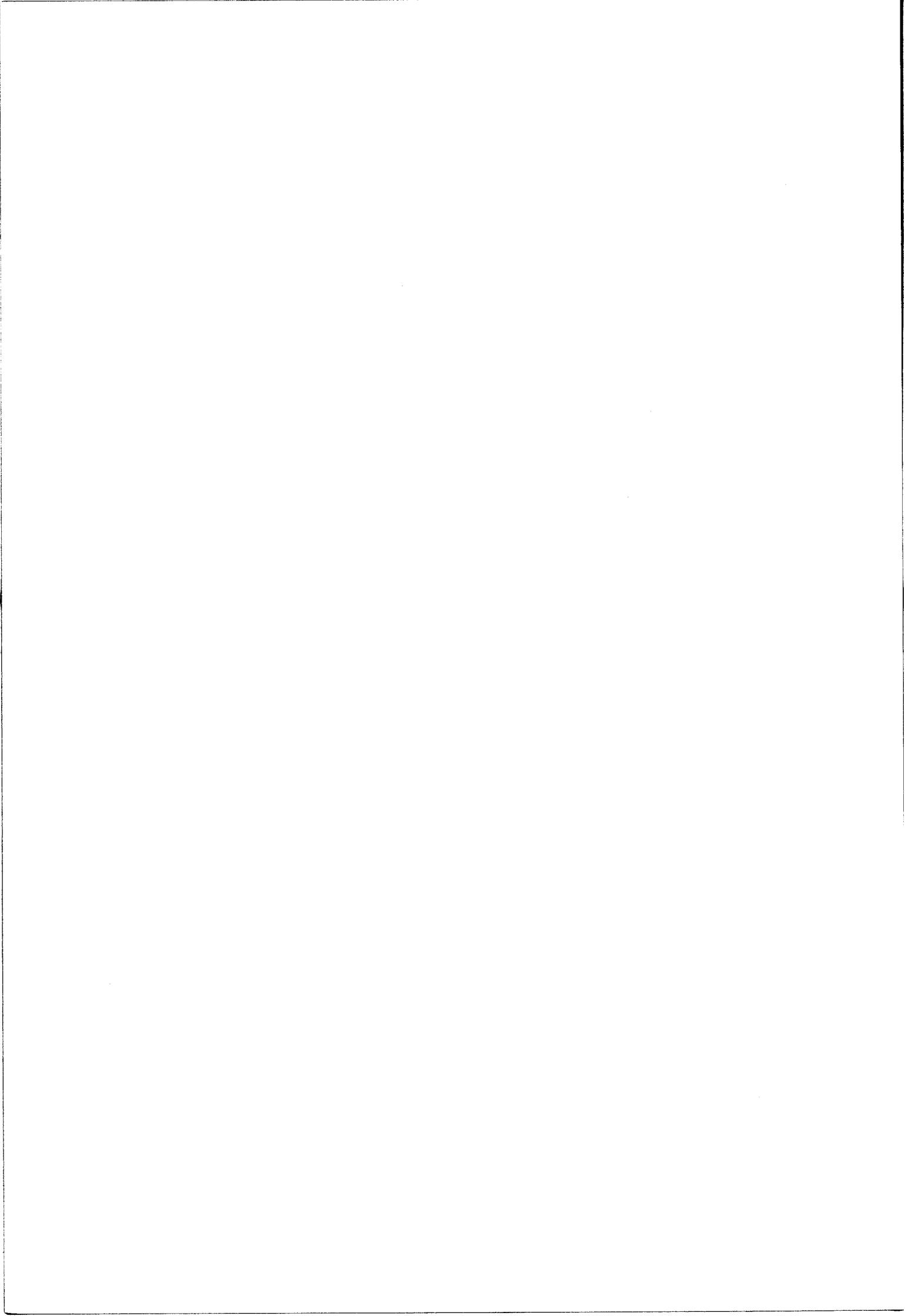
- (28) Md. Abu KHALED, V. RENUGOPALAKRISMAN et D.W. URRY
J. Am. Chem. Soc. (1976) 98, 7547-7553.
- (29) S.S. ZIMMERMAN et H.A. SCHERAGA
Macromolécules (1976) 408-416.
- (30) K. WÜTHRICH, CH. GRATHWOHL et R. SCHWYZER
Peptides, polypeptides and Proteins, Ed; WILEY
(1974) 300.
- (31) B. PERLY, C. CHACHATY et A. TSUTSUMI
J. Am. Chem. Soc. (1980) 102, 1521-1528.



C H A P I T R E V

ETUDE DES PEPTIDES DEPROTEGES

EN SOLUTION DANS LE DMSO ET LE TRIFLUOROETHANOL



La déprotection des extrémités fonctionnelles donne des dérivés sous forme zwitterionique. Les interactions électrostatiques de type "tête queue" peuvent alors intervenir et stabiliser les conformations repliées (1). C'est ce qui a conduit à entreprendre l'étude conformationnelle des formes zwitterioniques de nos trois dérivés.

Nous allons présenter successivement :

1 - Gly Pro Tyr Gly

2 - Gly Pro Gly Tyr

3 - Tyr Pro Gly Gly

Les spectres RMN proton (solvant: DMSO et trifluoroéthanol) seront présentés et discutés.

Les résultats des effets de température et de solvant sur les déplacements chimiques des protons NH seront analysés en vue de proposer une conformation pour chacun de nos modèles.

I - Gly Pro Tyr Gly

A - ETUDE DANS LE DMSO

1 - Spectre (X) et paramètres

Les déplacements chimiques et les constantes de couplages sont reportés dans le tableau 1. Les quelques valeurs obtenues pour l'isomère cis sont entre parenthèses.

2 - Discussion

a - *Rapport cis/trans.*

Le rapport des isomères cis - trans a été obtenu par comparaison des signaux respectifs du proton NH Tyrosine 3. La quantité d'isomère cis n'est plus que de 10 %, alors qu'elle était de 28 % pour le dérivé protégé correspondant.

Une observation analogue a été rapportée pour 2 peptides voisins : Gly Pro Asn Gly et Gly Pro Leu Gly (2).

b - *Protons amides*

. Tyrosine 3

Wüthrich et coll. (3) ont étudié des tétrapeptides du type Gly Gly X Ala (en solution dans le DMSO). Ils ont conclu que ceux-ci adoptent des conformations non ordonnées.

Les valeurs des constantes de couplage $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ (pour un résidu X donné) rapportées par ces auteurs peuvent alors servir d'éléments de comparaison.

Dans le cas du résidu Tyrosine, la valeur de $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ est 8,5 Hz (3). Pour notre modèle, les constantes $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ de ce résidu sont 9,75 Hz (isomère trans) et 9,5 Hz (isomère cis). Ces deux dernières valeurs sont donc différentes de celle attendue du résidu Tyrosine inclus dans une séquence dont la conformation est désordonnée. C'est un premier

Résidus	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	$H_{\alpha_1} = 3,83$ $H_{\alpha_2} = 3,75$	${}^2J_{\alpha_1\alpha_2} = 16,5$
Pro 2	$H_{\alpha} = 4,03$ $H_{\beta_1} = 1,95$ $H_{\beta_2} = 1,23$ $H_{\gamma} = 1,74$ $H_{\delta} = 3,40$	${}^2J_{\alpha\beta_1} = 8,5$ ${}^2J_{\alpha\beta_2} = 5$
Tyr 3	$HN = 7,94 (8,31)$ $H_{\alpha} = 4,45$ $H_{\beta_1} = 3,18$ $H_{\beta_2} = 2,57$ $H_{ar} = 6,64 - 6,96$	${}^3J_{HNC_{\alpha}H} = 9,75 (9,5)$ ${}^3J_{\alpha\beta_1} = 4$ ${}^3J_{\alpha\beta_2} = 12$ ${}^2J_{\beta_1\beta_2} = 14,2$
Gly 4	$HN = 7,05 (7,45)$ $H_{\alpha_1} = 3,66$ $H_{\alpha_2} = 3,25$	${}^3J_{HNC_{\alpha}H_{\alpha_1}} = 6$ ${}^3J_{HNC_{\alpha}H_{\alpha_2}} = 2,5$ ${}^2J_{\alpha_1\alpha_2} = 18$

TABLEAU 1

Paramètres spectraux de Gly Pro Tyr Gly
 (solvant DMSO - T = 32°C - C = 3.10⁻² mole/l - réf TMS)



point en faveur d'une restriction du mouvement de rotation autour de la liaison $N-C_{\alpha}$. Les corrélations $J = f(\theta)$ donnent pour $J = 9,75$ Hz, un angle θ de 160° (Marraud (4)).

Pour $\theta = 160^{\circ}$, Φ Tyr peut être de -100° ou -140°

. Glycine 4

Le proton amide Gly 4 est fortement blindé par le groupe carboxylate situé à proximité. Si on enregistre un spectre après avoir ajouté 1,5 équivalent d'HCl (par rapport au peptide) le signal NH Gly 4 passe de 7,05 à 8,2 ppm : ce glissement correspond bien à la neutralisation du CO_2^- .

Le résultat obtenu établit la nature ionique de l'extrémité C terminale, ce qui a été contesté par Schéraga (5) pour d'autres dérivés : nous reviendrons sur cette question essentielle puisqu'elle concerne la possibilité ou non d'interaction électrostatique entre les extrémités N et C terminales.

Le signal du proton NH d'une glycine se présente la plupart du temps sous la forme d'un triplet. Mais dans le cas présent, un "quasi-doublet" a été observé, cette forme particulière correspond à deux valeurs très différentes des constantes de couplage 3J du proton NH et des protons α du résidu Gly 4, l'une de ces constantes est de l'ordre de la résolution spectrale. Les valeurs ont pu être obtenues par l'analyse de la partie AB (signaux des H_{α}) du spectre ABX du résidu Gly 4, elles ont été attribuées respectivement au couplage avec les protons R et S conformément aux données bibliographiques (6) :

$$^3J_{HNC_{\alpha}H_S} = 6 \text{ Hz} \qquad ^3J_{HNC_{\alpha}H_R} = 2,5 \text{ Hz}$$

L'application de la corrélation de Marraud donne comme valeurs possibles de θ_S et θ_R :

$$\theta_S = 0^{\circ} \text{ ou } 135^{\circ}$$

$$\theta_R = 45^{\circ} \text{ ou } 110^{\circ}$$

c - protons α

- Les protons α Gly 1 sont inéquivalents, ils apparaissent sur le spectre sous forme d'un quadruplet (spectre AB) : le couplage avec les protons du groupe $^+\text{NH}_3$ est supprimé.

- Le signal $\text{H}_\alpha \text{Pro}_2$ est très différent de celui qui a été observé pour le dérivé protégé correspondant (ch. III). Les constantes ^3J du proton α et des protons β du cycle pyrrolidine sont ici de 8,5 Hz et 5 Hz. Ces valeurs sont voisines de celles rapportées dans la littérature, pour l'étude de la polyproline II (7) et pour les études récentes des deux zwitterions des séquences Gly Pro Asn Gly et Gly Pro Leu Gly (2).

L'analogie de nos résultats et des données bibliographiques suggère d'interpréter selon les conclusions de la littérature: le cycle de la proline existe sous deux conformations, endo et exo, en échange rapide.

- Les protons $\text{H}_\alpha \text{Gly 4}$ sont très inéquivalents (0,4 ppm) comparés aux données de la littérature (8) où des inéquivalences de l'ordre de 0,1 à 0,2 ppm sont plus souvent rapportées.

d - protons β

- βPro . L'un des deux protons β du résidu proline est très blindé, son signal RMN apparaît à un champ plus élevé que celui observé en général (9) (10).

Le spectre présenté (spectre X) ne permet pas de connaître les configurations de chacun de ces protons. Mais des expériences de découplage permettent d'apporter quelques précisions puisqu'il est possible d'irradier séparément les protons βPro .

Nous avons repris les représentations de Newman autour de la liaison $\text{C}_\alpha\text{C}_\beta$ (Figure I).

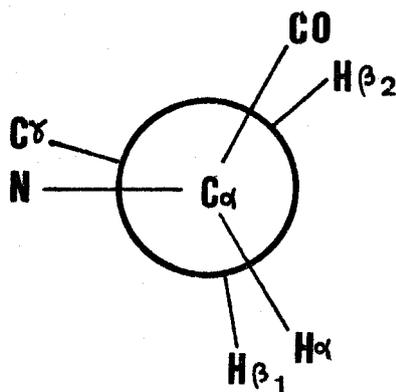


FIGURE I

Représentation autour de la liaison $C_{\alpha}C_{\beta}$ des positions relatives des protons β_1 et β_2 du résidu Proline

Pour respecter la nomenclature habituelle (10), le proton β_2 est celui qui adopte la conformation cis par rapport à la liaison $C_{\alpha} - C \begin{smallmatrix} // \\ \backslash \end{smallmatrix} O$ (plan de référence $NC_{\alpha}C_{\beta}$).

Les données de la littérature ont permis d'attribuer les couplages voisins de 8,5 Hz et 5 Hz respectivement à ${}^3J_{\alpha\beta_1}$ et ${}^3J_{\alpha\beta_2}$:

1 - pour obtenir l'accord entre spectre expérimental et spectre simulé de la proline, Ellenberger et coll. (10) ont introduit comme constantes 3J :

$${}^3J_{\alpha\beta_1} = 8,5 \text{ Hz} \qquad {}^3J_{\alpha\beta_2} = 6,2 \text{ Hz}$$

2 - Toma et coll. (2) ont obtenu pour :

$$\begin{array}{l} \text{Gly Pro Asn Gly} \quad {}^3J_{\alpha\beta_1} = 9,0 \text{ Hz} \quad {}^3J_{\alpha\beta_2} = 5,0 \text{ Hz} \\ \text{Gly Pro Leu Gly} \quad {}^3J_{\alpha\beta_1} = 8,5 \text{ Hz} \quad {}^3J_{\alpha\beta_2} = 5,2 \text{ Hz} \end{array}$$

Avec ces données, on se propose de préciser la configuration du proton β Pro situé à haut champ.

Si on suppose que les couplages longue distance sont peu importants (essentiellement ${}^5J_{\alpha\gamma}$), l'irradiation d'un proton β va en première approximation transformer la partie X (proton α Pro) du spectre ABX (protons β_1, β_2, α) en une partie X

d'un spectre AX (protons $\alpha\beta_1$ ou $\alpha\beta_2$) ; le signal H_α va donc se présenter sous forme d'un doublet. L'irradiation du proton β Pro le plus blindé ($\delta = 1,23$ ppm) s'est traduite par l'observation pour le proton α Pro d'un doublet dont les raies sont espacées de 8 Hz : l'irradiation a donc supprimé le couplage de 5 Hz (Figure II).

Le proton β dont le signal est situé à 1,23 ppm, est donc celui dont la constante de couplage au proton α est de 5 Hz, c'est d'après ce qui a été développé plus haut le proton β_2 .

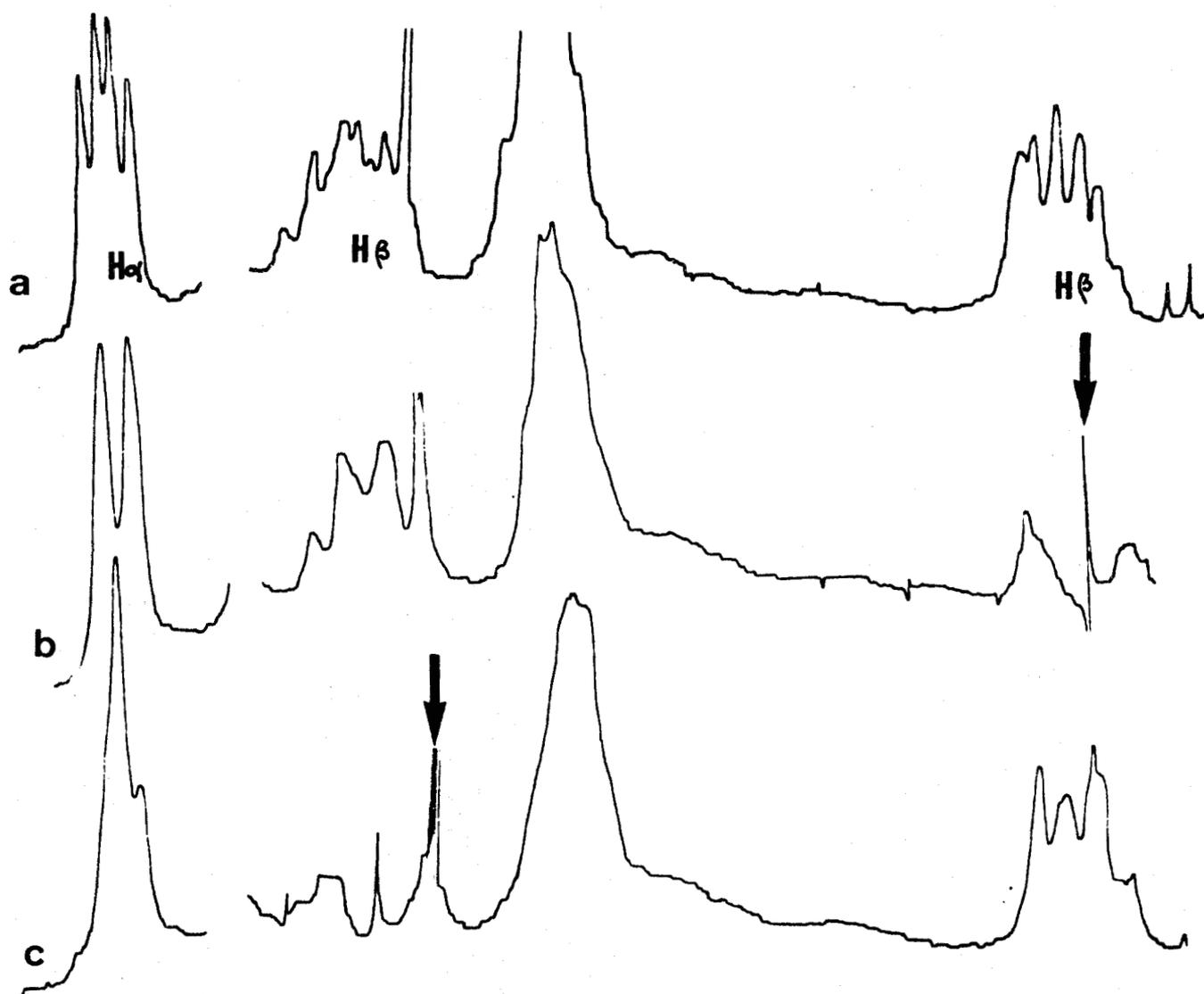


FIGURE II

Expériences d'irradiation des protons β du résidu Proline
(a) sans découplage, (b) irradiation à $\delta = 1,23$ ppm
(c) irradiation à $\delta = 1,95$ ppm

L'irradiation du second proton β Pro ($\delta = 1,95$ ppm) a donné une raie large, peu résolue, pour le signal H_{α} . Aucune mesure n'a donc pu être pratiquée, mais qualitativement le résultat obtenu signifie que l'on maintient cette fois un couplage plus faible, c'est-à-dire que l'on irradie le proton dont le couplage avec le proton α est de 8 Hz. Ce résultat ($\delta_{H\beta_2}$ Pro = 1,23 ppm) sera utilisé au chapitre suivant où une hypothèse sera proposée pour rendre compte du blindage qui s'exerce sur l'un des protons β Proline.

- β Tyr. L'analyse ABX du massif des protons β Tyrosine permet d'obtenir les populations des rotamères latéraux de la tyrosine (Tableau 2).

tg^-	tg^+	g^+g^-
85 %	13 %	2 %

TABLEAU 2

Distribution de la population des rotamères de la tyrosine de Gly Pro Tyr Gly

En comparaison des résultats obtenus pour le dérivé protégé correspondant (ch. III), la population du conformère tg^- , qui était déjà favorisée, augmente encore, surtout au détriment de g^+g^- . L'inéquivalence de ces deux protons est également en augmentation, elle passe de 0,3 ppm (t.Boc T₃ OCH₃) à 0,6 ppm pour le zwitterion. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour rendre compte de ce résultat.

1 - La modification de la distribution des rotamères a comme conséquence de modifier l'environnement moyen de chaque proton β Tyr, au plus l'un des rotamères sera favorisé, au plus la différence des déplacements chimiques sera marquée.

2 - La valeur moyenne de l'angle de rotation autour de la liaison $C_{\beta}C_{\gamma}$ du résidu tyrosine peut être changée : l'effet du courant de cycle du phényle sur chaque proton peut alors être modifiée.

3 - Les charges, en particulier celle du carboxylate assez proche, peuvent contribuer d'une manière appréciable à l'inéquivalence.

Il est probable que chaque effet participe, mais il n'est guère commode de déterminer la contribution de chacun d'eux : par exemple, si on essaie de préciser le rôle de la charge négative du carboxylate, on peut envisager de comparer les différences des déplacements chimiques des protons avant et après neutralisation de l'extrémité polaire, elle passe en effet de 0,6 à 0,3 ppm, mais pendant le même temps la distribution des rotamères a été modifiée, elle passe de 85 % à 68 %.

L'interprétation du spectre proton de Gly Pro Tyr Gly sous forme zwitterionique a permis d'établir que :

1 - La proportion d'isomère cis est réduite vis-à-vis de celle obtenue pour t.Boc Gly Pro Tyr Gly OCH_3 .

2 - Les couplages $^3J_{HNC_{\alpha}H}$ suggèrent une structure ordonnée.

3 - Le cycle pyrrolidine est en interconversion entre les formes endo et exo.

4 - Le proton β_2 est fortement blindé.

5 - Par rapport à t.Boc $T_3 OCH_3$, la proportion de tg^- augmente.

3 - Effet de température

Les variations des déplacements chimiques des protons NH des résidus Tyrosine 3 et Glycine 4 des isomères cis et trans ont été suivies en fonction de la température (Figure III).

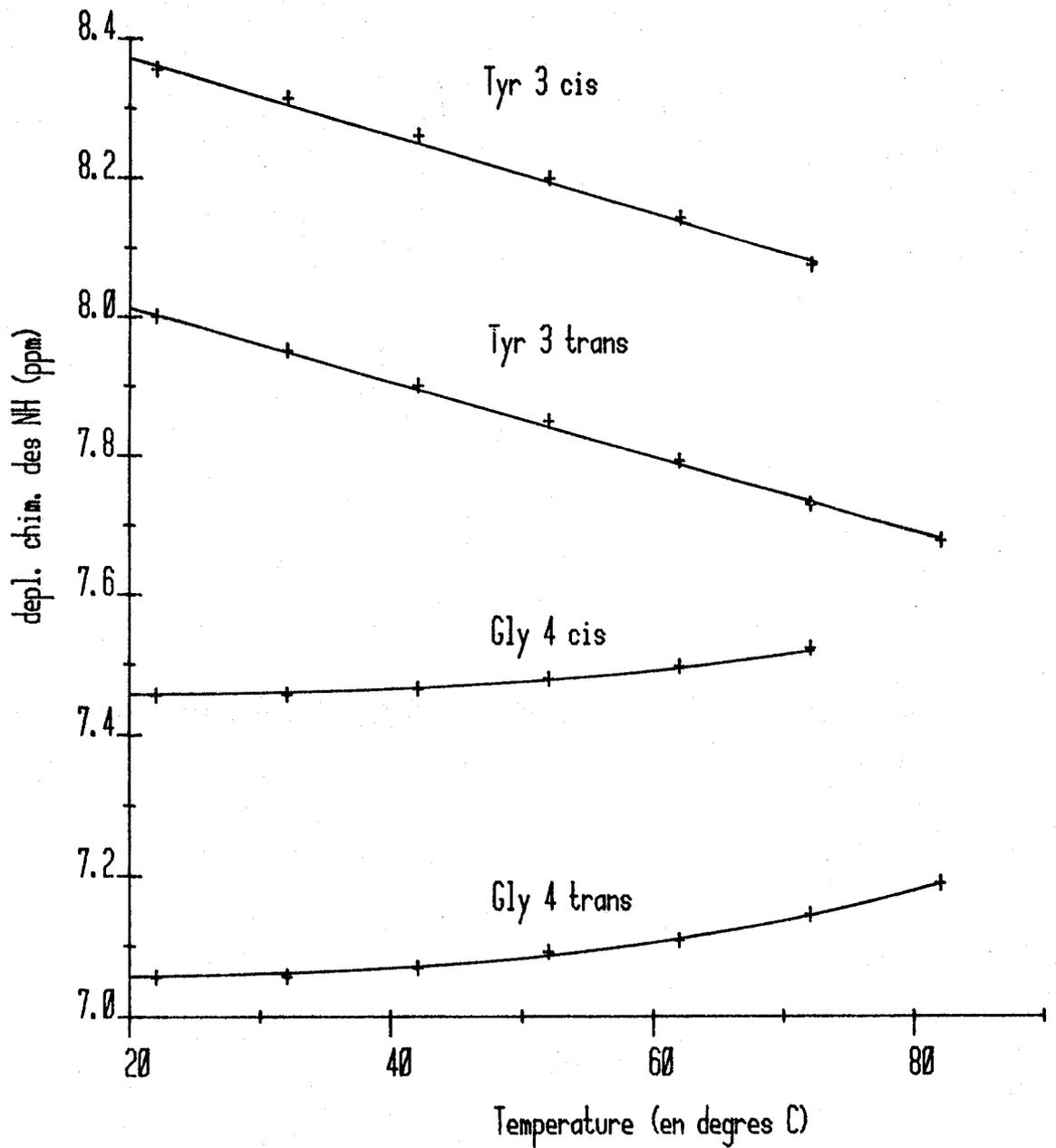


FIGURE III

Variations des déplacements chimiques des protons amides de Gly Pro Tyr Gly lors de l'effet de température (solvant DMSO)



Les résultats obtenus pour le zwitterion sont très différents de ceux rapportés pour le dérivé protégé correspondant (ch. III). Ils peuvent se résumer en quelques points essentiels.

1 - Les signaux des protons NH Tyr 3 (isomères cis et trans) glissent vers les hauts champs lorsque la température augmente. Les variations observées sont linéaires.

2 - Les protons NH Gly 4 (cis et trans) se déblindent lorsque la température croît. Dans un domaine restreint de température (de 20° à 60°), les variations peuvent être considérées comme quasi-linéaires et correspondent à des coefficients de température positifs (Tableau 3).

	Tyrosine 3	Glycine 4
cis	- 6,1	+ 0,6
trans	- 5,4	+ 1,4

TABLEAU 3

*Coefficients de température de Gly Pro Tyr Gly
(x 10³ ppm/°)*

Le signe positif observé ici pour le NH du résidu Gly 4 n'est pas un cas d'espèce, il a déjà été signalé dans la littérature surtout pour des tétrapeptides contenant la proline en seconde position et semble spécifique du caractère zwitterionique du dérivé (2).

En effet, si des pentes positives ont été observées lors des effets de température des zwitterions des séquences Gly Pro Asn Gly et Gly Pro Leu Gly, par contre pour les formes anionique et cationique de ces dérivés, des coefficients de température négatifs sont obtenus.

Les valeurs des coefficients de température obtenus pour Gly Pro Tyr Gly permettent d'établir :

1 - que les protons amides du résidu tyrosine 3 (isomères cis et trans) sont exposés au solvant.

2 - que les protons NH du résidu glycine 4 sont quant à eux peu accessibles aux molécules de solvant . Ils peuvent être engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires ou être protégés stériquement par leur environnement.

B - ETUDE DANS LE TRIFLUOROETHANOL

Les résultats de l'effet de température viennent d'être présentés et font apparaître l'inaccessibilité du NH Gly 4. La confirmation de ce résultat par la mise en oeuvre d'une seconde technique ne peut que justifier l'utilisation du caractère particulier du proton amide Gly 4 en vue de proposer une conformation pour notre dérivé. Cette seconde méthode, c'est l'effet de solvant dont le principe a déjà été décrit (Ch. IV).

Mais ici le couple de solvants DMSO - CDCl_3 ne peut pas être retenu, le zwitterion de Gly Pro Tyr Gly n'est pas soluble dans le chloroforme. C'est ce qui a conduit à retenir à sa place le trifluoroéthanol dont la littérature signale fréquemment l'usage comme solvant peu solvatant des protons NH (11).

Ce solvant possède des protons mobiles, il donne donc lieu à des réactions d'échange avec les protons amides. Aussi, pour essayer d'obtenir un maximum de renseignements, il est nécessaire de faire 2 spectres l'un avec du solvant deutérié, le second avec du solvant non deutérié.

1 - Avec le TFE d_3 , les résonnances de tous les protons non mobiles sont observées.

2 - Avec le TFE, on peut obtenir les résonnances des protons NH. Il a déjà été précisé que dans ce cas, il faut mettre en oeuvre une technique de suppression de lignes de solvant (avec le type de calculateur utilisé, on ne peut qu'irradier un seul type de protons : ceux du groupe méthylène ont été choisis).

Bien évidemment, des informations ne sont plus obtenues, en particulier avec l'utilisation du TFE d_3 , les couplages $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ sont supprimés.

Pour le TFE non deutérié et dans des conditions favorables, les signaux des protons α peuvent être observés, ce qui permet d'obtenir les $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$. Le couplage vicinal peut être obtenu par l'intermédiaire du signal NH correspondant qui est un doublet sauf pour le résidu glycine (on doit en principe observer un quadruplet si les protons H_α Gly sont inéquivalents, un triplet dans le cas contraire).

Mais l'élargissement de la raie dû au moment quadripolaire de l'azote rend très souvent impossible la mesure des constantes de couplage des protons amides et α des résidus glycine : le signal NH Gly est bien souvent dégénéré.

1 - Spectre XI et paramètres

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont reportés dans le tableau 4.

2 - Discussion

a - protons NH

Le couplage $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ (9,8 Hz) de la tyrosine reste identique à celui observé pour le spectre dans le DMSO (9,75 Hz), mais le signal est situé à champ plus élevé : il est à 7,37 ppm alors que pour le DMSO, il a été observé à 7,94 ppm. Ceci traduit bien la solvataion moins efficace du proton NH par le TFE.

En ce qui concerne le résidu glycine 4, l'allure du signal reste semblable à celle observée pour le spectre dans le DMSO : c'est un doublet. L'un des couplages $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ peut être mesuré directement : 8,3 Hz. L'autre trop faible vis-à-vis de la résolution spectrale a été estimé à 2 Hz en comparant les largeurs des raies NH Tyr et NH Gly. Le signal H_α Gly

Résidus	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	$H_{\alpha_1} = 4,05$ $H_{\alpha_2} = 3,77$	${}^2J_{\alpha_1\alpha_2} = 16,9$
Pro 2	$H_{\alpha} = 4,21$ $H_{\beta_1} = 2,14$ $H_{\beta_2} = 1,46$ $H_{\gamma} = 1,95$ $H_{\delta} = 3,60$	$J_{\alpha\beta_1} = 8,5$ $J_{\alpha\beta_2} = 5$
Tyr 3	$HN = 7,37$ $H_{\alpha} = 4,93$ $H_{\beta_1} = 3,48$ $H_{\beta_2} = 2,67$ $H_{ar} = 6,81 - 7,09$	${}^3J_{NHC_{\alpha}H_{\alpha}} = 9,8$ ${}^3J_{\alpha\beta_1} = 4$ ${}^3J_{\alpha\beta_2} = 12$ ${}^3J_{\beta_1\beta_2} = 14,1$
Gly 4	$HN = 7,22$ $H_{\alpha_1} = 4,41$ $H_{\alpha_2} = 3,49$	${}^3J_{HNC_{\alpha}H_{\alpha_1}} = 8,3$ ${}^3J_{NC_{\alpha}H_{\alpha_2}} = 2$ ${}^2J_{\alpha_1\alpha_2} = 18,1$



TABLEAU 4

Paramètres spectraux de Gly Pro Tyr Gly
 (solvant : TFE $T = 20^{\circ} C = 3.10^{-2}$ mole/l. réf TMS)

situé à $\delta = 4,41$ ppm est celui du proton α Gly 4 de configuration S (6) (il est composé de 4 raies - spectre TFE non deutérié - dont l'analyse établit que ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}\alpha}$ est de 8,3 Hz).

En conséquence, comme cela avait été obtenu pour le DMSO, ici encore le proton α_S de Gly 4 est celui qui est le plus couplé au proton amide.

La valeur élevée du couplage ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}\alpha_S}$ correspond sur le diagramme de Marraud et coll. (4) à une zone non dégénérée, alors que pour ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}\alpha_R}$ deux valeurs de θ sont possibles.

Les valeurs retenues sont :

$$\theta_S = 145^\circ$$

$$\theta_R = 45^\circ \text{ et } 110^\circ$$

Les valeurs des constantes de couplages 3J (Tyr et Gly) s'écartent ici encore des valeurs rapportées par Wüthrich et coll. (3) pour des séquences non ordonnées. C'est un premier argument en faveur d'une structure préférentielle.

b - protons H_α

Les protons H_α des résidus Gly 1 et Gly 4 donnent dans le TFE d_3 des quadruplets (spectre AB). Le problème de l'attribution des signaux respectivement à Gly 1 et Gly 4 s'est donc posé, il a été abordé de la manière suivante : de petites quantités de NaOD ont été introduites, l'extrémité N terminale est titrée, le signal le plus perturbé est celui du résidu Gly 1. Les couplages ${}^2J_{\text{HH}}$ de 16,9 Hz et 18,1 Hz ont ainsi pu être attribuées respectivement aux glycines 1 et 4. Ces valeurs correspondent bien à celles rapportées dans la littérature (12) pour les couplages 2J des résidus glycine en positions N et C terminales dans les séquences peptidiques. Le proton H_α Pro donne un quadruplet dont les constantes de

couplage ${}^3J_{\alpha\beta}$ sont de 8,5 Hz et 5 Hz. Celles-ci correspondent bien aux valeurs caractéristiques de l'interconversion endo-exo du cycle pyrrolidine, ce point a déjà été discuté.

c - protons β

Les résultats sont très voisins de ceux rapportés pour l'étude dans le DMSO :

- le proton β_2 Pro est fortement blindé
- l'analyse des couplages ${}^3J_{\alpha\beta}$ de la tyrosine indique une orientation tg^- très favorisée (90 %).

L'analyse des spectres de Gly Pro Tyr Gly dans le TFE (d_3 et non deutérié) a mis en évidence de nombreux points communs avec les conclusions de l'étude dans le DMSO. Ceci est vraisemblablement dû à des conformations très voisines du zwitterion en solution dans l'un et l'autre solvant.

3 - Effet de température

Nous avons fait varier la température et suivi les déplacements chimiques des protons amides. Celui de la tyrosine 3 a pu être obtenu jusqu'à 60°, mais le signal NH de Gly 4 a été recouvert par celui des résonnances des protons aromatiques au-delà de 50° (Fig.IV).

Les variations linéaires permettent d'obtenir les coefficients de température :

$$\text{NH Tyr 3} = - 6,5 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$$

$$\text{NH Gly 4} = - 2,9 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$$

Ces valeurs mettent en évidence l'accessibilité du proton NH Tyr 3 et la protection de celui du résidu Gly 4.

Il faut signaler que le coefficient de température obtenu pour le proton NH du résidu Gly 4 ($- 2,9 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$) est en deça de celui proposé par Urry et coll. (13) ($- 4 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$) pour un proton amide protégé de l'interaction avec le TFE.

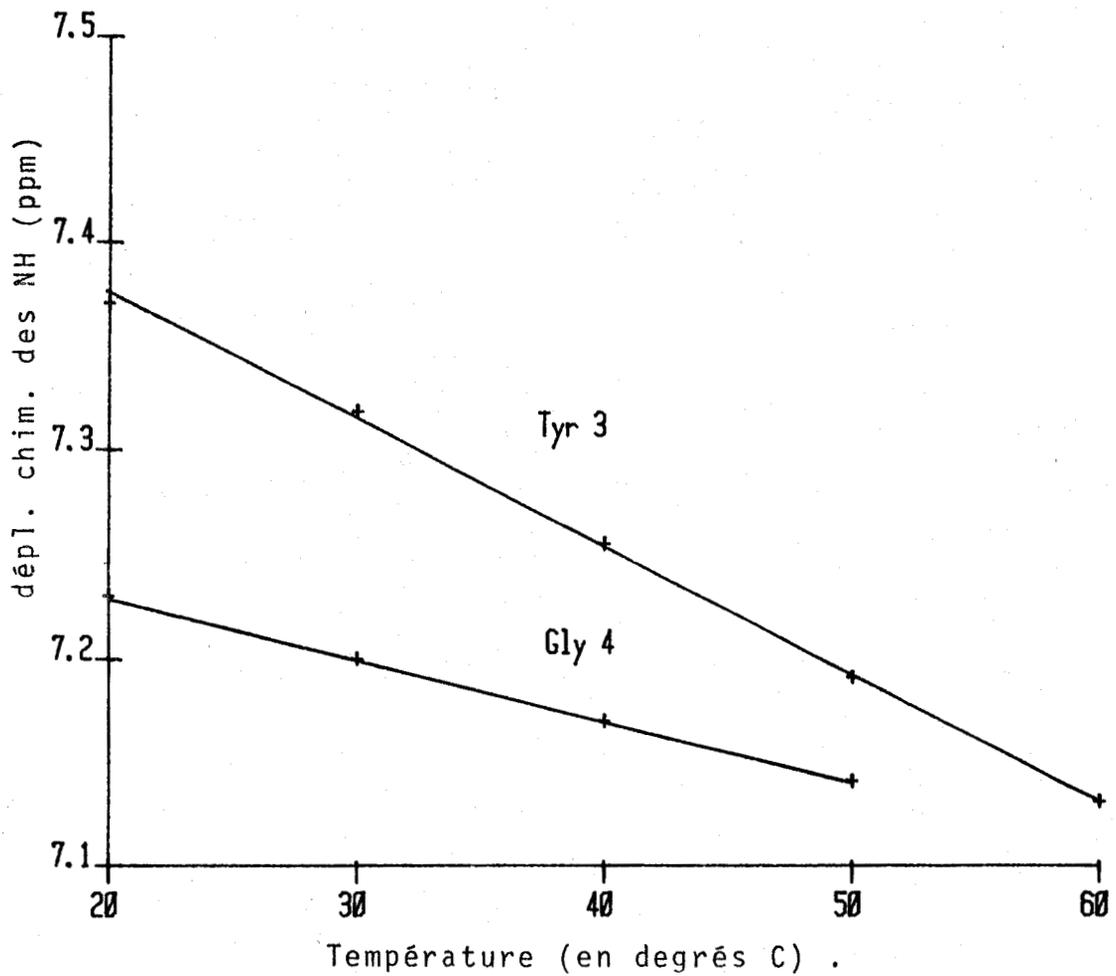


FIGURE IV

Variations des déplacements chimiques des protons amides de Gly Pro Tyr Gly lors de l'effet de température (solvant TFE)



C - EFFET DE SOLVANT

La méthode de l'effet de solvant a déjà été présentée. Mais il faut rappeler que les résultats (variations des déplacements chimiques) ne peuvent être analysés en terme d'accessibilité ou de protection que si pour chaque solvant, le dérivé adopte la même conformation.

Dans le cas contraire, des modifications de structure peuvent entraîner des variations de l'environnement magnétique et conduire à des résultats difficilement interprétables.

Les spectres de Gly Pro Tyr Gly en solution dans le DMSO ou le TFE viennent d'être présentés. Leur analyse a montré que de nombreux points communs existent ($^3J_{\text{NHC}_\alpha\text{H}}$, proton NH protégé, blindage du proton β_2 Pro, distribution des rotamères latéraux de la tyrosine...). Aussi on peut avancer l'hypothèse selon laquelle le dérivé adopte dans le TFE et le DMSO des conformations très proches. Les variations des déplacements chimiques obtenues lors de l'effet de solvant DMSO-TFE vont donc pouvoir être reliées directement à la solvataion plus ou moins efficace des protons amides.

Cependant, même dans l'hypothèse où seule la solvataion intervient, l'utilisation de solvants "acides" tels que le TFE peut conduire à des résultats dont l'interprétation n'est pas immédiate.

En effet, Schwyzer et Ludescher (14) ont attiré l'attention sur le fait que les solvants acides interagissent avec le carbonyle de la liaison peptidique: bien que le proton amide correspondant ne soit pas directement concerné par la solvataion, son déplacement chimique sera perturbé.

Ce point de vue a été repris et développé par Llinas et Klein (15) qui ont montré sur des modèles cycliques (ferrichrome C et alumichrome) que le signal d'un proton NH protégé du solvant glisse vers les bas champs lors de l'effet de solvant DMSO - TFE : ceci est la conséquence de la solvataion du carbonyle correspondant qui lui par contre est bien exposé.

Malgré cette possibilité d'obtenir, lors d'un effet de solvant, des effets composés, la méthode a permis d'obtenir des résultats démonstratifs, en particulier ceux rapportés par Urry et Pitner (16) pour la gramicidine S.

En ce qui concerne notre modèle, Gly Pro Tyr Gly, seules les résonances des protons amides de l'isomère trans ont pu être suivies.

Les résultats sont reportés sur la figure V.

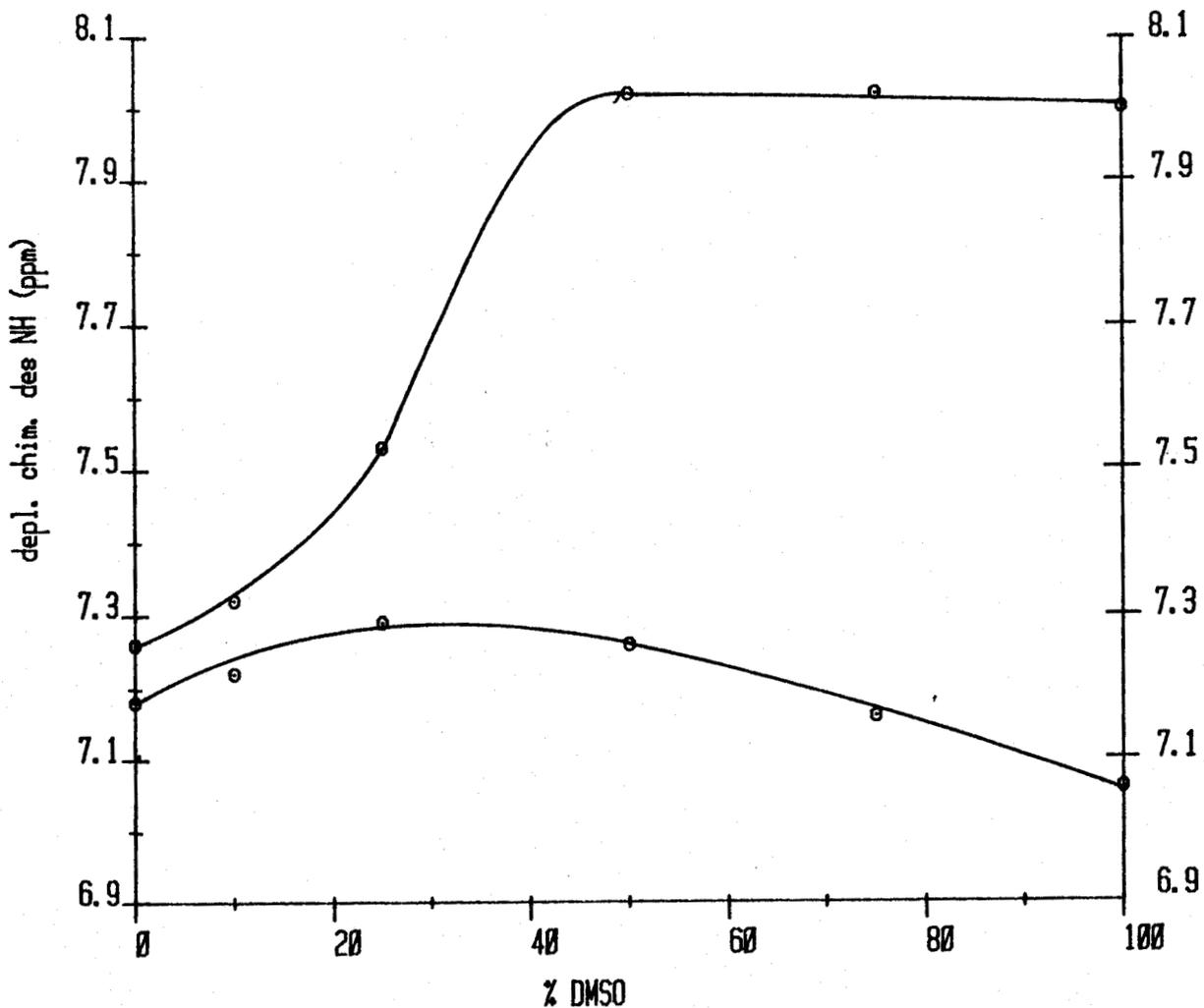


FIGURE V

Variations des déplacements chimiques des protons amides de Gly Pro Tyr Gly lors de l'effet de solvant

De l'examen de la figure V, quelques conclusions se dégagent :

1 - Le proton amide Tyr 3 se déblindé lorsqu'on ajoute du DMSO : il se solvate et on peut penser qu'il est bien accessible.

2 - Le déplacement chimique du proton NH Gly 4 est peu modifié lors de l'effet de solvant : il est protégé. De plus le léger déblindage observé pour le TFE pur est bien en accord avec les conclusions de Llinas et Klein (15) pour un proton NH peu accessible.

D - INTERPRETATION

Avant d'utiliser les conclusions des études qui viennent d'être présentées en vue de proposer une structure, plusieurs points doivent être discutés.

- 1 - La nature des extrémités N et C terminales.
- 2 - L'influence de la charge du carboxylate sur le comportement du proton NH Gly 4 (effets de température et de solvant).
- 3 - Le problème de l'agrégation des molécules de peptides.

a - extrémités N et C terminales

L'existence d'extrémités polaires ($^+NH_3$ et CO_2^-) a été récemment mise en cause par Schéraga et coll. (5) pour la Leu-enképhaline (Tyr Gly Gly Phe Leu) en solution dans le DMSO : l'addition de DCl perturbe surtout le signal du carbonyle du résidu tyrosine 1. Il y a donc protonation de l'extrémité N terminale, ce qui permet en conséquence de faire l'hypothèse d'extrémités non chargées (NH_2 , $COOH$).

En ce qui concerne notre peptide, une étude analogue à celle de Schéraga et coll. (5) n'a pas pu être entreprise, elle nécessite l'utilisation de dérivés dont le carbonyle du premier résidu est enrichi en ^{13}C pour qu'il puisse

être repéré sans ambiguïté sur le spectre. Mais, nous avons signalé plus haut que l'addition d'HCl à une solution de notre dérivé dans le DMSO fait glisser le signal du proton amide de Gly 4 vers les bas champs. Ce résultat peut s'expliquer par la titration de l'extrémité C terminale et en conséquence permet de proposer, pour Gly Pro Tyr Gly, l'existence de la forme zwitterionique qui est d'ailleurs généralement admise dans la littérature.

b - comportement du proton NH Gly 4

La charge négative du carboxylate peut créer dans son voisinage un effet de répulsion vis-à-vis des molécules de DMSO. En conséquence, l'approche du proton amide de Gly 4 peut être gênée. Aussi, les résultats des effets de température (et de solvant) peuvent être interprétés comme la conséquence d'un effet de densité d'électrons et ne pas avoir d'origine conformationnelle.

Pour réfuter cette interprétation, il faut donc montrer que le proton NH du résidu porteur de l'ion carboxylate possède, s'il est accessible, un coefficient de température caractéristique de son accessibilité.

Les résultats présentés par Toma et coll. (2) pour la séquence Z Gly Pro Leu Gly permettent d'apporter des éléments de réponse. En effet, les coefficients de température des protons amides de tous les résidus sont voisins de -4 à $-5 \cdot 10^{-3}$ ppm/°, aussi bien lorsque l'extrémité C terminale est neutralisée (CO_2H) que quand elle est ionisée (CO_2^-). Ces valeurs sont proches de celles généralement admises pour des protons NH accessibles (17) ; aussi, les valeurs obtenues pour le proton amide du résidu Gly 4 montrent que la présence du carboxylate ne modifie pas les résultats attendus d'un proton amide exposé au solvant. Les données bibliographiques permettent donc de rejeter l'hypothèse de la protection du proton amide de Gly 4 par la densité de charges : les résultats obtenus sont bien d'origine conformationnelle.

c - agrégation

Le problème de l'agrégation des zwitterions en solution dans le DMSO a été évoqué par Higashijima et coll. (18), (19) d'une part et Khaled et coll. (20) d'autre part.

Les résultats obtenus par ces derniers ont été contestés par Scheraga et coll. (5) : pour le même dérivé, ils n'ont en effet pas trouvé d'influence de la concentration sur les déplacements chimiques (jusqu'à $25 \cdot 10^{-3}$ molaire).

En ce qui concerne nos modèles, ce problème a été abordé par une technique différente de la RMN : la tonométrie. La masse molaire de l'entité en solution a été déterminée, elle n'est supérieure que de 10 % à la masse du monomère.

Les résultats RMN sont donc pour l'essentiel ceux correspondant à des espèces non agrégées.

d - conformation

Les données expérimentales appuient l'hypothèse d'une conformation préférentielle pour notre dérivé.

1 - Les valeurs des constantes 3J sont différentes de celles rapportées dans la littérature pour des structures non ordonnées.

2 - La forte inéquivalence des protons α Gly 4 traduit une diminution de la libre rotation

3 - Les effets de température et de solvant montre que le proton NH Gly 4 est protégé.

Disposant essentiellement des paramètres spectraux de l'isomère trans, seule la conformation de celui-ci est discutée ici.

Pour le résidu Gly 1, seule la valeur $^2J_{HH}$ est connue : 16,5 Hz, mais elle est difficilement analysable au moyen de la relation de Barfield (21) qui a été établie pour un résidu glycine dont les extrémités N et C terminales sont engagées dans des liaisons peptidiques, ce qui n'est pas le cas de Gly 1 de notre modèle (extrémité ^+N).

Il faut cependant signaler que la valeur 180° pour l'angle ψ Gly (d'une séquence Gly - Pro) a déjà été proposée (22).

En ce qui concerne le résidu Proline, les valeurs retenues sont $\phi = -60^\circ$ (cycle pyrrolidine) et $\psi = -35^\circ$ ou $+120^\circ$ (23).

Les valeurs possibles de ϕ Tyr 3 ont déjà été présentées : -100° et -140° . Le comportement spécifique du proton NH de Gly 4 permet d'écarter quelques valeurs. Il a déjà été signalé plus haut que la protection d'un proton amide est souvent interprétée en terme de sa participation à une liaison hydrogène intramoléculaire susceptible de stabiliser une conformation repliée. Mais cette protection peut également être d'origine stérique. En effet l'interaction électrostatique entre les extrémités polaires du peptide peut conduire à stabiliser une conformation repliée dans laquelle le proton NH Gly 4 reste tourné vers l'intérieur de la structure (ce qui le place hors d'atteinte des molécules de solvant).

Il est difficile de choisir entre ces deux hypothèses, mais du point de vue pratique, il est intéressant de noter qu'elles aboutissent toutes les deux à proposer un repliement de structure.

La valeur ψ Pro = $+120^\circ$ est écartée : cette valeur jointe à celles de ϕ Tyr (-100° ou -140°) ne permet pas de replier autour de Pro Tyr. Les valeurs ϕ Pro 2 = -60° , ϕ Tyr 3 = -100° sont celles qui caractérisent le repliement de type β_I : elles sont retenues. Nous n'avons pas d'arguments expérimentaux pour rejeter ϕ Tyr 3 = -140° mais avec cette valeur, la protection de NH Gly 4 demande que les autres angles dièdres (ϕ Pro, ψ Pro, ψ Tyr) s'écartent des valeurs stables rapportées dans la littérature pour les repliements de structure (24).

Pour le résidu Gly 4, porteur de l'ion carboxylate, la relation $^3J = f(\theta)$ doit être utilisée avec précaution. La littérature signale en effet l'influence de l'électronégativité sur la constante $^3J_{\text{NHC}_\alpha\text{H}}$ (25); mais à notre connaissance les termes correctifs pour prendre en compte l'influence de la

charge négative ne sont pas connus. Aussi, pratiquement, les résultats qui apparaissent dans la littérature sont obtenus à partir de la relation sous sa forme d'origine, c'est ce qui a également été fait dans le cadre de ce travail. Les valeurs θ_S (0° et 135°) et θ_R (45° et 110°) permettent de proposer 2 valeurs possibles pour $\phi_4 = +160^\circ$ ou $+90^\circ$ (Fig. VI).

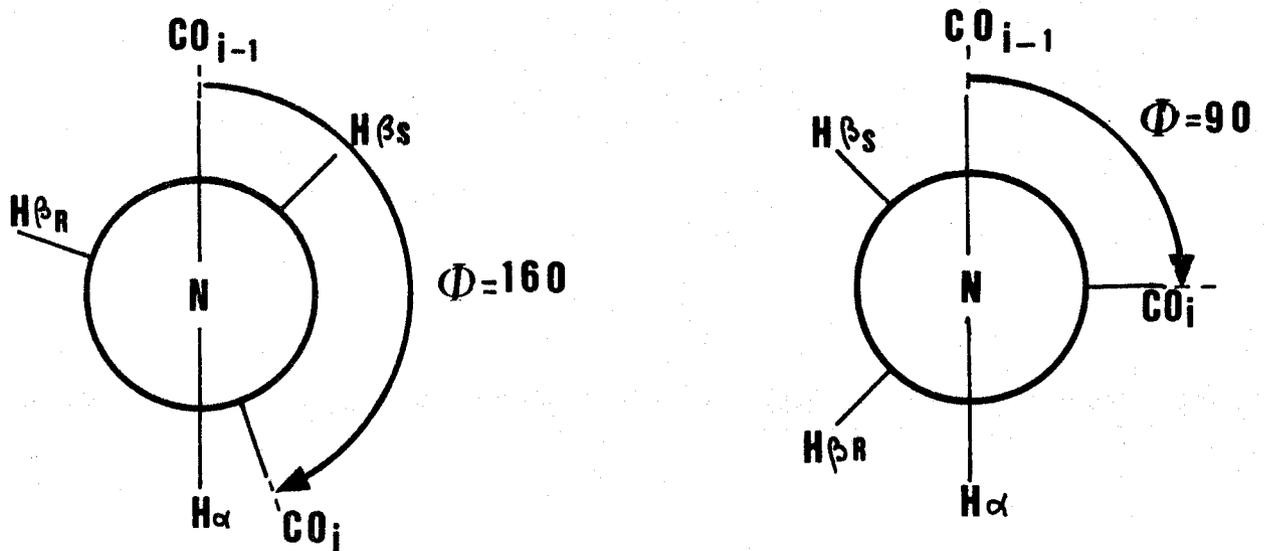


FIGURE VI

Représentations des valeurs possibles de l'angle ϕ du résidu Gly 4 de la séquence Gly Pro Tyr Gly

Les valeurs $\theta_S = 135^\circ$ et $\theta_R = 110^\circ$ ($\phi_4 = 160^\circ$) correspondent à un angle de valence ($H_{\alpha_S} C H_{\alpha_R}$) de 115° , alors que $\theta_S = 135^\circ$ et $\theta_R = 45^\circ$ ($\phi_4 = +90^\circ$) donnent pour ($H_S C_\alpha H_R$) : 90° .

Mais les deux valeurs de ϕ_4 doivent être retenues; en effet utiliser comme critère de choix la valeur de l'angle de valence n'est pas justifié : il a été précisé que l'application de la corrélation $^3J = f(\theta)$ n'aboutit qu'à proposer des valeurs approchées de θ .

Sur la figure VII une conformation possible de notre modèle est représentée.

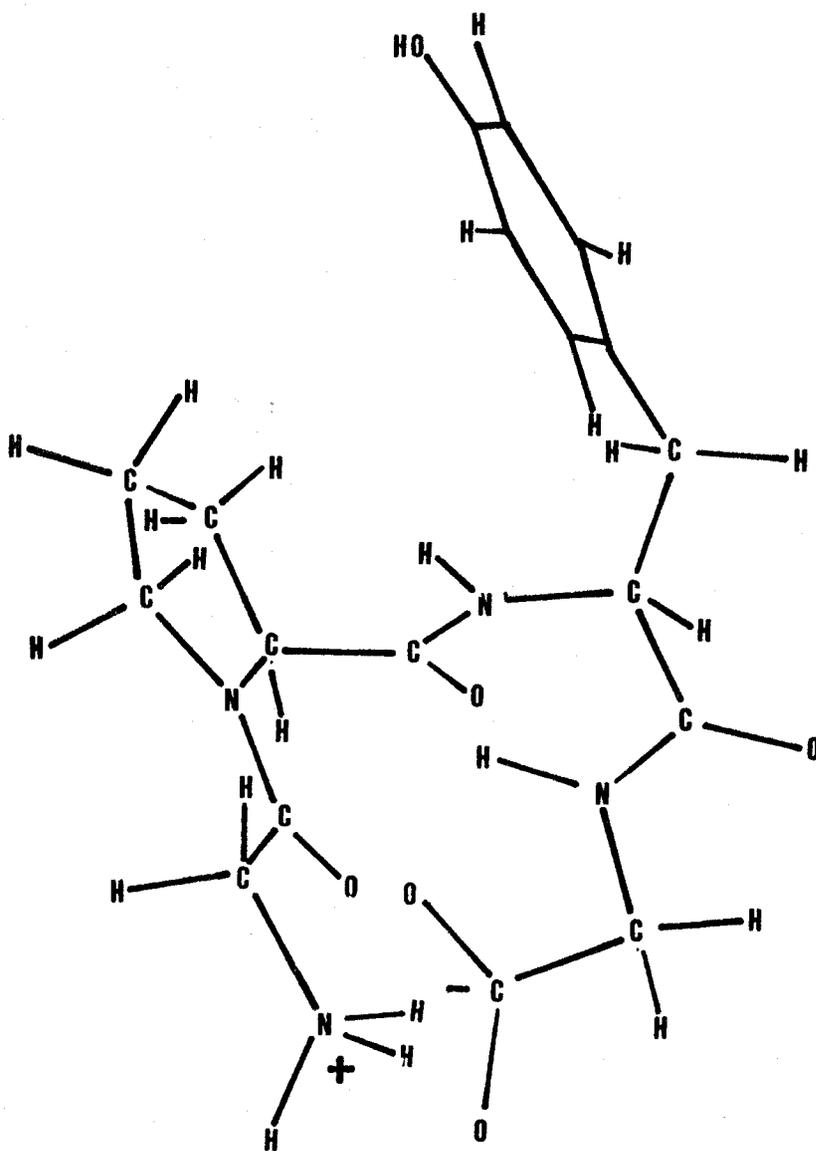


FIGURE VII

Représentation de la conformation de Gly Pro Tyr Gly



Enfin, il faut signaler que le résultat concernant la conformation flexible du cycle pyrrolidine est en accord avec ceux rapportés et interprétés par Toma et coll. pour Gly Pro Asn Gly et Gly Pro Leu Gly (2) : la participation du résidu proline 2 à un repliement β (type I) favorise l'interconversion rapide des conformères endo - exo de la chaîne latérale proline.

e - stabilisation de la forme repliée

Les résultats de l'effet de température ont mis en évidence des comportements analogues du proton amide Gly 4 des isomères cis et trans (les coefficients respectifs sont $+ 0,6.10^{-3}$ et $+ 1,4.10^{-3}$ ppm/°).

En conséquence, on peut penser que l'isomère cis adopte également une conformation repliée autour de la séquence Pro 2 Tyr 3.

Une première hypothèse pour rendre compte de la stabilisation de la forme repliée, c'est d'envisager l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire entre le proton amide de Gly 4 et le carbonyle de Gly 1 (26) et ceci aussi bien pour l'isomère cis que pour l'isomère trans.

A partir de données cristallographiques concernant Z Gly Pro Leu Gly, Toma et coll. (2) ont fait remarquer que l'axe de la liaison NH Gly 4 s'oriente perpendiculairement par rapport au plan de la liaison peptidique Gly - Pro. Aussi une rotation de 180° du plan de celle-ci (Isomérisation cis-trans) ne modifie pas les positions relatives du proton amide de Gly 4 et du carbonyle de Gly 1. Les comportements analogues du proton NH Gly 4 de chaque isomère (effet de température) pourraient alors être interprétés sur cette base.

Nous pensons cependant qu'il faut moduler cette hypothèse. Des signaux spécifiques du proton NH Gly 4 des isomères cis et trans sont observés (DMSO), aussi bien pour notre dérivé que pour ceux décrits dans la littérature (2) : Gly Pro Leu Gly et Gly Pro Asn Gly.

Les déplacements chimiques des protons peptidiques concernés dépendent donc de l'état de la conformation de la liaison amide Gly - Pro (cis ou trans) : l'axe de la liaison H - N n'est certainement pas tout à fait perpendiculaire au plan peptidique de Gly - Pro. Si la liaison hydrogène NH Gly 4CO Gly 1 participe fondamentalement à la stabilisation de la structure repliée, l'étude de l'effet de température sur un dérivé dont la chaîne est allongée d'un résidu du côté C terminal doit encore donner pour le proton amide Gly 4 un coefficient de température caractéristique (on suppose que le repliement se fait toujours autour de Pro 2 Tyr 3).

C'est pour cette raison que la synthèse de Gly Pro Tyr Gly Ala a été effectuée. L'effet de température a permis d'obtenir les coefficients de température des protons amides Gly 4 et Ala 5 (isomère trans) :

$$\begin{array}{ll} \text{pour NH Gly 4} & \Delta\delta/\Delta T = - 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/}^\circ \\ \text{pour NH Ala 5} & \Delta\delta/\Delta T = - 1,6 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/}^\circ \end{array}$$

Les résultats montrent que le proton amide du résidu Ala 5 (porteur de l'ion carboxylate) est protégé du solvant et celui du résidu Gly 4 un peu plus accessible.

La valeur du coefficient de température du proton amide de Gly 4 laisse tout de même supposer la participation de la liaison hydrogène NH Gly 4... CO Gly 1 à la stabilisation du repliement. Mais il apparaît clairement que l'interaction électrostatique entre les extrémités polaires permet de placer le proton NH Ala 5 hors d'atteinte des molécules de solvant : il est tourné vers l'intérieur de la structure repliée et sa protection est maintenue grâce à la rigidité de son environnement. Compte tenu de la valeur du coefficient de température du NH Ala 5, il semble donc que l'interaction électrostatique joue un rôle déterminant dans la stabilisation du repliement.

Il est intéressant, pour appuyer cette hypothèse, de considérer quelques données bibliographiques.

Les valeurs des coefficients de température des protons amides de Gly Pro Leu Gly et Gly Pro Asn Gly (2) dépendent de la nature des extrémités de la chaîne peptidique (protégée, zwitterionique, cationique ou anionique). Les résultats montrent qu'en passant de la forme zwitterionique (pour laquelle un repliement β_I a été proposé) à la forme protégée (ou cationique), la structure devient davantage flexible.

Si seule la liaison hydrogène évoquée plus haut intervient pour stabiliser le repliement, les résultats sont difficilement interprétables, par contre en envisageant l'hypothèse de l'interaction électrostatique on peut rendre compte du repliement du zwitterion et de l'augmentation de la flexibilité lorsque l'une des extrémités est neutralisée.

L'étude du spectre RMN proton de Gly Pro Tyr Gly dans deux solvants (DMSO et TFE) et les résultats des effets de température et de solvant permettent de proposer pour ce dérivé une structure repliée de type β_I (autour de la séquence Pro Tyr).

Les résultats sont en accord avec ceux rapportés récemment pour deux peptides voisins : Gly Pro Asn Gly et Gly Pro Leu Gly. Les coefficients de température obtenus pour Gly Pro Tyr Gly Ala permettent de faire l'hypothèse du rôle essentiel de l'interaction entre les extrémités polaires N et C terminales.

II - Gly Pro Gly Tyr

A - ETUDE DANS LE DMSO

1 - Spectre (XII) et paramètres spectraux

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont reportés dans le tableau 5, entre parenthèses figurent les paramètres de l'isomère cis.

Résidu	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	$H_{\alpha} = 3,28$	
Pro 2	$H_{\alpha} = 4,28$ $H_{\beta, \alpha} = 1,8$ $H_{\delta} = -$	
Gly 3	HN = 8,33 (8,60) $H_{\alpha_1} = 3,67$ $H_{\alpha_2} = 3,47$	$\Sigma^3 J = 11,5$ ${}^3 J_{\text{HNC}_{\alpha} H_{\alpha_1}} = 6,5$ ${}^3 J_{\text{HNC}_{\alpha} H_{\alpha_2}} = 5,5$
Tyr 4	HN = 7,23 (7,52) $H_{\alpha} = 3,96$ $H_{\beta} \sim 2,9 - 2,7$ $H_{\text{ar}} = 6,55 - 6,85$	${}^3 J_{\text{HNC}_{\alpha} H_{\alpha}} = 7$

TABLEAU 5

Paramètres spectraux de Gly Pro Gly Tyr
(solvant DMSO - $T^{\circ} = 20^{\circ}\text{C}$ - $C = 3.10^{-2}$ mole/l réf TMS)



2 - Discussion

La résolution spectrale n'est pas excellente, aussi certains signaux n'ont pas pu être analysés (en particulier H_{β} Tyr).

Des résonances des protons amides des isomères cis et trans ont été observées, elles ont permis de mesurer la proportion de chacun d'eux : la quantité d'isomère cis est de 22 %, elle est identique à celle observée pour le peptide protégé correspondant. Les protons α du résidu Gly 1 sont équivalents : un singulet est observé, ce résultat peut correspondre à une flexibilité plus élevée de ce résidu en comparaison du Gly 1 de Gly Pro Tyr Gly ($\Delta\delta = 0,08$ ppm). Les protons α de Gly 3 sont quant à eux inéquivalents. Les couplages 3J avec le proton amide sont de 6,5 Hz pour le H_{α} situé à bas champ (proton S) et de 5,5 Hz pour le H_{α} situé à haut champ (proton R). Ces valeurs sont proches de celles rapportées par Marraud et coll. (27) pour le résidu Gly d'une séquence Pro Gly (t.But Pro Gly NH Me) 6,3 Hz et 5,7 Hz (dans le DMSO).

Les protons γ , β Proline ont des déplacements voisins (le massif trop complexe ne permet pas une analyse détaillée), mais il faut noter l'absence du glissement vers les hauts champs du proton β_2 . L'éloignement du résidu Tyrosine laisse penser que le substituant aromatique joue un rôle essentiel dans le blindage observé sur le β_2 Pro de Gly Pro Tyr Gly.

3 - Variation de température

Les variations des déplacements chimiques des protons amides des résidus Gly 3 et Tyr 4 ont été étudiés en fonction de la température (Fig VIII) (Isomères cis et trans).

Les coefficients de température sont rassemblés dans le tableau 6.

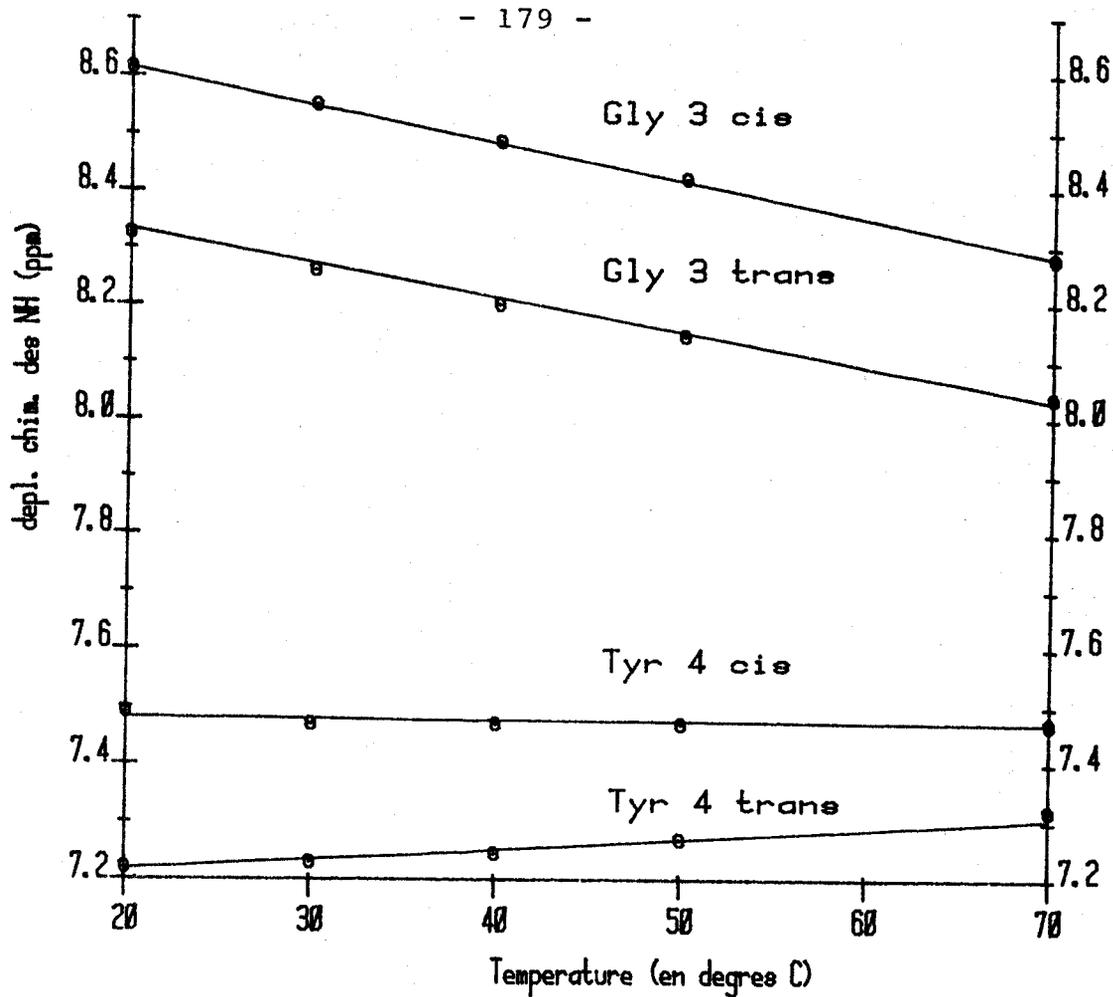


FIGURE VIII

Variations des déplacements chimiques des protons amides de Gly Pro Gly Tyr lors de l'effet de température (solvant DMSO)

	cis	trans
NH Gly 3	- 6,7	- 6,0
NH Tyr 4	0	+ 1,2

TABLEAU 6

Coefficients de température des protons amides de Gly Pro Gly Tyr ($\times 10^{-3}$ ppm/°)



L'examen des valeurs du tableau 6 montre que quel que soit l'isomère, le proton NH Tyr 4 est protégé du solvant, alors que celui du résidu Gly 3 est bien accessible.

Il faut rappeler que pour t.Boc T₄OCH₃, les protons amides des 3ème et 4ème résidus sont bien accessibles.

Les résultats de l'effet de température permettent d'avancer l'hypothèse d'une conformation préférentielle.

B - ETUDE DANS LE TFE

1 - Spectre (XIII) et paramètres spectraux

Les déplacements chimiques et les paramètres spectraux sont rassemblés dans le tableau 7.

2 - Discussion

Quelques différences apparaissent par rapport au spectre de ce peptide dans le DMSO : l'inéquivalence des protons α Gly 1 et Gly 3 augmente. Elle passe pour Gly 1 de 0 ppm (DMSO) à 0,12 ppm (TFE); pour Gly 3 de 0,3 ppm (DMSO) à 0,6 ppm (TFE). Ceci est peut-être dû à une diminution de la libre rotation autour des liaisons simples : le peptide serait alors un peu plus structuré. Le massif des protons H _{β} Tyr a été analysé, les populations des rotamères latéraux sont : $tg^- = 27\%$ $tg^+ = 20\%$ $g^+g^- = 53\%$. Il faut rappeler que pour t.Boc T₄OCH₃, pour lequel une structure statistique a été proposée, les résultats sont $tg^- = 53\%$ $tg^+ = 31\%$ $g^+g^- = 16\%$.

Le rotamère tg^+ oriente vers l'extrémité C terminale, aussi le passage de 31 % (t.Boc T₄OCH₃) à 20 % peut s'interpréter par la répulsion entre le phényle et le CO₂⁻. Mais tg^- , qui correspond à l'orientation qui éloigne le plus le phényle et l'ion carboxylate diminue aussi (de 53 % à 27 %). Nous pensons que ceci est la conséquence d'une modification de la conformation de la chaîne principale lorsque l'on enlève les protections N et C terminales (1).

Résidu	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	$H_{\alpha_1} = 3,69$ $H_{\alpha_2} = 3,57$	${}^3J_{\alpha_1\alpha_2} = 16,3$
Pro 2	$H_{\alpha} = 4,46$ $H_{\beta,\gamma} = 2,17$ $H_{\delta} = 3,45$	$\Sigma {}^3J_{\alpha\beta} = 12$
Gly 3	$HN = 7,43$ $H_{\alpha_1} = 4,31$ $H_{\alpha_2} = 3,68$	$\Sigma {}^3J_{HNC_{\alpha}H} = 11,5$ ${}^2J_{\alpha_1\alpha_2} = 17,5$
Tyr 4	$HN = 6,95$ $H_{\alpha} = 4,53$ $H_{\beta_1} = 3,11$ $H_{\beta_2} = 3,04$ $H_{ar} = 6,78 - 7,08$	${}^3J_{HNC_{\alpha}H_{\alpha}} = 7$ $J_{\alpha\beta_1} = 4,8$ $J_{\alpha\beta_2} = 5,6$

TABLEAU 7

Paramètres spectraux de Gly Pro Gly Tyr
 (solvant TFE - 25°C - C = 3.10⁻² mole/l)



C - VARIATION DE SOLVANT (DMSO - TFE)

Seuls les protons amides de l'isomère trans ont pu être suivis. Les résultats apparaissent sur la figure IX.

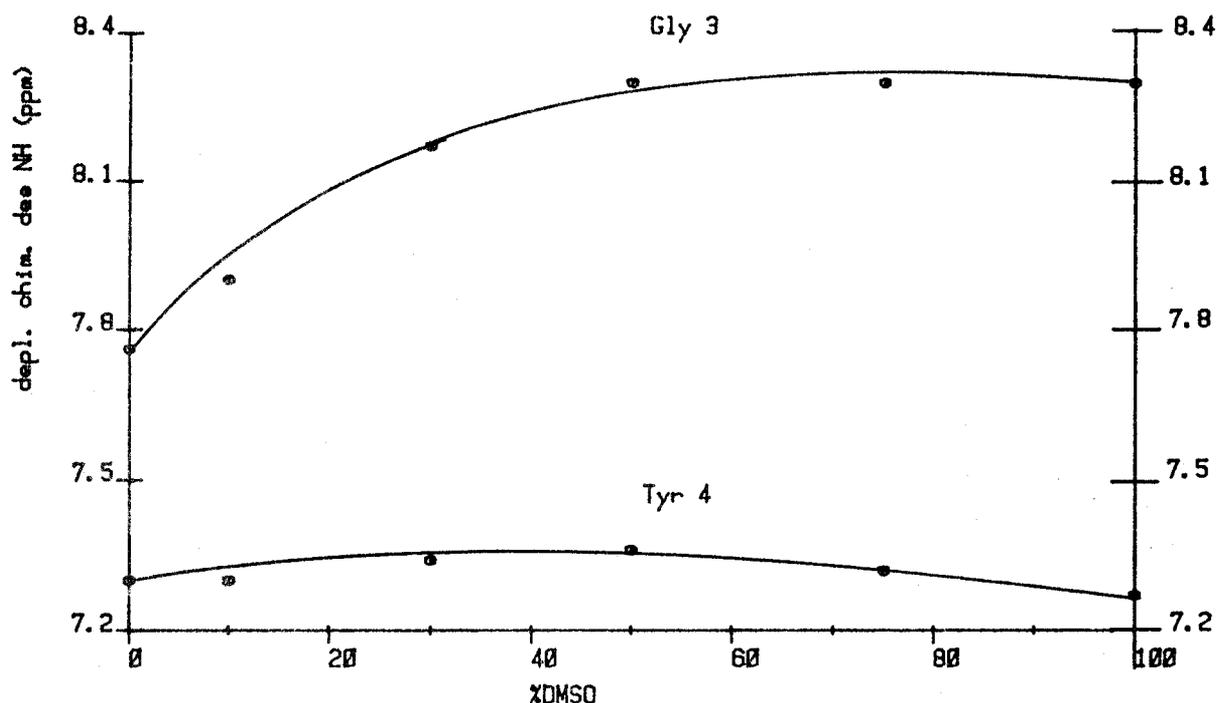


FIGURE IX

Variations des déplacements chimiques des protons amides de Gly Pro Gly Tyr lors de l'effet de solvant

L'examen de la figure IX montre que le proton amide Gly 3 se déblindé quand on ajoute du DMSO, contrairement à ce qui est observé pour le proton amide du résidu tyrosine 4.

Par conséquent, le proton NH Gly 3 se solvate : il est accessible alors que celui de Tyr 4 est protégé.

Ces conclusions rejoignent celles issues de l'effet de température.

Remarque : il a déjà été signalé que pour utiliser les résultats d'un effet de solvant en terme d'accessibilité, il faut que les structures soient voisines dans chaque solvant (DMSO et TFE). En particulier, les constantes ${}^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ doivent

conduire à retenir des valeurs proches des angles ϕ . Mais pour le TFE, celles-ci n'ont pas pu être extraites du spectre. Cependant, les résultats obtenus pour l'effet de solvant justifient a posteriori la mise en oeuvre de la méthode : si la structure de notre peptide dans le DMSO est très différente que celle dans le TFE, les variations des déplacements chimiques des NH vont être plus complexes que ce qui est rapporté ici (en particulier pour NH Tyr 4).

D - INTERPRETATION

Compte tenu des informations spectrales disponibles, seule la conformation de l'isomère trans (solvant DMSO) est discutée ici. Les résultats des effets de température et de solvant permettent de proposer pour notre modèle l'existence d'une conformation favorisée. Aussi les constantes 3J entre protons amides et α de Gly 3 peuvent être analysées en vue de proposer des valeurs pour l'angle ϕ correspondant.

En appliquant la relation de Marraud et coll., on obtient :

$$\theta_R = 20^\circ \text{ ou } 130^\circ$$

$$\theta_S = 140^\circ$$

A ces valeurs correspondent 2 solutions permises pour ϕ Gly 3

$$\theta_S = 140^\circ \text{ et } \theta_R = 20^\circ \quad \rightarrow \quad \phi \text{ Gly 3} = + 80^\circ$$

$$\theta_S = 140^\circ \text{ et } \theta_S = 130^\circ \quad \rightarrow \quad \phi \text{ Gly 3} = + 180^\circ$$

L'examen des modèles moléculaires correspondant montre que pour ϕ Gly 3 = 180° , il n'est pas aisé de rendre compte de la protection du proton NH Tyr 4. Par contre ϕ Gly 3 = $+ 80^\circ$ est une valeur intéressante, jointe à celle de ϕ Pro 2 = $- 60^\circ$ on obtient les valeurs nécessaires au repliement de type β_{II} . La structure peut être stabilisée, comme cela a déjà été dit, par l'établissement d'une liaison hydrogène NH Tyr... CO Gly 1, et par une interaction électrostatique entre les extrémités polaires.

En ce qui concerne le résidu Tyr 4, la valeur retenue pour ϕ est -160° ($J = 7$ Hz), cette valeur est préférée à -80° (autre valeur possible) qui correspond à une conformation dans laquelle de fortes interactions stériques existent (cf. Chapitre IV - t.Boc T₄ OCH₃) (28).

La figure X représente la conformation probable du modèle.

Il faut ajouter que l'isomère cis est très vraisemblablement replié également autour de Pro 2 Gly 3 si l'on se réfère aux résultats de l'effet de température.

En conclusion, l'ensemble des données expérimentales ($^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}}$, effets de température et de solvant) permet de faire l'hypothèse d'une structure repliée (β_{II}) pour Gly Pro Gly Tyr.

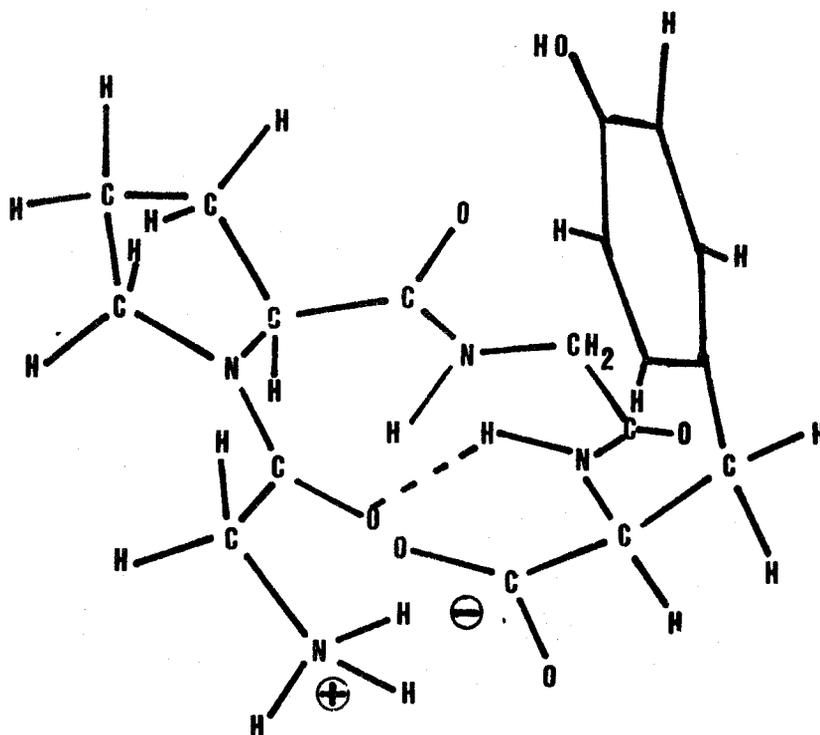


FIGURE X

Représentation de la conformation de Gly Pro Gly Tyr

III - Tyr Pro Gly Gly

Seule l'étude dans le DMSO sera décrite, les signaux du spectre dans le TFE n'ont pas été très nettement attribués, en particulier les résonnances NH se recouvrent.

1 - Spectre (XIV) et paramètres

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont reportés dans le tableau 8, les valeurs entre parenthèses se rapportent à l'isomère cis.

2 - Discussion

La quantité d'isomère cis est importante, elle représente 40 % des produits, alors que pour le modèle correspondant protégé seulement 10 % d'isomère cis ont été observés.

En tenant compte de la quantité importante de cet isomère, on s'attend à un spectre très fouillé, et en fait il est d'une simplicité décevante : les résonnances H_{α} Gly 3 et 4 se présentent sous forme de doublets (équivalence), alors que pour les 2 modèles qui viennent d'être décrits, des octuplets (spectre AB d'un ABX) ont été observés (Gly 4 de Gly Pro Tyr Gly et Gly 3 de Gly Pro Gly Tyr). Ceci est un inconvénient majeur pour l'analyse conformationnelle par RMN : on ne dispose pas des couplages spécifiques du proton amide et des protons α R et S des résidus Glycine. Les valeurs des angles θ_R et θ_S ne peuvent pas être précisées.

Les protons NH Gly 3 des isomères cis et trans donnent des signaux RMN distincts, alors qu'un massif commun est obtenu pour les protons NH Gly 4 de ces 2 isomères.

Les résonnances des protons aromatiques sont bien séparées : la différence entre les protons ortho et est 0,31 ppm pour l'isomère cis et 0,38 ppm pour le trans.

L'analyse des massifs H_{β} Tyr (cis et trans) fournit les populations des rotamères latéraux de la tyrosine (Tableau 9).

Résidu	δ (ppm)	J (Hz)
Tyr 1	$H_{\alpha} = 4,05$ $H_{\beta_1} = 2,94$ $H_{\beta_2} = 2,71$ $H_{ar} 2,6 = 7,07(6,97)$ $H_{ar} 3,5 = 6,69(6,66)$	$J_{\alpha\beta_1} = 6,3$ $J_{\alpha\beta_2} = 6,8$
Pro 2	$H_{\alpha} = 4,34$ $H_{\beta,\gamma} = 1,81-2,05$ $H_{\delta} = 3,22$	$J_{\alpha\beta_1} = 8,5$ $J_{\alpha\beta_2} = 5$
Gly 3	$HN = 8,2 (8,45)$ $H_{\alpha} = 3,73 (3,67)$	$\Sigma J = 11,5$ ${}^3J_{HNC_{\alpha}H_{\alpha}} = 5,6$
Gly 4	$HN = 7,90 (c+t)$ $H_{\alpha} = 3,67-3,61 (c+t)$	${}^3J = 5,6$

TABLEAU 8

Paramètres spectraux de Tyr Pro Gly Gly
 (solvant DMSO - $T = 30^{\circ}C$ - $C = 3.10^{-2}$ mole/l.)



	trans	cis
tg ⁻	49	58
tg ⁺	27	22
g ⁺ g ⁻	24	20

TABLEAU 9

Populations des rotamères latéraux de la Tyrosine de Tyr Pro Gly Gly

En comparaison des résultats obtenus pour t.Boc T₁ OCH₃, la proportion de tg⁺ augmente (elle passe de 11 à 27 % - isomère trans -) au détriment du tg⁻.

3 - Effet de température

a - protons amides

Les variations des déplacements chimiques des protons amides sont reportées sur la figure XI.

Quelques conclusions peuvent être tirées :

1 - Les coefficients de température des protons NH Gly 3 (isomère cis et trans) sont ceux attendus de protons accessibles :

$$\text{cis : } \Delta\delta/\Delta t = - 7,1 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$$

$$\text{trans : } \Delta\delta/\Delta t = - 5,1 \cdot 10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$$

2 - La pente nulle observée pour le signal NH Gly 4 caractérise un proton protégé du solvant.

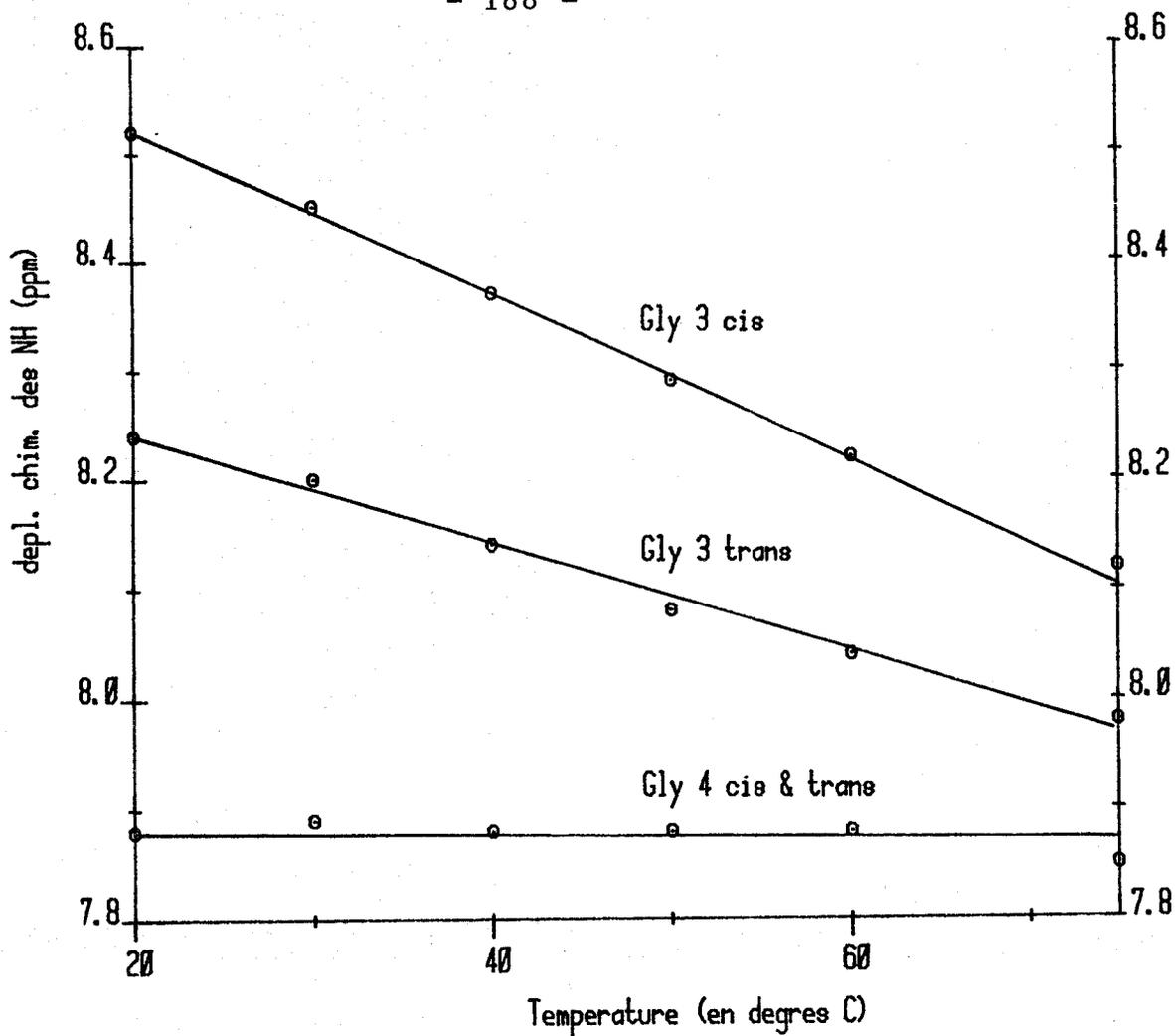


FIGURE XI

Variations des déplacements chimiques des protons amides de Tyr Pro Gly Gly lors de l'effet de température

b - protons β tyrosine

L'élévation de la température a modifié l'allure du signal des protons β de la tyrosine de l'isomère cis. Les spectres suivants montrent que les 2 protons β Tyr (cis) deviennent équivalents à 60° : ils apparaissent sous la forme d'un doublet.

Par contre, les protons β Tyr de l'isomère trans restent inéquivalents dans ce domaine de température (Figure XII).

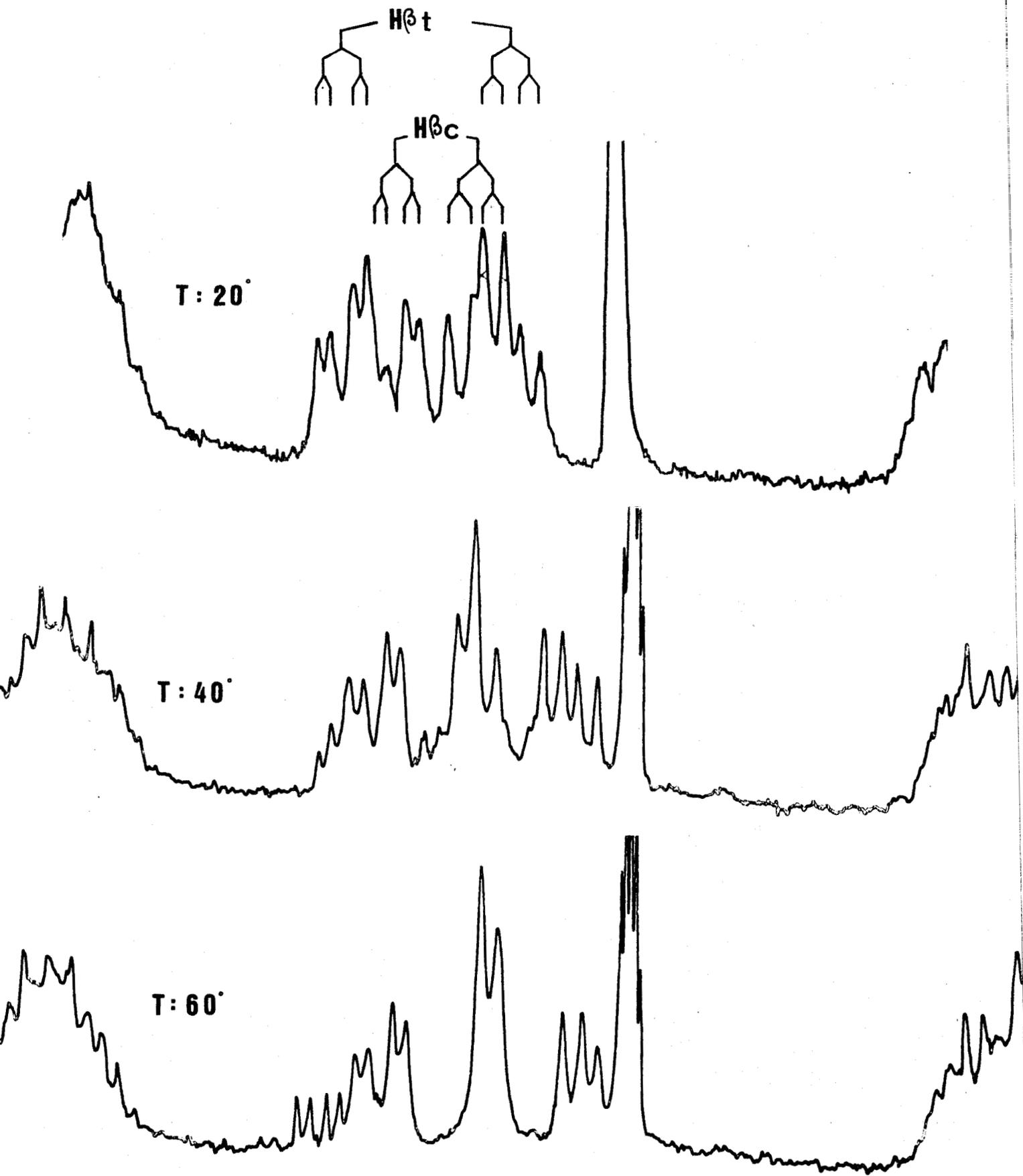


FIGURE XII
Massifs $H\beta$ Tyrosine de Tyr Pro Gly Gly
en fonction de la température

BUS
LILLE

4 - Interprétation

a - conformation

Les valeurs nulles des coefficients de température de NH Gly 4 (des isomères cis et trans) permettent de proposer comme pour les modèles précédents l'existence d'une structure privilégiée mettant le proton amide du résidu Gly 4 hors d'atteinte des molécules de solvant.

Mais comme les valeurs des angles ϕ ne sont pas connues (H_{α} Gly dégénérés) il n'est pas possible par les méthodes habituelles de la RMN ($^3J = f(\theta)$) de préciser davantage la structure.

Ce qui est probable, compte tenu de la similitude des résultats présentés pour les 3 modèles étudiés (effet de température) c'est que Tyr Pro Gly Gly (cis et trans) adopte une conformation repliée de type β autour de la séquence Pro 2 Gly 3, rendant possible la protection des protons NH Gly 4 des isomères cis et trans.

Des précisions auraient pu être apportées par la mise en oeuvre d'une méthode RMN particulière : l'effet Overhauser (29). L'utilisation de cette technique nécessite de préparer des échantillons exempts d'impuretés paramagnétiques et d'éliminer les traces d'eau, ce qui n'est pas toujours évident à faire et ce qui demande des équipements spéciaux. Aussi ce travail n'a pas pu être réalisé, mais il serait intéressant de pouvoir l'entreprendre essentiellement pour deux raisons qui vont être précisées.

Sans vouloir présenter le principe théorique de l'effet Overhauser (NOE) il faut tout de même savoir que si on irradie un proton, les intensités de résonances des protons voisins peuvent être modifiées : le rapport des intensités (avec et sans irradiation) varie en fonction de la distance entre proton irradié et proton observé (les équations sont en $1/r^6$). En ce qui concerne l'application à l'étude conformationnelle des peptides, il faut rappeler que pour le

β_I (ψ Pro = - 35) la distance du H_α Pro au proton amide du résidu suivant est 3,41 Å, alors qu'elle n'est que 2,16 Å pour le β_{II} (ψ Pro = + 120°) (Fig.XIII).

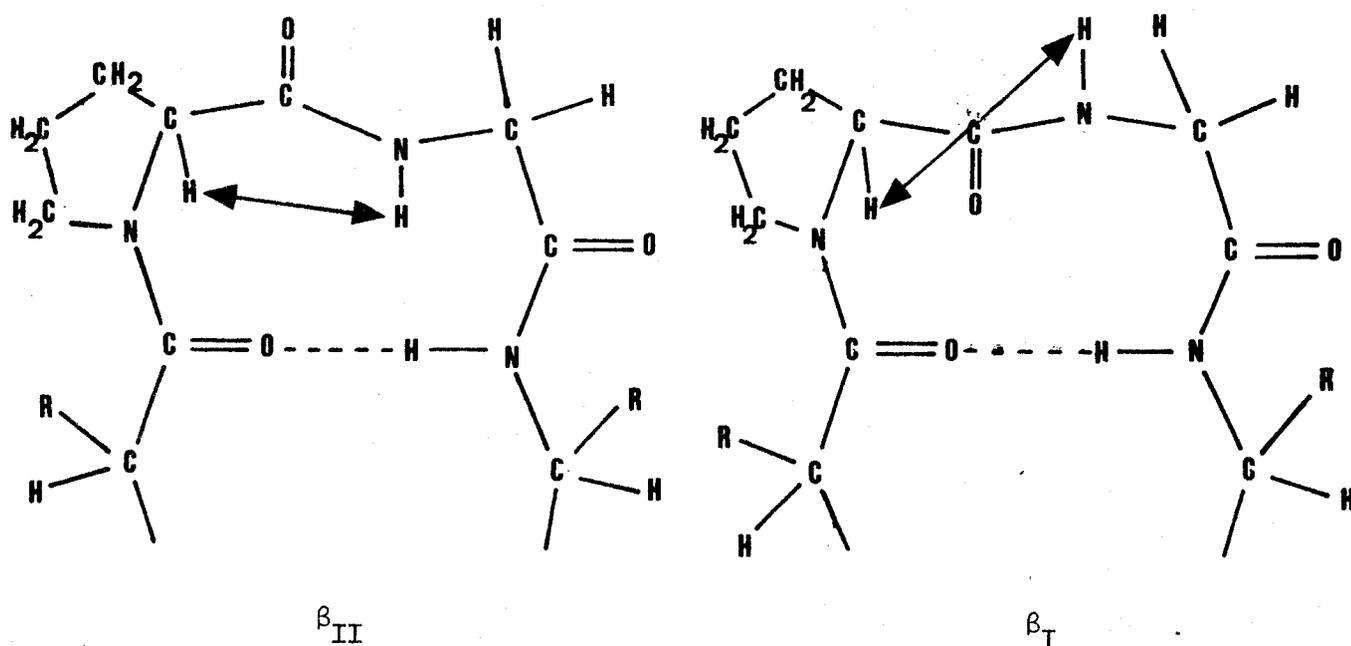


FIGURE XIII

Représentation des repliements β_I et β_{II}

Aussi, en irradiant le proton amide évoqué ci-dessus, le NOE sur le H_α Pro sera de 2 % pour le β_I et de 22 % pour le β_{II} . C'est ce qui permet de distinguer le type de repliement et la littérature signale quelques résultats acquis par cette méthode (30). L'application de cette technique pourrait donc éventuellement permettre :

- 1 - d'appuyer nos hypothèses sur les structures proposées pour Gly Pro Tyr Gly (β_I) et Gly Pro Gly Tyr (β_{II})
- 2 - d'obtenir des informations sur le type de repliement de Tyr Pro Gly Gly

b - Comportement de la chaîne latérale de la tyrosine

Les résultats obtenus pour les protons aromatiques sont à rapprocher de ceux rapportés dans la littérature pour l'étude de fragments de la corticotropine (31) qui possède 2 résidus tyrosine (positions 2 et 23). L'intérêt de la comparaison réside dans le fait que la tyrosine 23 précède une proline, la séquence est ... Val Tyr Pro Asn Gly... Les résultats de la littérature et ceux de Tyr Pro Gly Gly (notre travail) sont rassemblés dans le tableau 10 et sont exprimés sous la forme de $\Delta\delta$ qui représente la différence des déplacements chimiques entre les protons méta et ortho (Fig.XIV).

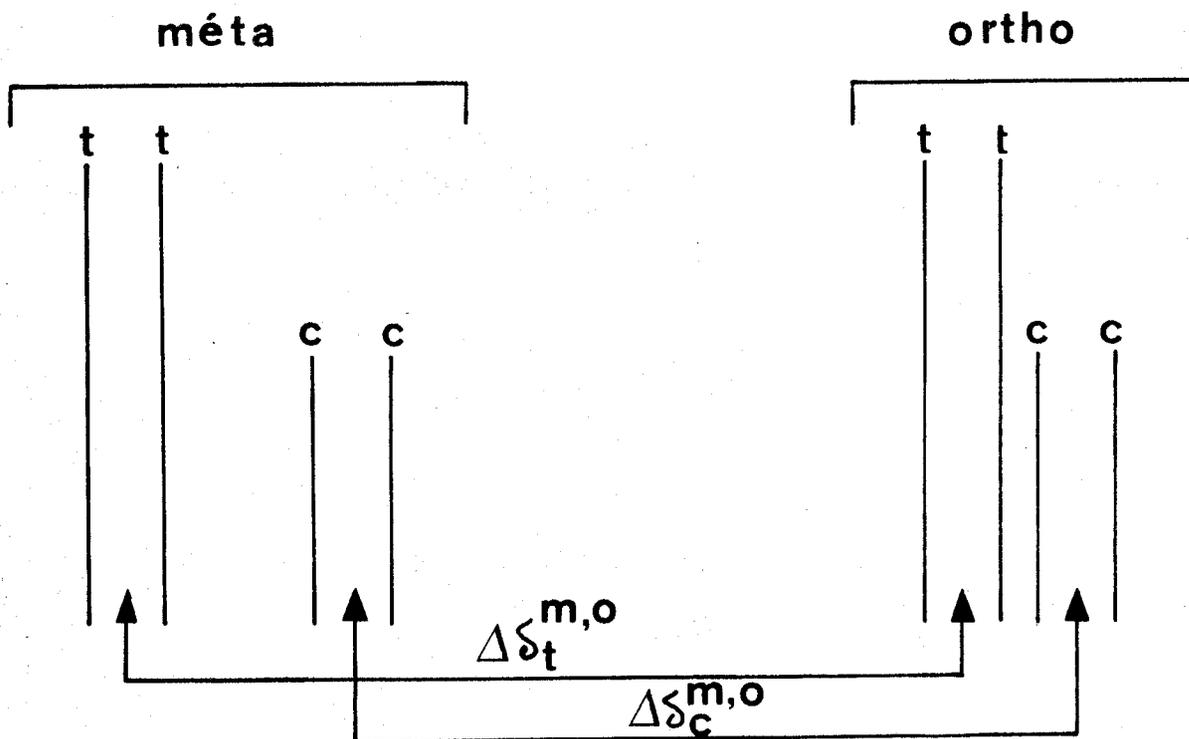


FIGURE XIV

Représentation schématique de la région des protons aromatiques de Tyr Pro Gly Gly

Séquence	$\Delta\delta$
N acétyl Tyrosinamide (31)	$\Delta\delta = 0,32 \text{ ppm}$
Tyr Pro Gly Gly (notre travail)	$\Delta\delta_{\text{cis}} = 0,31 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\text{trans}} = 0,38 \text{ ppm}$
Corticotropine (31) (séquence 1-24)	
- Tyr 2 (Tyr - Ser)	$\Delta\delta = 0,31 \text{ ppm}$
- Tyr 23 (Tyr - Pro)	$\Delta\delta_{\text{cis}} = 0,31 \text{ ppm}$ $\Delta\delta_{\text{trans}} = 0,38 \text{ ppm}$

TABLEAU 10

Différence des déplacements chimiques $\Delta\delta = \delta_{\text{méta}} - \delta_{\text{ortho}}$

La différence $\Delta\delta$ est de 0,31 ppm sauf dans le cas de la séquence Tyr - Pro trans où une valeur de 0,38 ppm est observée.

La similitude de nos valeurs et de celles de la littérature suggère d'interpréter nos résultats sur la base des conclusions proposées pour la corticotropine.

L'hypothèse qui a été proposée est la suivante :

Une différence des déplacements chimiques des protons aromatiques de 0,31 ppm correspond à un résidu tyrosine dont le mouvement de la chaîne latérale n'est pas contraint par l'environnement (c'est la valeur obtenue pour le modèle de référence, la N acétyltyrosinamide).

Une valeur plus élevée (0,38 ppm) traduit une diminution de la liberté du mouvement due vraisemblablement à des interactions

spécifiques entre chaînes latérales tyrosine et proline. Celles-ci n'interviennent que dans la conformation trans de la liaison peptidique Tyr - Pro.

A l'appui de cette hypothèse, il faut rappeler les comportements spécifiques des protons β Tyrosine de notre modèle (isomères cis et trans) observés lors de l'effet de température. En particulier, à 60° , ces deux protons β deviennent équivalents pour la forme cis de notre dérivé contrairement à ceux de l'isomère trans.

L'élévation de température augmente, entre autre, les vitesses de rotation autour des liaisons simples. A 60° , pour l'isomère cis, la rotation est suffisamment rapide pour que pendant le temps de la prise de l'information RMN, les 2 protons β moyennent tous les effets d'anisotropie qui contribuent à leur inéquivalence à plus basse température (20°) (En particulier ceux provenant de l'effet de courant de cycle, rotation $C_\beta C_\gamma$ Tyr). Pour l'isomère trans, la persistance de l'inéquivalence paraît traduire un mouvement plus contraint.

Notre interprétation rejoint bien celle de la littérature qui a été présentée ci-dessus.

Pour confirmer, il serait intéressant de reprendre cette partie du travail en l'abordant à l'aide d'une technique RMN mieux adaptée à l'étude du mouvement : la relaxation.

IV - ISOMERIE CIS - TRANS

Les proportions d'isomère cis (modèles protégés et zwitterions) sont rassemblés dans le tableau 11.

séquence	% cis (peptide protégé)	% cis (zwitterion)
Tyr Pro Gly Gly	9	40
Gly Pro Tyr Gly	28	10
Gly Pro Gly Tyr	22	22

TABLEAU 11

Pourcentage d'isomères cis (dans le DMSO)

De l'examen des résultats obtenus pour nos trois modèles, il apparaît que la proportion d'isomère cis ne varie que dans la mesure où la tyrosine précède ou suit la proline dans la séquence peptidique.

Pour observer une variation du rapport cis/trans il semble donc que le résidu voisin de la proline doive nécessairement porter une chaîne latérale.

L'hypothèse du rôle de l'interaction locale des chaînes latérales proline et tyrosine sur le rapport cis-trans peut donc être avancée.

Le passage d'une conformation flexible (peptide protégé) à une conformation repliée (zwitterion) modifie les positions relatives des chaînes latérales concernées et en conséquence l'interaction locale évoquée ci-dessus est modifiée : l'une des conséquences sera la variation du rapport cis/trans.

V - COEFFICIENTS DE TEMPERATURE

Dans le tableau 12, nous avons rassemblé les valeurs des coefficients de température obtenues pour les protons amides du 4ème résidu de nos modèles (solvant DMSO).

	cis	trans
Gly Pro Tyr Gly	+ 0,6	+ 1,4
Gly Pro Gly Tyr	0	+ 1,2
Tyr Pro Gly Gly	0	0

TABLEAU 12

*Coefficients de température ($\times 10^3$ ppm/°)
des protons NH du 4ème résidu de nos modèles*

Certains coefficients de température sont positifs (tableau 12). Des valeurs positives n'apparaissent qu'assez rarement dans la littérature et sont peu conformes au principe généralement admis de l'effet de température (dissociation du complexe de solvation par élévation de température, cf. Ch. III).

Aussi quelques commentaires s'imposent.

Il est intéressant de faire référence aux résultats de Urry et coll. (32) établis à propos d'études RMN de peptides modèles de la tropoélastine: $\text{HCO} (\text{Val}_1 \text{Pro}_2 \text{Gly}_3 \text{Gly}_4)_n \text{Val OCH}_3$ et $\text{HCO} (\text{Val}_1 \text{Pro}_2 \text{Gly}_3 \text{Val}_4 \text{Gly}_5)_n \text{Val OCH}_3$. Ces auteurs ont montré que l'élévation de température favorise la structuration de leurs dérivés : la liaison hydrogène intramoléculaire $\text{NH}(\text{Val } 1) \dots \text{O} = \text{C} (\text{Gly } 4)$ se renforce.

En utilisant ces données de la littérature, une hypothèse peut être proposée pour rendre compte des coefficients de température positifs obtenus pour nos modèles : quand on chauffe, la liaison hydrogène NH (4ème résidu) ... O = C (1er résidu) devient plus efficace. En conséquence, si l'interaction augmente : le proton amide impliqué dans la liaison hydrogène se déblindé (d'où le coefficient positif). Nous allons tenter d'appliquer cette hypothèse à nos dérivés.

En ce qui concerne Gly Pro Gly Tyr, le spectre RMN proton montre que le proton amide du résidu Tyrosine est moins blindé dans l'isomère cis ($\delta = 7,52$ ppm) que dans l'isomère trans ($\delta = 7,23$ ppm).

Cette différence de déplacements chimiques a déjà été présentée dans la littérature (33) comme un argument en faveur d'une distance plus courte dans l'isomère trans entre le C = O du premier résidu et le NH du 4ème.

Dans le cadre de notre hypothèse, la plus courte distance NH... O = C pour l'isomère trans laisse supposer que l'élévation de température va favoriser surtout la structuration de cet isomère.

Nos résultats sont en accord avec cette prévision : seul le coefficient de température de l'isomère trans est positif.

Pour le modèle Gly Pro Tyr Gly, un raisonnement analogue peut être proposé. En suivant l'hypothèse proposée, les valeurs relatives des coefficients de température des isomères cis et trans peuvent être reliées à la différence des déplacements chimiques des protons amides du résidu Gly 4.

Pour ce qui est de Tyr Pro Gly Gly, les coefficients de température des protons NH Gly 4 sont nuls. Selon notre hypothèse, il apparaît que ce dérivé ne se structure pas davantage quand la température s'élève. Nous pensons qu'il existe pour ce modèle une corrélation entre la valeur nulle de ces coefficients et les valeurs identiques des déplacements chimiques des protons amides correspondants.

CONCLUSION

L'étude conformationnelle par la RMN du proton de Gly Pro Tyr Gly, Gly Pro Gly Tyr et Tyr Pro Gly Gly a permis de proposer pour chacun de nos dérivés une structure repliée autour de $\text{Pro}_2 \text{X}_3$.

La mise en évidence de la conformation privilégiée a été faite par l'utilisation de deux méthodes : effets de température et de solvant (pour les 2 premières séquences). L'analyse des couplages a permis de caractériser le type du repliement des deux premiers dérivés :

β_{I} pour Gly Pro Tyr Gly
 β_{II} pour Gly Pro Gly Tyr

La stabilisation de la structure peut se faire par l'établissement d'une liaison hydrogène CO (1er résidu).... HN (4ème résidu). Mais sa contribution paraît moins importante que celle apportée par l'interaction électrostatique entre les extrémités chargées de la chaîne principale de la séquence peptidique.

Les différences des déplacements chimiques des protons aromatiques des isomères cis et trans (autour de la liaison amide Tyr - Pro) ont été interprétées en terme de mouvements contraints de la chaîne latérale du résidu aromatique (isomère trans).

La comparaison des rapports cis/trans des séquences protégées et zwitterioniques suggère d'exprimer les variations observées par l'existence d'interactions locales entre la chaîne latérale du résidu proline et celle du résidu voisin.

Enfin, à partir de données bibliographiques, une hypothèse est proposée pour rendre compte des coefficients de température positifs : au fur et à mesure de l'élévation de la température, la liaison hydrogène (1er résidu)... HN (4ème résidu) devient plus efficace.

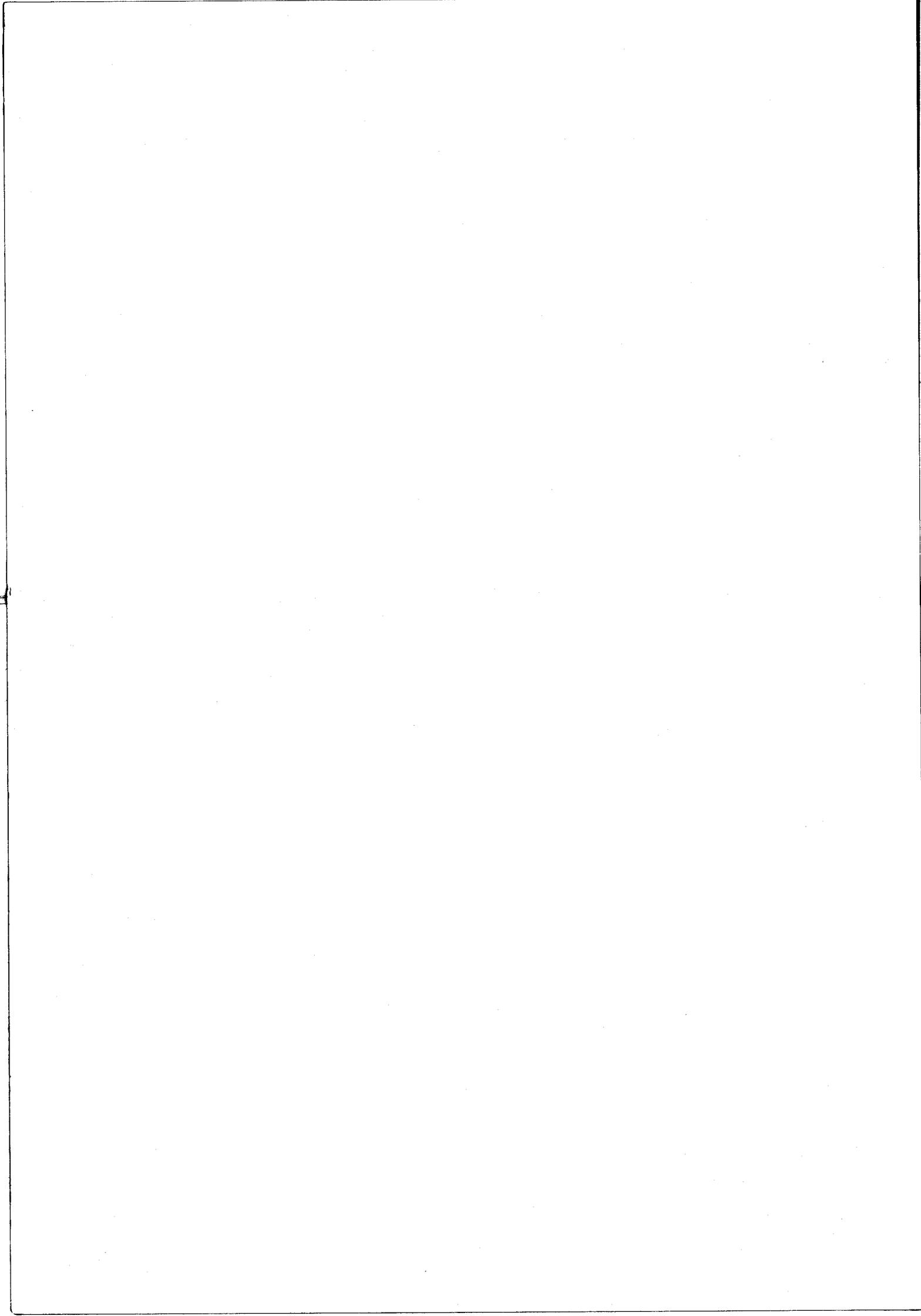
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE V

- (1) H. LAM-THANH, F. TOMA, S. FERMANDJIAN et P. FROMAGEOT
Int. J. Pept. and Proteins (1976), 609-616.
- (2) F. TOMA, H. MAL-THANH, F. PIRIOU, M.C. HEINDL, K. LINTNER
et S. FERMANDJIAN
Biopolymers (1980) 19, 781-804.
- (3) A. BUNDI, C. GRATHWOHL, J. HOCHMANN, R.M. KELLER, G. WAGNER
et K. WÜTHRICH
J. Magn. Resonance (1975) 18, 191-198.
- (4) M.T. CUNG, M. MARRAUD et J. NEEL
Macromolécules (1974) 7, 606-613.
- (5) E.R. STIMSON, Y.C. MEINWALD et H.A. SCHERAGA
Biochemistry (1979) 18, 1661-1671.
- (6) M. KAINOSHO, K. AJISAKA, M. KAMISAKU et A. MURAI
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1975) 64, 425-432.
- (7) D.A. TORCHIA
Macromolécules (1971) 4, 440-442.
- (8) S. FERMANDJIAN, F. PIRIOU, F. TOMA, R. MERMET-BOUVIER,
E. BRISCAS et P. FROMAGEOT
Biochem. Biophys. Acta (1975) 339, 313-338.
- (9) M. ELLENBERGER et L. POGLIANI
Biochem. Biophys. Res. Comm. (1974) 58, 613-622.
- (10) L. POGLIANI et M. ELLENBERGER
Org. Magn. Resonance (1975) 7, 61-71.
- (11) R. WALTER et J.D. GLICKSON
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1973) 70, 1199-1203.
- (12) M. ANTEUNIS, C. BECU, A.K. LALA, G. VERHEGGE et
K. NARAYA-LALA
Bull. Soc. Chim. Belg. (1977) 86, 161-183.
- (13) D.W. URRY et M.M. LONG
CRC Critical Reviews in Biochemistry (1976) 1.
- (14) R. SCHWYZER et U. LUDESCHER
Helv. Chim. Acta (1969) 52, 2033.



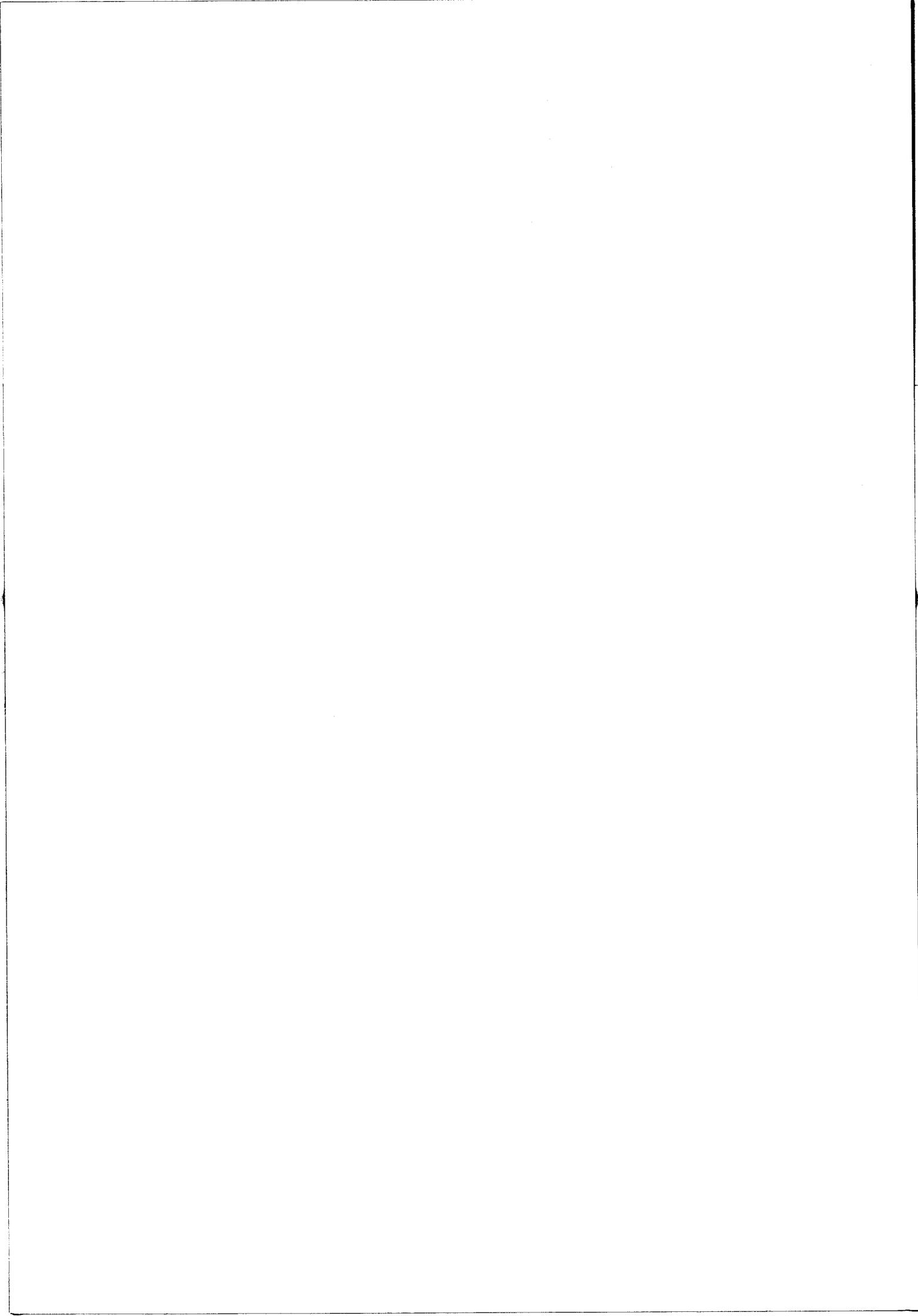
- (15) M. LLINAS et M.P. KLEIN
J. Am. Chem. Soc. (1975) 97, 4731-4737.
- (16) T.P. PITNER et D.W. URRY
J. Am. Chem. Soc. (1972) 94, 1339-1340.
- (17) D.J. PLATEL
Biochemistry (1973) 12, 667-676.
- (18) T. HIGASHIJIMA, J. KOBAYASHI, U. NAGAI et T. MIYAZAWA
Eur. J. Biochem. (1979) 97, 43-57.
- (19) T. HIGASHIJIMA, M. TASUMI, T. MIYAZAWA et M. MIYOSHI
Eur. J. Biochem. (1978) 89, 543-556.
- (20) M.A. KHALED, M.M. LONG, W.D. THOMPSON, R.J. BRADLEY,
G.B. BROWN et D.W. URRY
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76, 224.
- (21) M. BARFIELD, J. HRUBY et J.P. MERALDI
J. Am. Chem. Soc. (1976) 98, 1308-1313.
- (22) K.D. KOPPLE, A. GO, T.J. SCHAMPER et C.S. WILCOX
J. Am. Chem. Soc. (1973) 95, 6090-6096.
- (23) A.E. TONELLI
J. Am. Chem. Soc. (1973) 95, 5946-5948.
- (24) P.N. LEWIS, F.A. MOMANY, et H.A. SCHERAGA
Biochem. Biophys. Acta (1973) 303, 211-229.
- (25) R.J. ABRAHAM et G. GATTI
J. Chem. Soc. B. (1969) 961.
- (26) D.W. URRY, W.D. CUNNINGHAM et T. OHMSHI
Biochemistry (1974) 13, 609-615.
- (27) G. BOUSSARD, M. MARRAUD et A. AUBRY
Biopolymers (1979) 18, 1297-1331.
- (28) C. GARBAY-JAUREGUIBERRY, B.P. ROQUES, R. OBERLIN,
M. ANTENIS et A.K. LALA
Biochem. Biophys. Res. Commun (1976) 71, 558-565.
- (29) J.H. NOGGLE et R.E. SCHIRMER
The Nuclear Overhauser Effect, Chemical Application
(1971) Acad. Press.

- (30) Md. A. KHALED et D.W. URRY
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1976) 70, 485-491.
- (31) F. TOMA, S. FERMANDJIAN, M. LÖW et L. KISFALUDY
Biochem. Biophys. Acta (1978) 534, 112-122.
- (32) D.W. URRY, M.A. KHALED, R.S. RAFAKA et K. OKAMOTO
Biochem. Biophys. Res. Commun (1977) 79, 700-706.
- (33) P.H. VON DREELE, I.D. RAE et H.A. SCHERAGA
Biochemistry (1978) 17, 956-961.



C H A P I T R E V I

ETUDE DE Gly Pro Ala Gly EN SOLUTION DANS LE D.M.S.O.



Au chapitre précédent, la comparaison des déplacements chimiques des protons β de la proline de Gly Pro Tyr Gly et de Gly Pro Gly Tyr a montré que le blindage observé sur le proton β_2 de Gly Pro Tyr Gly peut être mis en relation avec la position du résidu aromatique et l'orientation tg^- - 90 % des rotamères - qui favorisent le rapprochement du phényle et du cycle pyrrolidine.

Aussi des hypothèses sur le rôle du courant de cycle du noyau aromatique peuvent être avancées.

Mais les conclusions de l'analyse conformationnelle de ces deux dérivés ont établi que si le repliement autour de la séquence L Pro L Tyr est de type β_I , il est de type β_{II} pour L Pro Gly. Aussi, pour étayer nos hypothèses, il faut comparer les résultats obtenus pour Gly Pro Tyr Gly (déplacements chimiques des protons β Pro) avec ceux d'un modèle dont le type de repliement est également β_I .

La littérature signale que les repliements autour des séquences L Pro L X sont plus fréquemment du type I (1), c'est ce qui a conduit à synthétiser Gly L Pro L Ala Gly.

Après avoir analysé les résultats RMN proton et proposé une structure pour notre modèle, la comparaison avec un dérivé étudié par Schéraga et coll. (2) : Gly Val Arg Gly Pro Ala NH₂ sera envisagée (ce dérivé possède la séquence L Pro L Ala).

Dans une seconde partie, l'hypothèse du courant de cycle sera précisée et permettra de montrer que la conformation préférentielle autour de la liaison C _{α} C _{β} Tyr est bien tg^- , ce qui est en parfait accord avec les conclusions de la littérature (3) (4).

I - SPECTRE RMN PROTON (XV) ET PARAMETRES

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage sont reportés dans le tableau 1. Il faut préciser que ces paramètres sont ceux de l'isomère trans (90 % de l'ensemble des deux formes).

Résidu	δ (ppm)	J (Hz)
Gly 1	$H_{\alpha} = 3,78$	
Pro 2	$H_{\alpha} = 4,17$ $H_{\beta_1} = 2,18$ $H_{\beta_2} = 1,77$ $H_{\gamma} = 1,89$ $H_{\delta_1} = 3,48$ $H_{\delta_2} = 3,65$	$\Sigma^3 J_{\alpha\beta} = 13$
Ala 3	$HN = 8,16$ $H_{\alpha} = 4,35$ $H_{\beta} = 1,21$	${}^3J_{HNC_{\alpha}H_{\alpha}} = 9,2$ ${}^3J_{\alpha\beta} = 7,6$
Gly 4	$HN = 7,04$ $H_{\alpha_1} = 3,67$ $H_{\alpha_2} = 3,21$	

TABLEAU 1

Paramètres spectraux de Gly Pro Ala Gly
 (solvant : DMSO - C : 3.10^{-2} mole/l - T : 22° - réf TMS)



Deux points essentiels vont être discutés :

- 1 - La valeur de la constante de couplage entre proton amide et proton α du résidu Ala
- 2 - Les déplacements chimiques des protons β Pro

$$1 - {}^3J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}_{\alpha}} \text{ Ala } 3$$

La valeur obtenue : 9,2 Hz est élevée et elle est bien différente de celle proposée par Wüthrich (5) : 7,5 Hz pour un résidu Ala d'une séquence peptidique dont la structure est non organisée.

L'application de la relation de Marraud et coll. (6) donne pour 3J : 9,2 Hz une valeur de θ ($\text{HNC}_{\alpha}\text{H}_{\alpha}$) de 155° ce qui correspond à deux valeurs possibles de $\phi_3 = -145^{\circ}$ et -95° .

Si on choisit la relation de Bystrov (7), il faut adjoindre aux valeurs de ϕ_3 , la valeur $+60^{\circ}$.

Parmi les valeurs ϕ Pro : -60° et ϕ Ala : $+60^{\circ}$, -95° et -145° on trouve celles qui sont nécessaires au repliement β_{I} (ϕ Ala $= -95^{\circ}$) et au repliement β_{II} (ϕ Ala $= +60^{\circ}$ en fait la théorie prévoit $+80^{\circ}$ (8)). Mais des données de la littérature permettent d'écarter la valeur $+60^{\circ}$. En effet, les valeurs possibles de l'angle ϕ peuvent être obtenues par l'intermédiaire des couplages protons ${}^3J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}_{\alpha}}$, mais aussi par les couplages ${}^{13}\text{C}$ - proton :

$${}^3J_{\text{COC}_{\alpha}\text{H}_{\alpha}} \quad (9)$$

La mise en oeuvre de ces deux méthodes a permis à Toma et coll. (10) de comparer les séries de valeurs possibles de l'angle ϕ Leu de Gly Pro Leu Gly.

Par les couplages ${}^3J_{\text{HNC}_{\alpha}\text{H}_{\alpha}}$, ϕ Leu = -90° , -150° , $+60^{\circ}$

Par les couplages ${}^3J_{\text{COC}_{\alpha}\text{H}_{\alpha}}$, ϕ Leu = -90° , -150° , $+5^{\circ}$, $+125^{\circ}$

La comparaison des résultats permet de retenir ϕ Leu = -90° , -150° . L'élimination de la solution $\phi = +60^{\circ}$,

valeur permise par l'application de la relation de Bystrov, mais interdite par celle de Marraud suggère une plus grande fiabilité de cette dernière (ce qui justifie le choix de cette relation pour nos études conformationnelles).

2 - Protons β Proline

Les protons β proline de Gly Pro Ala Gly résonnent à des fréquences différentes de celles observées pour Gly Pro Tyr Gly. On trouve ces protons à 2,18 ppm (β_1) et 1,77 ppm (β_2) alors que pour la séquence contenant la tyrosine, $\delta\beta_1 = 1,95$ ppm et $\delta\beta_2 = 1,23$ ppm. La substitution dans la séquence du résidu tyrosine par le résidu alanine fait donc glisser vers les bas champs les 2 protons β , mais si ce glissement est 0,23 ppm pour le β_1 , il est de 0,54 ppm pour le β_2 .

II - EFFET DE TEMPERATURE - CONFORMATION DU MODELE

L'étude de l'effet de température sur les déplacements chimiques des protons amides a conduit à des résultats analogues à ceux de Gly Pro Tyr Gly (Fig. I) :

- le proton amide du résidu Ala 3 présente un coefficient de température élevé : $- 5,1 \cdot 10^{-3}$ ppm/°. Cette valeur caractérise un proton exposé au solvant (11).

- la variation du déplacement chimique du proton NH du résidu Gly 4 n'est pas linéaire dans la gamme de température étudiée (20 à 80°). Pour obtenir le coefficient de température, nous avons pris la valeur de la pente de la tangente à l'origine qui est de $+ 0,8 \cdot 10^{-3}$ ppm/°. Cette valeur correspond à celles rapportées dans la littérature pour le proton NH Gly 4 des séquences Gly Pro X Gly (10). Le proton NH Gly 4 est donc protégé du solvant (11). Pour rendre compte du résultat obtenu pour le proton amide de Gly 4 aux plus hautes températures (variation non linéaire), une hypothèse sur la modification de la conformation est proposée. Elle est appuyée par deux résultats expérimentaux :

1 - Le couplage $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ Ala qui est de 9,2 Hz à 22° passe à 7,8 Hz à 60°, cette dernière valeur s'approche de celle trouvée pour un résidu Ala dans une séquence non organisée (5).

2 - L'inéquivalence des protons H_α Gly 4 diminue, elle passe de 0,6 ppm (22°) à 0,3 ppm (60°) : plus la structure est désordonnée, plus les environnements magnétiques des protons H_α Gly deviennent équivalents.

Le faible coefficient de température (extrapolée à l'origine) du proton peptidique de Gly 4 et la valeur du couplage $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ du résidu Ala (9,2 Hz) permettent de proposer l'existence d'une conformation repliée (autour de Pro 2 Ala 3).

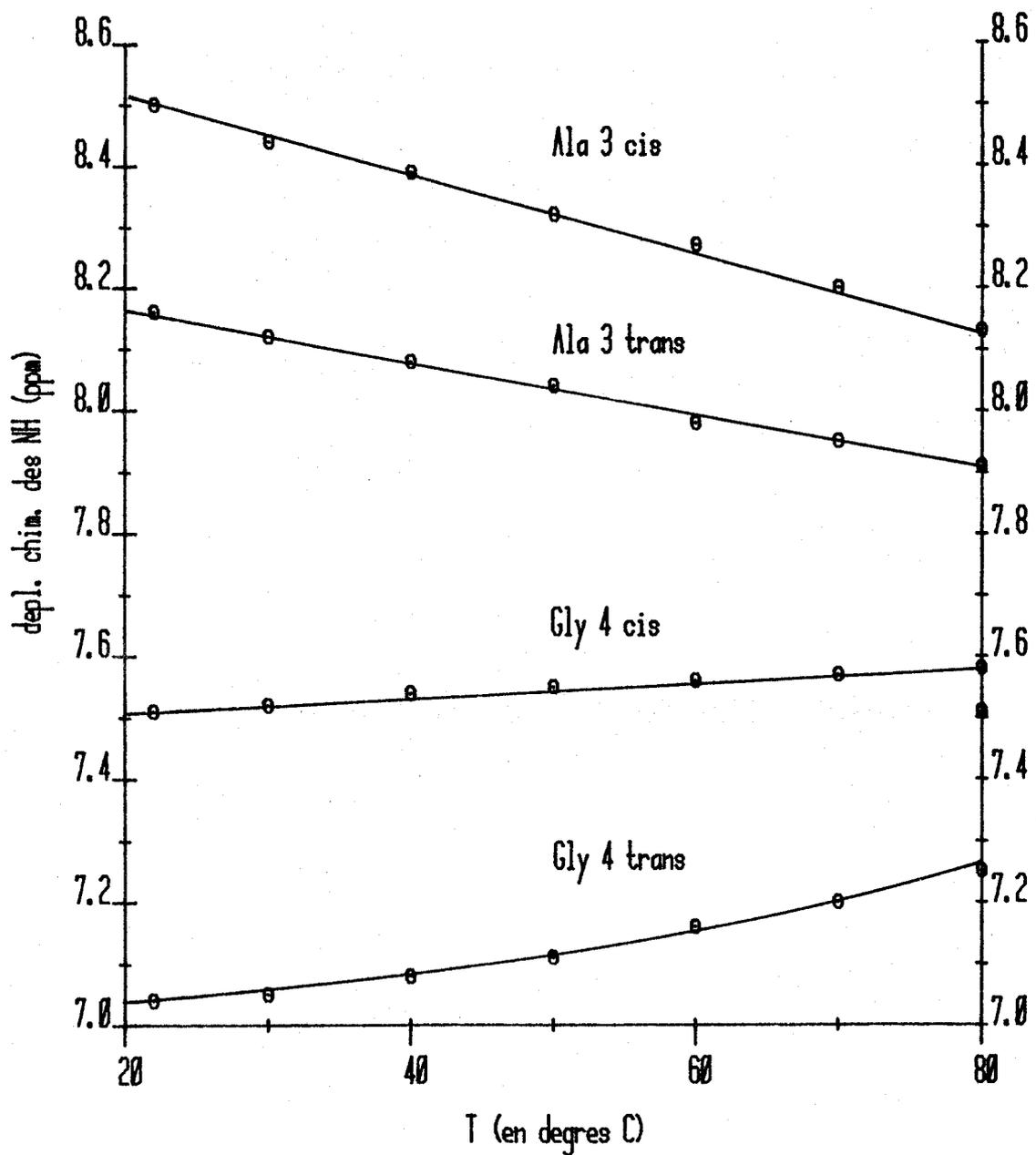


FIGURE I

Variations de déplacements chimiques des protons NH de Gly Pro Ala Gly lors de l'effet de température



Ceci conduit les auteurs à choisir le β_{II} . Il y a par conséquent une contraction entre ce résultat de la littérature et nos conclusions.

Pour avancer sur cette question, il serait intéressant de mesurer le NOE sur le H_{α} Pro de notre dérivé (Gly Pro Ala Gly) pour confirmer le type de repliement.

Toujours à propos du fragment modèle du fibrinogène (2), il a été proposé l'existence d'une liaison hydrogène faisant participer le proton amide anti (du groupe $CONH_2$ terminal). Les valeurs des coefficients de température sont :

proton anti : $- 5,2 \cdot 10^{-3}$ ppm/°

proton syn : $- 5,4 \cdot 10^{-3}$ ppm/°

Dans l'hypothèse de la structure repliée proposée par Schéraga et coll. (2) la très faible différence des valeurs ci-dessus montre que si la liaison hydrogène existe, elle est assez faible. Ceci rejoint, d'une certaine manière, l'hypothèse que nous avons émise sur le rôle essentiel de l'interaction électrostatique (cf. Ch. V) en vue de stabiliser le repliement de nos modèles zwitterioniques.

III - EFFET DU COURANT DE CYCLE DE LA TYROSINE

Les conformations de Gly Pro Ala Gly et Gly Pro Tyr Gly sont les mêmes : ces deux dérivés se replient autour de Pro_2X_3 selon le type β_I .

La différence des déplacements chimiques observés pour les protons β Pro, en particulier le fort blindage du proton β_2 , a vraisemblablement son origine dans la nature spécifique des chaînes latérales des résidus Alanine et Tyrosine.

Aussi, l'hypothèse de l'effet de courant de cycle du phényle de la tyrosine est avancée.

En corollaire à cette hypothèse, deux conditions doivent être remplies :

1 - Le phényle doit être proche du cycle pyrrolidine, c'est-à-dire que la conformation de la chaîne latérale du résidu tyrosine doit être essentiellement tg^- .

En considérant les valeurs des constantes de couplage $^3J_{\alpha\beta}$ (résidu Tyrosine) ($^3J_{\alpha\beta_1} = 4 \text{ Hz}$; $^3J_{\alpha\beta_2} = 12 \text{ Hz}$; $\delta\beta_1 = 3,18 \text{ ppm}$; $\delta\beta_2 = 2,57 \text{ ppm}$) et en appliquant les relations de Pachler (12), l'orientation tg^- est majoritaire ($\approx 90 \%$) si le proton β_2 (à haut champ) est celui de configuration absolue R (cf. Ch. III).

Cette proposition sur les positions relatives des signaux des protons β_R et β_S tyrosine est en accord avec les résultats présentés par Kobayashi et coll. (3).

Au cours des chapitres précédents, nous n'avons pas d'arguments expérimentaux qui permettent de connaître les configurations absolues des protons β Tyrosine qui résonnent respectivement à bas et haut champs. Aussi toutes les valeurs des populations tg^- , tg^+ , g^+g^- ont été calculées sur la base des résultats de Kobayashi et coll. (3).

L'analogie de nos conclusions ($\beta_2 = \beta_R$) et de celles de la littérature (3) justifie les valeurs des distributions de populations qui ont été proposées pour nos modèles.

2 - L'examen de modèles moléculaires montre que le proton β_2 proline est plus proche du phényle de la tyrosine (orientation tg^- de la chaîne latérale de ce résidu) : par conséquent l'hypothèse du courant de cycle impose que le proton β proline le plus blindé (dans Gly Pro Tyr Gly) et qui apparaît à $\delta = 1,23$ ppm soit le proton β_2 (fig. III).

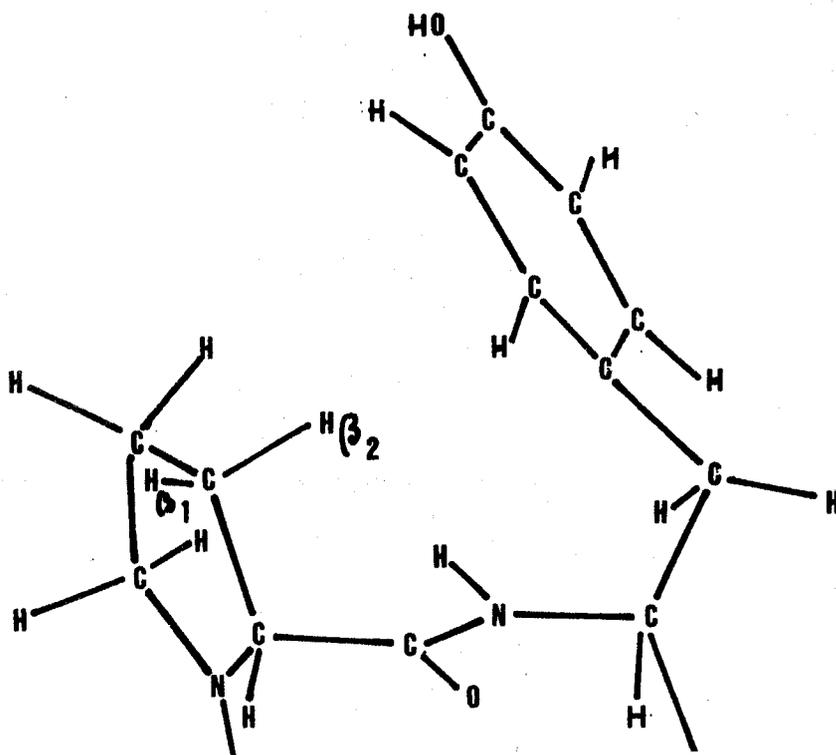


FIGURE III

Représentation des positions relatives des protons β Pro et du phényle de la tyrosine

Au chapitre précédent, des expériences de découplage ont montré qu'effectivement le signal du proton β Pro situé à haut champ est bien celui du proton β_2 .

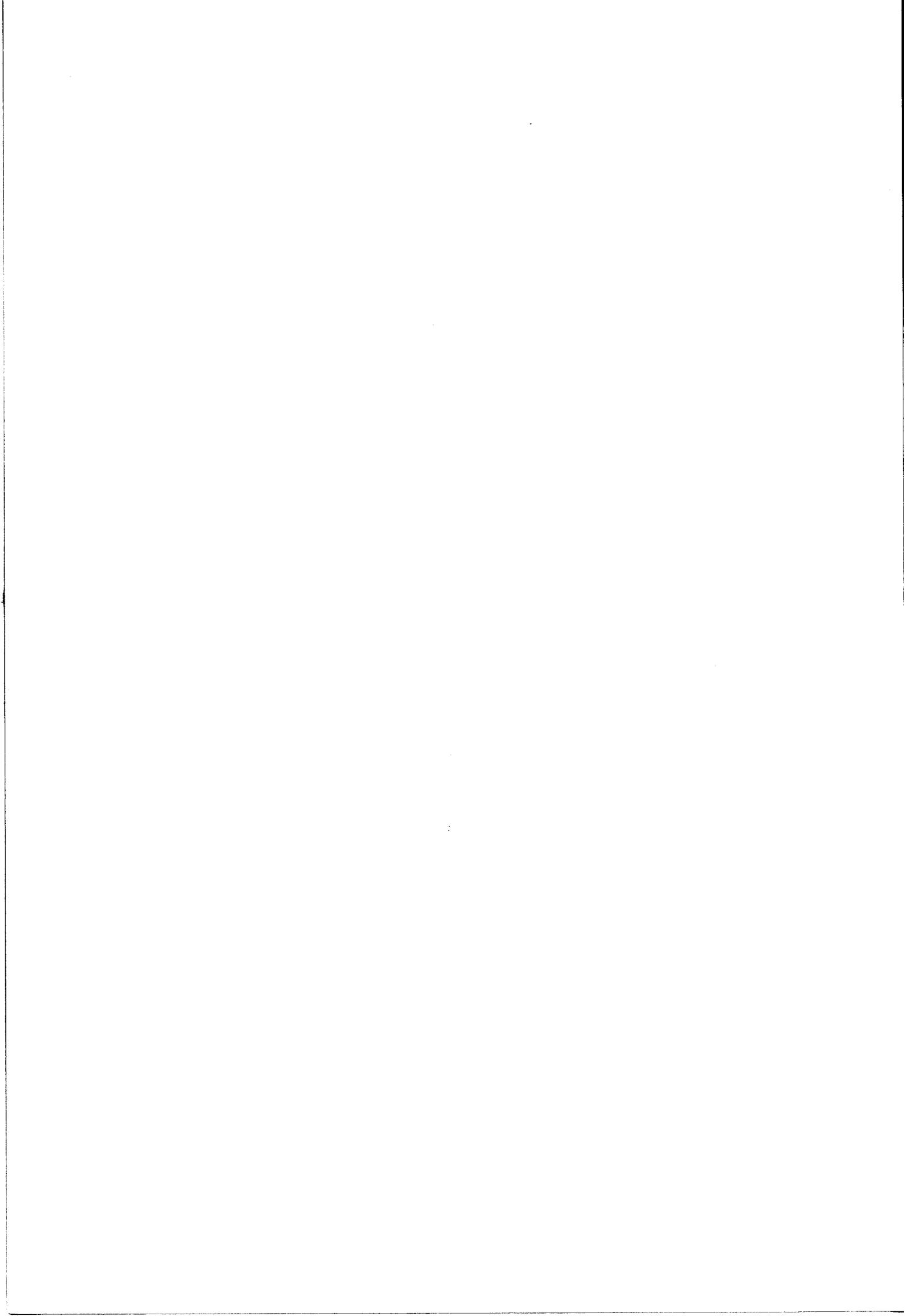
Il est bien évident que le point qui vient d'être discuté n'est pas une justification de l'hypothèse du courant de cycle, mais une condition absolument nécessaire pour qu'elle puisse être envisagée.

CONCLUSION

L'effet de température sur les déplacements chimiques des protons amides et la valeur de la constante de couplage $^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha}$ Ala 3 permettent de proposer pour Gly Pro Ala Gly un repliement de structure de type β_I .

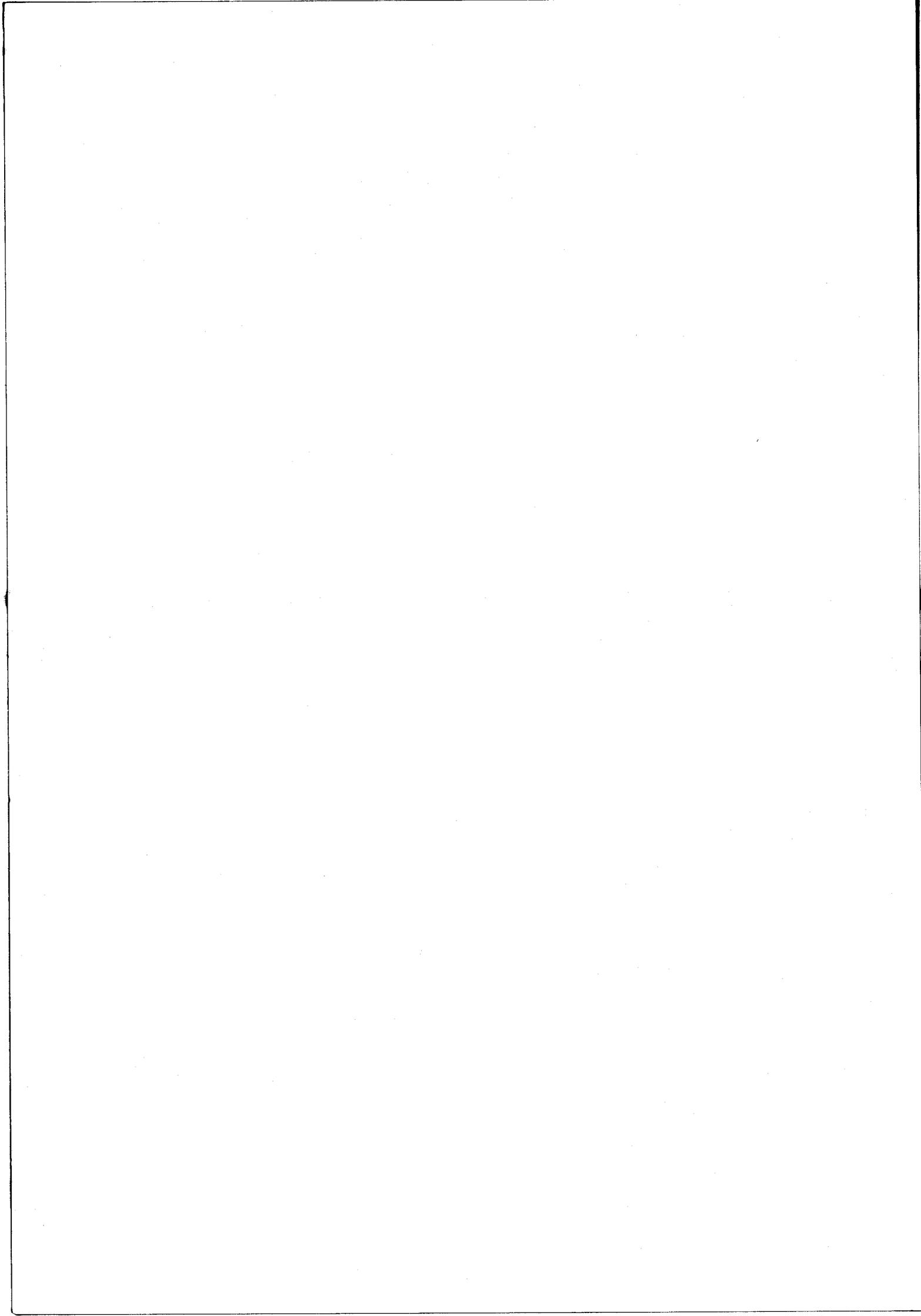
L'analogie des conformations des chaînes principales de Gly Pro Ala Gly et Gly Pro Tyr Gly suggère de rendre compte du blindage des protons β proline du second modèle par un effet du courant de cycle du noyau aromatique.

Cette hypothèse implique que le rotamère tg^- soit prépondérant ce qui est en accord avec les résultats bibliographiques.



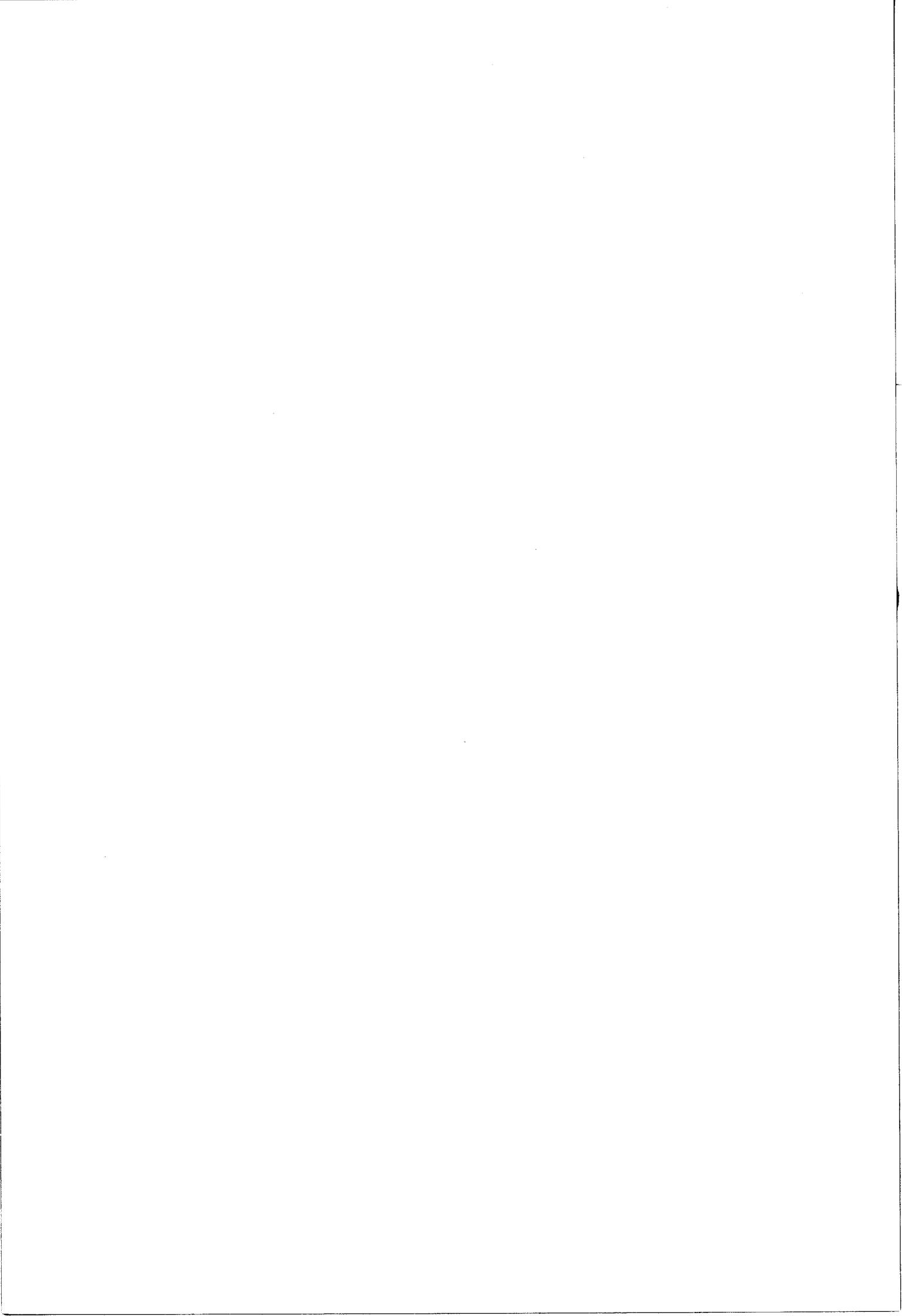
BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE VI

- (1) S.S. ZIMMERMAN et H.A. SCHERAGA
Biopolymers (1977) 16, 811-843.
- (2) Z.H. VON DREELE, I.D. RAE et H.A. SCHERAGA
Biochemistry (1978) 17, 956-962.
- (3) J. KOBAYASHI, U. NAGAI, T. HIGASHIJIMA et T. MIYAZAWA
Biochem. Biophys. Acta (1970) 577, 195-206.
- (4) K. WÜTHRICH et A. DE MARCO
Helv. Chim. Acta (1976) 59, 2228-2235.
- (5) A. BUNDI, C. GRATHWOHL, J. HOCHMANN, R.M. KELLER
G. WAGNER et K. WÜTHRICH
J. Magn. Resonance (1975) 18, 191-198.
- (6) M.T. CUNG, M. MARRAUD et J. NEEL
Macromolécules (1974) 7, 606-613.
- (7) V.F. BYSTROV, V.T. IVANOV, S.L. PORTNOVA, T.A. BALASHOVA
et Y.A. OUCHINNIKOV
Tetrahedron (1973) 29, 873-877.
- (8) P.N. LEWIS, F.A. MOMANY et H.A. SCHERAGA
Biochem. Biophys. Acta (1973) 303, 211-229.
- (9) V.F. BYSTROV
Progress in NMR spectroscopy (1976) vol. 10, 41-81.
- (10) F. TOMA, H. LAM-THANH, F. PIRIOU, M.C. HEINDL, K. LINTNER
et S. FERMANDJIAN
Biopolymers (1980) 19, 781-804.
- (11) O.J. PATEL
Biochemistry (1973) 12, 667-676.
- (12) K.G. PACHLER
Spectrochim. Acta (1964) 20, 581-587.



C H A P I T R E V I I

ETUDE DE NOS MODELES EN SOLUTION DANS L'EAU



L'eau est un solvant qui possède des propriétés dissociantes bien connues. Par conséquent, l'interaction électrostatique entre les extrémités ionisées des zwitterions est moins forte. A titre d'exemple, il faut signaler que si dans le DMSO, la Met-enképhaline est repliée (1), il vient d'être établi récemment que dans l'eau, ce peptide adopte une conformation flexible (2).

Mais des controverses dans l'interprétation des résultats apparaissent parfois dans la littérature (3). Ceci est dû, en partie, au fait que dans l'eau, les méthodes habituelles (effet de T, de solvant) de l'analyse conformationnelle par RMN conduisent à des résultats peu concluants.

En ce qui concerne nos modèles, l'étude en solution aqueuse est essentiellement basée sur la différence des résultats obtenus pour les isomères cis et trans autour de la liaison amide X - Pro.

I - ETUDE COMPARATIVE DES SEQUENCES

Tyr Pro Gly Gly ET Phe Pro Gly Gly

A - Tyr Pro Gly Gly

1 - Spectre XVI

Solvant : D₂O pH = 6,6. Toutes les résonances des protons non mobiles sont observées.

Nous avons également fait figurer la région des protons amides obtenue en utilisant un mélange 90 % H₂O, 10 % D₂O (pH = 4,6).

Spectre XVII

Agrandissement de la région H_α du spectre XVI

Spectre XVIII

Solvant : 90 % H₂O, 10 % D₂O pH = 6,1

Région H_α Gly et H_β Tyr

Les couplages ${}^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}}$ sont maintenus

Spectre acquis en mode "Gated homonuclear decoupling"

2 - Commentaires

- protons amides

Les résonnances des protons NH Gly 3 et Gly 4 se présentent sous forme de triplets : seule $\Sigma {}^3J$ peut être obtenue ($\approx 11 - 12$ Hz). Les protons amides de Gly 4 (isomères cis et trans) résonnent à des fréquences différentes ($\Delta\delta = 0,1$ ppm), alors qu'en solution dans le DMSO, un signal commun pour NH Gly 4 des deux formes isomères est observé.

- protons α Gly 3 et Gly 4

Les protons α Gly 3 et Gly 4 de l'isomère trans sont inéquivalents contrairement à ce qui est observé pour ceux de l'isomère cis.

Les couplages ${}^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}}$ peuvent être extraits du spectre XVIII et respectivement attribués aux couplages du proton amide et des protons α_R et α_S conformément aux données de la littérature (4)

Isomère trans :

$$\text{Gly 3} \quad {}^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_{\alpha_S}} = 6 \text{ Hz}$$

$${}^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_{\alpha_R}} = 5,75 \text{ Hz}$$

$$\text{Gly 4} \quad {}^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_{\alpha_S}} = 6 \text{ Hz}$$

$${}^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_{\alpha_R}} = 5,5 \text{ Hz}$$

Isomère cis :

$$\text{et Gly 3} \quad {}^3J_{\text{HNC}_\alpha\text{H}_\alpha} = 6 \text{ Hz}$$
$$\text{Gly 4}$$

3 - Effet de température

Les déplacements chimiques des protons amides ont été suivis en fonction de la température.

Les coefficients de température correspondants sont :

$$\text{Gly 3 (cis et trans)} = 12.10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$$

$$\text{Gly 4 cis} = 10.10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$$

$$\text{Gly 4 trans} = 8,3.10^{-3} \text{ ppm/}^\circ$$

Ces valeurs sont très élevées et traduisent une bonne accessibilité des protons amides du modèle étudié. Cependant la comparaison des résultats entre eux met en évidence des différences d'exposition des NH aux molécules du solvant, en particulier le NH Gly 4 trans possède la pente la plus faible.

4 - Variation de pH

- *protons amides*

Les résonnances des protons amides ne peuvent être suivies que de pH acide à pH neutre, pour des valeurs plus élevées du pH, les signaux coalescent.

L'examen de la figure I montre que quand on passe de pH 6,1 à pH 1,8 :

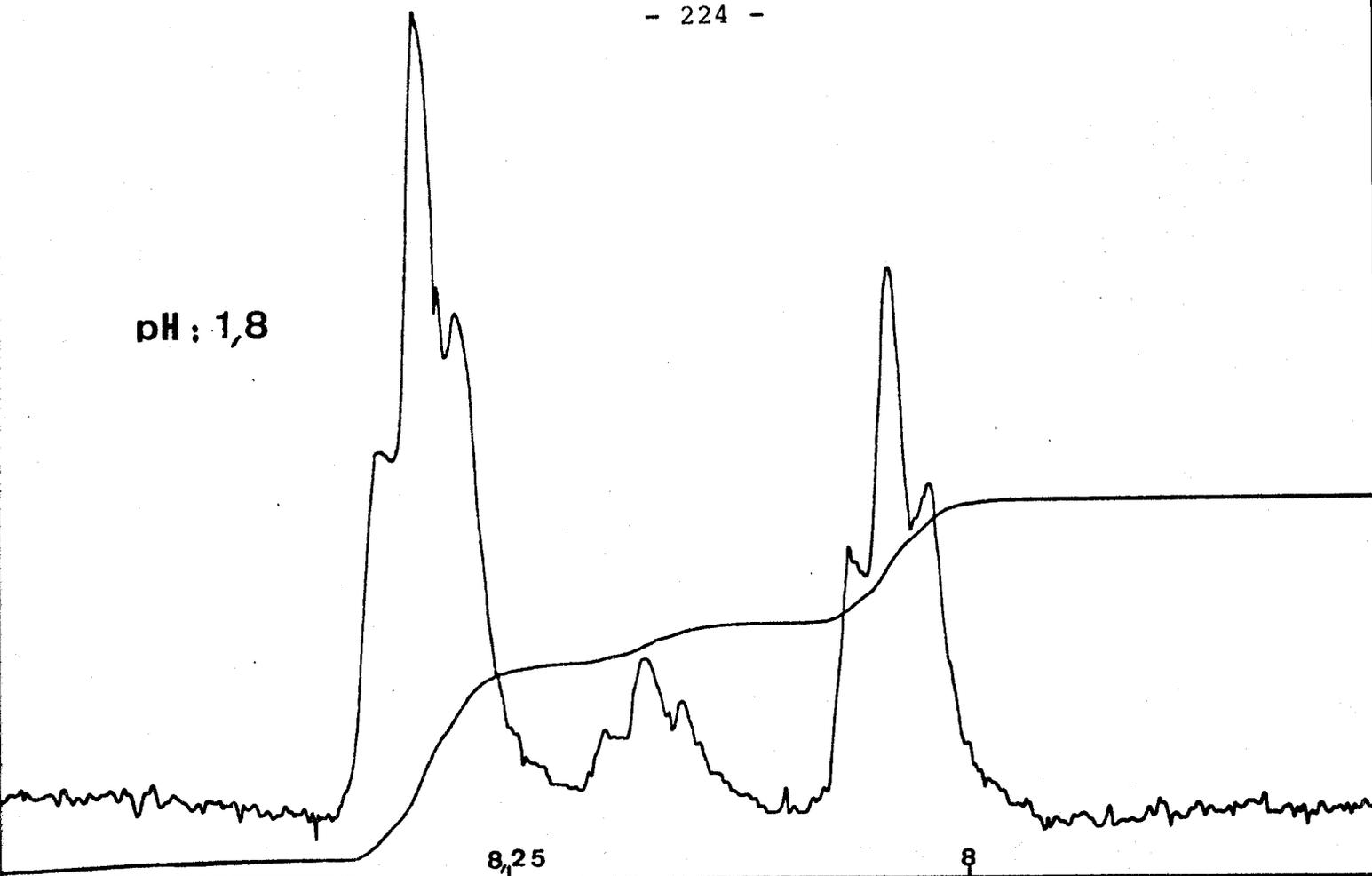
- 1 - Le déplacement chimique du signal situé à $\delta = 8,28$ ppm est inchangé, c'est par conséquent celui de Gly 3.
- 2 - Les résonnances situées à $\delta = 7,85$ ppm (cis) et 7,77 ppm (trans) se déplacent vers les bas champs. Elles correspondent aux protons NH de Gly 4 : le déblindage observé traduit bien la titration de l'ion carboxylate (vers 3,1 - 3,2).

Le rapport des intégrales des résonnances (cis + trans) des protons NH Gly 3 et Gly 4 varie avec la valeur du pH :

à pH 1,8, il est de 0,9

à pH 6,1, il est de 0,4.

pH: 1,8



pH: 6,1

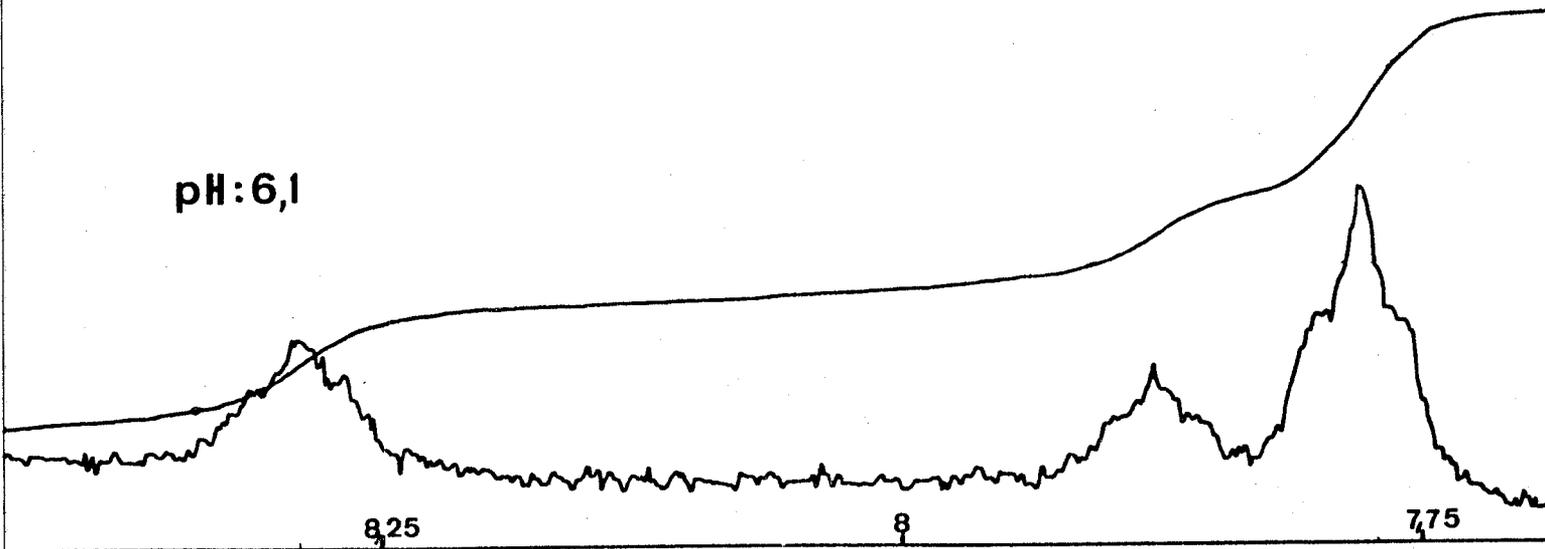


FIGURE I

Signaux de résonance des protons amides de Tyr Pro Gly Gly
pour 2 valeurs du pH (1,8 et 6,1)



Compte tenu de la précision expérimentale, la valeur 0,9 (pH = 1,8) est attendue de signaux correspondant chacun à un proton.

Mais à pH 6,10, le signal du proton NH Gly 3 est atténué. Pour interpréter ce résultat, il faut rappeler que l'acquisition des interférogrammes est faite dans des conditions particulières : les protons de l'eau sont irradiés (gated homonuclear decoupling). Les protons NH et H₂O s'échangent, aussi en présence d'irradiation de ceux de l'eau, les populations relatives des spins des protons NH vont être perturbées ; en particulier la différence de populations entre les états + 1/2 et - 1/2 décroît. Comme la probabilité d'une transition est directement en relation avec cette différence, l'intensité du signal RMN va diminuer d'autant plus que l'échange est rapide.

A partir de ces considérations, il apparaît que pour notre dérivé, le proton NH Gly 3 est plus échangeable (donc mieux exposé) que celui de Gly 4, ceci pour une valeur voisine du point isoélectrique (pH 6,1), là où l'interaction électrostatique entre les extrémités de la chaîne peptidique est plus efficace.

Aussi des hypothèses pourraient être avancées : cette interaction stabilise une forme repliée qui protège le proton amide du résidu Gly 4.

Une argumentation semblable a été développée par Glickson et coll. (5) à propos de l'étude conformationnelle de l'angiotensin II. Mais d'autres données bibliographiques nous ont contraints d'abandonner ces hypothèses.

En effet l'étude de la Met-Enképhaline en milieu DMSO-H₂O (6) a montré qu'en augmentant le pH, la coalescence des résonances NH se fait d'autant plus vite que le résidu correspondant est proche de l'extrémité N terminale. Des interprétations ont été proposées (7) (8) : elles sont basées pour l'essentiel sur une catalyse acido-basique de l'échange des protons NH - H₂O.

Aussi, nos résultats peuvent très bien s'interpréter à partir de ces dernières données bibliographiques. Le proton NH Gly 3 étant plus proche de l'extrémité N terminale, l'augmentation du pH fait croître plus vite la vitesse d'échange de celui-ci.

- protons α

Les variations des déplacements chimiques des protons α des résidus glycine sont représentées sur la figure II.

A partir de l'examen des courbes obtenues, quelques remarques peuvent être faites :

. La titration de la fonction acide carboxylique (pH \approx 3,1) permet d'attribuer au résidu Gly 4 les résonnances qui apparaissent à haut champ sur le spectre XVI.

. Les protons α Gly 3 et Gly 4 de l'isomère cis restent équivalents pour toutes les valeurs du pH, contrairement à ceux de l'isomère trans.

. Les valeurs des déplacements chimiques des protons α Gly de l'isomère cis sont assez proches des valeurs moyennes

$(\frac{\delta\alpha_R + \delta\alpha_S}{2})$ des déplacements chimiques des protons R et S des résidus correspondants dans l'isomère trans.

. L'inéquivalence passe par un maximum aux environs du point isoélectrique.

. Vers pH 10, l'inéquivalence des 2 protons α Gly 3 (isomère trans) est fortement réduite.

- protons β

Les massifs H_β Tyr obtenus pour 3 valeurs du pH (1,8 - 5,2 - 11,9) sont reportés sur la figure III.

La comparaison des intensités des raies laissent supposer que les protons β_S (signaux à bas champ (9)) des isomères cis et trans ont même déplacement chimique.

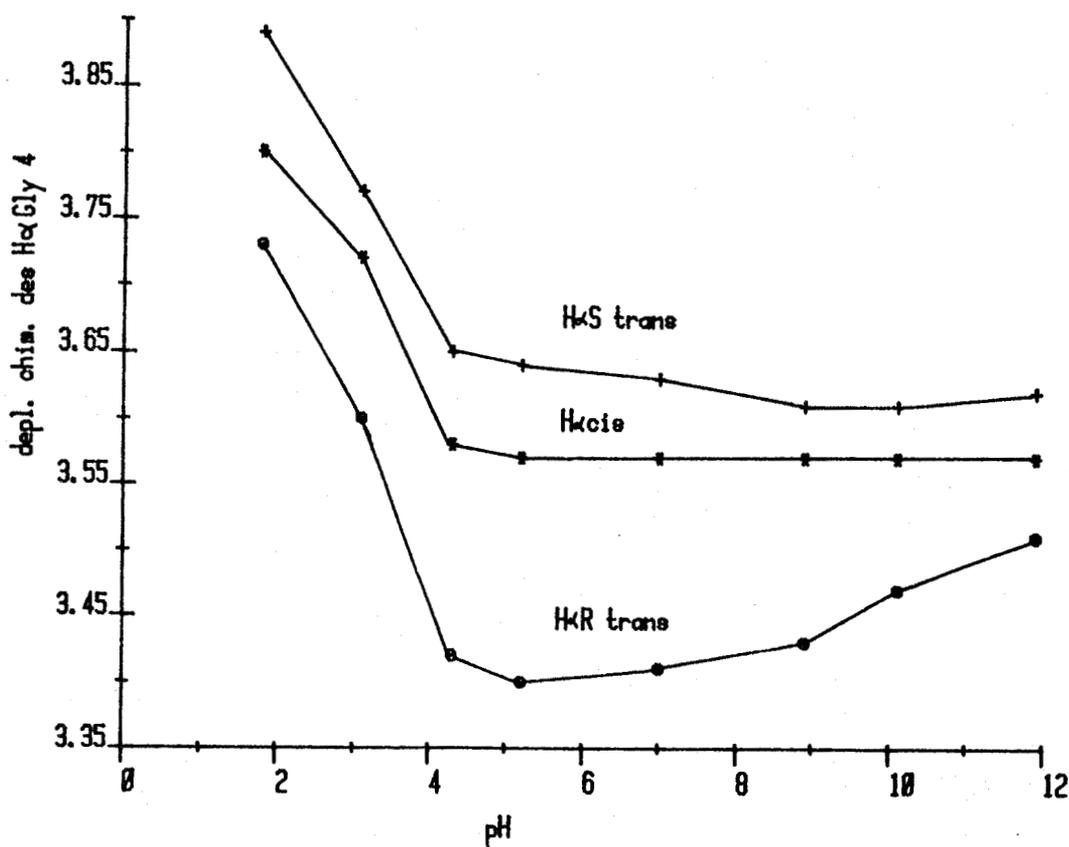
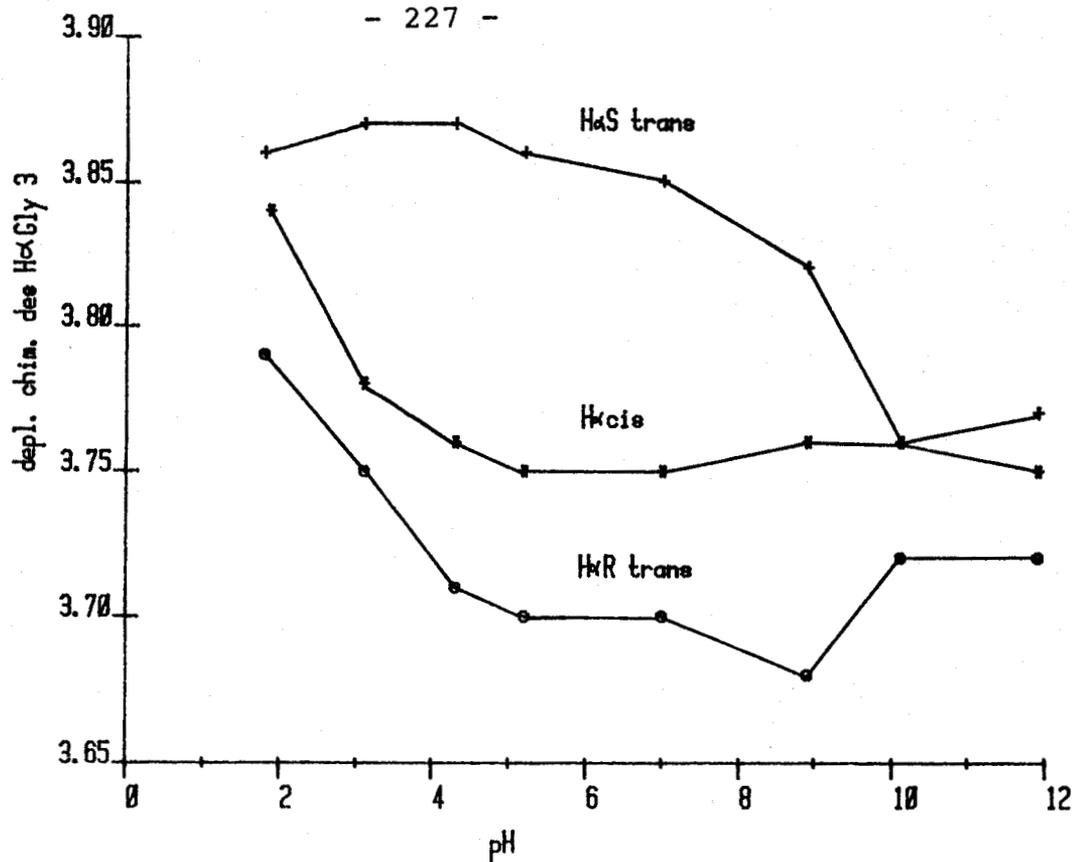


FIGURE II

Variations des déplacements chimiques des protons α Gly 3 et Gly 4 de Tyr Pro Gly Gly en fonction du pH

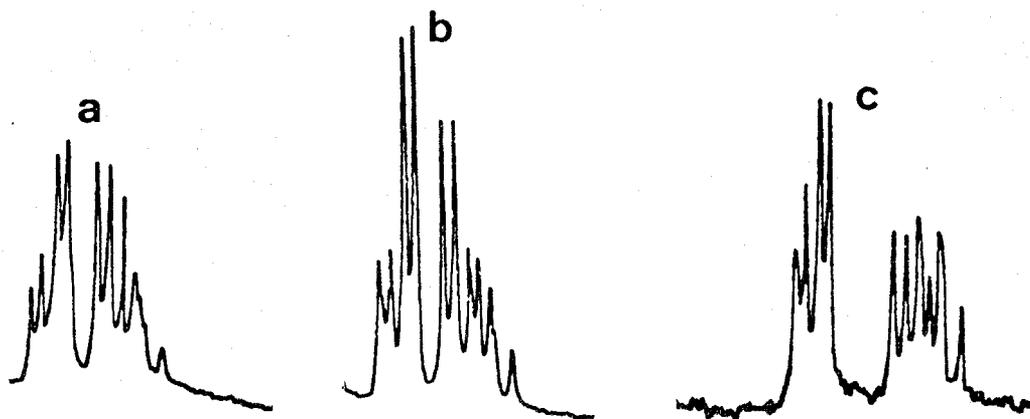


FIGURE III

Massifs H_{α} Tyrosine de Tyr Pro Gly Gly pour 3 valeurs du pH :

(a) : 1,8 ; (b) : 5,2 ; (c) : 11,9

A partir de cette hypothèse, les déplacements chimiques (Fig. IV) et les distributions de populations (Fig. V) sont obtenues par l'analyse ABX des fréquences.

Les résultats permettent de dégager quelques traits essentiels.

1 - Le rotamère tg^{-} est fortement peuplé dans l'isomère cis (75 %) alors que pour l'isomère trans, la distribution s'approche de valeurs statistiques ($tg^{-} = 37\%$, $tg^{+} = 33\%$, $g^{+}g^{-} = 30\%$, pH = 7).

2 - Les titrations des groupes fonctionnels ne modifient pas d'une façon importante la distribution, aussi compte tenu de la précision expérimentale, il est difficile de tirer des conclusions nettes. Il semble cependant que la titration de la fonction phénol se traduise par une légère augmentation de la population tg^{-} (au détriment de tg^{+}).

3 - L'augmentation du pH fait glisser vers les hauts champs les signaux des protons β Tyr, ce qui est en accord avec l'augmentation de la densité électronique de leur voisinage (titration des fonctions ammonium et phénol). Le proton β_R de l'isomère trans est plus perturbé par la titration du phénol; en effet les blindages observés quand on passe de pH 10 à pH 12 sont les suivants :

$\Delta\delta \beta_S$ (cis et trans)	:	0,12 ppm
$\Delta\delta \beta_R$ cis	:	0,12 ppm
$\Delta\delta \beta_R$ trans	:	0,21 ppm

- protons aromatiques

Les résonnances des protons aromatiques obtenues pour quelques valeurs du pH sont représentées sur la figure VI.

Depuis les pH acides jusqu'à pH 9, les déplacements chimiques des protons ortho (et méta) des isomères cis et trans sont très voisins. Mais entre pH 9 et pH 12 (titration de la fonction phénol) les résonnances apparaissent à des fréquences différentes.

Des signaux distincts des protons aromatiques (des 2 formes isomères) ont également été observés pour le même modèle dans le DMSO (cf. ch. V).

Les résultats expérimentaux similaires obtenus pour les études dans le DMSO et dans H_2O permettent de proposer la même interprétation : des résonnances spécifiques aux protons aromatiques des isomères cis et trans traduisent un mouvement de la chaîne latérale de la tyrosine plus contraint dans l'isomère trans que dans l'isomère cis. Des interactions tyrosine - proline ont été avancées (10) pour interpréter ce résultat.

Pour Tyr Pro Gly Gly en solution dans l'eau, jusqu'à pH 9, les mouvements de la chaîne latérale de la tyrosine sont peu contraints : δ ortho cis \approx δ ortho trans et δ méta cis \approx δ méta trans. A pH > 9, l'apparition de la charge négative (titration de la fonction phénol) modifie les interactions entre tyrosine et

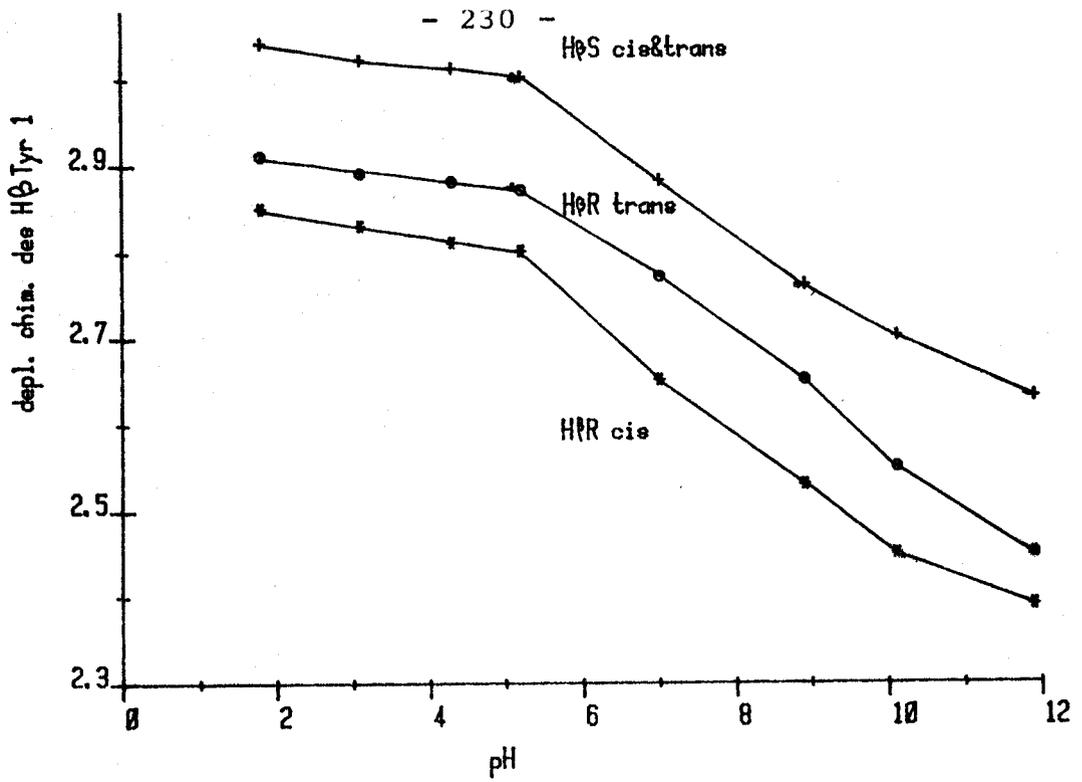


FIGURE IV

Variations des déplacements chimiques des protons β Tyr de Tyr Pro Gly Gly en fonction du pH

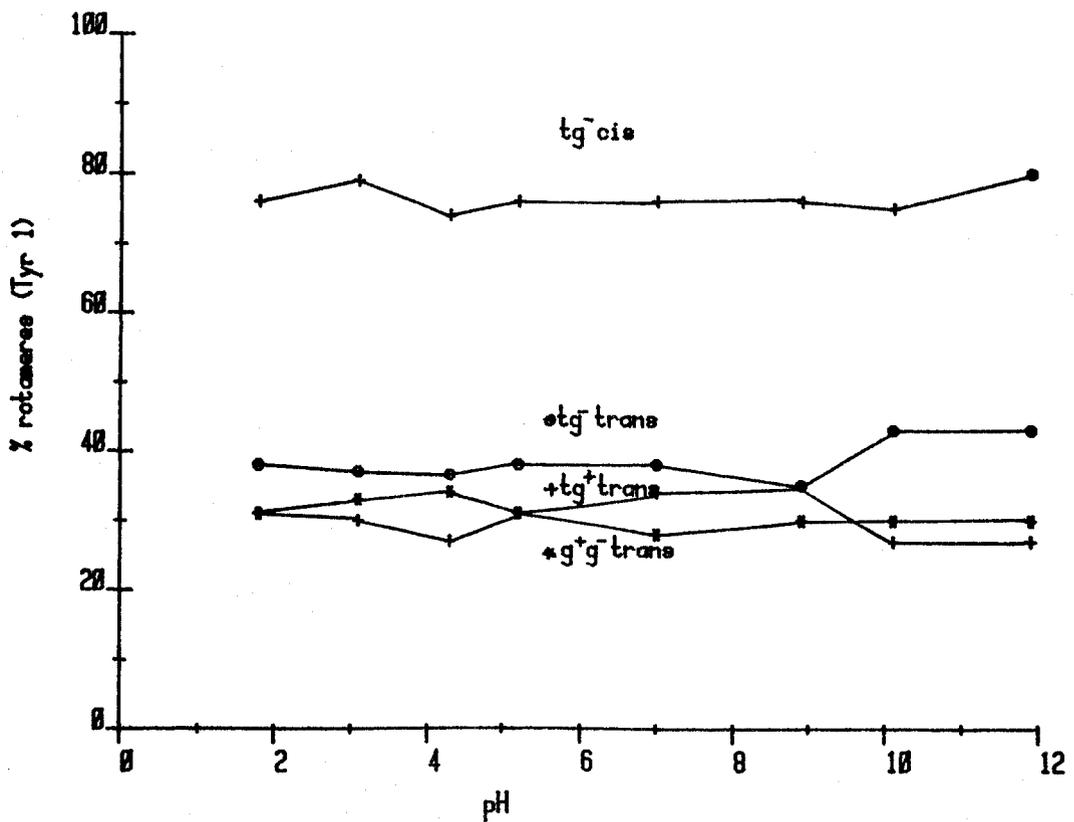


FIGURE V

Variations des populations tg^- , tg^+ , g^+g^- de Tyr Pro Gly Gly en fonction du pH

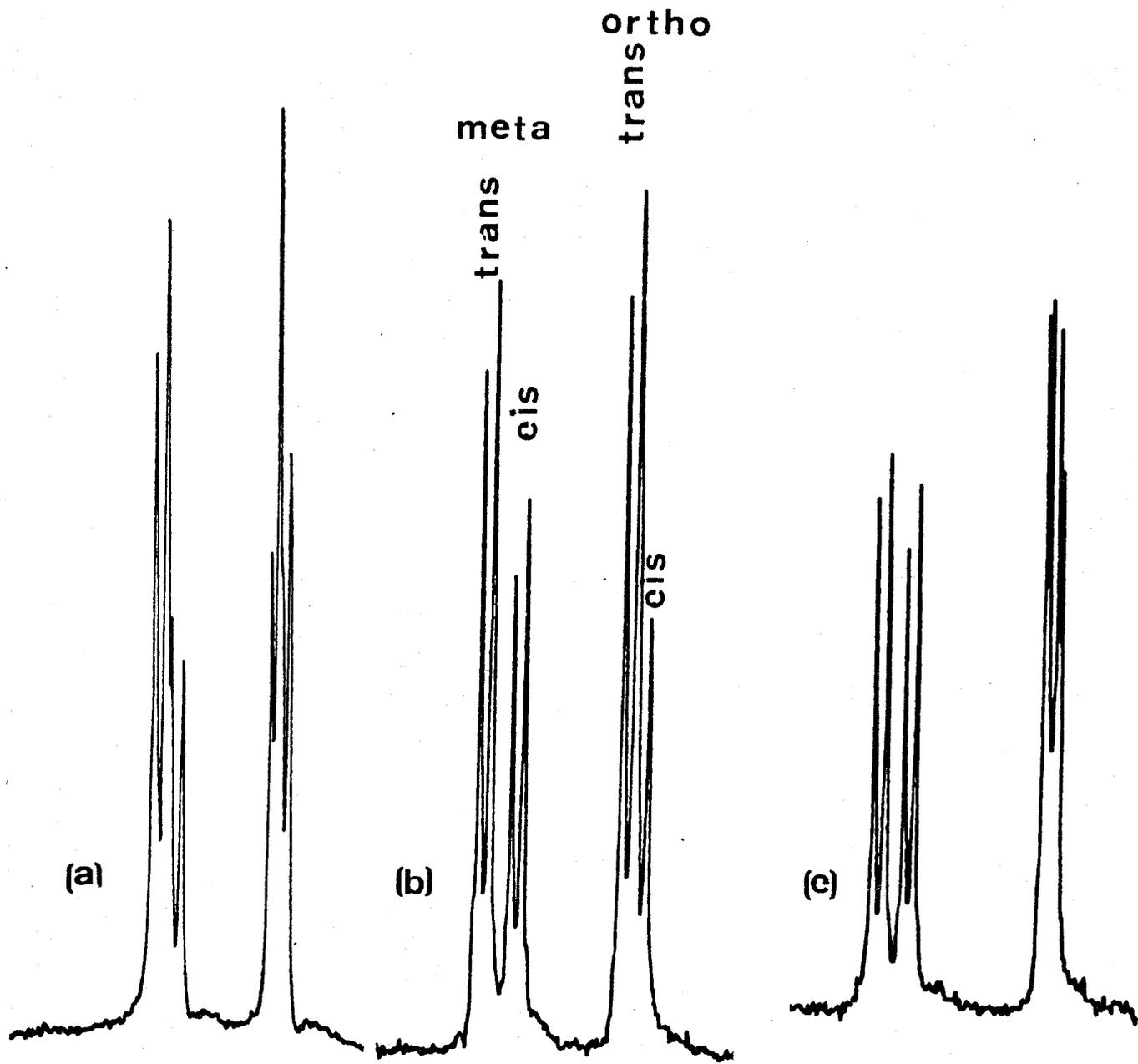


FIGURE VI

Signaux de résonances des protons aromatiques de

Tyr Pro Gly Gly pour 3 valeurs du pH

(a) : 8,9 ; (b) : 10,9 ; (c) : 11,9



proline conduisant à des mouvements plus contraints de la chaîne latérale de la tyrosine (isomère trans).

- isomérisation *cis-trans*

La quantité d'isomère *cis* augmente avec le pH : ceci est déjà bien connu (11). Dans le cas de notre modèle, la proportion d'isomère *cis* est de 25 % à pH 5,2; elle est de 50 % à pH 12.

Remarque :

L'ensemble de nos résultats expérimentaux n'est pas d'analyse immédiate, en particulier en milieu basique, il n'est pas toujours facile d'attribuer les effets observés à la titration du $^+NH_3$ ou à celle de la fonction phénol située à proximité.

Pour avancer dans l'interprétation, l'étude RMN proton de Phe Pro Gly Gly a donc été envisagée : elle peut permettre de préciser les effets dus à la titration du $^+NH_3$ et par voie de conséquence ceux dus à la titration de la fonction phénol du modèle Tyr Pro Gly Gly.

B - Phe Pro Gly Gly

1 - Spectres

Spectre XIX Solvant D_2O pH = 6,6

Spectre XX Agrandissement de la région H_α Gly et H_β Phe du spectre XIX

2 - Variation de pH

Les variations des déplacements chimiques des protons α des résidus glycines (Fig. VII) ainsi que celles des protons β du résidu phénylamine (Fig. VIII) ont été étudiées en fonction du pH.

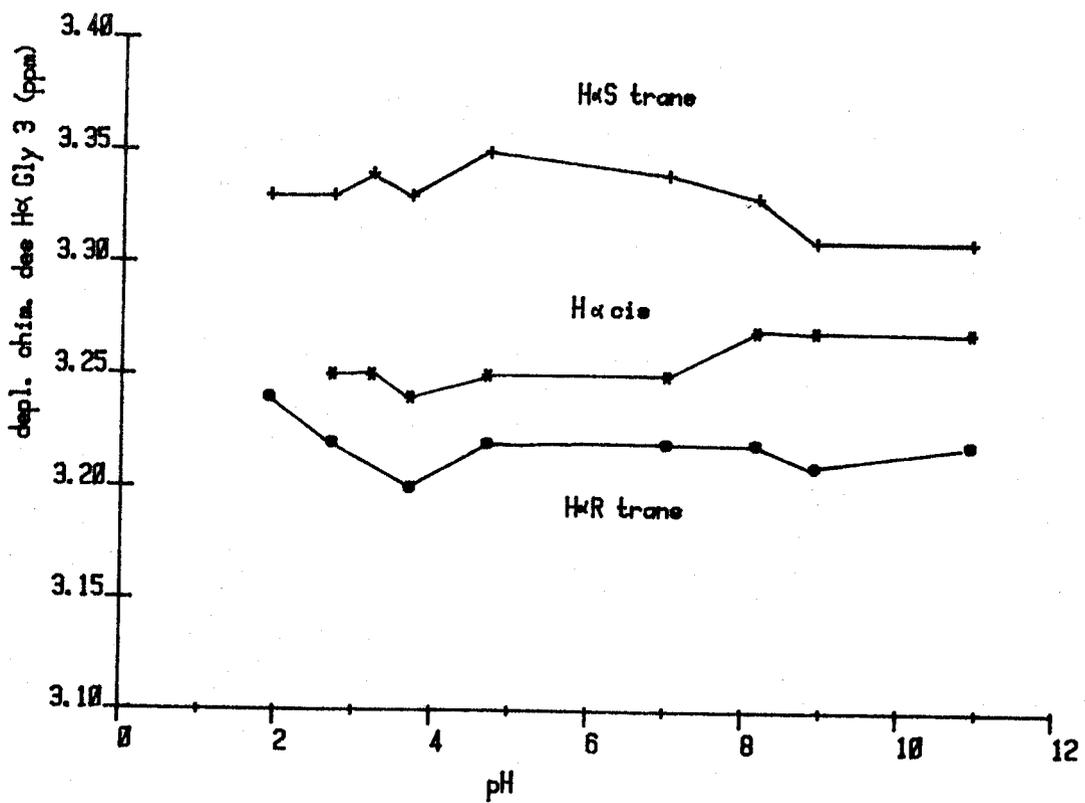
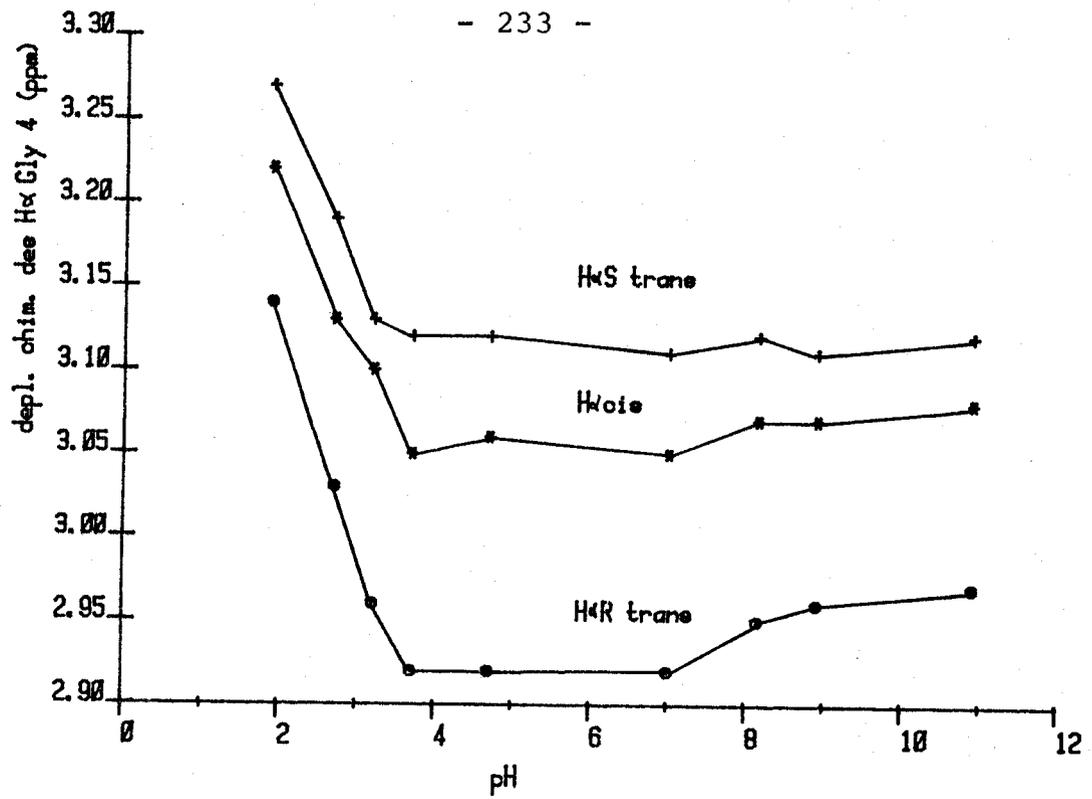


FIGURE VII

Variations des déplacements chimiques des protons α de Gly 3 et Gly 4 de Phe Pro Gly Gly en fonction du pH



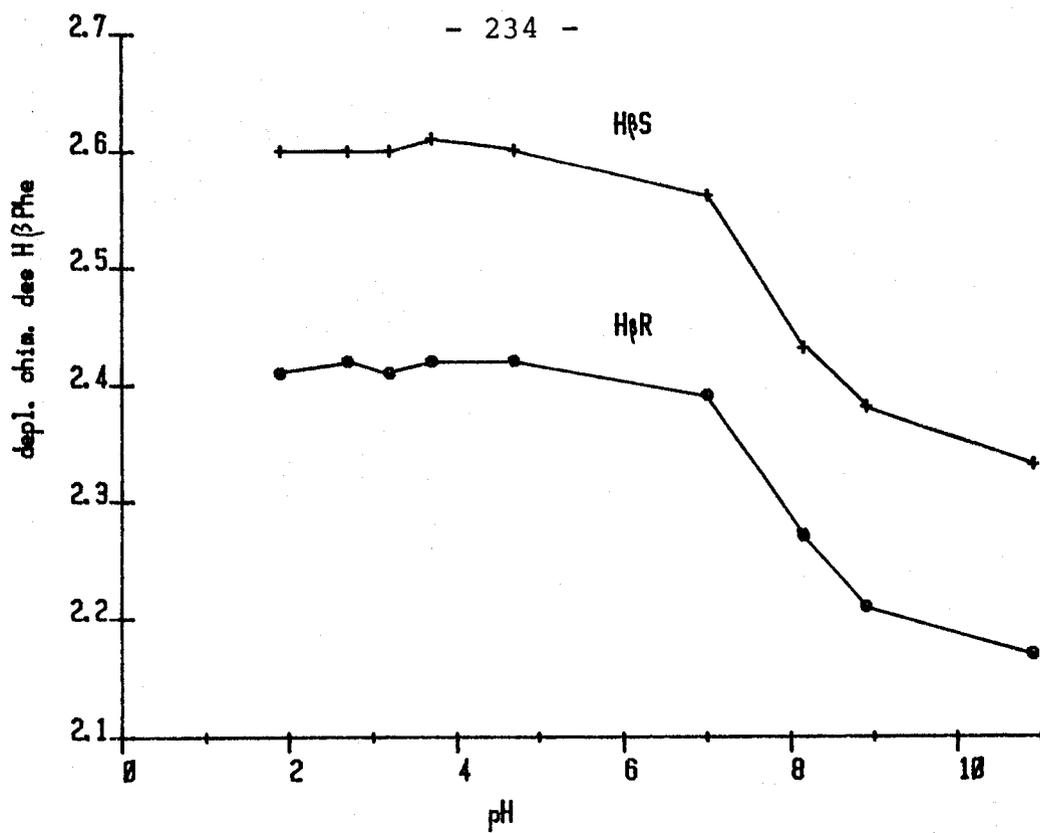


FIGURE VIII

Variations des déplacements chimiques des protons β Phe de Phe Pro Gly Gly en fonction du pH

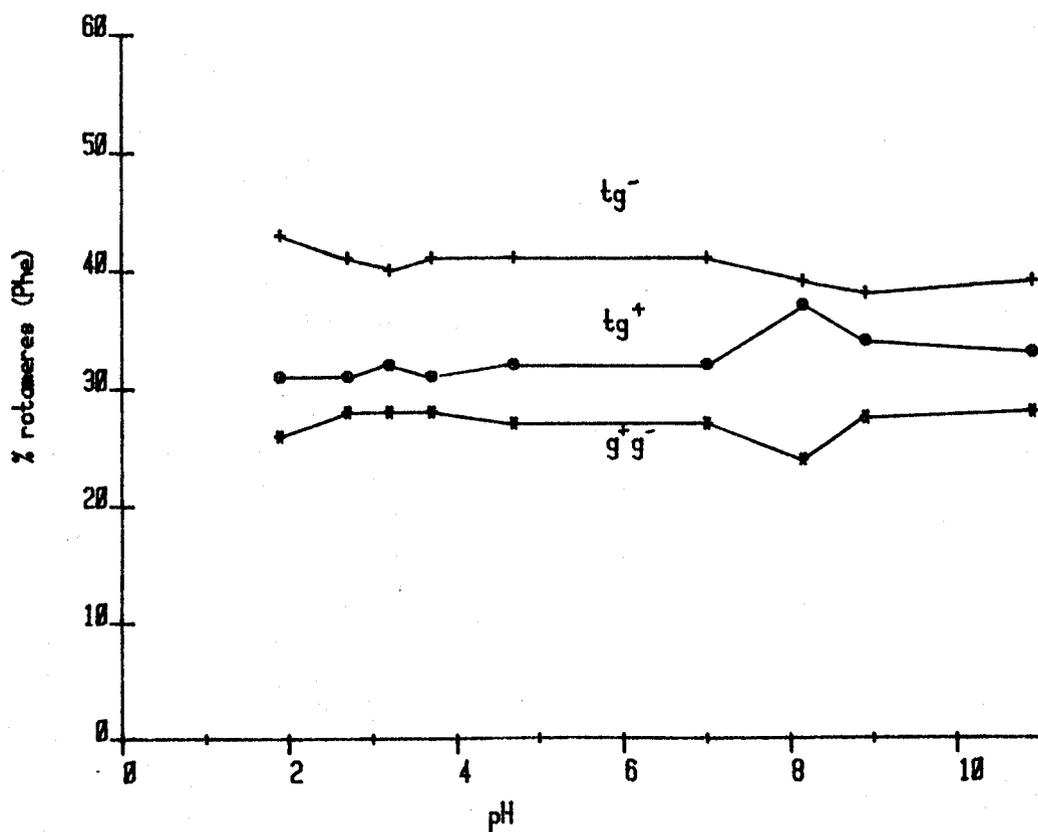


FIGURE IX

Variations des populations tg^- , tg^+ , g^+g^- de Phe Pro Gly Gly en fonction du pH



Les distributions des populations de rotamères de la chaîne latérale de la phénylalanine sont reportés sur la figure IX (isomère trans). Comme pour la séquence Tyr Pro Gly Gly, les valeurs obtenues s'approchent de celles d'une distribution statistique. Pour l'isomère cis, les populations n'ont pu être calculées que pour 2 valeurs du pH (8,15 et 10,9). Dans l'un et l'autre cas, le rotamère tg^- est le plus peuplé (75 %).

Les résultats obtenus mettent en évidence des points communs avec ceux de l'étude de Tyr Pro Gly Gly :

- 1 - Inéquivalence des protons α Gly de l'isomère trans et équivalence de ceux-ci pour l'isomère cis.
- 2 - Forte prépondérance de la population tg^- pour l'isomère cis et tendance à une distribution statistique pour l'isomère trans.

Mais des différences apparaissent pour les valeurs élevées du pH. En particulier pour Phe Pro Gly Gly, les protons α Gly 3 maintiennent leur inéquivalence après pH 10, alors que pour Tyr Pro Gly Gly, elle est fortement réduite. Aussi, il semble que les comportements spécifiques des protons α Gly 3 observés pour la séquence Tyr Pro Gly Gly soient en relation avec la titration de la fonction phénol.

C - INTERPRETATION

La discussion qui suit a pour but essentiel de préciser la conformation de Tyr Pro Gly Gly, mais les résultats similaires obtenus pour Phe Pro Gly Gly (sauf à pH > 10) laissent supposer que l'interprétation peut dans ses grandes lignes s'appliquer aussi à ce modèle.

Les résultats spécifiques obtenus pour les isomères cis et trans (protons α Gly, distribution des populations de rotamères) permettent de proposer pour chacun d'eux des conformations différentes : l'équivalence des H_{α} Gly suggère une structure flexible pour l'isomère cis ; par contre, l'inéquivalence

de ces protons pour l'isomère trans pourrait être utilisé pour avancer l'hypothèse d'une conformation plus organisée.

Nos conclusions seraient alors en accord avec celles de Fermandjan et coll. (12) proposées pour la séquence Gly Pro Asn Gly : pour l'isomère trans, les résidus Gly 1 et Gly 4 sont assez proches (structure repliée) contrairement à ce qui est observé pour l'isomère cis (solvant D₂O).

Mais, utiliser pour l'analyse conformationnelle l'inéquivalence des protons α des résidus glycine pose un problème : il apparaît en effet dans la littérature des controverses sur l'origine de l'inéquivalence.

En particulier Morlino et Martin (13), en se basant sur l'analyse théorique de Pople (14), estiment que l'inéquivalence peut ne pas correspondre à une restriction des mouvements de rotation autour des liaisons simples : la présence d'un centre asymétrique (par exemple, un résidu chiral voisin de la glycine) ne permet pas aux protons α Gly de moyenniser un même environnement magnétique, même en présence d'une libre rotation autour des liaisons simples (théorie du gradient de champ électrique).

Par contre, Nakumura et Jardetzki (15) ont montré que l'hypothèse ci-dessus n'est pas compatible avec de nombreuses données expérimentales. Ceci amène ces auteurs à conclure que l'inéquivalence est la conséquence des positions géométriques spécifiques de chacun des protons α Gly : l'écart de leur déplacement chimique a donc une origine conformationnelle (mouvements restreints).

Nos résultats paraissent appuyer l'hypothèse de Jardetzki et coll. (15) : il est en effet difficile de rendre compte sur la base de l'effet de gradient de champ de l'inéquivalence des protons α Gly 3 et Gly 4 de l'isomère trans et de leur équivalence dans l'autre isomère alors que la séquence est identique (même asymétrie de l'environnement immédiat).

Récemment, Anteunis et coll. (16) (17) ont aussi présenté des arguments en faveur de l'hypothèse des mouvements

restreints. Ils ont de plus attiré l'attention sur le rôle du courant de cycle des résidus aromatiques qui peuvent accentuer le degré de l'inéquivalence. En ce qui concerne notre modèle, si on retient la participation à l'inéquivalence du courant de cycle de la tyrosine, il faut admettre une certaine proximité du phényle et des résidus glycine. Ceci conduit à proposer une structure repliée qui permet de rapprocher les résidus tyrosine 1 et glycine 4.

Mais l'examen de la figure I suggère de ne pas envisager un rôle essentiel du courant de cycle.

En effet, la titration de la fonction phénol se traduit par une forte diminution de l'inéquivalence des protons α de Gly 3 : les protons R et S glissent respectivement vers les bas et hauts champs. Mais leur "déplacement chimique moyen" reste pratiquement constant, il est voisin de celui des protons α Gly 3 de l'isomère cis. Si la réduction de l'inéquivalence est due à une diminution de l'effet du courant de cycle de la tyrosine, on peut s'attendre à un glissement vers les bas champs du "déplacement moyen" (déblindage). Ceci est contraire à nos résultats.

En conséquence, il est probable que la diminution de l'inéquivalence correspond à une flexibilité accrue de la chaîne principale, d'autant plus que les déplacements chimiques des H_{α} Gly 3 de l'isomère trans deviennent très voisins de celui des H_{α} Gly 3 de l'isomère cis pour lequel une structure flexible a été proposée.

La comparaison des résultats obtenus pour Tyr Pro Gly Gly et Phe Pro Gly Gly montre que l'accroissement de la flexibilité (premier modèle, isomère trans) est en relation avec l'apparition de la charge négative sur la fonction phénol, mettant en évidence son rôle dans la transition conformationnelle.

De la discussion qui vient d'être présentée, il ressort que l'inéquivalence peut être analysée pour proposer une conformation assez ordonnée de notre modèle (isomère trans, pH < 10).

Les valeurs différentes, pour les isomères cis et trans, des distributions des rotamères latéraux de la tyrosine sont vraisemblablement en relation avec les conformations spécifiques des chaînes principales correspondantes.

La population de l'orientation tg^- (75 %) pour l'isomère cis est sans doute à rapprocher de celle observée pour le dérivé protégé en solution dans le DMSO ($\approx 70\%$) où une structure désordonnée, flexible du modèle a été proposée. En ce qui concerne l'isomère trans, la distribution quasi statistique des populations de rotamères traduit le peu d'influence de l'environnement local de la tyrosine, en particulier on pouvait s'attendre à un effet d'orientation induit par la charge positive de l'ion ammonium situé à proximité. S'il est difficile d'évaluer la participation spécifique de tous les phénomènes qui régissent la distribution des populations, il faut tout de même signaler que dans l'hypothèse de la conformation repliée, l'approche des ions carboxylate et ammonium tend à neutraliser les charges. Ceci peut dans une certaine mesure rendre compte des résultats obtenus.

Cette hypothèse a également été proposée par B. HECQUET à l'issue d'études d'extinction par Cs^+ et I^- de la fluorescence du noyau aromatique de Tyr Pro Gly Gly. Il a en effet constaté que la constante de vitesse de la réaction de chacun de ces ions est la même, ce qui n'est concevable que si la charge positive de l'extrémité N terminale est suffisamment neutralisée pour éviter les effets d'attraction ou de répulsion selon la nature de l'ion.

L'étude comparative de Tyr Pro Gly Gly et de Phe Pro Gly Gly permet de tirer quelques conclusions :

1 - L'inéquivalence des protons α de Gly 3 et Gly 4 suggère une structure plus organisée de l'isomère trans alors que leur équivalence pour l'isomère cis correspond à une structure flexible.

2 - Les distributions des populations de rotamères des résidus aromatiques (Tyr et Phe) sont en accord avec ces

propositions, en particulier la distribution quasi-statistique (isomère trans) s'interprète en partie dans le cadre de la structure repliée pour laquelle les extrémités polaires (N et C terminales) se neutralisent au moins partiellement.

3 - Pour l'isomère trans, la titration de la fonction phénol ($\text{pH} \approx 10$) rend la chaîne principale davantage flexible et modifie la force de l'interaction entre le cycle pyrrolidine de la proline et celui du phényle de la tyrosine conduisant à une mobilité restreinte de la chaîne latérale du résidu aromatique.

4 - Lors de l'étude de la séquence Tyr Pro Gly Gly en solution dans le DMSO, il n'est pas apparu de comportements très différents des isomères cis et trans, contrairement aux conclusions de la présente étude.

L'augmentation du pouvoir dissociant du solvant modifie les forces susceptibles de stabiliser des structures repliées et en particulier, celles-ci ne paraissent plus suffisamment efficaces dans le cas de l'isomère cis.

II - Gly Pro Tyr Gly

1 - Spectre (XXI)

a : solvant D₂O pH = 6,3

b : solvant : 90 % H₂O, 10 % D₂O pH = 5,1

2 - Commentaires

- protons amides

L'isomérisation cis trans de la liaison amide Gly - Pro donne lieu à l'observation de résonances spécifiques aux protons amides de chaque isomère.

- protons α Gly

- Isomère trans. Les protons α Gly 1 et Gly 4 sont inéquivalents $\Delta\delta(\text{Gly } 1) = 0,08 \text{ ppm}$, $\Delta\delta(\text{Gly } 4) = 0,28 \text{ ppm}$.

- Isomère cis. Seuls les signaux H _{α} de Gly 4 peuvent être observés ; l'inéquivalence, $\Delta\delta = 0,07 \text{ ppm}$, est nettement plus faible que celle des H _{α} du résidu Gly 4 de l'isomère trans (028 ppm).

- protons β , γ Proline

Les résonances des 4 protons β , γ sont bien séparées. L'attribution a pu être faite par découplage du proton α et des protons δ .

3 - Variations du pH

- protons amides

Des comportements analogues à ceux présentés pour le modèle Tyr Pro Gly Gly ont été observés ; en particulier, lorsque le pH croît, le rapport des intégrales des résonances NH Tyr 3 / NH Gly 4 est nettement inférieur à 1 (à pH 6,7 on obtient 0,3). Une interprétation a déjà été proposée au paragraphe précédent.

- protons α (Fig. X)

- Gly 1. L'augmentation du pH réduit l'inéquivalence des 2 protons α . Dans l'hypothèse d'une interaction entre les extrémités polaires, la neutralisation de l'extrémité N terminale (ion ammonium) réduit la force de cette interaction ce qui peut permettre des mouvements de rotation plus libres autour des liaisons simples.

- Pro 2. Dans toute la gamme de pH étudiée, les constantes de couplage du proton α et des protons β sont voisines de 8,5 Hz et 4,5 Hz, valeurs proches de celles rapportées par Torchia (18) pour la polyproline II et Toma et coll. (19) pour Gly Pro Leu Gly. En accord avec ces auteurs, l'hypothèse de l'interconversion des formes endo, exo du cycle pyrrolidine est retenue.

- Gly 4. Les 2 protons glissent vers les hauts champs quand on titre la fonction acide carboxylique, mais l'effet est nettement plus marqué pour le proton de configuration R (Isomère trans). Pour quelques valeurs du pH, les résonnances des protons α Gly 4 de l'isomère cis ont été observées, ces protons restent peu inéquivalents.

- protons β Tyr

Les déplacements chimiques et les distributions des populations des rotamères tg^- , tg^+ , g^+g^- sont reportés respectivement sur les figures XI et XII.

En augmentant le pH, l'inéquivalence croît ; elle passe par un maximum au point isoélectrique.

La distribution des populations n'est pas fondamentalement modifiée par la variation du pH. L'effet le plus marqué semble situé vers $pH = pK_1$ (titration de la fonction C terminale).

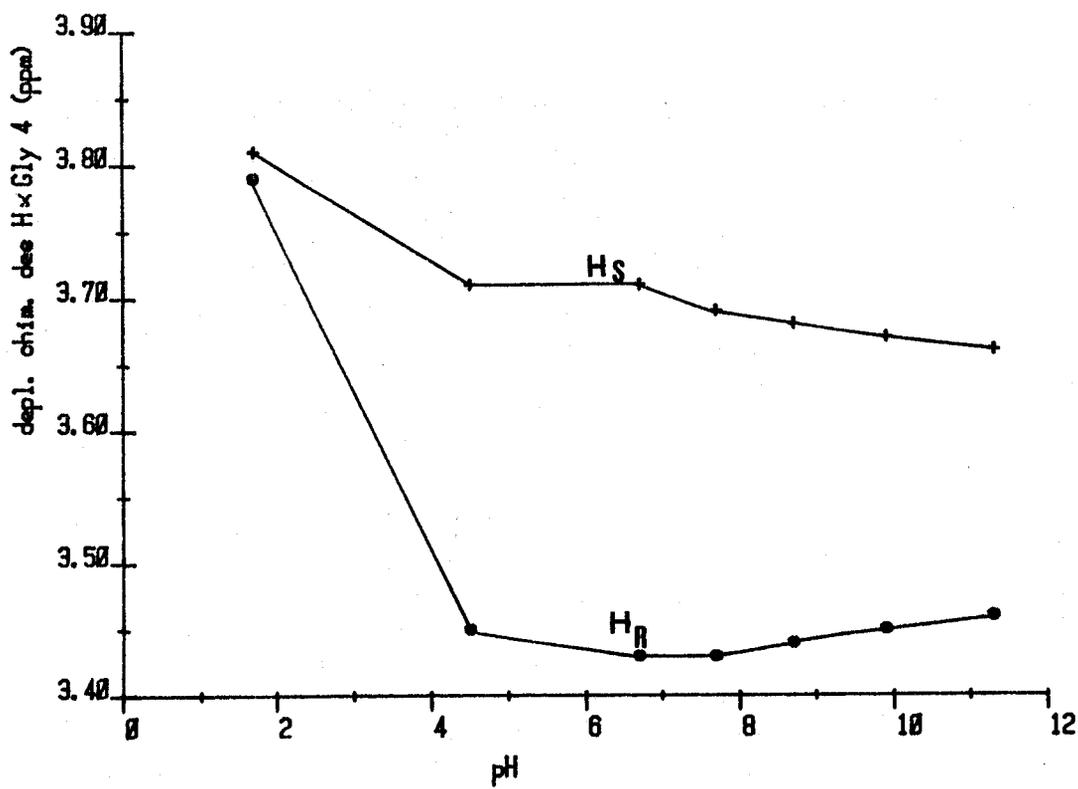
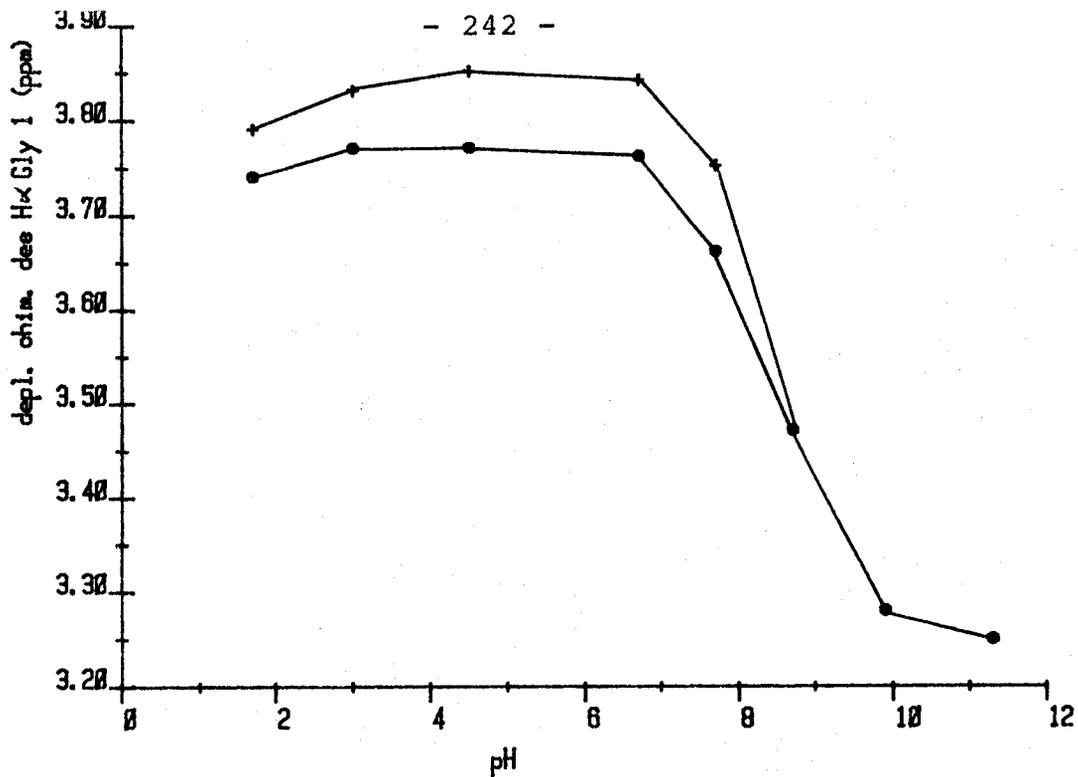


FIGURE X

Variations des déplacements chimiques des protons α Gly 1 et Gly 4 de Gly Pro Tyr Gly en fonction du pH



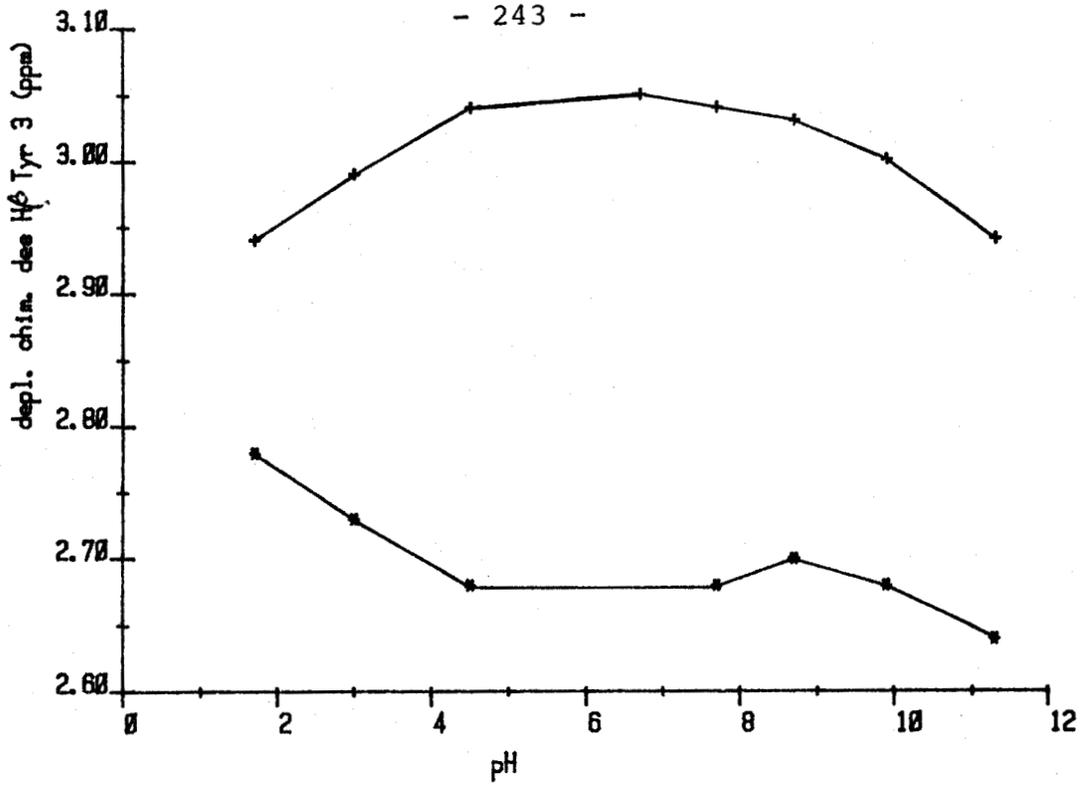


FIGURE XI

Variations des déplacements chimiques des protons β Tyr de Gly Pro Tyr Gly en fonction du pH

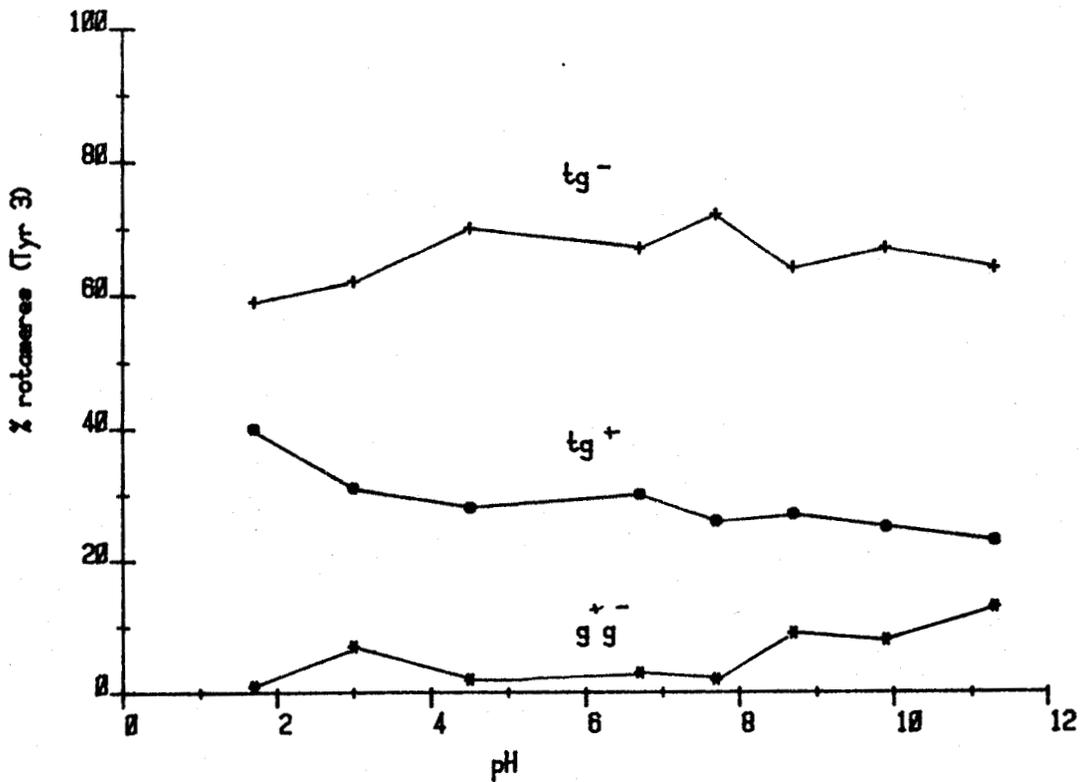


FIGURE XII

Variations des populations tg^- , tg^+ , g^+g^- de Gly Pro Tyr Gly en fonction du pH.



- protons β et γ Pro (Figure XIII)

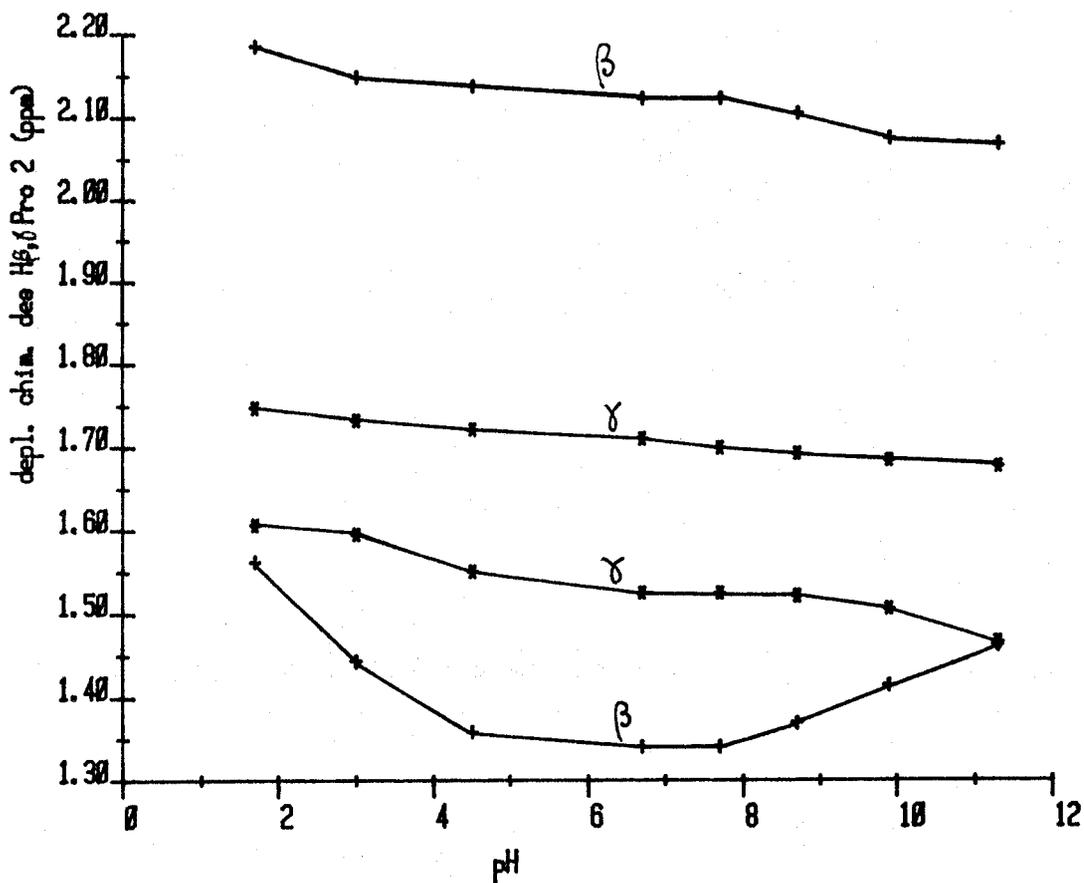


FIGURE XIII

Variations des déplacements chimiques des protons β , γ Pro de Gly Pro Tyr Gly en fonction du pH

Les protons β et γ les plus sensibles aux variations du pH sont ceux qui résonnent à champ plus élevé.

Lors de la titration de la fonction phénol, l'inéquivalence des protons β décroît contrairement à ce qui est observé pour les protons γ .

4 - Variation de température (isomère trans)

Les déplacements des protons NH ont été suivis en fonction de la température. Ceci a été fait pour 2 valeurs du pH :

pH : 6,7 (forme zwitterionique)

pH : 2,1 (forme cationique)

Les coefficients de température sont reportés dans le tableau I.

Valeurs du pH	2,1	6,7
$\Delta\delta/\Delta t$ NH Tyr 3	5,8	4,6
$\Delta\delta/\Delta t$ NH Gly 4	4,2	2,6

TABLEAU I

Coefficients de température ($\times 10^3$ ppm/°) des protons amides de Gly Pro Tyr Gly pour 2 valeurs du pH

Il est difficile de comparer entre elles des valeurs obtenues pour des pH différents. Mais pour une valeur donnée du pH, le rapport des coefficients de température obtenus pour les protons amides des résidus Tyr 3 et Gly 4 donne une idée des accessibilités relatives.

Pour pH 2,1, le rapport des coefficients de température NH Gly 4 / NH Tyr 3 est de 0,72 et pour pH 6,7, il est de 0,56. Aussi, on peut penser que le proton NH de Gly 4 est moins accessible quand le modèle est sous forme zwitterionique.

5 - Discussion

De la comparaison des résultats obtenus pour Gly Pro Tyr Gly avec ceux déjà discutés pour les séquences Tyr Pro Gly Gly et Phe Pro Gly Gly, il ressort un point commun essentiel : l'inéquivalence des protons α Gly 4 est nettement plus élevée pour l'isomère trans que pour l'isomère cis.

Ce résultat a déjà été discuté et interprété en terme de conformation repliée pour l'isomère trans et de structure plus flexible pour l'isomère cis (cf. paragraphe I).

essentiellement vers la proline ($\text{tg}^- \approx 60-70 \%$). Aussi une modification de la valeur de χ_2 doit perturber non seulement les protons β Tyr (effet du courant de cycle), mais aussi le proton β proline le plus proche du phényle et dans une moindre mesure, l'un des protons γ . Il est intéressant de noter qu'effectivement les protons β et γ Proline les plus influencés par la variation du pH sont ceux dont les résonances sont à haut champ (plus proche du phényle).

Une hypothèse est alors proposée : la modification de l'état ionique de la chaîne principale du dérivé modifie surtout la valeur de l'angle χ_2 .

III - Gly Pro Gly Tyr

1 - Spectre (XXII)

a : solvant D₂O pH = 6,1

b : solvant 90 % H₂O - 10 % D₂O pH = 5,4

2 - Variation du pH

Seules les résonnances de l'isomère trans ont pu être suivies.

- H_α Glycine (Figure XIV)

- Résidu Gly 1. Les 2 protons α sont équivalents. La titration de l'extrémité N terminale (pH = pK₂ ≈ 8,5) fait glisser vers les hauts champs le singulet de Gly 1. Lors de la titration de l'extrémité C terminale (pH = 3,1) un très léger effet de blindage est également observé. Aussi, l'hypothèse d'une certaine proximité entre les extrémités peut être avancée (repliement de la structure) ceci est en accord avec les conclusions de Fermandjan et coll. (12) pour l'étude par RMN du ¹³C de Gly Pro Asn Gly.

- Résidu Gly 3. Les 2 protons α Gly 3 sont inéquivalents (sauf pH < pK₂). L'augmentation du pH fait glisser vers les hauts champs le "déplacement moyen" (augmentation de la densité électronique de l'extrémité C terminale).

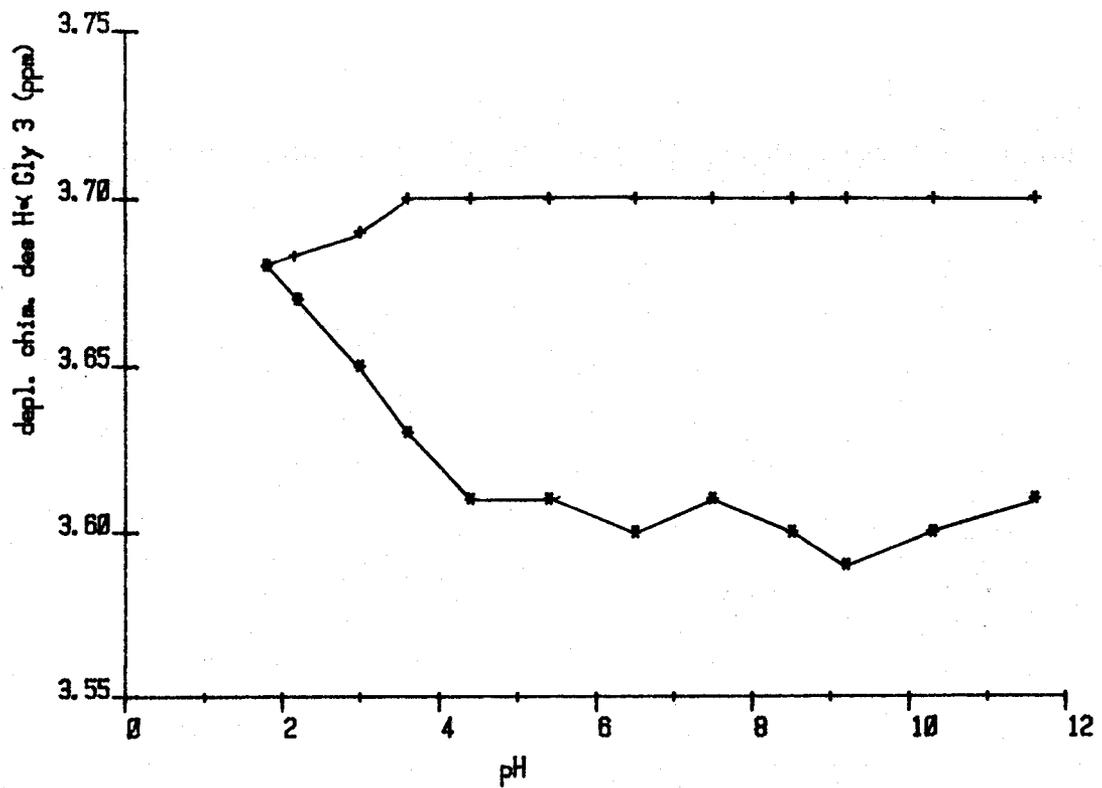
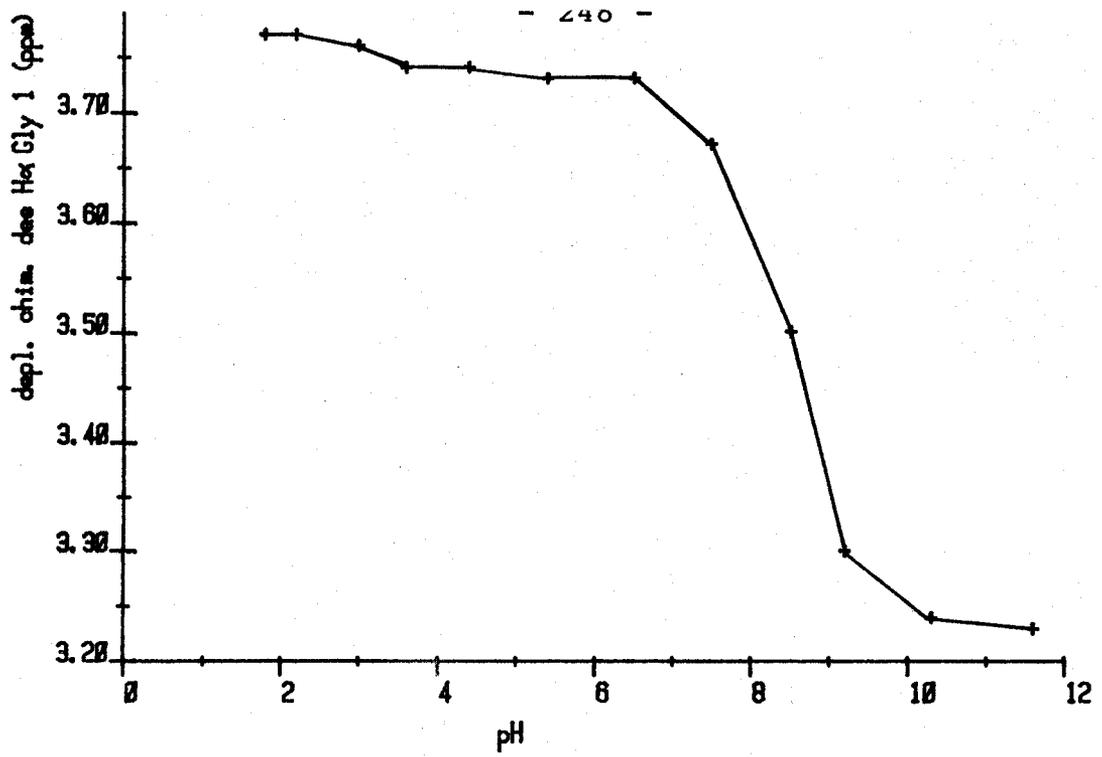


FIGURE XIV

Variations des déplacements chimiques des protons α Gly 1 et Gly 3 de Gly Pro Gly Tyr en fonction du pH



Aussi l'analogie des résultats laisse supposer que les isomères cis et trans de Gly Pro Tyr Gly adoptent des conformations proches de celles proposées pour les formes isomères de Tyr Pro Gly Gly.

En ce qui concerne l'isomère trans, les résultats des effets de température s'accordent bien avec l'hypothèse du repliement : le proton NH du résidu Gly 4 est assez bien protégé ($\Delta\delta/\Delta t = - 2,6 \cdot 10^{-3}$ ppm/° à pH 6,7). Le rôle stabilisateur de l'interaction électrostatique entre les extrémités polaires est mis en évidence par la comparaison des rapports des coefficients de température du tableau I : le proton NH Gly 4 est mieux protégé dans le zwitterion que dans la forme cationique.

Pour ce qui est de l'inéquivalence des protons β tyrosine, seuls les résultats obtenus de pH acide à pH neutre sont discutés : les variations observées peuvent alors être mises en relation avec l'état ionique de la chaîne principale (la fonction phénol n'est titrée qu'à pH bien plus élevé).

L'augmentation de l'inéquivalence quand on passe de pH 1,8 ($\Delta\delta = 0,16$ ppm) à pH = 6,7 ($\Delta\delta = 0,38$ ppm) peut être exprimée par des modifications des environnements magnétiques de chacun des protons β tyrosine.

Ceci peut se faire au moins par deux contributions :

- 1 - Modification des positions des protons β Tyr par rapport à la chaîne principale (variation de χ_1)
- 2 - Modification des positions de ces mêmes protons vis-à-vis du phényle (variation de χ_2).

En ce qui concerne le premier point, les faibles modifications des populations des rotamères (Fig. XII) ne paraissent pas susceptibles d'exprimer l'augmentation de l'inéquivalence des 2 protons β Tyrosine (Fig. XI).

Pour ce qui est de la rotation autour de l'axe $C_\beta C_\gamma$ (χ_2) il faut rappeler que le phényle de la tyrosine est orienté

- H_{β} Tyr

L'analyse des massifs H_{β} Tyr permet d'obtenir les variations, en fonction du pH, des déplacements chimiques (Fig. XV) et des distributions des populations de rotamères (Fig. XVI).

Les résonances des protons β Tyr glissent vers les hauts champs lors de la titration des fonctions acide carboxylique et phénol.

3 - Discussion

Pour la séquence Gly Pro Gly Tyr, l'inéquivalence des protons β Tyr reste constante (Fig. XV), alors que pour le modèle Gly Pro Tyr Gly, l'écart des déplacements chimiques dépend de l'état ionique de la chaîne principale (cf. paragraphe II).

Il n'est pas évident d'interpréter les résultats spécifiques à ces deux séquences. Il semble cependant que les observations expérimentales puissent être mises en relation avec les hypothèses des structures repliées des chaînes principales. Pour l'une et l'autre séquences, le résidu aromatique occupe une position dont la fonction dans le repliement est très différente; en particulier lorsqu'elle est en 3ème position, la tyrosine participe avec le résidu précédent, la proline, au retournement à 180° de la chaîne peptidique.

En ce qui concerne les variations des populations de rotamères, elles ne sont notables, compte tenu de la précision expérimentale, que lors de la titration de la fonction acide carboxylique. Le rotamère tg^{+} oriente le phényle vers l'extrémité C terminale, aussi quand la valeur du pH augmente, la diminution de la population de l'orientation tg^{+} (aux environs de $pH = pK_1$) peut s'interpréter sur la base d'une répulsion phényle - ion carboxylate.

Le résultat observé pour la population du rotamère tg^{-} est plus inattendu. La conformation tg^{-} de la chaîne latérale tyrosine est celle qui éloigne le plus l'ion carboxylate

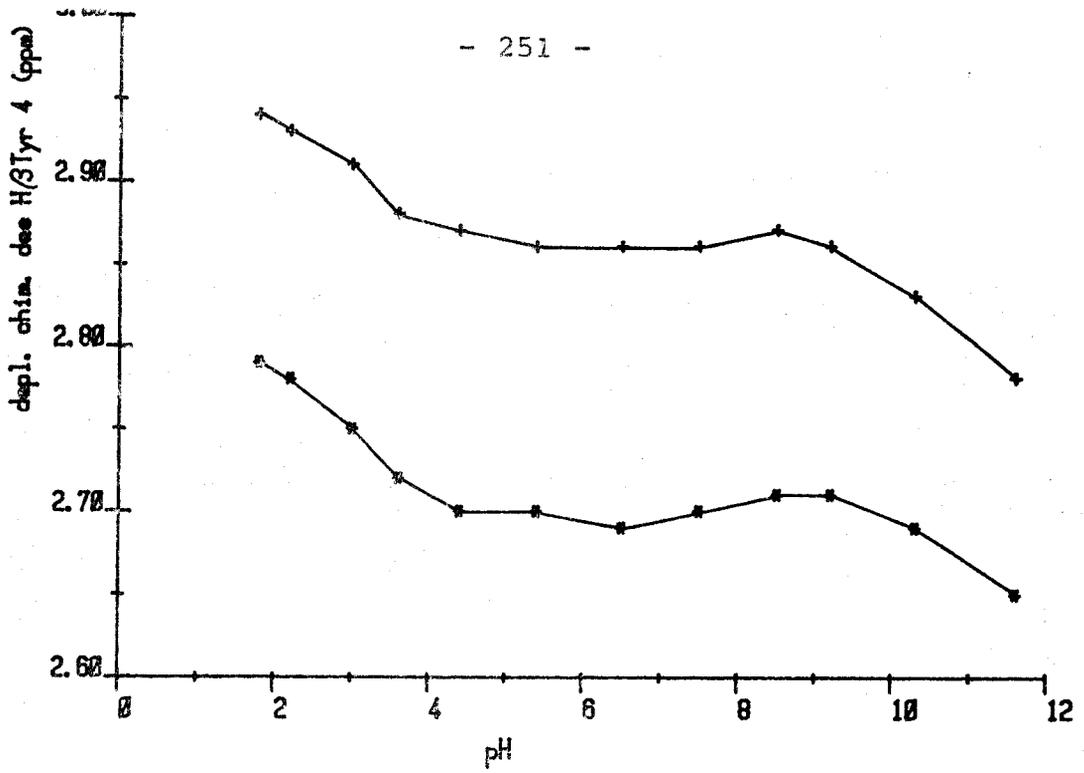


FIGURE XV

Variations des déplacements chimiques des protons β Tyr de Gly Pro Gly Tyr en fonction du pH

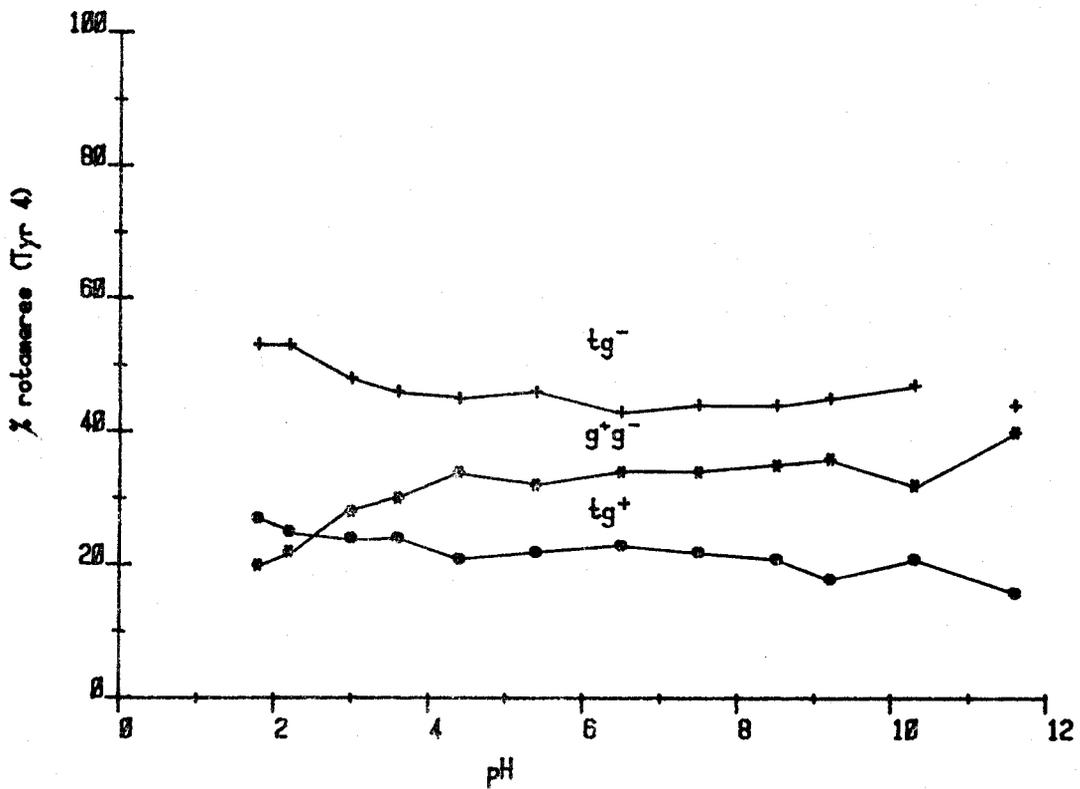


FIGURE XVI

Variations des populations tg^- , tg^+ , g^+g^- de Gly Pro Gly Tyr en fonction du pH



et le phényle ; cependant lors de la titration de la fonction acide, cette population est la plus en régression. Ce résultat n'est pas simple à interpréter. Il est possible que la titration de l'extrémité C terminale implique des modifications de la conformation de la chaîne principale et que celles-ci défavorisent davantage l'orientation tg^- . Il faut noter que dans le DMSO, un résultat analogue a pu être observé : la déprotection des extrémités N et C terminales s'est traduite par une forte diminution de la population tg^- , en corrélation la séquence peptidique qui est désordonnée à l'état protégé, paraît repliée lorsqu'elle est sous forme d'un zwitterion (cf. ch. V).

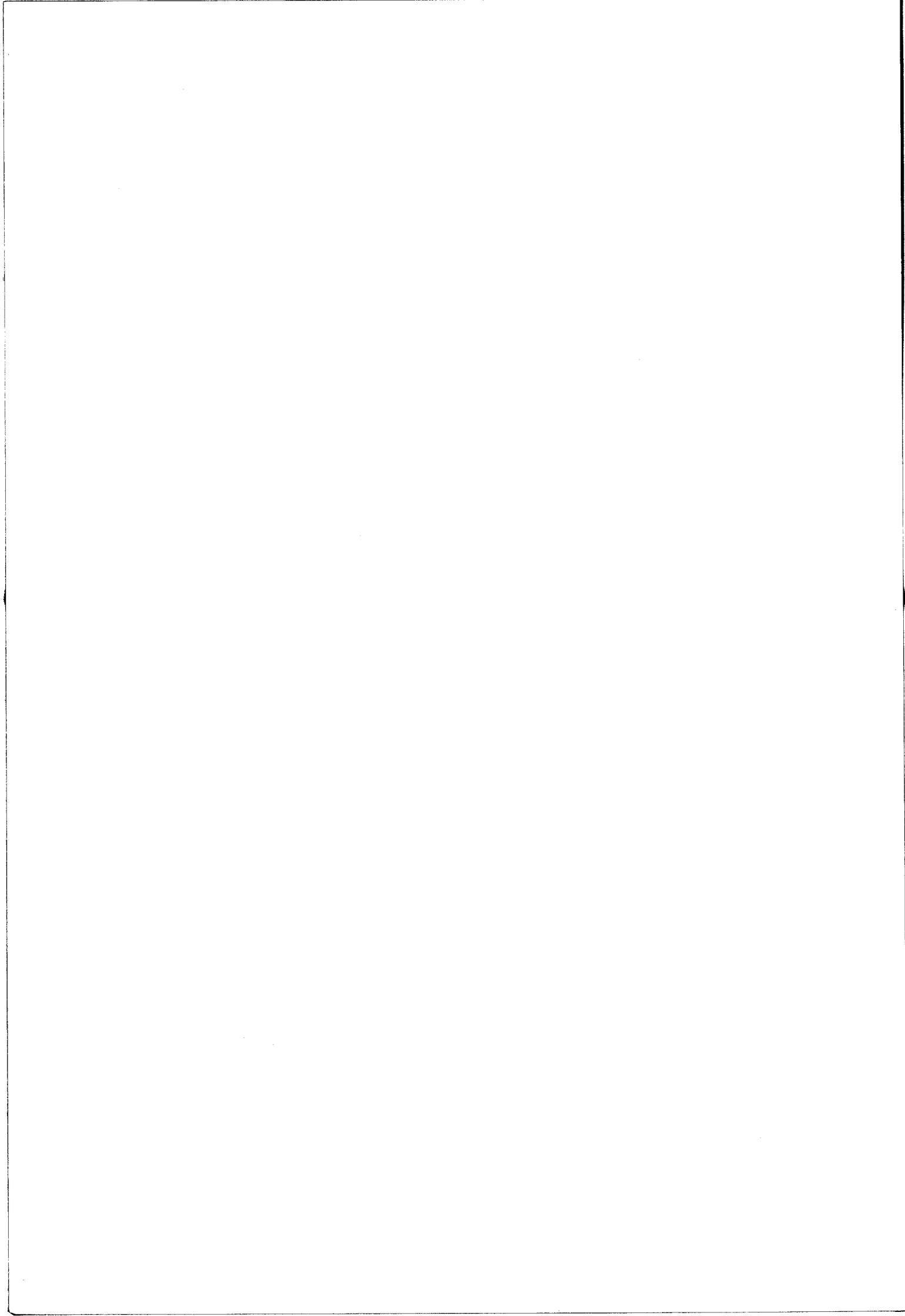
L'origine de l'inéquivalence des protons α Gly a déjà été discutée (1er paragraphe), les résultats obtenus pour ceux de Gly 3 (Fig. XIV) permettent d'apporter quelques précisions. En effet, leur inéquivalence est très sensible à la titration du groupe CO_2H . Dans l'hypothèse du gradient de champ électrique présentée au paragraphe I, l'asymétrie à prendre en compte pour exprimer l'inéquivalence des H_α Gly 3 est par conséquent celle induite par le résidu tyrosine porteur de l'ion carboxylate. On peut donc s'attendre à observer un effet sur les 2 protons β de la tyrosine plus proches du centre d'asymétrie. Or l'inéquivalence de ces 2 derniers n'est pas perturbée par la titration de l'extrémité C terminale.

Cette observation expérimentale - manque de corrélation entre les variations de l'inéquivalence des protons α Gly 3 et β Tyr 4) - semble donc réfuter une fois de plus la théorie du gradient de champ et donc paraît appuyer l'hypothèse de Jardetzki et coll. sur l'origine conformationnelle de l'inéquivalence (restriction de la liberté des mouvements).

CONCLUSION

Les variations des déplacements chimiques des protons α Gly et β Tyr ainsi que celles des populations des rotamères tg^- , tg^+ , g^+g^- ont été étudiées en fonction du pH.

Les résultats obtenus paraissent mettre en évidence une différence des conformations des isomères cis et trans (autour de la liaison X-Pro). En effet, en accord avec des données de la littérature, la conformation de l'isomère trans semble repliée, alors que celle de l'isomère cis paraît plutôt désordonnée.

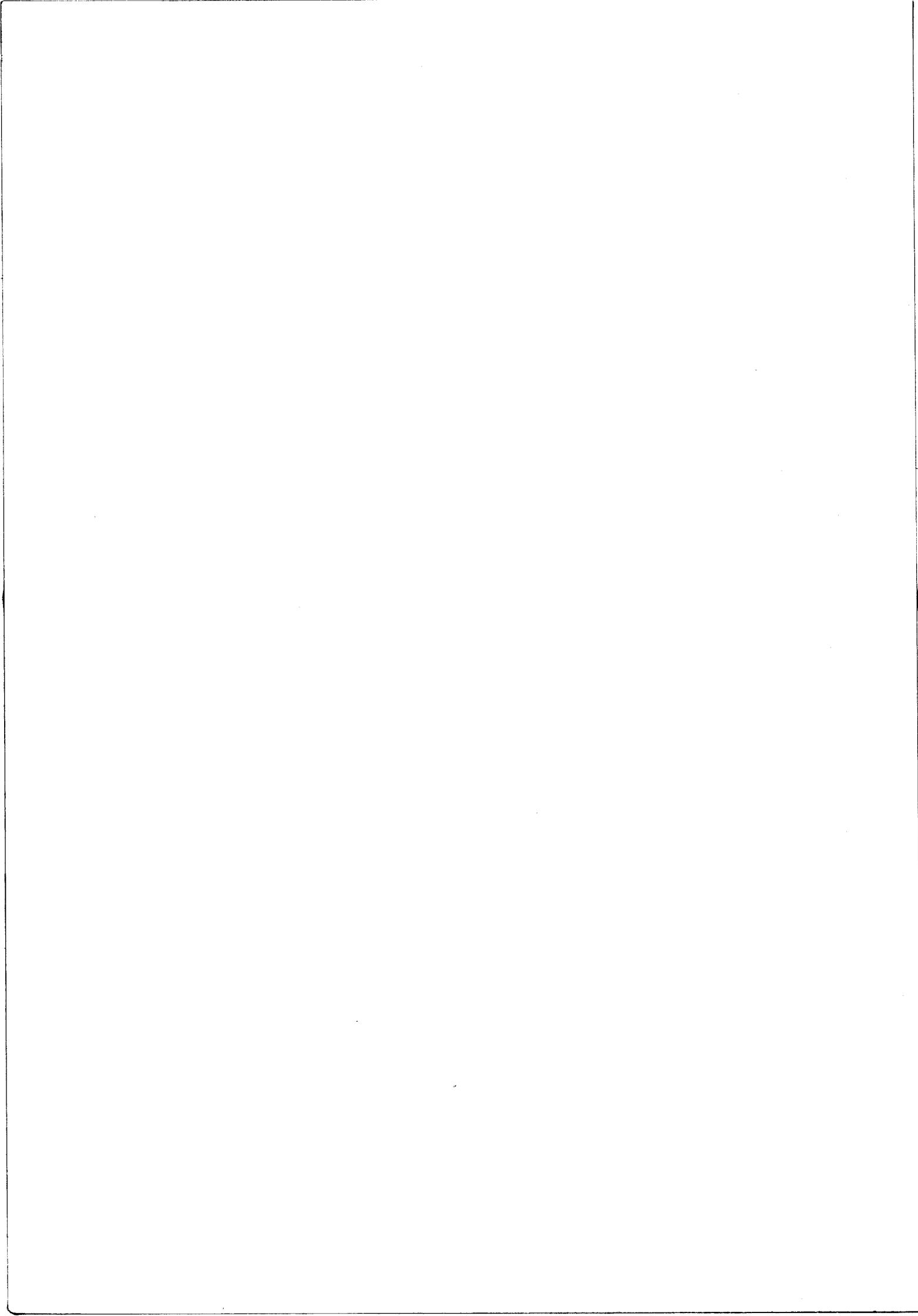


BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE VII

- (1) C. GARBAY-JAUREGUIBERRY, B.P. ROQUES, R. OBERLIN,
M. ANTEUNIS et A.K. LALA
Biochem. Biophys. Res. Commun (1976) 71, 558-565.
- (2) L. ZETTA, F. CABASSI, R. TOMATIS et M. GUARNERI
Eur. J. Biochem. (1979) 95, 367-376.
- (3) G.R. MARSHALL, H.E. BOSSHARD et W.H. VINE
Nature (1973) 245, 125-126.
- (4) M. KAINOSHO, K. AJISAKA, M. KAMISAKU et A. MURAI
Biochem. Biophys. Res. Commun (1975) 64, 425-432.
- (5) T.P. PITNER, J.D. GLICKSON, J. DADOK et G.R. MARSHALL
Nature (1974) 250, 582-584.
- (6) M. ANTEUNIS, A.K. LALA, C. GARBAY-JAUREGUIBERRY et
B.P. ROQUES
Biochemistry (1977) 16, 1462-1466.
- (7) M. SCHEINBLATT
J. Am. Chem. Soc. (1965) 87, 572.
- (8) J.D. GLICKSON, R. ROWAN, T.P. PITNER, J. DADOK,
A.A. BOTHNER-BY et R. WALTER
Biochemistry (1976) 15, 1111-1119.
- (9) J. KOBAYASHI, U. NAGAI, T. HIGAHIJIMA et T. MIYAZAWA
Biochem. Biophys. Acta (1979) 577, 195-206.
- (10) F. TOMA, S. FERMANDJIAN, M. LÖW et L. KISFALUDY
Biochem. Biophys. Acta (1978) 534, 112-122.
- (11) C. GRATHWOHL et K. WÜTHRICH
Biopolymers (1976) 15, 2043-2054.
- (12) H. LAM-THANH, F. TOMA, S. FERMANDJIAN et P. FROMAGEOT
Int. J. Pept. Prot. (1976) 609-616.
- (13) V.J. MORLINO et R.B. MARTIN
J. Am. Chem. Soc. (1967) 89, 3107-3111.

- (14) J.A. POPLÉ
J. Mol. Phys. (1958) 1, 1.
- (15) A. NAKAMURA et O. JARDETZKY
Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1967) 58, 2212-2219.
- (16) M.J.O. ANTEUNIS
Tetrahedron. Letters (1977) 18, 1535-1538.
- (17) M.J. ANTEUNIS, C. BECU, A.K. LALA, G. VERHEGGE et
K. NARAYAN-LALA
Bull. Soc. Chim. Belg. 86 (1977) 161-186.

C O N C L U S I O N



Des données radiocristallographiques de protéines globulaires ont montré que les chaînes principales se replient à 180° , le plus fréquemment par l'intermédiaire de coudes β qui font participer 4 résidus consécutifs.

Certains travaux théoriques sur ces structures cou-dées ont conclu que ces repliements sont stabilisés par des interactions à longue distance.

Cependant des études récentes ont montré que des peptides linéaires de petite taille peuvent aussi adopter la conformation en coude β . A ce propos, le rôle essentiel du résidu proline a pu être mis en évidence.

L'existence d'une organisation spatiale particulière (ou son aptitude à l'adopter) peut avoir un rôle essentiel sur la réactivité.

Dans ce contexte, nous avons entrepris l'étude de la conformation de peptides modèles par une technique spectroscopique : la résonance magnétique nucléaire.

La détermination de la conformation par RMN d'une molécule de peptide comporte pour l'essentiel trois étapes.

D'abord, les résonnances sont attribuées par des techniques de découplage. Ensuite, des méthodes sont mises en oeuvre pour préciser la nature flexible ou structurée de la molécule de peptide (effets de température, de solvants...).

Enfin, dans l'hypothèse où une conformation privilégiée peut être avancée, l'utilisation d'une relation de type Karplus permet d'analyser les constantes du couplage des protons α et amide en vue de proposer des valeurs des angles de torsion autour des liaisons simples N - C $_{\alpha}$.

La mise en application de ces méthodes pour l'étude de nos modèles a abouti aux conclusions suivantes :

En solution dans le DMSO, les peptides protégés adoptent des structures flexibles, ce qui est dû sans doute à la capacité du DMSO à solvater les protons amides et par conséquent à défavoriser l'établissement de liaisons hydrogène intramoléculaires susceptibles de stabiliser une conformation préférentielle.

A partir de cette hypothèse, nous avons cherché à favoriser une structure stable en essayant d'augmenter les forces d'interaction stabilisatrice dans la molécule. Ceci peut être fait soit en substituant au DMSO un solvant peu polaire (par exemple le chloroforme) ou soit en enlevant les protections N et C terminales de nos modèles : les zwitterions résultants peuvent alors adopter des conformations stabilisées par des interactions électrostatiques entre les extrémités polaires.

Dans l'un et l'autre cas, l'interprétation des résultats RMN a permis de proposer des structures repliées autour des séquences Pro_2X_3 .

L'analyse des couplages vicinaux montre que pour deux des modèles étudiés, le type de repliement peut être précisé :

β_{I} pour la séquence Gly Pro Tyr Gly

β_{II} pour la séquence Gly Pro Gly Tyr

En ce qui concerne la stabilisation des conformations repliées proposées pour nos dérivés en solution dans le chloroforme, il semble qu'elle soit essentiellement assurée par une liaison hydrogène NH (1er résidu).... O = C (4ème résidu) avec une participation dans certains cas de celle qui implique le NH du 4ème résidu et le carbonyle du premier résidu.

Pour les zwitterions en solution dans le DMSO, l'interaction électrostatique entre les extrémités polaires paraît jouer un rôle déterminant pour stabiliser le repliement de structure.

En outre, la conformation des chaînes latérales a pu être précisée. En particulier, les populations des rotamères latéraux de la tyrosine ont pu être calculées à partir des relations de Pachler.

Les blindages observés sur les protons β Pro de la séquence Gly Pro Tyr Gly ont été interprétés sur la base d'un effet de courant de cycle du phényle de la chaîne

DC
Glycyl

RMN
Glycyl

latérale de la tyrosine. C'est ce qui a permis, en accord avec les données de la littérature, d'attribuer les populations des rotamères aux trois orientations tg^- , tg^+ , g^+g^- .

Par conséquent, en ce qui concerne les études dans le chloroforme et le DMSO, la mise en oeuvre des méthodes habituelles de l'analyse conformationnelle ont permis de conclure.

A la fin du travail présenté, une étude de nos dérivés en solution dans l'eau a été entreprise, mais les informations sont plus délicates à interpréter. En effet, le pouvoir dissociant élevé de ce solvant diminue les forces d'interaction qui stabilisent le repliement : la flexibilité augmente. Mais il est difficile d'estimer avec précision le comportement dynamique de nos modèles par les méthodes habituelles. Il faut alors chercher à acquérir des données sur les vitesses des mouvements de rotation autour des liaisons simples, c'est ce qui peut être fait par la mise en oeuvre de techniques mieux adaptées à l'étude de la dynamique des molécules, en particulier par des techniques de relaxation.

La résonance magnétique nucléaire n'est pas bien entendu la seule technique de l'analyse conformationnelle. D'autres techniques spectroscopiques sont également utilisées : I.R., Raman, fluorescence, dichroïsme circulaire...

La différence essentielle entre ces techniques et la RMN, c'est que cette dernière permet d'accéder à des informations sur la conformation locale d'un résidu dans une séquence peptidique alors que les autres techniques sont mieux adaptées à une analyse du comportement global de la molécule. Ceci ne signifie pas qu'en tout état de cause, la RMN doit être préférée aux autres méthodes spectroscopiques car il est bien évident qu'à partir du moment où le spectre RMN est trop fouillé, donc peu exploitable, le recours à l'une des techniques précédentes est la solution qui s'impose.

Si dans le cas des oligopeptides, on peut considérer que la RMN possède un avantage certain sur les autres méthodes, par contre en ce qui concerne les protéines la

situation opposée est fréquente. Il faut cependant signaler que des progrès techniques récents laissent entrevoir pour la RMN des possibilités intéressantes (par exemple, la RMN à deux dimensions).

En résumé, ce travail a permis d'aborder les méthodes et techniques de la RMN utilisées pour l'analyse conformationnelle et d'apprécier les limites de leur utilisation.

Les modèles étudiés ne constituent pas une fin en soi, mais l'expérience acquise peut permettre d'aborder l'étude de problèmes plus complexes. En particulier, le comportement dynamique des peptides impliqués dans des processus de type biologique paraît présenter un grand intérêt. Mais cette étude ne peut se concevoir que dans le cadre d'une étroite collaboration entre chimistes, physico-chimistes et biologistes.

C'est dans cette optique que nous souhaitons développer la suite de notre activité.

