

50376
1983
85

50376
1983
85

THÈSE

présentée à
**L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE**

pour obtenir le grade de
DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES



**Caractérisation des modes normaux de vibration
de peptides adoptant une conformation repliée
COUDES β**

par
Philippe LAGANT



Attaché de Recherche CNRS à L'Institut de
Recherche sur le Cancer de LILLE

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

JURY : MM. C. LOUCHEUX Président
H. BENOIT
G. TURRELL
G. VERGOTEN } Rapporteurs
Mme M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE }
MM. G. FLEURY
J. BANDEKAR Membre invité

LILLE le 25 Mars 1983

AVANT-PROPOS

Ce travail est le résultat de la collaboration entre le laboratoire de Physicochimie de Mme M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE à l'institut de Recherche sur le Cancer de LILLE (U 124 de l' INSERM Dr Pr Gérard BISERTE) et le laboratoire de Physique de la faculté de Pharmacie de LILLE (Pr G. FLEURY).

Au laboratoire de Physique de la faculté de Pharmacie, j'ai pu bénéficier de la compétence scientifique de Mr Gérard VERGOTEN qui m'a formé aux problèmes de la spectrométrie Raman et aux calculs de fréquences de vibration.

Il m'est agréable ici de lui témoigner mon amitié et ma reconnaissance profonde pour l'attention soutenue qu'il m'a prodigué durant tout ce travail.

De nombreux projets scientifiques ont pris naissance ces derniers temps , à la fois comme conclusion de cette thèse et comme point de départ pour la poursuite de cette collaboration fructueuse.

Je tiens aussi à affirmer au travers de Mr le Pr Gérard BISERTE Directeur de L'IRCL , mon attachement et mon admiration à tous les biochimistes et biologistes de l'Institut de Recherche sur le cancer de LILLE .

Madame Marie-Henriette LOUCHEUX-LEFEBVRE, Maître de Recherches au CNRS à l'I.R.C.L m'a fait l'honneur de m'accepter dans son équipe.Pendant plusieurs années, elle m'a accordé sa confiance .Sa compétence et sa disponibilité scientifiques ont beaucoup marqué la façon dont ce travail s'est déroulé.Je tiens ici à lui exprimer ma profonde gratitude.

Le Professeur Guy FLEURY m'a accueilli dans son laboratoire de Physique lorsque j'ai débuté dans ce travail. Malgré les difficultés d'enregistrement des spectres de vibration de composés biologiques, il a toujours fait preuve de patience à mon égard et m'a accordé pleinement sa confiance. J'ai pu me rendre compte au cours de ces années de ses grandes connaissances scientifiques et apprécier sa forte personnalité.

Qu'il soit assuré de mon profond respect et de l'amitié que je lui porte.

REMERCIEMENTS

Je tiens ici à remercier messieurs les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Pr Henri BENOIT Professeur à l'Université des Sciences de STRASBOURG, me fait l'honneur de juger ici ce travail. Je tiens à l'en remercier profondément.

Monsieur Jagdeesh BANDEKAR ,Ph.D Biophysics Division Research Ann ARBOR University (MICHIGAN) me fait l'honneur de juger ici de ce travail. Spécialiste des calculs de modes normaux de vibration des 3 turns, sa compétence en ce domaine est internationale. Qu'il soit fort remercié pour l'attention qu'il va porter à ce travail.

Monsieur Claude LOUCHEUX Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille me fait l'honneur de juger ici ce travail.C'est avec un grand plaisir que je retrouve ici mon ancien directeur de recherche chez qui j'ai effectué ma thèse de Doctorat de troisième cycle.

Monsieur G. TURRELL Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE a accepté de faire partie de ce jury. Qu'il en soit ici particulièrement remercié.

Je tiens également à remercier plusieurs personnes qui m'ont aidé dans mon travail

Monsieur DA SILVA (société DILOR LILLE) auquel j'associe tous les techniciens .

Monsieur Jean-Pierre HUVENNE (Centre Universitaire de Mesures et d'analyses Faculté de Pharmacie de LILLE).

Monsieur Pierre LEGRAND Maitre assistant à l'Université des Sciences et Techniques de LILLE.

Monsieur Bruno Perly (équipe R.M.N) du Pr CHACHATY) du C.E.A à SACLAY

Madame Annick LORIAUX-RUBENS (équipe du Pr DELHAYE à l'USTL) et Monsieur Jean-Luc LORIAUX.

Monsieur Jean-Pierre AUBERT et Melle Nicole HELBECQUE (IRCL) .

SOMMAIRE

INTRODUCTION	pages 1-2
CHAPITRE 1 "Problèmes biologiques et physicochimiques concernant les repliements dans les protéines"	pages 3-27
CHAPITRE 2 "Etudes expérimentales et calculs des coordonnées de dipeptides"	pages 28-45
"Raman spectra and normal vibrations of dipeptides I) α -Glycylglycine"	pages 46-68
CHAPITRE 3 "Etude du dipeptide Glycyl-L-Proline"	pages 69-78
"Raman spectra and normal vibrations of dipeptides II) Glycyl-L-Proline"	pages 79-94
CHAPITRE 4 "Introduction aux B turns"	pages 95-97
"Raman spectroscopy and normal vibrations of peptides; Characteristic normal modes of a type II B turn."	pages 98-145
"Vibrational normal modes of folded Prolyl containing peptides: Applications to B turns"	pages 146-171
"Raman spectroscopic evidence for B turn conformation"	pages 172-184
"Normal vibrations of an Angiotensin model peptide: The C7C5 conformation"	pages 185-214
CONCLUSION GENERALE	pages 215-216
Annexe technique 1 Equation séculaire	pages 217-222
Annexe technique 2 Bases de l'analyse des vibrations normales	pages 223-231
Annexe technique 3 Résonance magnétique nucléaire des peptides	pages 232-253
Annexe technique 4 Projection cartésienne des modes	pages 254-255

INTRODUCTION

Le fait d'établir des corrélations entre la structure conformationnelle et l'activité des molécules biologiques est apparu, depuis de nombreuses années comme une aide précieuse à la connaissance des mécanismes impliqués dans le fonctionnement de ces molécules.

Dans le domaine des macromolécules biologiques, le groupe auquel j'appartiens s'intéresse aux glycoprotéines (Dr Mme M.H.LOUCHEUR-LEFEBVRE). En particulier, il y a été montré que le résidu aminoacide sur lequel était attachée la chaîne glycannique était toujours situé dans un coude Béta(β -Turn)(ref.1,2). Cette propriété a été exploitée lors de l'étude de N-Glycosylation IN-VITRO réalisée par J.P AUBERT(3,4) sur des peptides modèles contenant la séquence code Asn-X-Ser(Thr) à l'aide de Dolichylphosphate oligosaccharidique en présence de membranes contenant l'équipement enzymatique nécessaire au transfert de la chaîne oligosaccharidique sur le résidu Asparaginyl.

Cette glycosylation n'est réalisable que si le peptide accepteur adopte une structure secondaire en coude Béta. Il y a alors une interaction spécifique entre le peptide en coude β et l'enzyme dolichylphosphate oligosaccharide transférase(5).

Ces résultats rendent parfaitement compte de ce qui se passe IN-VIVO: La N-Glycosylation s'effectue au cours de l'elongation de la chaîne protéique sur les polysomes attachés aux membranes du réticulum

endoplasmique; Le squelette peptidique se replie et adopte la configuration privilégiée qui permettra à la glycosylation de se faire par l'intermédiaire de lipides transportant une chaîne oligomannosidique.

L'orientation spatiale précise des chaînes glycanni ques dont la synthèse est achevée au niveau de l'appareil de GOLGI, leur permet d'aquérir leurs fonctions spécifiques.

Des études physicochimiques (Résonance Magnétique Nucléaire, dichroïsme circulaire) de peptides modèles préparés dans le laboratoire par Melle N. HELBECQUE ont été également menées: elles constituent un complément indispensable aux études de glycosylation IN-VITRO (5 b).

Mon travail s'est inséré tout naturellement dans cette démarche scientifique par l'intermédiaire d'une collaboration avec le Laboratoire de Physique de la Faculté de Pharmacie de LILLE (Pr G.FLEURY). Les activités de ce groupe sont axées essentiellement sur les spectrométries vibrationnelles de Diffusion RAMAN et d'absorption Infrarouge.

J'y ai bénéficié de la compétence scientifique de G. VERGOTEN dans les domaines de calculs de fréquences vibrationnelles (Programmes de l'équipe de TOKYO du Pr T.SHIMANOUCHI).

La thèse que je présente est donc le résultat de la collaboration entre ces deux laboratoires; elle m'a permis de déterminer les fréquences vibrationnelles de peptides adoptant une structure en coude Béta.

CHAPITRE I

PROBLEMES BIOLOGIQUES ET PHYSICOCHIMIQUES CONCERNANT LES REPLIEMENTS DANS LES PROTEINES

A) IMPORTANCE BIOLOGIQUE DES COUDÉS B

A-1) Qu'est-ce qu'un coude?

Les coudes(Reverse Turns), sont des structures adoptées par des séquences peptidiques composées en général de quatre(coude B) ou de trois (coude Gamma) résidus consécutifs (6,7) qui permettent à la chaîne peptidique de se replier sur elle-même et de former des liaisons Hydrogène stabilisant la structure (Energie conformationnelle minimum). Un certain

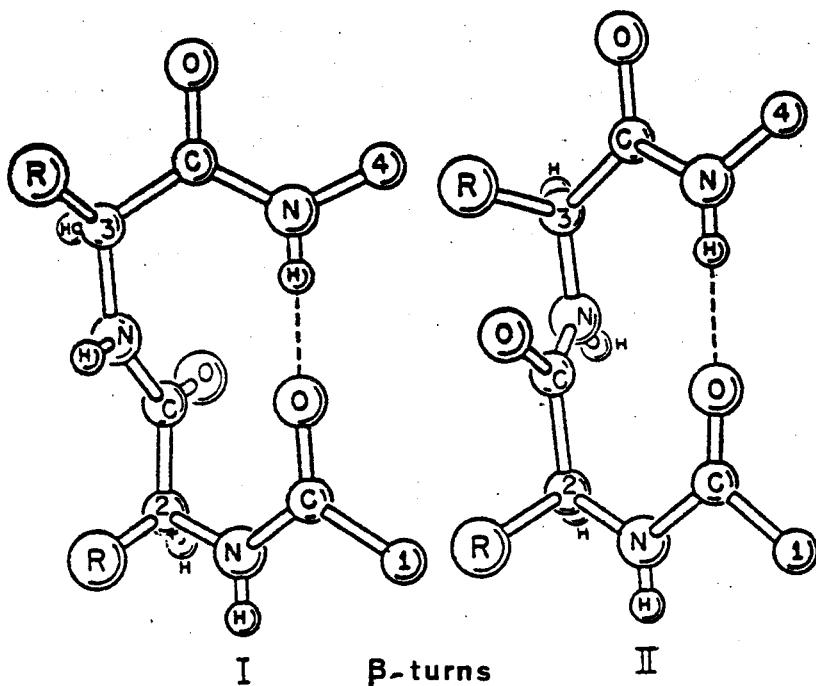


Fig A₁

ref M.A KHALED (35)

Standard Bend Types ^a				
Type	Dihedral Angles, degrees ^b			
	ϕ_{i+1}	ψ_{i+1}	ϕ_{i+2}	ψ_{i+2}
I	-60	-30	-90	0
I'	60	30	90	0
II	-60	120	.80	0
II'	60	-120	-80	0
III	-60	-30	-60	-30
III'	60	30	60	30
IV	any of bend types I through III' with two or more dihedral angles ϕ_{i+1} , ψ_{i+1} , ϕ_{i+2} , or ψ_{i+2} differing by at least 40° from typical dihedral angles given above			
V	-80	80	80	-80
V'	80	-80	-80	80
VI	a cis peptide bond between residues $i + 1$ and $i + 2$			
VII	a kink in the peptide chain created by $ \psi_{i+1} > 140^\circ$ and $ \psi_{i+2} < 60^\circ$, or $ \psi_{i+1} < 60^\circ$ and $ \phi_{i+2} > 140^\circ$			

ref S.SCOTT ZIMMERMAN,H.A SCHERAGA
Biopolymers 16 811-843 (1977)

Table A₁

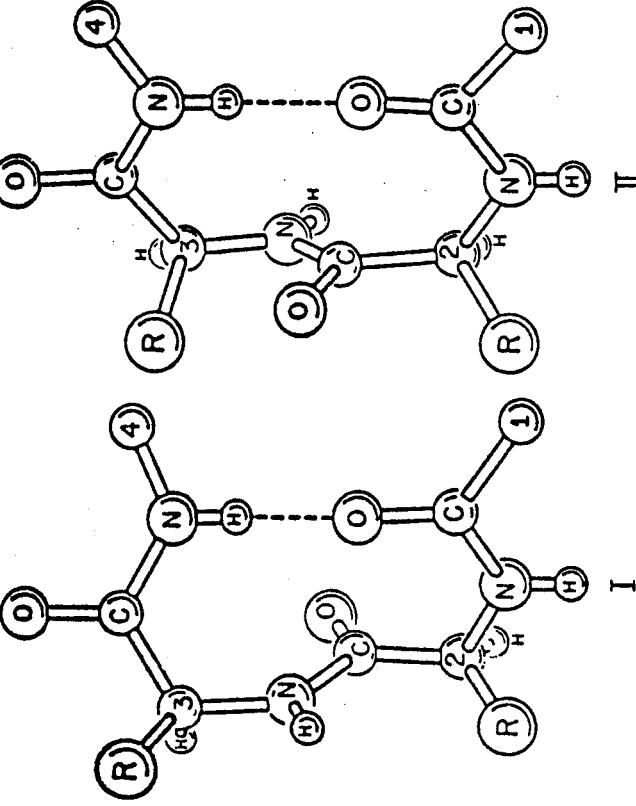
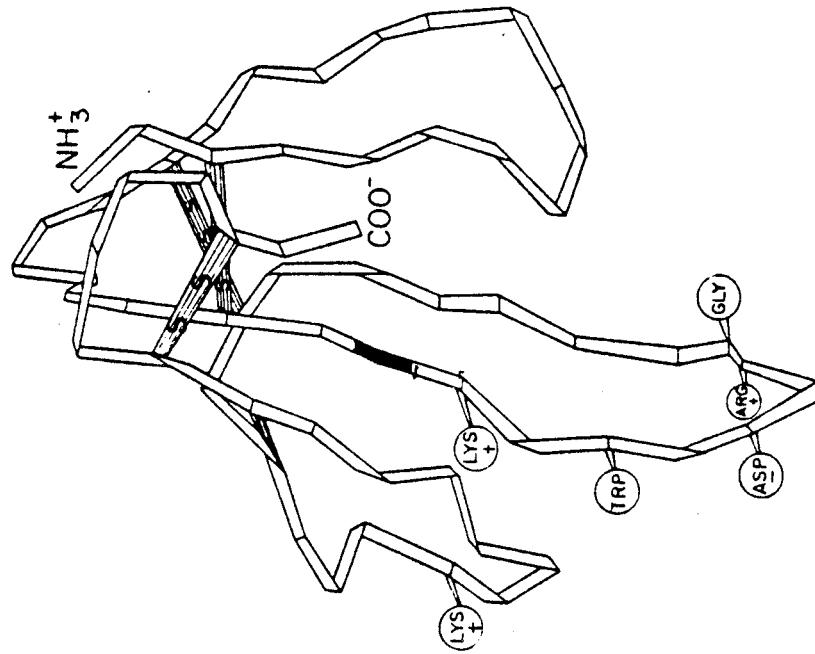


Fig A1 Two basic types of β -turn conformation described by Venkatachalam.
[Reprinted with permission from R.E. Dickerson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 246, 1511 (1971). Copyright by the American Society of Biological Chemists.]



Perspective ribbon drawing of the folding of the polypeptide chain in toxins *a* and *b*, and, by implication, all *fan* type neurotoxins. Folds in the ribbon occur at α -carbon positions. Viewed from this direction the molecule is about 40 Å long and about 30 Å wide but only about 15 Å thick. The residues believed involved in neurotoxic action are labeled; disulfide bridges are striped. His 26 is located immediately above the lysine in the middle loop, as indicated by the *star* kedene segment.

Fig A2 ref 37

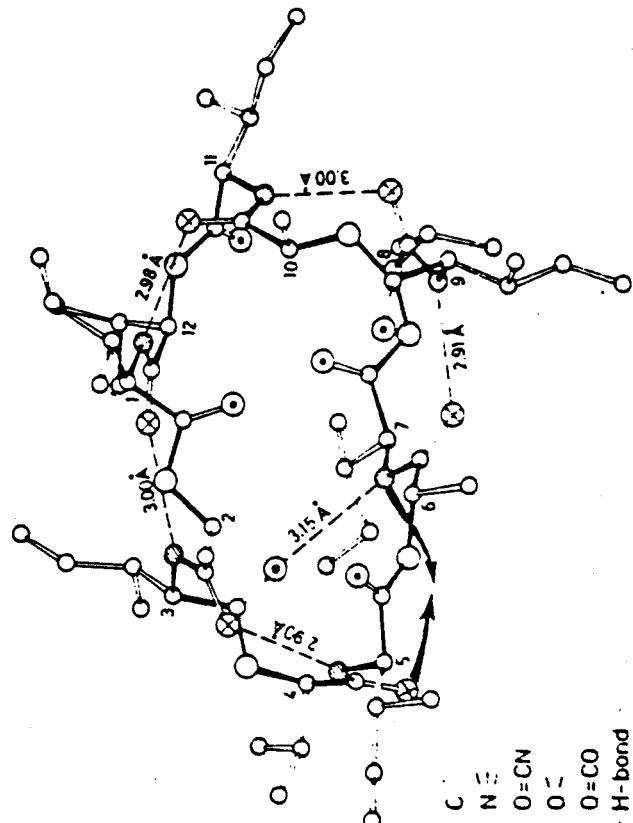
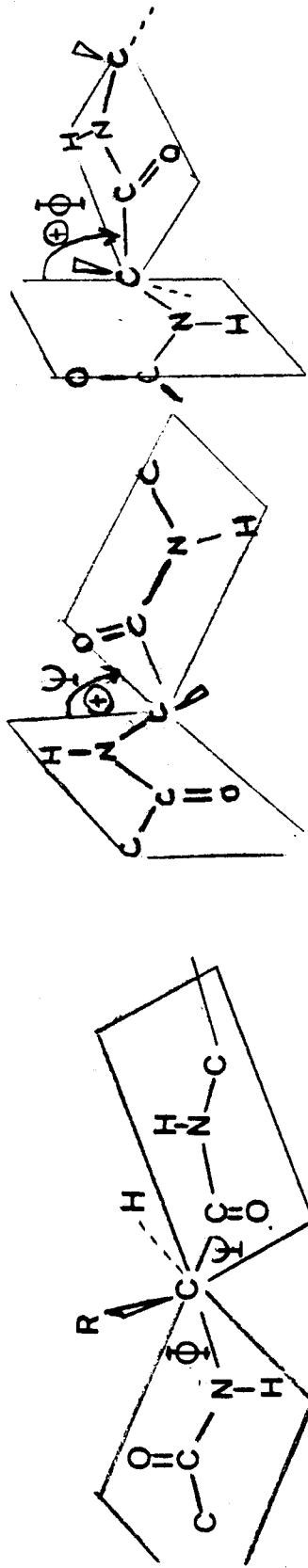


Fig A4
ref 37



Chaîne complètement étendue $\phi = \psi = 180^\circ$
 sens > 0 dans le
 sens horaire

Définition des angles ϕ, ψ IUPAC-IUB. (8)

Fig A₂



nombre de facteurs favorisent la formation de telles structures: Par exemple, certains résidus d'acides aminés présentent une probabilité élevée d'être localisés dans un coude β . C'est le cas de la Proline, de la Glycine, de l'Asparagine et de la Sérine. Des interactions à courte, moyenne et longue distances peuvent stabiliser certains coudes, telles les forces d'interaction dipolaires(a), les liaisons hydrophobes(b) ou hydrogène(c). Les interactions(a,c) s'établissent en général du côté des extrémités N et C terminales et les liaisons(b) au "coeur" de la protéine.

Seuls les coudes β ont fait jusqu'à ce jour l'objet d'un nombre d'études physicochimiques suffisant pour être bien définis. La figure A1 schématisse la structure générale des coudes les plus fréquemment rencontrés et la table A-1 donne les valeurs des angles dièdraux des résidus en 2ème et 3ème positions($i+1, i+2$) caractéristiques de chaque coude. La figure A2 définit le sens des angles dièdraux suivant la convention IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE(8).

C'est C.M.VENKATACHALAM(9) qui, le premier a défini les caractéristiques correspondant à trois coudes β , et depuis, un certain nombre d'autres types de coudes ont été identifiés(Table A-1). Les coudes I,II,III ainsi que leur image dans un miroir(coudes I',II',III') avaient identifiés par VENKATACHALAM. Dans les protéines, ce sont les coudes β de type I qui sont le plus souvent rencontrés puis ceux de type II et enfin de ceux de type III.

A-2) Importance biologique des coudes.

On estime, à partir d'études faites par diffraction des rayons X réalisées sur 29 protéines globulaires que le nombre de résidus engagés dans les coudes correspondait environ

à un tiers de l'ensemble des acides aminés favorisant la présence d'une structure compacte.

Les coudes correspondent à des zones hydrophiles qui sont localisées à la surface de la protéine(10) en contact avec le milieu extérieur(eau) alors que les résidus hydrophobes se trouvent de préférence au centre de la molécule où les contacts "résidu-résidu" l'emportent sur les contacts "résidu-solvant" (11). Ainsi, les acides aminés localisés dans le coude pourront être le siège de certaines modifications chimiques post-transcriptionnelles que subissent les protéines. Ceci est particulièrement important à considérer puisque 120 dérivés d'acides aminés ont été identifiés à partir d'un grand nombre de protéines appartenant à des organismes différents (12).

En d'autres termes, une fois biosynthétisée, la protéine subit un certain nombre de modifications chimiques. Il semble logique, à priori, de penser que ces transformations ne peuvent se faire qu'en certains sites correspondant à une "présentation privilégiée" des chaînes latérales des résidus impliqués. Dans l'évolution des protéines homologues, la grande majorité des mutations se font de manière telle que les coudes soient conservés.

De plus en plus on relie l'activité biologiques des protéines à leur structure tertiaire ; C'est donc grâce à l'existence de coudes que peuvent être expliquées certaines réactions .

C'est le cas par exemple de certains mécanismes de régulation (Phosphorylation-déphosphorylation) de l'action de différentes hormones ,des réactions de glycosylation etc... (13).

Citons pour exemples quelques cas remarquables:

a) les **glycoprotéines** et l'existence d'une relation

N-Glycosylation- existence d'un coude B au site de N-

Glycosylation: Asn-X-Ser(Thr).

Nous avons déjà traité ce problème dans l'intro-

b) Les neurotoxines et cardiotoxines des venins de serpent (Asian Cobra)(14,15,16,17,18), d'anémones de mer (19) et d'abeilles(20,21,22). Ces peptides sont constitués d'une soixantaine de résidus . De nombreuses études physicochimiques leur ont été consacrées, principalement en diffraction des rayons R.X(14,23,24) , en diffusion RAMAN(15,24,25,26,27) , en dichroïsme circulaire et méthodes de prévisions de structures de CHOU et FASMAN (16,17,20,21,29) ainsi que par Résonance Magnétique Nucléaire(18,22,28,29) .

Ces techniques ont montré l'existence dans ces peptides de coudes permettant le repliement de la molécule en trois boucles stabilisées à la fois par quatre ponts disulfures et par des interactions entre groupements terminaux chargés.(Fig A3). De plus, il a été montré qu'un résidu tyrosyl, un résidu tryptophanyl et un aspartyl, localisés aux environs immédiats des coudes jouaient un rôle important dans l'activité biologique de ces peptides.

On sait maintenant que **l'activité biologique des neurotoxines est reliée à leur organisation spatiale** (structure tertiaire):Les neurotoxines se lient à un récepteur protéique au niveau post-synaptique et bloquent la transmission de l'acétylcholine en inhibant la transmission nerveuse à la jonction neuromusculaire. Les Cardiotoxines se lient à un récepteur de type lipidique et provoquent un réarrangement structural de la membrane en inactivant la Na⁺-K⁺ATPase.

Ces différences de mécanisme ont été reliés à des différences de structure (17).

c)L'action hormonale de peptides post-hypophysaires a également été étudiée.Ces peptides favorisent le transport actif du Na⁺.Citons plus spécialement l'**Ocytocine** qui stimule la contraction utérine et favorise l'expulsion du lait maternel, la **Vasopressine** qui favorise la

réabsorption rénale de l'eau (30,31,32). L'**Angiotensine II** (octapeptide) où sont présents à la fois des coudes Béta(β) et Gamma(γ) est un agent hypertensif rénal dérivé du substrat de la Rénine; Ce substrat étant une alpha₂ globuline du plasma synthétisée dans le foie.

De nombreux autres cas de peptides biologiquement actifs peuvent être donnés comme par exemple: Les peptides stimulant la phagocytose dans les granulocytes tels la **Tuftsine** (Thr-Lys-Pro-Arg) (33,34). - La **Tropoélastine** (35) à séquences répétitives (L-Val-L-Pro-Gly-Gly).

*Les peptides montrant des **activités antibiotiques** comme la **Gramicidine S** dont l'activité dépend de deux chaînes latérales Ornithine voisines, la **Valinomycine** qui agit sur les membranes en causant une forte augmentation de la perméabilité des ions K⁺(36) et l'**Isoleucinomycine**(37)(FigA4).

Dans tous ces exemples, l'existence de coudes a été mise en évidence. Ces recherches illustrent bien la place accordée par les Biochimistes et les Physicochimistes au problème de la **relation Structure- Activité Biologique**.

Deux publications générales récentes résument parfaitement l'ensemble des travaux acquis dans ce domaine (J.A SMITH, L.G PEASE(38) et C.TONILO(39)).

A-3) Techniques Physicochimiques d'analyse des conformations:

A-3a) Diffraction des rayons X:

De nouvelles méthodes d'analyse par "phase directe" (37,40) permettent d'étudier les peptides sans l'intervention d'atomes lourds (41,42). C'est une méthode intéressante pour connaître le pourcentage

d'**isométrie Cis-Trans** autour d'une **liaison X-Pro(43.,44,45,46)**. Elle a permis de montrer que l'isomère Cis était surtout présent dans les peptides cycliques.

C'est à partir de la détermination par RX des structures secondaires des protéines que se sont dégagées diverses méthodes de prévisions conformationnelles, principalement celle développée par **CHOU et PASMAN (47,48,49)**. Cependant les résultats de diffraction par RX qui permettent d'obtenir la structure cristalline et les conformations de plus basse énergie engagées dans des liaisons intermoléculaires ne donnent pas forcément la (ou les) conformation(s) en solution.

Une corrélation entre angles dièdraux et type de coude a été formulée d'après l'analyse des résultats en RX d'abord par **VENKATACHALAM (48)** puis par d'autres auteurs à partir de protéines: **LEWIS et AL (50), DICKERSON et AL (51)**.

A-3b) **Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire:**

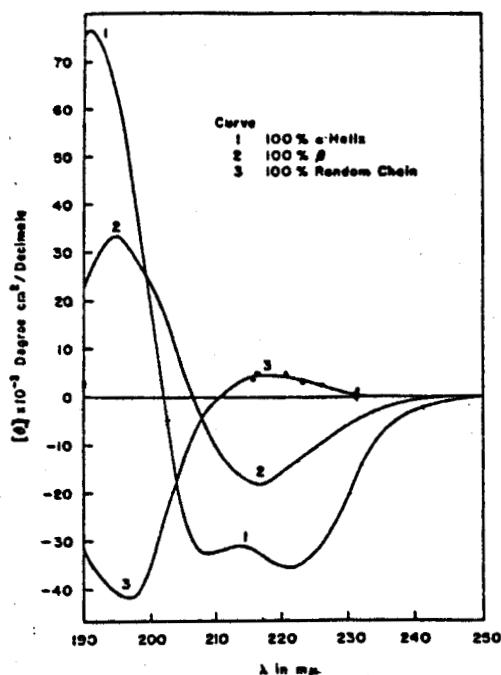
Divers procédés sont utilisés en RMN du proton pour déterminer les différentes conformations en solution:

*L'exposition ou la dissimulation des protons amide (CONH) aux solvants (52,53,54,55) permet de dire si ces protons sont accessibles ou non, donc s'ils sont engagés ou non dans une structure donnée.

*La dépendance des déplacements chimiques des protons NH aux variations de température permet également de mesurer l'état de liaison du proton considéré.

*L'effet OVERHAUSER (NOE) (52,56) homo et hétéronucléaire suit une loi de variation en $1/r^6$ (r étant la distance entre les deux noyaux considérés) et permet d'établir leurs positions relatives (57,58,59).

*La mesure des temps de relaxation en ^{13}C (55) permet de mesurer



: Circular dichroism spectra of poly-L-lysine in the α -helical, β , and random conformation.

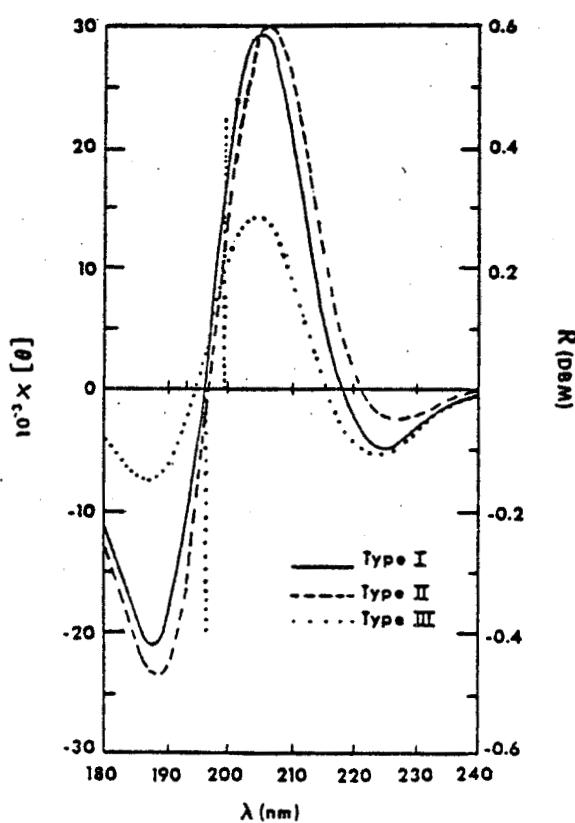


FIG A-5

. Calculated CD curves for Venkatachalam's β turns (11). Type I (—), type II (---), and type III (· · ·). These are all class-B spectra. The vertical dotted lines indicate the $\pi\pi^*$ rotational strengths for the type-III conformation.

la mobilité du noyau considéré.

*L'utilisation de la dépendance conformationnelle des constantes de couplage J_3 NH-CH (56) en fonction des angles dièdraux .

*L'utilisation des Lanthanides(60,61).

Les nombreux travaux qui découlent de ces expérimentations ont pu montrer que la RMN était une des techniques les plus efficaces d'analyse de la conformation des peptides possédant une structure en coude β comme par exemple les unités répétitives de la Tropoélastine (7 ,59,62) ou en coude Gamma(Y)(63) pour la Bradykinine et ses analogues ,ainsi que pour des peptides cycliques possédant à la fois des coudes β et Y (64).

A-3c)Dichroïsme circulaire:

Le dichroïsme circulaire reflète les positions relatives des chromophores présents dans une structure peptidique engagée dans une conformation secondaire définie.

R.W WOODY (65) a calculé les spectres théoriques de dichroïsme circulaire d'oligopeptides adoptant une structure en coude β . La fig A5 donne l'allure des spectres dichroïques pour les turns β I,II,III et la table A-2 donne le classement des types de coudes suivant les domaines de longueur d'onde du maxima et du minima de la différence d'absorption entre la composante gauche et la composante droite d'une lumière incidente polarisée circulairement.

Ces données théoriques sont en accord avec les spectres expérimentaux déterminés depuis à partir de peptides adoptant une structure coudée (66 ,67,68,69) .

*Dans les protéines ou les coudes β I et β II sont les plus fréquents ,le spectre résultant en dichroïsme circulaire de la contribution des β turns peut être considéré comme étant constitué de

deux bandes négatives à 225nm et 190nm environ et une bande positive vers 205nm. Le spectre dichroïque résultant de l'ensemble des contributions des structures secondaires (Hélice alpha, chaîne β/β et β/β structure désorganisée R.C., β turns) peut être décomposé pour donner le pourcentage de contribution de chaque structure.

Ceci nécessite de choisir de bonnes références et se fait à partir des contributions données par chacune des structures de polypeptides modèles (fig A5 poly-L-Lysine) ou encore à partir d'un ensemble de protéines dont les structures sont connues (fig A5') (70,71).

A chaque longueur d'onde, la différence des coefficients d'absorption $\epsilon_g - \epsilon_d = \Delta\epsilon$ est une combinaison linéaire des coefficients d'absorption correspondant à chacune des structures présentes (1,72,73,66,74,75)

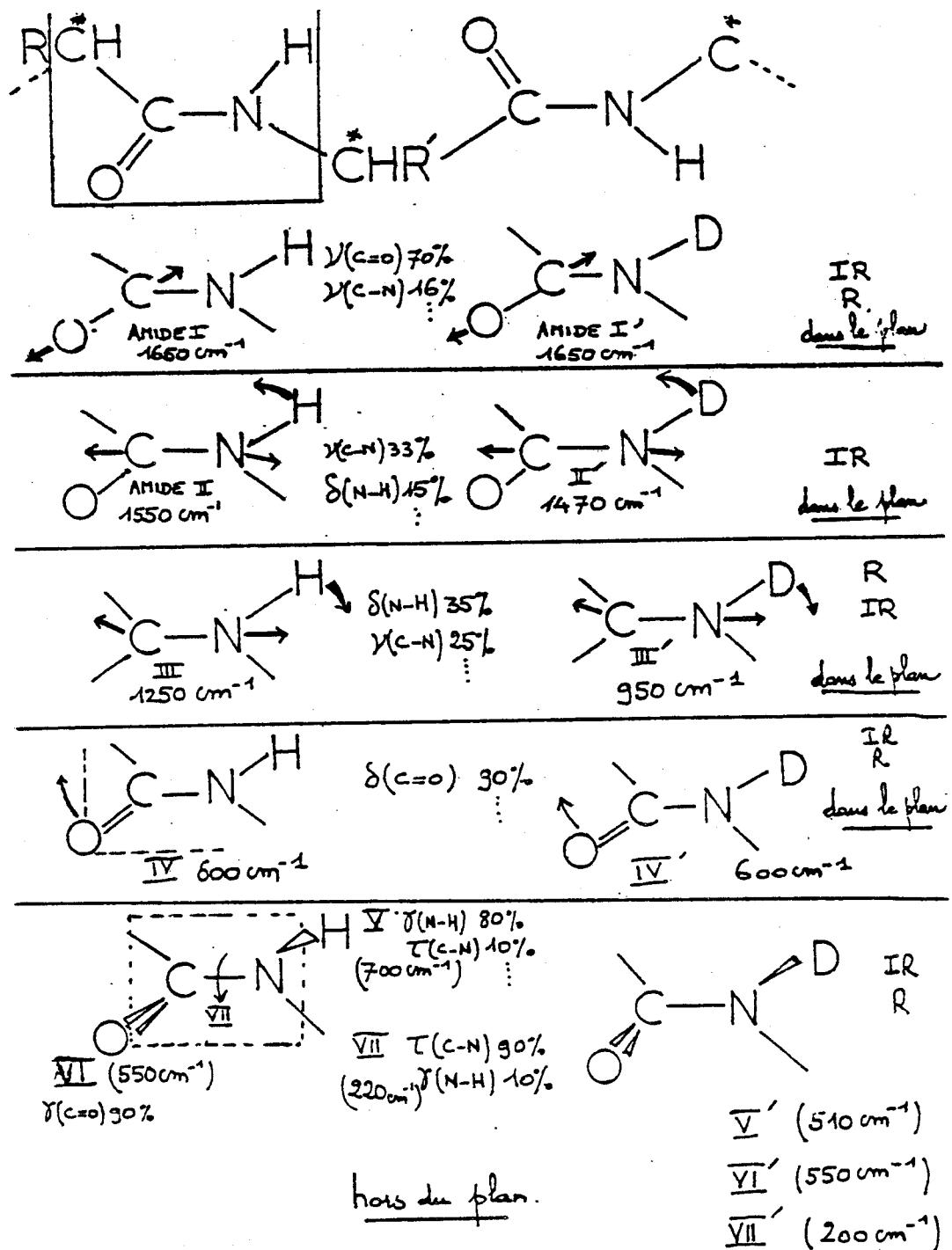
$$\Delta\epsilon_{min} = x^{\beta T} \Delta\epsilon_{\lambda_i}^{\beta T} + x^{\text{hel}} \Delta\epsilon_{\lambda_i}^{\text{hel}} + x^{\beta H} \Delta\epsilon_{\lambda_i}^{\beta H} + x^{rc} \Delta\epsilon_{\lambda_i}^{rc}$$

où les x sont les fractions de structures en présence et $\sum x = 1$ et ϵ_{λ_i} est l'absorption à λ_i pour la structure en hélice seule.

A-3d) Spectrométries de vibration:

Les **spectrométries de diffusion RAMAN** et **d'absorption Infrarouge** ont été très employées depuis de nombreuses années dans les études de conformations de protéines (76) et plus récemment pour celles de peptides adoptant une structure en coude β (74,77,78,79,80,81,82)

L'application de ces spectrométries à la détermination des structures conformationnelles est possible puisque les fréquences de vibration de certains groupes de la molécule sont tributaires de la conformation dans laquelle se trouve cette molécule. En particulier, les bandes de vibration des groupements amide ainsi que celles dues aux élongations des liaisons du squelette peptidique sont très sensibles à leur environnement. La fig A6 donne la description et



BUS
LILLE

Fig A6.

Les figures A7 et A8 donnent les spectres RAMAN caractéristiques de conformations secondaires pour la poly-L-Lysine(90).

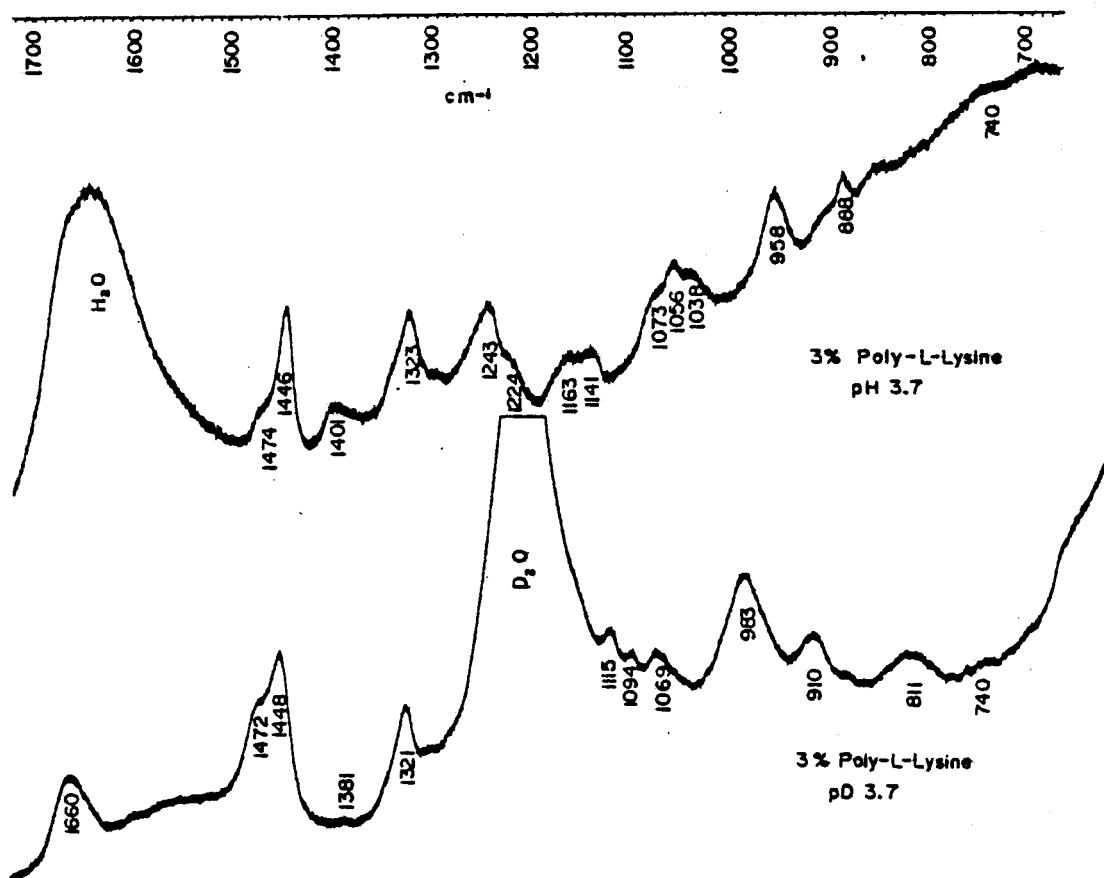


FIG. 2. — Laser Raman spectra of ionized form of poly-L-lysine (top) 3 p. cent in H_2O pH 3.7 (bottom) 3 p. cent in D_2O pD 3.7 both at 22°C.

figA7(REF)

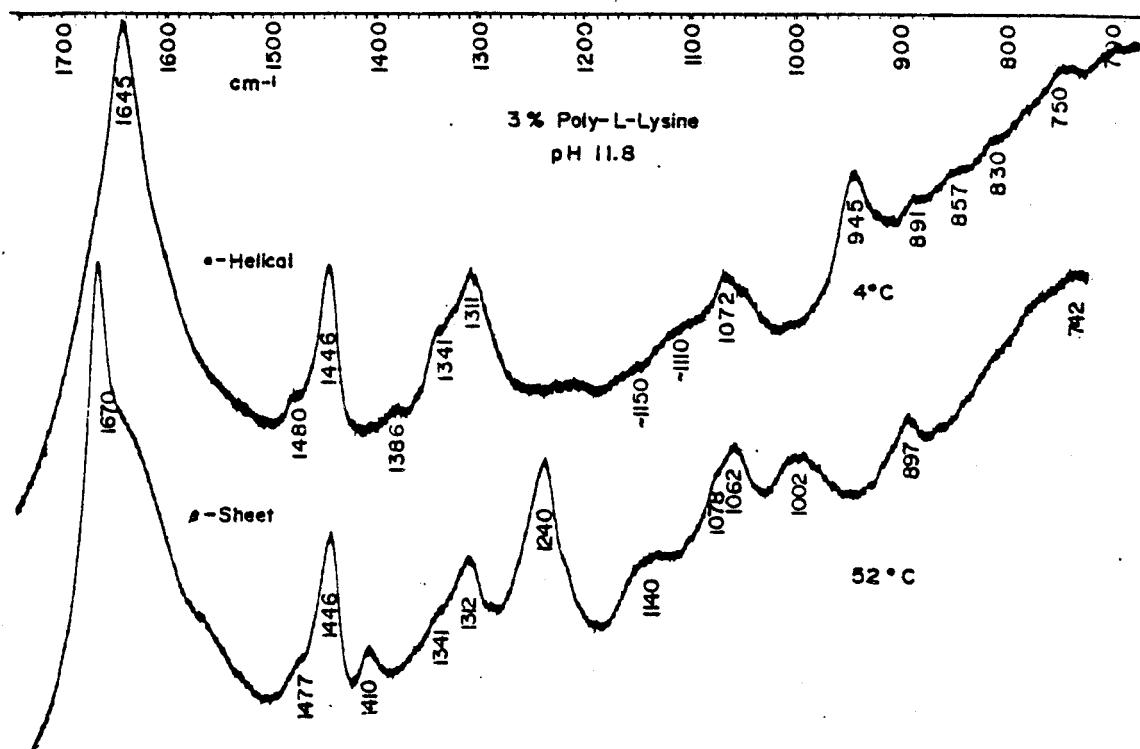


FIG. 1. — Laser Raman spectra of (top) α -helical poly-L-lysine 3 p. cent H_2O pH 11.8 $T = 4^\circ\text{C}$ and (bottom) β -sheet poly-L-lysine 3 p. cent H_2O pH 11.8 $T = 52^\circ\text{C}$.

fig A8 (REF)

les contributions relatives des mouvements de vibration des diverses bandes amide et les fréquences moyennes des vibrations correspondantes sont indiquées dans la table A-3.

		$\bar{\nu}$ (groupe libre) (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}$ (groupe associé) (cm ⁻¹) (liais.H)
Amide	A	3450-3350	3400-3300
Amide	B	3250-3100	3150-3080
Amide	I	1720-1630	1660-1620
Amide	II	1580-1550	1550-1520
Amide	III	1260-1250	1330-1230
Amide	IV	680- 650	700- 600
Amide	V	720- 650	720- 680
Amide	VI	600- 550	600- 550
Amide	VII	230- 200	200- 180

TABLE A-3

B) UTILISATION DES SPECTROMETRIES VIBRATIONNELLES RAMAN

ET

INFRAROUGE:

B-1) Raisons du choix:

Des études en absorption Infrarouge de peptides modèles, (74, 77, 78, 83), ou de peptides naturels (33, 84) adoptant une structure coudée, ainsi que des études par diffusion RAMAN sur des peptides naturels ou isolés (comme le tripeptide terminal Pro-Leu-Gly-NH₂ de l'Ocytocine qui adopte une structure en coude β) ont montré qu'il y avait divergence des résultats quant à l'attribution expérimentale de la fréquence de vibration Amide III par rapport aux prévisions théoriques (obtenues par calculs des modes normaux de vibrations) de S. KRIMM et J. BANDEKAR (85, 86, 87).

En effet, les travaux expérimentaux précités font ressortir, en particulier, la présence de la vibration amide III à une fréquence plus basse que celle prévue par les calculs. Les travaux expérimentaux attribuent vers 1260-1285 cm⁻¹ la fréquence de vibration pour la déformation du N-H amide dans le plan (et élongation de la liaison C-N) lorsque celui-ci est engagé dans une liaison Hydrogène refermant le coude β (cycle en C10). Ceci est un fait expérimental très important car R.C LORD (88) prévoit alors une relation entre la fréquence de vibration amide III caractéristique de la structure et l'angle dièdral Ψ qui lui est attaché: $v(\text{amide III}) = f(\Psi)$, positionnant ainsi la vibration amide III du groupe NH engagée dans un coude β vers 1260-1285 cm⁻¹.

Notre travail a consisté à analyser la fréquence amide III particulière à l'existence d'un coude β de même que les autres

vibrations (amide I en particulier) dont les fréquences sont caractéristiques du type de repliement. Une étude expérimentale a été menée sur le tripeptide déprotégé +³HN-Glycyl-L-ProlylGlycylGlycine (GPGG) ainsi que sur le peptide protégé N-Cbz-Glycyl-L-ProlylGlycylGlycine-OMe (N-Cbz-GPGG-OMe) qui adoptent en totalité une conformation en coude β II ($\phi_2=-60^\circ$, $\psi_2=120^\circ$, $\phi_3=-30^\circ$, $\psi_3=0^\circ$).

B-2) Définition des techniques:

J'ai choisi d'utiliser ces techniques pour plusieurs raisons :

*La spectrométrie Infrarouge, même avec des appareils de performances moyennes comme ceux utilisés le plus fréquemment dans les laboratoires de Biochimie, est d'une grande utilité pour l'analyse conformationnelle de peptides isolés (solides). Cependant l'obstacle majeur à l'utilisation de cette technique est l'emploi pratiquement interdit en solution aqueuse (saturation en absorption).

*Peu de travaux théoriques ont été effectués en ce domaine qui cependant est apparu depuis longtemps comme un auxilliaire très précieux de la RMN. (85, 86, 87)

*Les échantillons (peptides et protéines) sont rarement cristallisés et ne peuvent être analysés en diffraction des Rayons X.

*L'avantage particulier (et très marquant) de la diffusion RAMAN sur les spectroscopies RX et RMN est que celle-ci peut être mise en œuvre à la fois sur l'échantillon solide et en solution aqueuse (l'eau, milieu naturel biologique ne diffusant que très peu).

La diffusion RAMAN s'observe lorsqu'on éclaire un échantillon avec une lumière monochromatique de fréquence ν_0 (Faisceau L.A.S.E.R) et que l'on observe la lumière diffusée à 90° (Intensité maximale) par

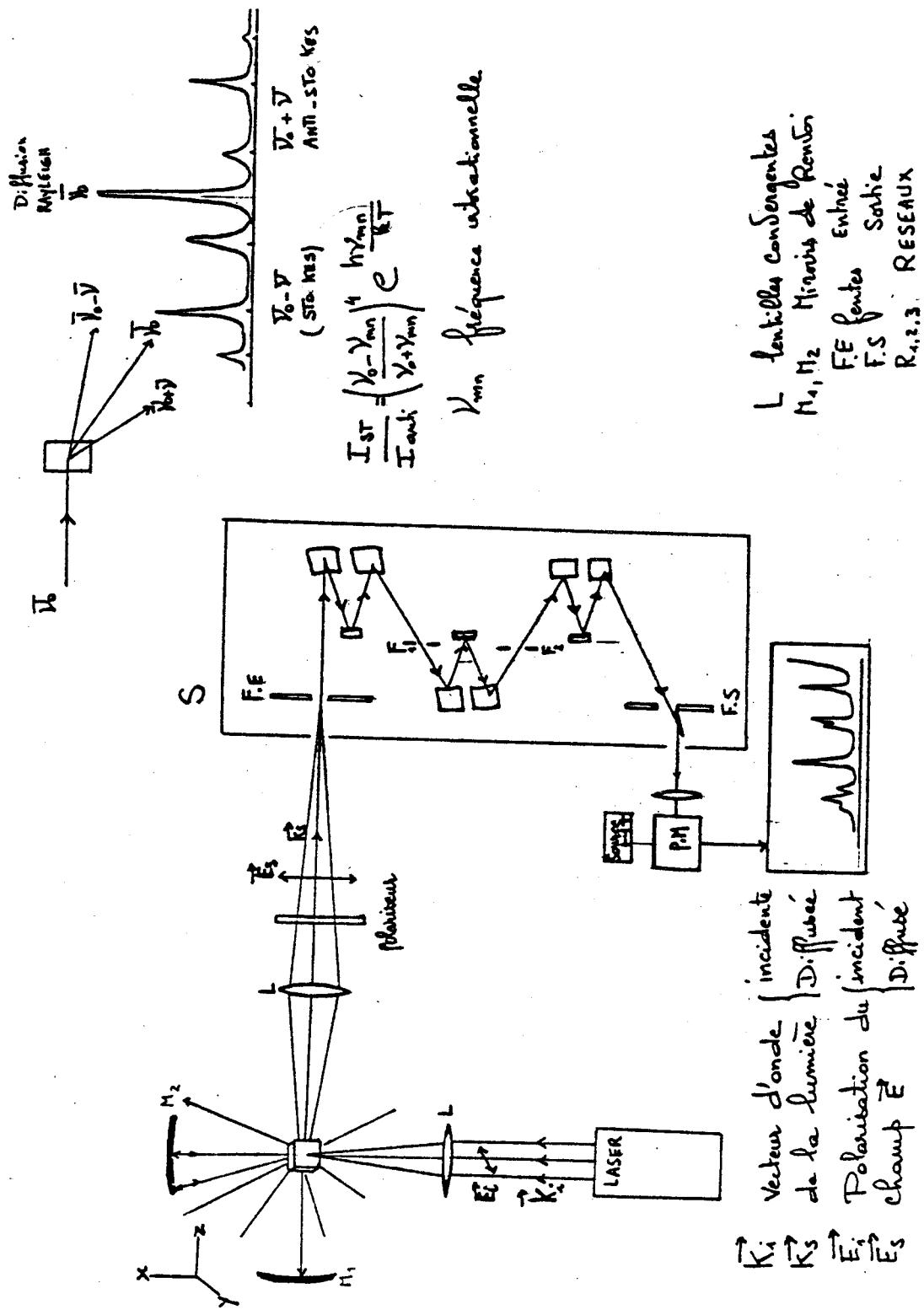


Microsonde mole RAMAN



Triple monochromateur T800

FIG A-9



rapport à la direction incidente; cette lumière diffusée est décomposée par des réseaux (monochromateurs) en domaines de fréquences dont chacune est restituée à l'enregistreur sous forme de bande dont la fréquence $\bar{\nu}$ (déplacée de $\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_0 + -\bar{\nu}$ par rapport à la raie exitatrice) est la fréquence propre de vibration des groupes de la molécule.

La figure A9 schématise un spectromètre RAMAN à triple monochromateur.

Cependant, si la spectrométrie RAMAN apporte à priori un bon outil au biochimiste ou au physicochimiste, elle voit ses possibilités d'utilisation diminuées du fait de phénomènes annexes parmi lesquels il faut citer:

*L'apparition de la fluorescence comme lumière parasite. La figure A 10 schématise à partir des courbes d'énergies potentielles l'origine de la fluorescence qui comme pour le RAMAN est un processus de transition à deux photons.

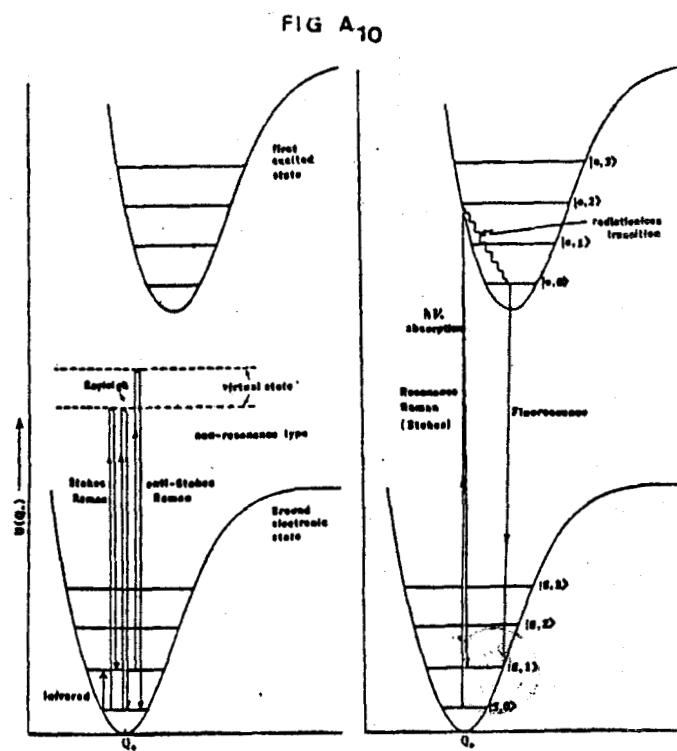
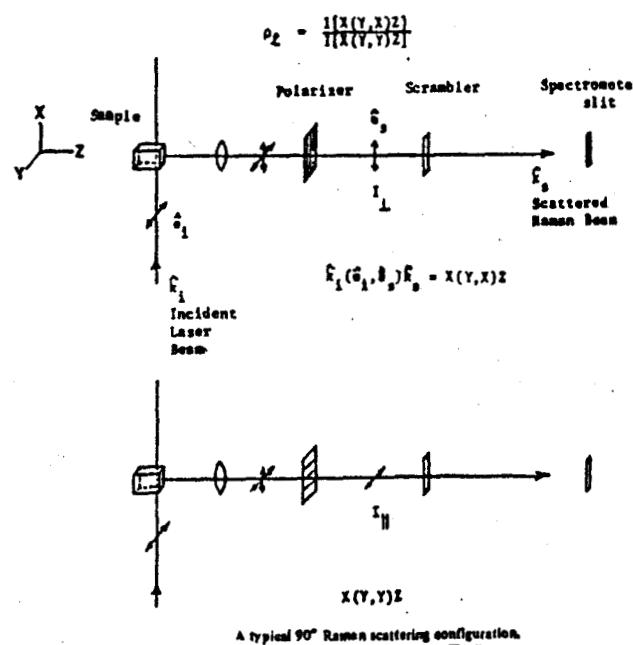


FIGURE : Schematic comparison of various processes: Rayleigh, Stokes Raman, anti-Stokes Raman, infrared, resonance Raman, and fluorescence.

Cette fluorescence provient souvent d'ions (charges des

Cette fluorescence provient souvent d'ions (charges des récipients plastiques, graises à rodages, produits de dépolymérisation des gels utilisés dans la purification des échantillons, bactéries qui se dégradent dans le faisceau LASER.

*Les faibles intensités des bandes obtenues sur des échantillons amorphes et difficulté de compromis entre ouverture des fentes et résolution spectrales qui se traduit par un rapport Signal/Bruit très faible.

*L'augmentation de la puissance de la source lumineuse peut détruire l'échantillon quand le faisceau est trop focalisé.

* Plusieurs moyens peuvent être mis en œuvre pour diminuer le phénomène de fluorescence:

***Moyens chimiques:**

*Traitement sur colonne de charbon actif

*Substances agissant par "quenching" de fluorescence; il s'agit en général d'ions lourds comme l'Iodure (KI).

Ces moyens chimiques ne sont pas toujours probants: pertes de produit par adsorption sur charbon actif, réactivité des iodures avec les groupes phényles (Phénylalanine ou Tyrosine).

***Moyens physiques:**

*Diffusion cohérente Anti-STOCKES RAMAN (CARS) du type Résonance RAMAN. Comme la fluorescence se trouve du côté STOCKES, on observe mieux les bandes du côté Anti-STOCKES mais elles restent néanmoins assez faibles pour des peptides amorphes.

*RAMAN rapide multicanal (89): L'excitation se fait par LASER pulsé et l'un des avantages techniques serait d'aller plus vite que le

phénomène de fluorescence. Cependant, les essais réalisés en balayage rapide (quelques secondes) sur des peptides montrent que dans ces conditions, on fait disparaître les bandes de faible intensité.

*Laisser la fluorescence décroître naturellement en conservant l'échantillon dans le faisceau pendant plusieurs ^{heures} avant enregistrement du spectre. Il se pose alors le problème de la résistance de l'échantillon et du prix de revient.

*Emploi d'une lumière excitatrice à grande longueur d'onde, telle celle obtenue avec un LASER au Krypton (647,1nm), le fond de fluorescence étant moindre que pour les raies verte (514,5nm) et bleue (488 nm) d'un LASER à Argon.

*Accumulations en balayage lent, le rapport Signal/Bruit se traduisant comme une fonction de \sqrt{N} où N est le nombre d'accumulations.

C'est cette dernière méthode que nous avons utilisée lorsque les échantillons étaient trop fluorescents et/ou trop fragiles.

BIBLIOGRAPHIE CHAPITRE I

- 1) M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE, J.P AUBERT
C.R.Acad.Sci 282 585-587 (1976)
- 2) J.P AUBERT, G.BISERTE, M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE
Arch.Biochem.Biophys 175 410-418 (1976)
- 3) J.P AUBERT, N. HELBECQUE, M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE
Arch.Biochem.Biophys 208 20-29 (1981)
- 4) J.P AUBERT Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Physiques
LILLE (1981)
- 5 a) J.P AUBERT, M.CHIROUTRE, J.P KERCKAERT, N. HELBECQUE , M.H LOUCHEUX
LEFEBVRE Biochem.Biophys.Res.Comm. sous presse
- 5 b) N. HELBECQUE Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences Physiques
LILLE 19
- 6) P.N LEWIS, F.A MOMAHY, H.A SCHERAGA Proc.Natl.Acad.Science USA 68
2293 (1971)
- 7) R.E LONDON Int.Peptide Protein Res 14 (1979) 377-387
- 8) IUPAC-IUB Commission on Biochemical nomenclature
Biochem (1970) 9 3471
- 9) C.M VENKATACHALAM Biopolymers 6 1425-1436 (1968)
- 10) I.D KUNTZ J.Am.Chem.Soc. (1972) 94 4009
- 11) G.D ROSE Nature (1978) 272 586-
- 12) R.URRY, F.WOLD Science (1977) 198 890-
- 13) M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE L'Actualité Chimique (Janv.1981) 12-27
- 14) D. TSERNOGLOU, A. PETSKO Febs letters 68 (1) 1-4 (1976)
- 15) I. HARADA, T. TAKAMATSU, T. SHIMANOUCHI, T. MIYAZAWA, N. TAMIYA
J.Phys.Chem 80 (11) 1153-1156 (1976)
- 16) J.FOX, A.T. TU Arch.Biochem.Biophys 193 (2) 407-414 (1979)
- 17) L.VISSER, A.I LOUW Biochem.Biophys.Acta 533 80-89 (1978)
- 18) J. LAUTERWEIN, K. WUTHRICH, H. SCHWEITZ, J.P VINCENT, M. LAZDUNSKI
Biochem.Biophys.Res.Comm. 76 (4) 1071-1078 (1977)
- 19) H. ISHIZAKI, R. Mc KAY, T.R NORTON, K.T YASUNOBU, J. LEE, A.T TU
J. Biol.Chem 254 (19) 9651-9656 (1979)
- 20) R.C HIDER, U. RAGNARSSON Febs Letters 111 (1) 189-193 (1980)
- 21) R.C HIDER, U. RAGNARSSON Biochem.Biophys.Acta 667 (1981) 197-208
- 22) P. WALDE, H.J JACKLE, P.L LUISI, C.J DEMPSEY, B.E.C BANKS
Biopolymers 20 373-385 (1981)
- 23) B.W LOW, H.S PRESTON, A.SATO, L.S ROSEN, J.E. SEARL, A.D. RUDKO,
J.S RICHARDSON Proc.Natl.Acad.Science 73 (9) 2991-2994 (1976)
- 24) T.H HSEU, H. CHANG, D.M HWANG, C.C YANG Biochem.Biophys.Acta 537
284-292(1978)
- 25) T. TAKAMATSU, I. HARADA, T. SHIMANOUCHI, M. OHTA, K. HAYASHI
Febs Letters 72 (3) 291-294 (1976)
- 26) N.T YU, T.S LIN, A.T TU J. Biol.Chem 250 (5) 1782-1785 (1975)
- 27) T. TAKAMATSU, I. HARADA, K. HAYASHI Biochem.Biophys.Acta 622 189-
200 (1980)
- 28) A. ARSENIEV, T.A BALASHOVA, Y.N UTKIN, V.I TSETLIN, V.F BYSTROV
V.T IVANOV, Y.A OVCHINNIKOV Eur.J.Biochem 71 595-606 (1976)
- 29) F. INAGAKI, T. MIYAZAWA, H. HORI, N. TAMIYA Eur.J.Biochem 89
433-442 (1978)
- 30) V.J HRUBY, K.K DEB, A.F SPATOLA, D.A UPSON, D. YAMAMOTO J.A.C.S 101
(1) 202-212 (1979)
- 31) A.T TU, J.B BJARNASSON, V.J HRUBY Biochem.Biophys.Acta 533 530-
533 (1978)

- 32) J.ROY,U. ROY,D.C GAZIS,I.L SCHWARTZ Proc.Natl.Acad.Science 76
 (7) 3309-3313 (1979)
 33) A. SUCHARDA-SOBCZYK,I.Z SIEMION,D. KONOPINSKA Eur.J.Biochem 96
 131-139 (1979)
 34) I.Z SIEMION,M. LISOWSKI,D. KONOPINSKA,E. NAWROCKA
 Eur.J.Biochem 112 33ç-343 (1980)
 35) M.A KHALED,C.M VENKATACHALAM,H. SUGANO,D.W URRY
 Int.J.Peptide Protein Res. 17 23-33 (1981)
 36) W.L DUA,H.W HAUPTMAN,C.M WEEKS,D.A NORTON Science 176 911-
 (1972)
 37) V.Z PLETNEV,N.M GALITSKII,G.D SMITH,C.M WEEKS,W.L DUAX
 Biopolymers 19 1517-1534 (1980)
 38) J.A SMITH,L.G PEASE Crit.Rew.in Biochem 8 Issue 4 315-399 1980
 39) C. TONOLIO Crit.Rew.in Biochem 1-44 (1980)
 40) I.L KARLE,J. KARLE Acta Cryst 16 969- (1963)
 41) T. UEKI,T. ASHIDA,M. KAKUDO,Y. SASADA,Y. KATSUBE
 Acta Cryst. B25 1840-1849 (1969)
 42) T. ASHIDA,I. TANAKA,Y. SHIMONISHI,M. KAKUDO
 Acta Cryst B33 3054-3059 (1977)
 43) T. ASHIDA,M. KAKUDO Bull.Chem.Soc. JAPAN 47 (5) 1129-1133
 (1974)
 44) T. YAMANE,T.ASHIDA,K. SHIMONISHI,M. KAKUDO,Y. SASADA
 Acta Cryst B32 2071-2076 (1976)
 45) T. ASHIDA,I. TANAKA,T. YAMANE,M. KAKUDO
 biomolecular structure,conformation,function and evolution
 VOL 1 Diffraction and related studies R. SRINIVASAN
 Pergamon Press Oxford and N.Y (1980)
 46) R. BALASUBRAMANIAN,A.V LAKSHMINARAYANAN,M.N SABESAN,G.
 TEGONI,G.N RAMACHANDRAN Int.J.Peptide Protein Res III 25-33
 (1971)
 47) P.Y CHOU,G.D FASMAN Biochemistry 13 211-249 (1974)
 48) P.Y CHOU,G.D FASMAN J.Mol.Biol 115 135-175 (1977)
 49) P.Y CHOU,G.D FASMAN Ann.Rev.Biochem 47 251-276 (1978)
 50) P.N LEWIS,F.A MOMAMY,H.A SCHERAGA Biochim;Biophys Acta
 303 201- (1973)
 51) R.E DICKERSON,T.TAKANO,D. EISENBERG,D.B KALLAI,L. SAMSON, A
 COOPER,E.MARGOLIASH J.Biol.Chem (1971) 246 1511-
 52) M. BATAILLE Thèse de Doctorat D'Etat es Sciences Physiques
 LILLE fevrier 1981
 53) V.F BYSTROV,A.S ARSENIEV,YU.D GAVRILOV J.Mag.Res
 30 151-184 (1978)
 54) K.D KOPPLE,A. GO Biopolymers 15 1701-1715 (1976)
 55) Y.V VENKATACHALAM,P. BALARAM Biopolymers 20 625-628 (1981)
 56) B. PERLY Thèse d'Etat es Sciences Physiques LILLE Nov 1980
 57) M.A KHALED,D.W URRY Biochem.Biophys.Res.Comm. 70 485-
 (1976)
 58) G.N RAMACHANDRAN,R. CHANDRASEKARAN,K.D KOPPLE
 Biopolymers 10 2113-2131 (1971)
 59) D.W URRY,M.M LONG Crit.Rew.in Biochem Issue (1976)
 60) Interpretation of C13 NMR spectra F.W WEHRLI,T. WIRTHLIN
 Edition HEYDEN (1976)
 61) G.A ELGAVISH,J. REUBEN J.Magn.Res 42 242-254 (1981)
 62) V. RENUGOPALAKRISHNAN ,M.A KHALED,R.S RAPAKA,D.W URRY
 Biochem.Biophys.Acta 536 (1978) 421-428

- 63) R.E LONDON Int.J.Pept.Prot.Res 14 377-387 (1979)
64) L.G PEASE ,C. WATSON J.Am.Chem.Soc. 100(4) 1279-1286 (1978)
65) R.W WOODY in Peptides,Polypeptides and Proteins (BLOUT E.R BOVEY F.A,GOODMAN M,LOTAN N Edition John WILEY and Sons Inc NEW-YORK (1974) pp 338-348
66) S. BRAHMS,J. BRAHMS,G. SPACH,A. BRACK Proc.Natl.Acad.Science 74(8) 3208-3212 (1977)
67) A. AUBRY,J. PROTAS,G. BOUSSARD,M. MARRAUD Acta Cryst. B33 (1977) 2399-2406
68) S. BRAHMACHARI,V.S ANANTHANARAYANAN,S. BRAHMS,J. BRAHMS , R.S RAPAKA,R.S BHATNAGAR Biochem.Biophys.Res.Comm (1979) 86 605-612
69) S.BRAHMS,J. BRAHMS J.Mol.Biol (1980) 138 149-178
70) V. MADISON,J. SCHELLMAN Biopolymers (1972) 14 1011-1076
71) T.H HSEU,H. CHANG,D.M HWANG,C.C YANG Biochem.Biophys.Acta 537 (1978) 284-292
72) C.BUSH,S.K SARKAR,K.D KOPPLE J.Am.Chem.Soc. 17 (23) 4951-4954 (1978)
73) D.W URRY,M.M LONG,T. ONISHI,M. JACOBS Biochem.Biophys.Res.Comm. 61(4) 1974
74) M. KAWAI,G. FASMAN J.Am.Chem.Soc. 100(11) 3630-3632 (1978)
75) D. GREFF,S. FERMANDJIAN,P. FROMAGEOT,M.C KHOSLA,R.R SMEBY,F.H BUMFUS Eur.J.Biochem 61 297-305 (1976)
76) N.T YU Crit.Rew.in Biochem Issue (1977)
77) A. AUBRY,J. PROTAS,G. BOUSSARD,M. MARRAUD Biopolymers 17 1693-1711 (1978)
78) G. BOUSSARD,M. MARRAUD,A. AUBRY Biopolymers 18 1297-1331 (1979)
79) T.H HSEU,H. CHANG Biochem.Biophys.Acta 624 340-345 (1980)
80) V.J HRUBY,K.K DEB,J. FOX,J. BJARNASSON,A.T TU J.Biol.Chem 253 (17) 6060-6067 (1978)
81) J.A FOX,A.T TU,V.J HRUBY,H.I MOSBERG Arch.Biochem.Biophys 211 (2) 628-631 (1981)
82) S.L HAN,E.R STIMSON,F.R MAXFIELD,H.A SCHERAGA Int.J.Peptide Protein Res. 17 (1981) 297-315
83) C.P RAO,R. NAGARAJ,C.N.R RAO,P. BALARAM J.Am.Chem.Soc. 19 425-431 (1980)
84) S; FERMANDJIAN,P. FROMAGEOT,A.M TITSCHENKO,J.P LEICKNAM,M. LUTZ Eur.J.Biochem 28 174-182 (1972)
85) S. KRIMM,J. BANDEKAR Biopolymers 19 1-29 (1980)
86) J. BANDEKAR,S. KRIMM Biopolymers 19 31-36 (1980)
87) J. BANDEKAR,S. KRIMM Proc.Natl.Acad.Science 76(2) 774-777 (1979)
88) R.C LORD Applied spectroscopy 31(3) 187-194 (1977)
89) M. BRIDOUX,A. DEFFONTAINE,M. DELHAYE,B. ROSE,E. DA SILVA J.RAMAN Spect. (6) 515-516 (1981)
90) W.L PETICOLAS Biochimie (1975) 57 417-428
-

CHAPITRE II

ETUDES EXPERIMENTALES ET CALCULS DES COORDONNEES

DE DIPEPTIDES

A-1) ETUDES EXPERIMENTALES:

-Etudes en diffusion RAMAN:

Les spectres sont enregistrés à l'aide du spectromètre T800 à triple monochromateur au Laboratoire de la Faculté de Pharmacie de LILLE. Le fonctionnement d'un tel appareil a été vu précédemment. Le principe de la diffusion RAMAN a été précédemment introduit. La lumière utilisée est issue d'un Laser à Argon ionisé (Ar+) dont les deux longueurs d'onde les plus utilisées pour leur intensité (1 à 1,3 W) sont la raie verte à 514,5 nm et 488 nm dans le domaine du visible.

Un LASER au Krypton (647,1 nm) a été utilisé lors des études de tripeptides en solution dans le Diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO-d6), ceci dans le but d'obtenir le spectre de diffusion RAMAN en dehors de la bande de fluorescence et les spectres ont été accumulés par l'intermédiaire d'un analyseur Multicanal. L'enregistrement des spectres s'est toujours effectué en balayage lent ($5 - 25 \text{ cm}^{-1}$ et $40 \text{ cm}^{-1}/\text{mn}$).

-Etudes par spectrométrie d'absorption Infrarouge:

Les spectres ont été enregistrés soit à l'aide d'appareils à

monochromateurs (PERKIN ELMER 621) soit à l'aide d'appareillage enregistrant les interférogrammes (Interféromètre du type MICHEL-SON) auquel est associé un calculateur permettant de redonner le spectre d'absorption à partir de la Transformée de FOURIER de l'interférogramme. (NICOLET FT 7190 Centre Universitaire de mesures et d'analyses de la faculté de Pharmacie de LILLE).

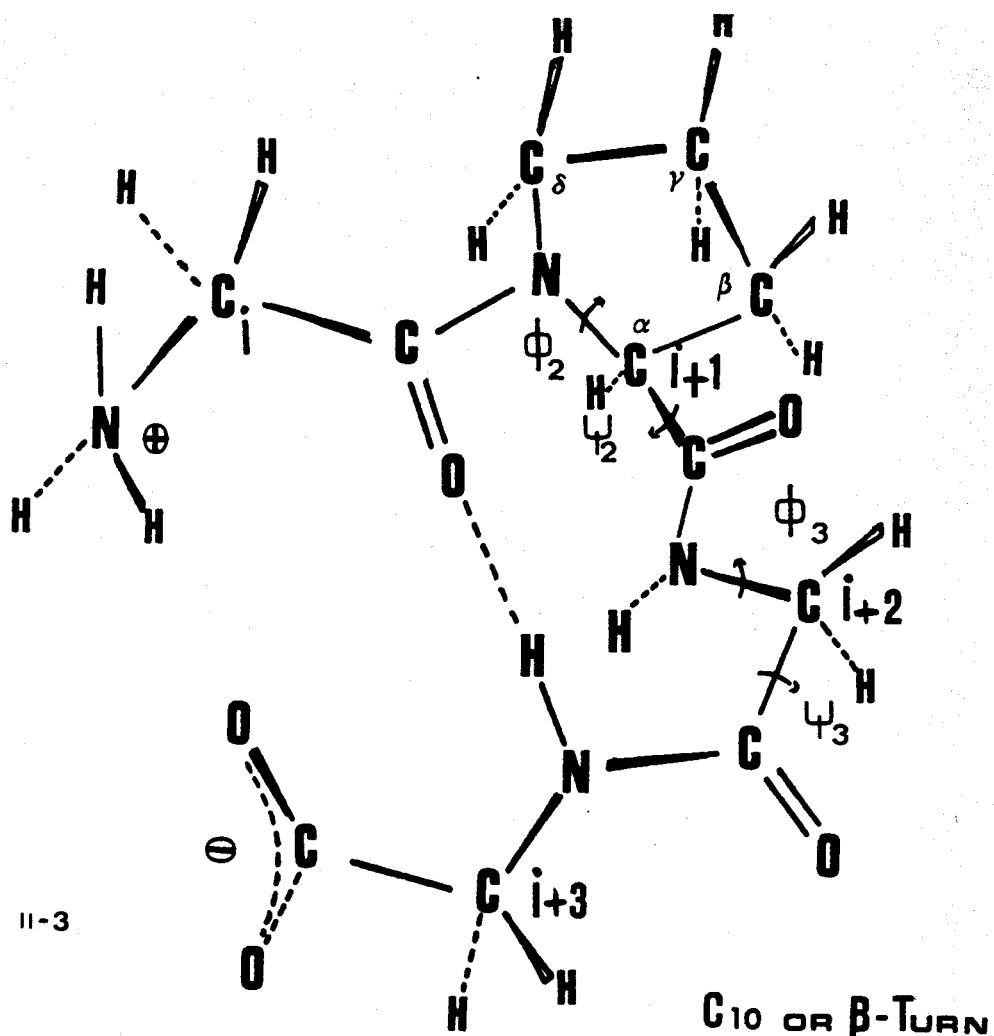
A-2) CALCULS DES FREQUENCES DES MODES NORMAUX DE VIBRATION:

Les principes de calcul pour les molécules isolées sont rappelés en annexe technique 1 et ceux relatifs à la molécule dans son contexte cristallin sont expliqués pour la Diglycine.

*Les programmes N.C.T (Normal Coordinate Treatment) qui s'appliquent aux calculs des fréquences de vibration pour des molécules isolées ainsi que les programmes C.V.O.A (Cristalline Vibrations Optically Active) qui traitent le cristal en incluant les effets des liaisons Hydrogène intermoléculaires, les interactions non liantes entre paires d'atomes non liés ,les interactions de type dipolaire ou plus généralement de type électrostatique proviennent de l'équipe du Pr T.SHIMANOUCHI (Université des sciences de TOKYO). Ces programmes ont été adaptés en FRANCE au C.I.R.C.E (Centre Inter régional de Calcul Electronique) à la faculté des sciences d'ORSAY par G. VERGOTEN.

B) CONFORMATIONS EN COUDE BETA: MODELES PEPTIDIQUES CHOISIS:

Le tripeptide Glycyl-L-Prolyl-GlycylGlycine (GPGG) , dessiné ci-dessous dans sa forme en coude B II (fig II-3) a été choisi comme modèle pour les raisons suivantes:



*La présence d'un résidu Proline en position $i+1$ du peptide est un élément favorable, d'après les calculs conformatiionnels de CHOU et FASMAN (1), à l'établissement d'un coude Béta.

*L'abscence (hormis le résidu iminoacide Prolyl) de chaînes latérales. Seules seront observées les fréquences dues au squelette peptidique.

Quelques auteurs ont réalisé plusieurs études à l'aide de différentes techniques physicochimiques sur des tripeptides comportant un résidu proline en position $i+1$.

En RMN du proton, le tripeptide

Glycyl-L-Prolyl-L-Leucyl-Glycine (GPLG) a été étudié par TOMA et AL (2). Ces auteurs ont mis en évidence l'existence d'une structure en **coude B I** en solution dans le DMSO-d₆. On verra par la suite que, dans le cas de l'étude réalisée par RMN du proton le tripeptide **GPGG** adopte une structure en **coude B II** dans le DMSO-d₆.

En spectrométrie RAMAN , BLANCHARD (3) a étudié les peptides du type $\text{Ala}_x\text{-Pro-Ala}_y$ à l'état solide.Cependant cet auteur n'a pas utilisés les techniques de N-deutération pour séparer les bandes de vibration Amide III de celles dues aux groupes méthylènes de la Proline.Des études complémentaires utilisant cette dernière technique étaient nécessaires et nous les avons réalisées sur nos peptides.

De nombreuses études sur des composés comprenant un résidu Proline en position i+1 ont été réalisées comme par exemple celles menées par URRY et coll. sur Val-Pro-Gly-Gly (4).

Avant de simuler les spectres vibrationnels,nous avons devant leur complexité,tenté de les analyser par parties,c'est à dire d'étudier **les deux dipeptides constituants du tripeptide** ,l'un sous sa forme cristallisée (**alpha GlycylGlycine**) et l'autre sous sa forme trans de molécule isolée (**Glycyl-L- Proline**).

*Le tétrapeptide protégé homologue N-Cbz-GPGG-OMe a été également étudié.La facilité de son conditionnement sous forme de film transparent obtenu à partir de l'évaporation du solvant chloroforme a grandement facilité l'analyse par dichroïsme circulaire et spectrométries vibrationnelles.

Enfin les résultats expérimentaux de ces deux dernières années sur d'autres peptides effectués par nombre d'auteurs cités dans le premier chapitre,nous ont confirmé dans l'utilité d'entreprendre de tels études.

*Au cours de notre travail ,des travaux théoriques voisins des nôtres ont été publiés par S.KRIMM et J. BANDEKAR (5,6).Cependant dernièrement des auteurs contestent leurs attributions de bandes(

**Cette thèse présente les résultats de nos calculs et la confrontation à l'expérimentation .Ils ont aussi permis dans certains cas de concilier les résultats de KRIMM avec ceux de ses détracteurs.

C) ETUDES DE DEUX DIPEPTIDES:**Alpha-GLYCYLGLYCINE** et **GLYCYL-L-PROLINE**:

PROLINE:

C-1) Traitement des coordonnées normales de l'alpha-GlycylGlycine:

La **structure de la forme alpha du dipeptide GlycylGlycine** a été obtenue à partir de l'étude en **diffraction des rayons X** de **BISWAS et Al.**(7 et article). Ce dipeptide cristallise sous forme monoclinique ($P2\ 1/a$ Groupe facteur $C2h^5$) avec quatre molécules par maille .Les fig II-4,II-5,II-6 donnent respectivement les schémas du cristal ,des molécules de la maille élémentaire ainsi que la table de données cristallographiques pour les structures $P\ 2\ 1/c$ transformées en $P\ 2\ 1/a$. La molécule de Diglycine $(+)\text{3HN-CH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-CO}_2(-)$ n'a aucune symétrie moléculaire (Groupe $C1$ n'ayant comme élément de symétrie que l'identité E).

Le groupe de site dans lequel est placée la molécule est également de symétrie $C1$,ce dernier groupe(site) pouvant être considéré du point de vue de la molécule elle-même comme la façon dont elle voit sa situation par rapport au cristal.

Lorsqu'on considère l'ensemble des quatres molécules de la maille élémentaire ,on se rend compte qu'il existe une symétrie locale et que certaines opérations de symétrie permettent d'amener la molécule 1 sur les autres molécules.

Les opérations de symétrie sont classées par type de symétrie (E: opération identité , $C2$ axe autour duquel tourne la molécule de

$C_n=2 / n$, ici $n=2$), i centre d'inversion ($mol_1 mol_3, mol_2 mol_4$) et un plan σ_h . L'ensemble de ces quatres classes forment le **groupe C_{2h}** appelé **groupe facteur**.

L'ensemble des opérations de translation-rotation (axes hélicoïdaux, plans de glissement qui permettent de passer de la maille élémentaire à l'ensemble du cristal plus le groupe facteur), constitue le **groupe d'espace**. On a montré que l'on peut **décrire la symétrie de l'ensemble des quatres molécules** (Groupe facteur) composant la maille élémentaire par **quatre représentations** différentes. Chacune de ces représentations est caractérisée par 4 termes (dus aux quatre classes) qui sont les **traces** (somme des éléments diagonaux) des plus petites matrices (ici unidimensionnelles) qui transforment, par l'opération de symétrie considérée une molécule en son homologue.

L'ensemble de ces quatres représentations forment la **table de caractères (C_{2h})** qui se présente ainsi:

nom du groupe

C _{2h}	E	C ₂	i	σ_h	act IR	act RAMAN
Ag	1	1	1	1	Rz	X , Y , Z , XY
Bg	1	-1	1	-1	RX,RY	XZ,YZ
Au	1	1	-1	-1	Z	
Bu	1	-1	-1	1	X,Y	

nom des 4 représentations

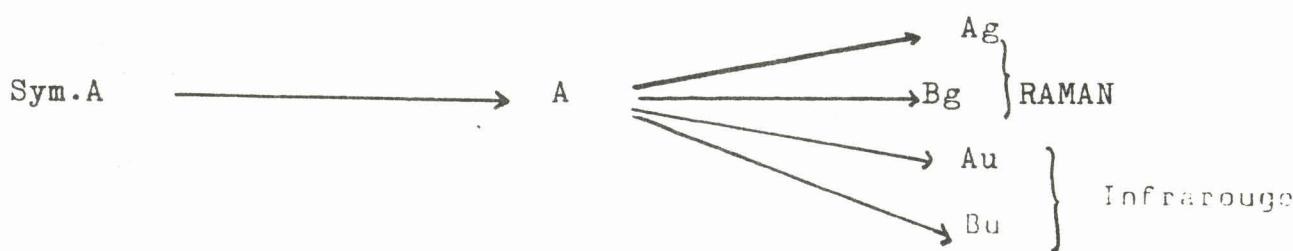
composantes du moment de transition dipolaire
composantes du tenseur de diffusion RAMAN

E , C_2 , i , σ_h sont les **classes** (éléments de symétrie classés d'après leur genre).

A , B symétrie ou antisymétrie par rapport à l'axe de rotation C_2 .
 g , u symétrie ou antisymétrie par rapport à l'inversion. Les nombres 1 , -1 sont les **caractères (X) de la représentation et traduisent l'effet de l'opération de symétrie.**

Comme conséquence, les bandes de vibration éclateront chacune en quatre composantes suivant les quatres représentations :

Groupe moléculaire groupe de site groupe facteur C_{2h}



Suivant le mode g (gerade) ou u (ungerade) les vibrations seront actives en RAMAN (modes Ag et Bg) et en Infrarouge(Au et Bu).

Dans la maille référence, les phases vibrationnelles représenteront la façon dont la même coordonnée normale des molécules II, III, IV se comporte vis à vis de la coordonnée normale correspondante de la molécule I.

MODE	MOLECULES	VIBRATIONS/MOLECULE I
Ag	II, III, IV	en Phase ($XAg=1, 1, 1, 1$)
Bg	II III, IV	en phase avec I $XBg = 1$ opposit.de phase $XBg=-1, -1$

Au	III II, IV	en phase avec I XAu = 1 opposit.de phase XAu=-1,-1
Bu	IV II, III	en phase avec I XBu = 1 opposit.de phase XBu=-1,-1

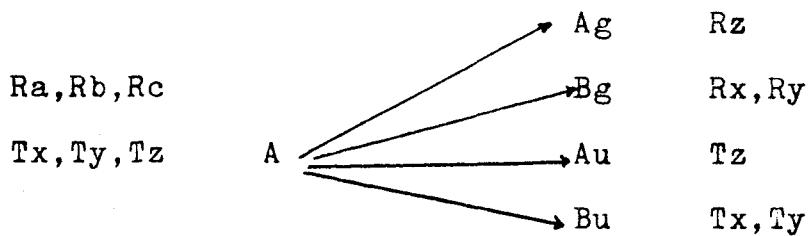
C'est de cette constatation qu'est née la **théorie des perturbations** développée pour les peptides par **MIYAZAWA** (8) et appliquée principalement aux vibrations amide I,II,III des peptides engagés dans des structures secondaires hélicoïdales ou en chaîne Béta , travail repris principalement par **S.KRIMM** (9) pour les chaînes β antiparallèles ($B\beta$) et dernièrement pour les coudes Béta (10).

La molécule de Glycylglycine (Diglycine) comprend 17 atomes. Il existe donc **3N-6 =45 degrés de libertés** de vibrations internes; les vibrations internes des 4 molécules de la maille élémentaire vont se coupler suivant les éléments de symétrie du G.F et la représentation totale irréductible sera donnée par $R_{vib.int} = 45Ag + 45Bg + 45Au + 45Bu$

La représentation irréductible des vibrations du réseau est déterminée par l'analyse de la table de caractères:

Groupe de Site(GS)

Groupe Facteur(GF)



$R_{vib \text{ rés.}}$ sera composée de $4(3N-(3N-6))=24$ modes suivant : $6Ag+6Bg+6Au+6Bu$ auxquels il faut retrancher **3 modes acoustiques de**

fréquence nulle (activité optique nulle) et donc:

$$R_{vib\ res} = 6Ag + 6Bg + 5Au + 4Bu$$

La représentation totale irréductible du cristal sera :

$$R_{tot} = R_{vib\ int} + R_{vib\ res} = 51\ Ag + 51\ Bg + 50\ Au + 49\ Bu$$

CONSTRUCTION DU CRISTAL:

a) **Construction de la maille élémentaire:**

Les coordonnées des atomes de la molécule I (réf) ont été données en fonction des paramètres atomiques (fractions de a , b , c) à partir des résultats de diffraction des rayons X.

On définit :

A matrice des paramètres atomiques

V matrice donnant l'expression des vecteurs a , b , c dans le repère cartésien cristallin .

Xc matrice des coordonnées cartésiennes des atomes dans le système cartésien cristallin.

$$X_c = V \cdot A$$

W, T matrice de transformation et vecteur de translation permettant de passer de la molécule de référence à la molécule n de la cellule origine $A_n = W \cdot A_1 + T$

A_n matrice des paramètres atomiques de la molécule n

$X_{c,n}$ matrice des coordonnées cristallines cartésiennes de la molécule n

on a :

$$A_n = W \cdot A_1 + T$$

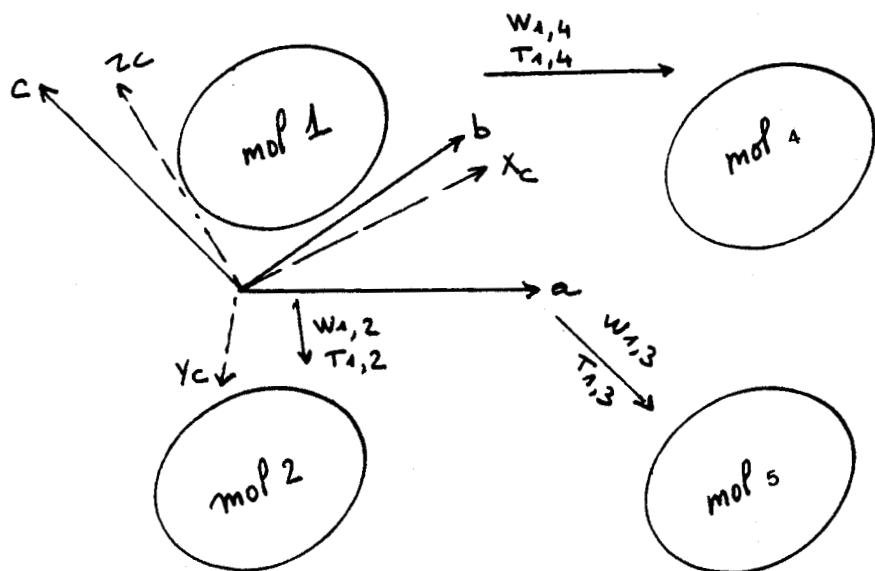
$$X_{c,n} = V \cdot A_n = V \cdot W \cdot A_1 + V \cdot T$$

$$X_{c,1} = V \cdot A_1 = A_1 = V \cdot X_{c,1}$$

$$X_{c,n} = V \cdot W \cdot V \quad X_1 + V \cdot T = D X_1 + V T$$

$D = V W V$ matrice de transformation des coordonnées cristallines cartésiennes de la molécule de référence aux coordonnées cristallines cartésiennes de la molécule n dans la cellule origine .

La figure II-7 schématise le processus suivi:



*expression de la matrice V pour la diglycine.

$$\begin{pmatrix} a & 0 & -c \cdot \cos\beta \\ 0 & b & 0 \\ 0 & 0 & c \cdot \sin\beta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 7.7 & 0 & -5.380888 \\ 0 & 9.57 & 0 \\ 0 & 0 & 7.804898 \end{pmatrix}$$

$$\text{avec } a=7.7 \text{ \AA}^\circ, b=9.57 \text{ \AA}^\circ, c=9.48 \text{ \AA}^\circ, B=124^\circ 35'$$

*Expressions des matrices W et T pour la diglycine:

	WI,II	TI,II
molécule I-II	$\begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$
molécule I-III	$\begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0.5 \\ 0.5 \\ 0 \end{pmatrix}$
molécule I-IV	$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 0.5 \\ 0.5 \\ 0 \end{pmatrix}$

b) **construction du cristal:**

A partir de la maille élémentaire, on construit le cristal. On se limitera ici aux mailles ayant une face ou une arête commune avec la maille élémentaire , ce qui définit un nombre de $3^3 = 27$ **mailles** , ce qui est suffisant dans la plupart des cas pour rendre compte des influences à longues distances des mailles sur la maille origine .

Certains auteurs poussent le calcul jusqu'à 125 mailles (10) . La position des mailles élémentaires (qui sont les plus petits motifs géométriques qui, par translation , reproduisent le cristal entier et ses propriétés vibrationnelles) est décrite par rapport à la molécule origine à l'aide des indices (k, l, m) qui représentent les translations suivant les axes cristallographiques a, b, c . Le tableau II-1 donne les indices (k, l, m) pour les 27 mailles.

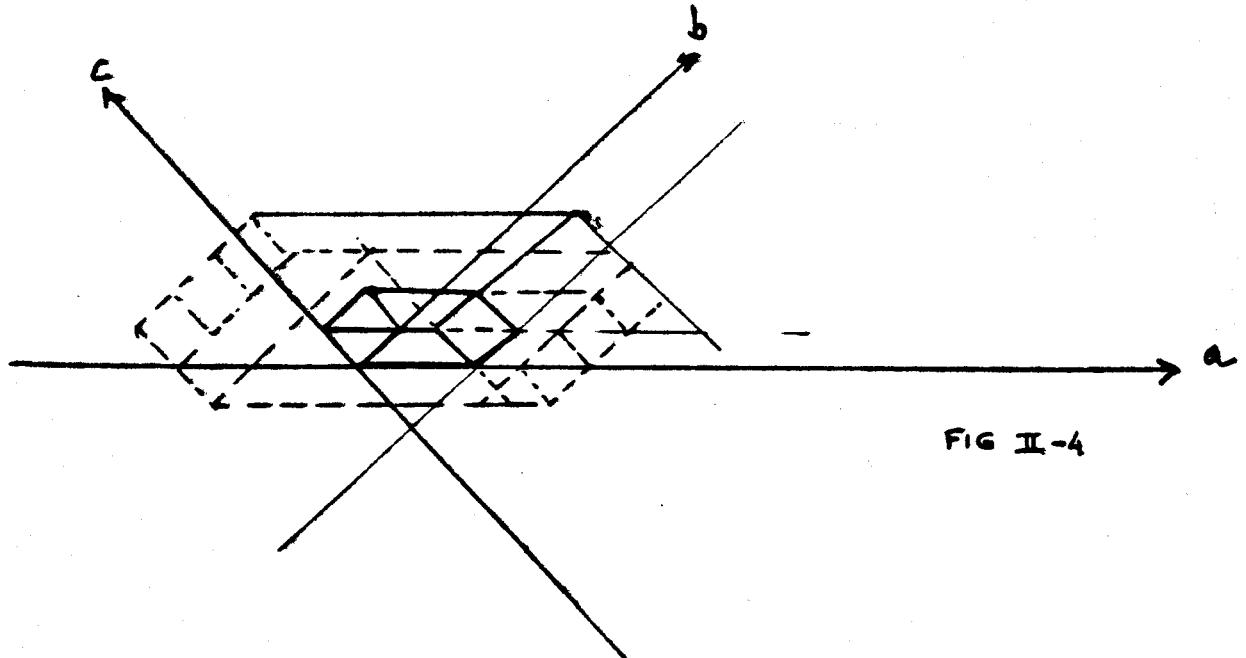


FIG II-4

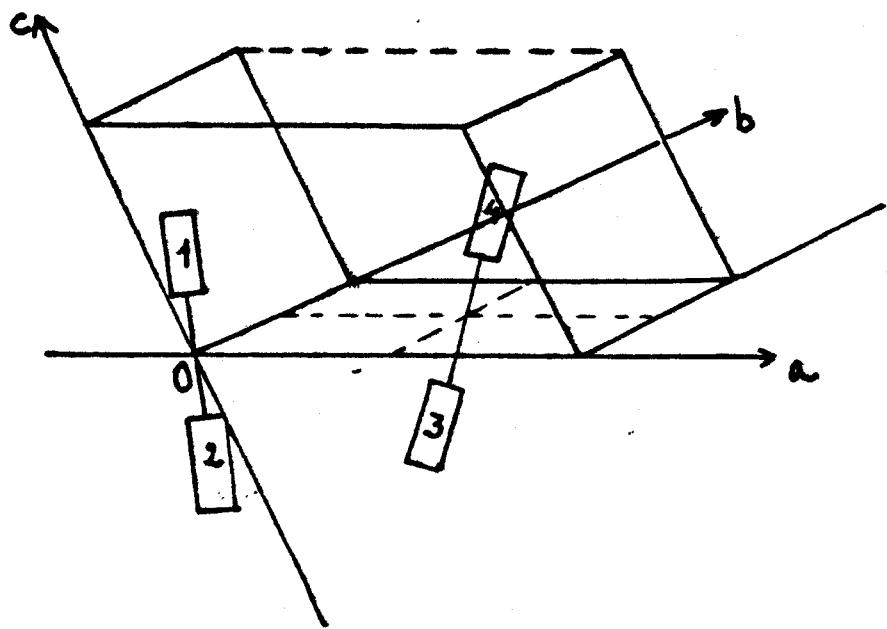


FIG II-5

Maille	k, l, m
1	(0, 0, 0)
2	(0, -1, 0)
3	(1, -1, 0)
4	(1, 0, 0)
5	(1, 1, 0)
6	(0, 1, 0)
7	(-1, 1, 0)
8	(-1, 0, 0)
9	(-1, -1, 0)
10	(0, 0, 1)
11	(0, -1, 1)
12	(1, -1, 1)
13	(1, 0, 1)
14	(1, 1, 1)
15	(0, 1, 1)
16	(-1, 1, 1)
17	(-1, 0, 1)
18	(-1, -1, 1)
19	(0, 0, -1)
20	(0, -1, -1)
21	(1, -1, -1)
22	(1, 0, -1)
23	(1, 1, -1)
24	(0, 1, -1)
25	(-1, 1, -1)
26	(-1, 0, -1)
27	(-1, -1, -1)



La partie théorique traitant de:

*la construction de la matrice U de passage des coordonnées internes aux coordonnées de symétrie intramoléculaires ,

* des calculs des éléments de la matrice B ,

*de la construction de la matrice des contraintes Zr pour les termes intramoléculaires et ZSI pour les termes intermoléculaires ainsi que de la résolution de l'équation séculaire $\tilde{L}_{\epsilon} \cdot F_c \cdot L_{\epsilon} = \Lambda_c$ et du calcul des fréquences ($\tilde{\nu}$) à partir de Λ_c , du calcul de la distribution d'énergie potentielle et du JACOBIEN est parfaitement décrite dans la **thèse de G. VERGOTEN** (11 ch.I).

Nous allons simplement décrire les fonctions potentielles dues aux interactions intermoléculaires.

Potentiel du aux interactions entre paires d'atomes non liés.

Ces interactions sont fonction de la distance r entre l'atome i de la molécule n et l'atome j de la molécule m. Le potentiel peut s'exprimer sous la forme :

$$U_{nm} = \sum_i \sum_j V_{ij}(r_{ij}).$$

Les dérivées secondes des V (mdyne/Å) par rapport aux déplacements cartésiens X et Y donnent les constantes de force pour les interactions i-j , l'action des dérivées premières étant considérée comme négligeable. L'expression des potentiels V_{ij} est de la forme:

$$V_{ij} = A_{ij} \exp(-B_{ij} r_{ij}) - C_{ij} r_{ij}^{-6}$$

Les coefficients A,B,C (tableau II de l'article) sont donnés à partir de calculs d'énergie réticulaires de structures cristallines par **A. KITAIGOROSKII** (12) et **D.E WILLIAMS** (13,14) pour les interactions entre atomes N,C,O,H . L'annexe technique IV donne les différentes paires d'interactions prises en compte .L'énergie

calculée du réseau est de -12,1 KCAL/Mole.

Potentiel du aux interactions dipolaires:

Les interactions dipolaires proviennent d'interactions électrostatiques .Elles sont surtout importantes pour la vibration Amide I $\nu(c=o)$.La méthode de calcul des perturbations proposée par **MIYAZAWA** (4) s'applique surtout aux structures secondaires organisées telles les hélices ou les chaînes B// et B \ddagger qui possèdent une symétrie.

A partir des fréquences expérimentales ,on définit pour chaque vibration une relation de la forme

$$\bar{\nu}(\delta) = v^* + \sum_s D_s \cos s$$

où δ est l'angle de phase entre les mouvements des oscillateurs adjacents ou reliés par des liaisons H .Ces fréquences sont éclatées (splittings) suivant le groupe facteur de la maille élémentaire (5,6,7). **H. TAKEUCHI et AL** (15) définissent le tenseur:

$$D_{\alpha\beta} = \sum_{r_{1\beta}} \left(I/r_{1\beta}^3 - 3 R_{1\beta} R_{1\beta} / r_{1\beta}^5 \right) - 4 I/3Vc$$

$R_{1\beta}$ position du dipole du site B de la cellule 1 par rapport au dipole de référence .I tenseur identité,R rayon de la sphère de LORENTZ,Vc volume de la cellule unité . $D_{\alpha\beta}$ ne dépend que de la structure cristalline et non de la forme du cristal.

L'énergie d'interaction est de la forme :

$$V = \frac{1}{4} D_{\alpha\beta} \frac{1}{r_{ij}} . Le développement peut être mis sous la forme \\ K = K^* + \sum_i S_i + 1/2 \sum_{i,j} S_i S_j + \dots \text{ avec } = 12,6 \text{ Debye } / \text{\AA}$$

K^* moment dipolaire permanent . En négligeant les termes de couplages entre modes normaux différents $i = j$,on peut exprimer le potentiel d'interaction dipolaire sous la forme:

$$V = \sum_{a,b} K_a^b S_a^a S_b^b$$

ou S_a^a et S_b^b sont les mêmes coordonnées de symétrie intramoléculaires des molécules a et b. Le tableau III donne les constantes de force pour les interactions dipolaires des modes amide I, ν_a (CO_2^-), et δ_s (NH_3^+).

Liaisons Hydrogène:

L'expression du potentiel du type **UREY-BRADLEY** due aux liaisons Hydrogène ainsi que les liaisons participant à ce potentiel ont été résumées dans la table I de l'article.

Projections cartésiennes des modes normaux:

Le moyen d'atteindre la visualisation des modes normaux a été décrite dans l'annexe V. Elle a été réalisée au laboratoire de Physique de la faculté de Pharmacie par **G. VERGOTEN** sur un calculateur Graphic Display TEKTRONIC et tracés sur table traçante TEKTRONICS.

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE II

1) P.Y CHOU, G.D FASMAN

Ann. Rev Biochem. 47 251 - 276 (1978)

2) F. TOMA , H. LAM-THANH , F. PIRIOU, M.C HEINDL, K. LINTNER
S. FERMANDJIAN Biopolymers 19 781-804 (1980)

--

3) S.BLANCHARD J.Molecular Structure 38 63-76 (1977)

4) T.MIYAZAWA J.Chem.Physics 32 (6) 1647-1652 (1960)

5) W.H MOORE , S. KRIMM P.N.A.S 72 (12) 4933-4935 (1975)

6) W.H MOORE , S. KRIMM Biopolymers 15 2465-2483 (1976)

7) Y. ABE , S. KRIMM Biopolymers 11 1841-1853 (1972)

8) J. BANDEKAR , S. KRIMM Biopolymers 19 31-36 (1980)

9) S.KRIMM , J. BANDEKAR Biopolymers 19 1 29 (1980)

10) K.MACHIDA , A.KAGAYAMA, Y.SAITO 1979 J.Ram.Spect. 8 133-138

11) G. VERGOTEN Thèse d'Etat ès Sciences Physiques
LILLE (1977)

12) A. KITAIGORODSKII J.Chem.Physics 63 9-

(1966)

- 44 -

13) D.E. WILLIAMS J.Chem.Physics 45 3770- (1966)

14) D.E. WILLIAMS J.Chem.Physics 47 4680- (1967)

15) H. TAKEUCHI, J.L. BRIBES, I.HARADA , T.SHIMANOUCHI

Bull.Chem.Soc.JAPAN 49 (12) 3483- (1976)

Raman Spectra and Normal Vibrations of Dipeptides. I. Glycylglycine

P. LAGANT, *Institut de Recherches sur le Cancer et Unité 124 de l'INSERM, 59020 Lille Cédex*; G. VERGOTEN, *Laboratoire de Physique, Faculté de Pharmacie, F-59045 Lille Cédex and Centre de Technologie Biomédicale, F-59 Lille Cédex*; M. H. LGUCHEUX-LEFEBVRE, *Institut de Recherches sur le Cancer et Unité 124 de l'INSERM, 59020 Lille Cedex*; and G. FLEURY, *Laboratoire de Physique, Faculté de Pharmacie, F-59045 Lille Cédex and Centre de Technologie Biomédicale, F-590 Lille Cédex*, France

Synopsis

We studied the Raman spectra of the zwitterionic glycylglycine crystal (GG) and its N-deuterated analog. A normal coordinate analysis on its α -crystalline form was performed and the effects of intra- and intermolecular couplings are discussed. A modified Urey-Bradley potential was used as a model of the intramolecular force field. Splitting of factor groups is described by the use of intermolecular potentials consisting of nonbonded atom-atom interactions and dipole-dipole interactions. Effects of hydrogen bonds on the vibrational frequencies of amino and carboxylate groups are also analyzed.

INTRODUCTION

Knowledge of the intra- and intermolecular vibrations of dipeptides and the determination of intramolecular potentials are of great interest in conformational studies of proteins. This is particularly true when the effects of lattice vibrations on atomic groups of the molecule must be analyzed. Frequency calculations by Machida et al.¹⁻³ on amino acid crystals have shown that bending frequencies of terminal groups increase significantly compared to those of the free molecule.

Similar increases are also observed in the study of the α -form of glycylglycine, which is the most stable crystal structure that this dipeptide adopts.⁴⁻⁶ Its characteristics have been determined by Biswas et al.⁴ The glycylglycine crystallizes in the monoclinic system (space group $P_{21/c}$ or C_{2h}^5) with four molecules per unit cell having the following cell parameters: $a = 7.7$, $b = 9.57$, $c = 9.48 \text{ \AA}$, $\beta = 124^\circ 35'$. Destrade et al.⁷ performed a vibrational analysis of the α -glycylglycine using selective deuterations. They identified the main vibrational frequencies but did not explain the shifts of some frequencies in the crystal.

A complete normal-coordinate treatment of the α -glycylglycine crystal

* To whom correspondence should be addressed.

Biopolymers, Vol. 22, XXX-YYY (1983)

© 1983 John Wiley & Sons, Inc.

CCC 0006-3525/83/NNPPPP-DD\$ZZ.ZZ

47101 kb 017 tk a1
lagant-biopol-mar

has been performed. In addition to a modified Urey-Bradley force field, atom-atom nonbonded interactions, dipole-dipole interactions and hydrogen bonds have been taken into account.

EXPERIMENTAL

Commercial glycylglycine (Fluka A.G.) was used. The α -crystalline form was obtained by precipitation with acetone or by crystallization from an aqueous solution. The N-deuterated analog, prepared by exchange with D₂O in an aqueous solution was obtained in the α -crystalline form in the same manner as the undeuterated sample. Total deuteration has not been attained even after several weeks.

Raman spectra were recorded using a Coderg T 800 spectrometer and the 514.5- or 488-nm radiation of an argon-ion laser (with 100–200 mW power on the sample). The spectral slit width was 6 cm⁻¹ (for frequencies higher than 250 cm⁻¹) and 4 cm⁻¹ for the low-frequency range. Spectra were calibrated using anisole frequency values.

The ir spectra were obtained with a FTIR Nicolet 7000 spectrometer (KBr disk).

NORMAL-COORDINATE ANALYSIS

Atomic coordinates were deduced from the structure given by Biswas et al.⁴ They were slightly modified ($<10^{-2}$ Å) to improve the crystal characteristics. Frequencies of optically active normal modes were calculated using a modified Urey-Bradley-type force field.^{8,9} The atom numbering system is that given by Biswas et al.⁴ (Fig. 1). Our initial values for the intramolecular force constants are those given by Dwivedi and Gupta.¹⁰

The intermolecular potential consists of three terms $V_1 + V_2 + V_3$. The first is a potential V_1 due to hydrogen bonds (Fig. 1). Its actual form is of the Urey-Bradley type.¹¹ The parameters of hydrogen bonds and the corresponding potentials are given in Table I. These interactions account for the hydrogen-bond contribution except in two cases: the H_{1,1}¹⁰—O_{1,19}⁹ and H_{1,1}¹⁵—O_{3,11}⁴ bonds. The K value of H_{1,1}¹⁰—O_{1,19}⁹ and the torsion internal coordinates Y of H_{1,1}¹⁵—O_{3,11}⁴ were experimentally derived ($K = 0.45$ mdyn/Å, $Y = 0.03, 0.007, 0.003$, and 0). V_2 represents the atom-atom nonbonded interactions and the corresponding parameters are from the literature.¹² The minimal and maximal values assigned to the r_{\min} and r_{\max} parameters are from our experimental results. Formulas and their corresponding parameters are given in Table II. The calculated lattice energy is -12.13 kcal. mol⁻¹. Unfortunately, no experimental values are available for comparison. V_3 gives the dipole-dipole interactions, which are responsible for the frequency shifts and splittings (see Table III). This term may be expressed as $V_3 = \sum_{i,j} K_d^{ij} S_\alpha^i S_\alpha^j$, where S_α^i and S_α^j are the α th intramolecular symmetry coordinates for molecules i and j , respectively.¹ Table IV gives

RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. I

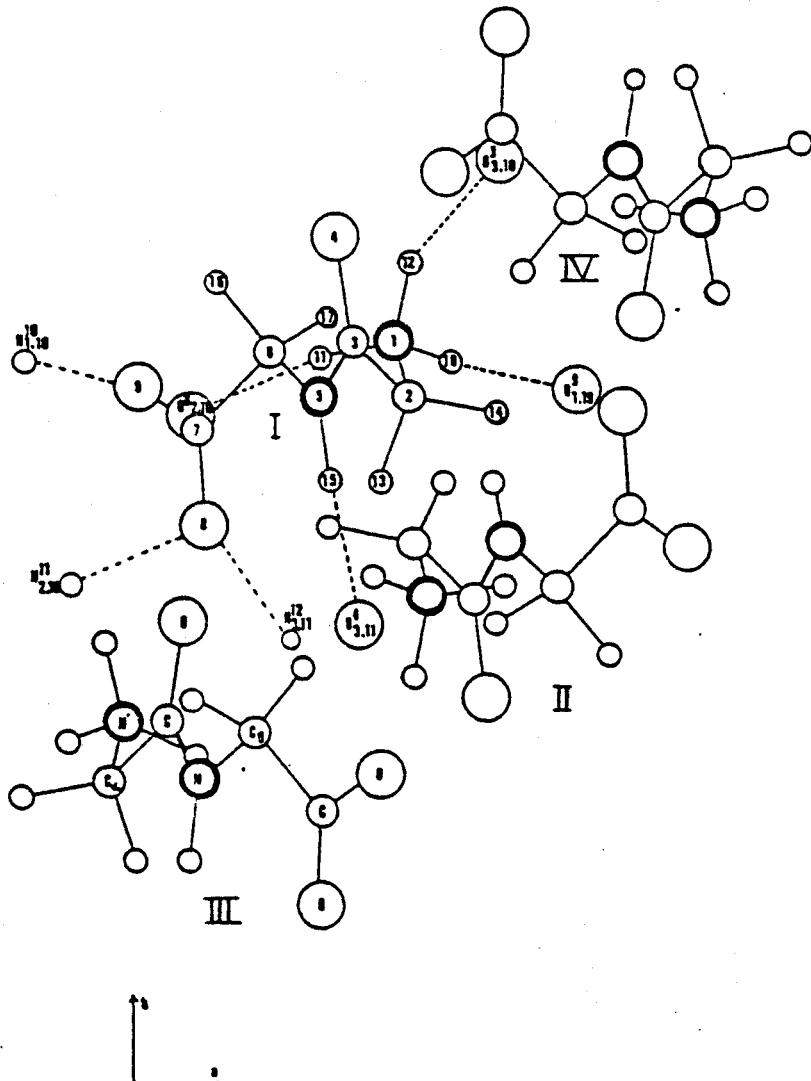


Fig. 1. Unit cell of α -glycylglycine (GG). $O'_{m,n} \cdots H_j^k$ are the hydrogen bonds defined in Table L.

the observed (Figs. 2-5,9) and calculated results for the intramolecular frequencies. Observed (Figs. 6-9) and calculated lattice frequencies are given in Table V with the corresponding potential-energy distribution.

DISCUSSION

Intramolecular Vibrations

From the model of Biswas et al.⁴ one observes (Fig. 1) that one hydrogen bond from the peptidic nitrogen and two hydrogen bonds from the terminal

47101 kb 017 tk a1
lagant-biopol-mar

TABLE I
Analytical Expression of the Intermolecular Potential Describing the Hydrogen Bonds and Parameters of Hydrogen Bonds*

$$V_i = \frac{1}{2} K_{O-iH} (\Delta r_{O-iH})^2 + \frac{1}{2} H_{C-O-N} \Delta \phi_{C-O-N}^2 + \frac{1}{2} H_{O-H-N} \Delta \phi_{O-H-N}^2 + \frac{1}{2} Y_{C-O} \Delta r_{C-O} + \frac{1}{2} Y_{N-H} \Delta r_{N-H}$$

<i>r</i> (Å)	$\frac{H_{i,i}^k - O_{i,i}^k}{R}$	$\frac{H_{i,i}^k - O_{i,i}^k}{T}$	<i>K</i> (mdyn/Å)	$H(O=H-N)$ (mdyn/Å)	$H(C-O-H)$ (mdyn/Å)	$Y(C-O)$	$Y(O=H)$	$Y(H-N)$
$H_{1,1}^1-O_{1,10}^1$	1.793	i	(0,0,1)	0.35	0.03	0	0	0
$H_{1,1}^1-O_{1,19}^1$	1.757	E	(0,0,-1)	0.45	0.03	0	0	0
$H_{1,1}^2-O_{1,10}^2$	1.869	$a_{x,s}$	$\left(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, 1\right)$	0.35	0.03	0	0	0
$H_{1,1}^3-O_{1,11}^3$	1.995	C_{2b}	$\left(\frac{1}{2}, -\frac{1}{2}, 1\right)$	0.35	0.03	0.03	0.007	0.003

* *K*, *H*, and *Y* refer to the force constants for stretching, bending, torsion internal coordinates Δr , Δd , and $\Delta \tau$, respectively. *k,l*: label atoms; *i,m*: label molecules; *j,n*: label cells. *R* and *T* express the symmetry operation and the translation vector that transform the molecule containing the H donor to the one containing the O acceptor.

RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. I

TABLE II
Potential Parameters for Nonbonded Atom-Atom Interaction V_2 *

Atom Pair	r_{\max} (Å)	r_{\min} (Å)	A	B	C
N—N	6	0.7	76,200	4.063	402
N—C	6	3.3	55,300	3.768	456
N—O	6	3	86,100	4.194	374
N—H	6	0.7	49,500	4.561	130
C—O	6	3.6	63,700	3.881	441
C—H	6	3	8766	3.670	125
C—C	6	3.3	83,630	3.6	568
O—H	6	2.9	57,500	4.727	122
O—O	6	3.2	96,500	4.333	346
H—H	6	2.61	2654	3.74	27.3

* $V_2 = A \exp(-Br) - Cr^{-6}$. r_{\max} and r_{\min} are the maxima distance of interaction and the minimum distance, respectively. Units of A, B, and C are taken in order to express V_2 in kcal mol⁻¹.

nitrogen are formed between molecules in the same layer. The third hydrogen bond from the terminal nitrogen atom represents an interaction between adjacent layers. The O(4) and O(9) oxygen atoms accept one hydrogen bond each (in one layer). The O(8) oxygen atom receives two hydrogen bonds, one in the same layer, the other in the adjacent layer. Table I gives all the parameters for hydrogen bonds.

On the basis of the crystalline structure, two kinds of shifting have to be considered depending on either the intermolecular interactions (g-u splittings or Raman-ir) or the neighbors in one layer (A-B splittings).

Normal-coordinate treatment leads us to assign frequencies for some bands of the crystalline molecule that are different from those given previously in the literature^{7,10} for the free molecule.

Because of dipolar interactions,^{1,13,14} an important splitting of the amide I band (consisting of 60% of C=O stretching and 40% of C—N stretching) is observed, as shown in Figs. 2 and 3. Table III gives interaction constants obtained from the Raman and ir frequencies. Using Miyazawa's¹⁵ perturbation method, the unperturbed C=O stretching vibrational frequency is obtained at $\nu_0 = 1665 \text{ cm}^{-1}$ and is observed as a single band at 1665 cm^{-1} in the ir for disorganized lyophilized glycylglycine N-d₀. Determination of vibrational frequencies for the NH₃⁺ group (degenerate deformation and degenerate rocking) leads us to assign the bands at 1503 and 1480 cm^{-1} to the NH₃⁺ symmetric deformation. They shift to 1280 cm^{-1} in the deuterated analog (Fig. 3). Destrade et al.⁷ attributed the 1280-cm^{-1} band to the C^aH₂ twisting vibration. However, we observed the C^aH₂ twisting frequency at 1338 cm^{-1} in glycylglycine N-d₀ and at 1348 cm^{-1} in glycylglycine N-d₄ (Figs. 3, 5, and 9).

Table III presents the intermolecular interaction force constants responsible for the splittings observed for the NH₃⁺ symmetric deformation vibration.

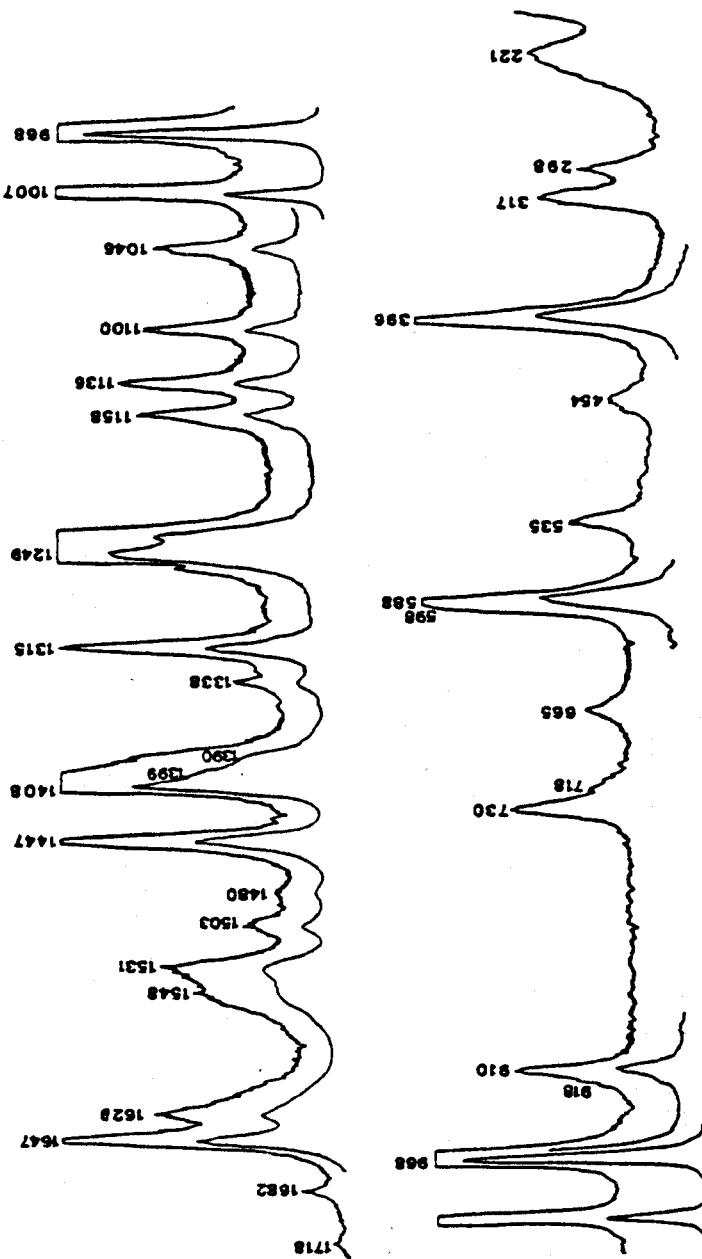
47101 kb 017 tk a3
lagant-biopol-mar

TABLE III
Force Constants of $\text{NH}_3^+\text{C}^\alpha\text{H}_2\text{CONHC}^\beta\text{H}_2\text{CO}_2^-$

Modified Urey-Bradley Constants (mdyn/Å)					
$K(\text{N}^\pm \text{C})$ -	2.87	$K(\text{C}^\delta-\text{C})$	2.93	$K(\text{NH}_3)$	-0.05
$K(\text{C}^\alpha-\text{C})$	2.98	$K(\text{C}-\text{O})$	7.11	$K(\text{CH}_2)$	0.03
$K(\text{C}=\text{O})$	7.23	$K(\text{N}^+\text{H})$	5.06	L	0.02
$K(\text{C}=\text{N})$	6.19	$K(\text{C}-\text{H})$	4.24	$P(\text{CH}-\text{CH})$	-0.11
$K(\text{N}-\text{C}^\beta)$	4.91	$K(\text{N}-\text{H})$	5.45	$P(\text{NH}-\text{NH})$	-0.11
$H(\text{CN}^+\text{H})$	0.24	$F(\text{CN}^+\text{H})$	0.44		
$H(\text{HN}^+\text{H})$	0.47	$F(\text{HN}^+\text{H})$	0.04		
$H(\text{N}^+\text{C}^\alpha\text{C})$	0.35	$F(\text{N}^+\text{C}^\alpha\text{C})$	0.23		
$H(\text{N}^+\text{C}^\alpha\text{H})$	0.25	$F(\text{N}^+\text{C}^\alpha\text{H})$	0.55		
$H(\text{HC}^\alpha\text{H})$	0.42	$F(\text{HC}^\alpha\text{H})$	0.06		
$H(\text{CC}^\alpha\text{H})$	0.25	$F(\text{CC}^\alpha\text{H})$	0.63		
$H(\text{C}^\alpha\text{CN})$	0.57	$F(\text{C}^\alpha\text{CN})$	0.65		
$H(\text{C}^\alpha\text{CO})$	0.46	$F(\text{C}^\alpha\text{CO})$	0.50		
$H(\text{NCO})$	0.40	$F(\text{NCO})$	0.76		
$H(\text{CNC}^\beta)$	0.37	$F(\text{CNC}^\beta)$	0.79		
$H(\text{CNH})$	0.28	$F(\text{CNH})$	0.24		
$H(\text{C}^\beta\text{NH})$	0.16	$F(\text{C}^\beta\text{NH})$	0.20		
$H(\text{NC}^\beta\text{C})$	0.16	$F(\text{NC}^\beta\text{C})$	0.50		
$H(\text{NC}^\beta\text{H})$	0.21	$F(\text{NC}^\beta\text{H})$	0.48		
$H(\text{CC}^\beta\text{H})$	0.25	$F(\text{CC}^\beta\text{H})$	0.40		
$H(\text{OCO})$	0.58	$F(\text{OCO})$	2.12		
$H(\text{C}^\beta\text{CO})$	0.11	$F(\text{CCO})$	0.50		
Valence Type Constants (mdyn/Å)					
$\gamma(\text{C}=\text{O})$	0.42	$\gamma(\text{N}-\text{H})$	0.17	$\gamma(\text{CO}_2^-)$	0.54
$\tau(\text{N}^+\text{C}^\alpha)$	0.08	$\tau(\text{C}^\alpha\text{C})$	0.03	$\tau(\text{C}-\text{N})$	0.27
				$\tau(\text{N}-\text{C}^\beta)$	0.1
				$\tau(\text{CO}_2)$	0.02
Intramolecular Coupling Constants (mdyn/Å)]					
$f(\text{HN} + \text{H} - \text{N}^+\text{C}^\alpha\text{H})$			-0.11		
Intermolecular Coupling Constants (mdyn/Å)					
$\nu(\text{C}=\text{O})$		$\nu_a(\text{CO}_2^-)$		$\delta_a(\text{NH}_3^+)$	
$K^{1,2}$	-0.054	$K^{1,2}$	0.026	$K^{1,2}$	-0.003
$K^{1,3}$	-0.241	$K^{1,3}$	-0.1	$K^{1,3}$	+0.013
$K^{1,4}$	-0.062	$K^{1,4}$	-0.219	$K^{1,4}$	-0.003
$(\partial\mu/\partial Q)_{\text{C}=\text{O}} = 12.6 \text{ debye}/\text{\AA}$					

A single band is observed for the CH_2 scissoring vibration (Raman and ir). After NH_3^+ deuteration, the frequencies shift from 1399 to 1358 cm^{-1} for the $\text{C}^\alpha\text{H}_2$ wagging and from 1338 to 1348 cm^{-1} for the $\text{C}^\alpha\text{H}_2$ twisting vibrations. These results are well confirmed by calculations in which an





alpha-glycyl-glycine
Fig. 2. Raman spectrum of α -glycylglycine N-d₆.

47101 kb 017 tk a2
lagant-biopol-mar



TABLE IV

Observed and Calculated Frequencies for Glycylglycine d₀ and d₁ and Their Assignments.

47101 kb 017 tk a2
lagant-biopol-mar
15-3 2-6

一
九
四

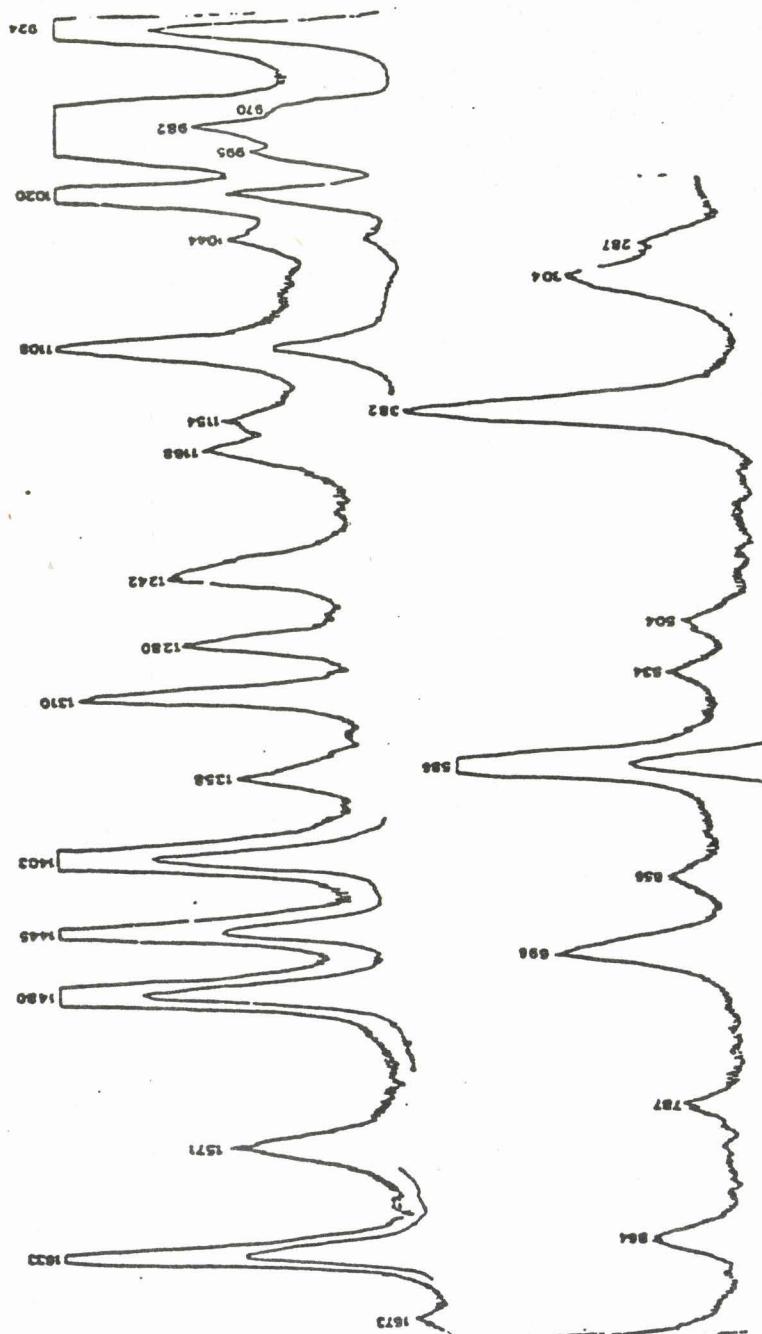
RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. I

CO ₂ ⁻ S stretch	1408	1407 (4)	1403	1408	1404	1402
C≡H ₂ wag.	1399	1393 (-5)	1368	1365	1388	1367
C≡H ₂ twist	1390	1338 (4)	1348	1353	1333 (3)	1390
C≡H ₂ wag. □312	1338 w 1315 s	1313 (-2)	1310	1310	1315 (1)	1345 (367)
Am III (CN stretch + NH bend)	1249	1248 (-1)	924	929	1231	1245 (3)
C≡H ₂ twist	1242	1241 (0)	1242	1236	1251	1242 (-7)
NH ₃ ⁺ rock.	1158	1156 (6)	864	861	1157	1148 (0)
NC ⁺ stretch	1136	1137 (1)	1108	1130	1129	1135 (6)
NH ₃ ⁺ rock.	1100	1098 (3)	787	783	1094	1094 (2)
N≡C ⁺ stretch	1046	1045 (-1)	982	994	1037	1044 (-1)
C≡H ₂ rock.	1007	1007 (0)	935	994	1001	1007 (2)
C≡C stretch	968	968	975	977	965	971 (3)
C≡H ₂ rock.	918	922 (2)	1020	1026	918	918 (1)
C≡C stretch	910	907 (-3)	1044	1042	895	898 (2)
CO ₂ ⁻ bend	730	731 (-2)	699	698	731 (-6)	710
Am V NI (wag.)	718	711 (-1)	604	567	711	716 (-1)
Am IV C=O bend	665	665 (0)	655	655	665	655 (0)
CO ₂ ⁻ wag.	598	691 (0)	588	599	604 (9)	592
Am VI (C=O wag.)	688	680 (-1)	574	574	585 (4)	582
CO ₂ ⁻ rock.	635	535 (0)	534	529	522	534 (0)
C≡N tors.	454	460 (2)	364	364	449	458 (5)
Skel def. (C≡CN)	396	399 (2)	382	394	400	383 (-1)
Skel def. (N≡C≡C)	317	320 (1)	304	300	310	314 (-8)
Skel def. (C≡NC ⁺)	298	297 (5)	287	293	274 (-2)	282
Skel def. (NCC ⁺)	234	234	233	233	231	228 (-12)
Am VII (C—N tors.)	221	221	213	213	207	193 Å _w
CO ₂ ⁻ tors.	182	191 (-5)	175 (0)	175 (0)	180 (1)	180 (1)
(N≡C ⁹) tors.	167	171 (7)	150 (7)	147 (6)	168 (-8)	168 (-8)
C≡C tors.	156	156	150 (7)	147 (6)	146 (1)	146 (1)

* Values of the calculated $\nu A_v \nu B_v$ and $\nu A_u \nu B_u$ are given into parentheses. Abbreviations: a, □, s, ▨; def., □; wag., rocking; rock., tors., torsional.

47101 kb 017 tk a2
lagant-biopol-mar
3-3204



Fig. 3. Raman spectrum of α -glycylglycine N-d₄.

47101 kb 017 tk a3
lagant-biopol-mar

RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. I

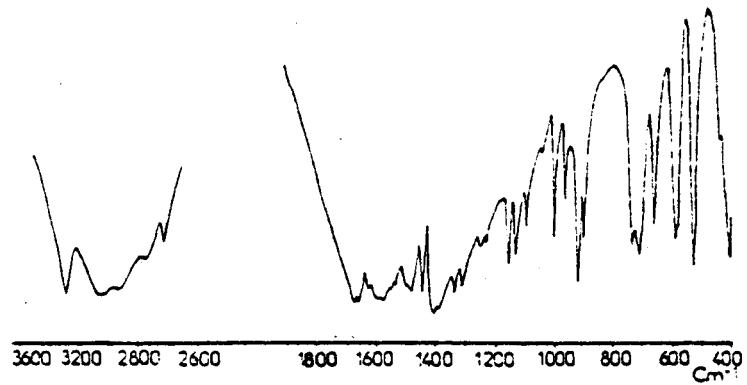


Fig. 4. The ir spectrum of α -glycylglycine N-d₄.

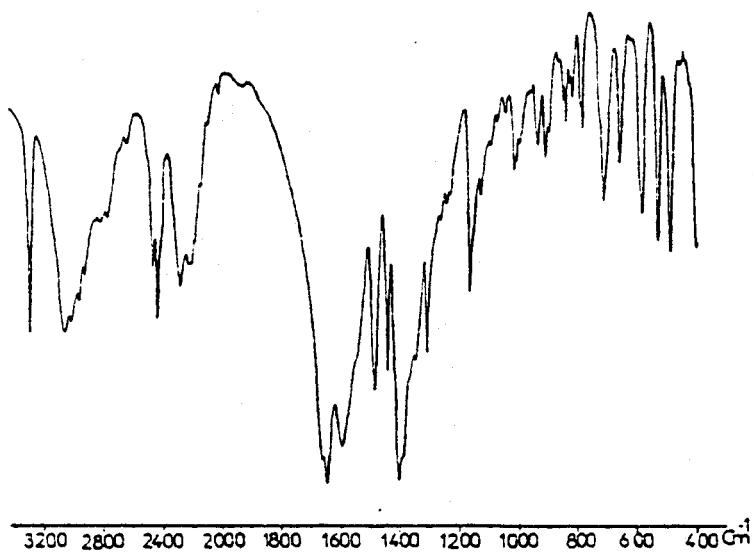


Fig. 5. The ir spectrum of α -glycylglycine N-d₄.

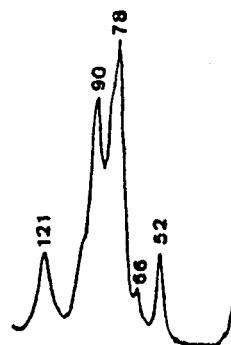
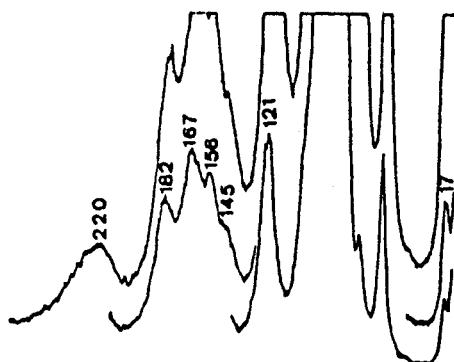


Fig. 6. Low-frequency Raman spectrum of GG N-d₄.

BUS
LILLE

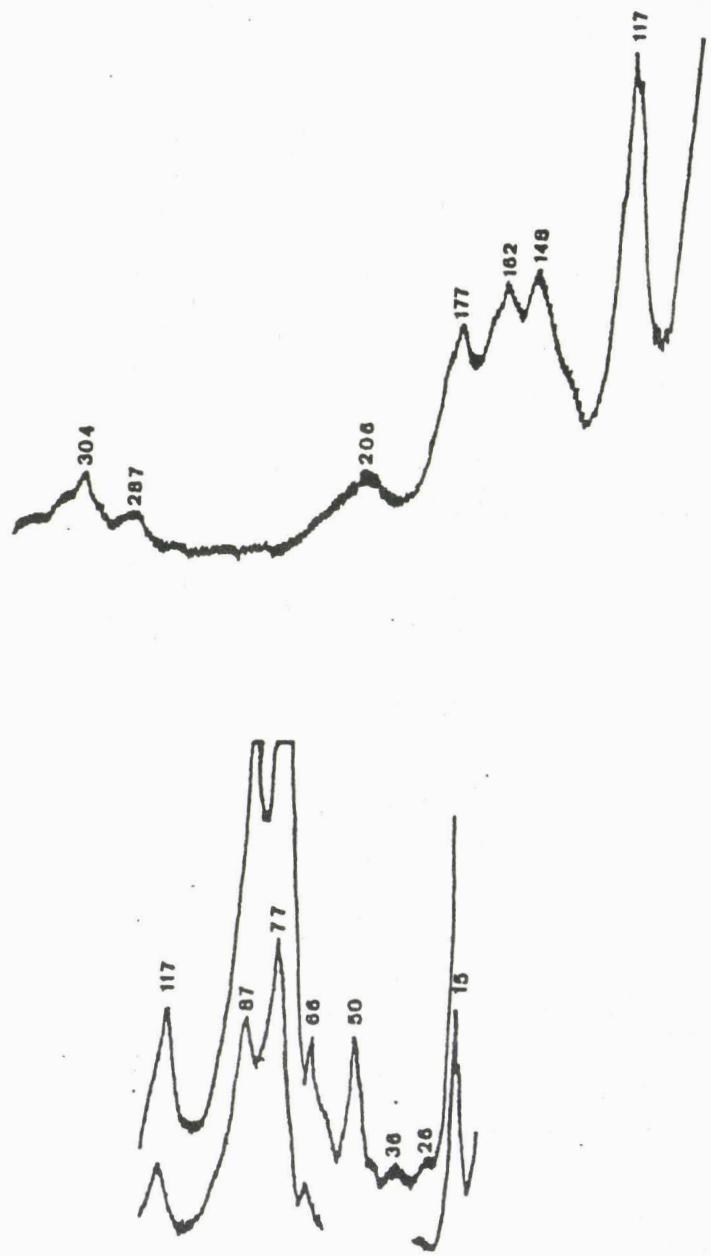


Fig. 7. Low-frequency Raman spectrum of GG N-d₄.



47101 kb 017 tk a1
lagant-biopol-mar

RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. I

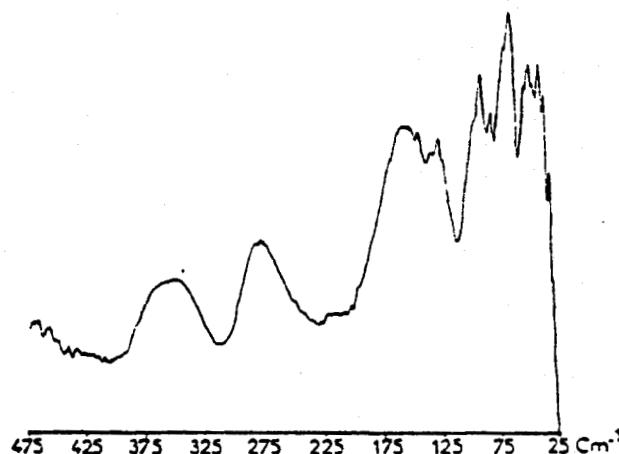


Fig. 8. Far-ir spectrum of GG d₀.

intermolecular interaction constant is introduced between the corresponding internal coordinates.

Two bands at about 1600 and 1550 cm⁻¹ are expected for the N-d₀ and N-d₄ compounds. They are assigned to the CO₂ antisymmetric stretching vibration. Interaction constants explaining the g-u splitting for this vibration are given in Table III. These two CO₂ antisymmetric stretching vibrations are observed in ir spectra of both deuterated and undeuterated

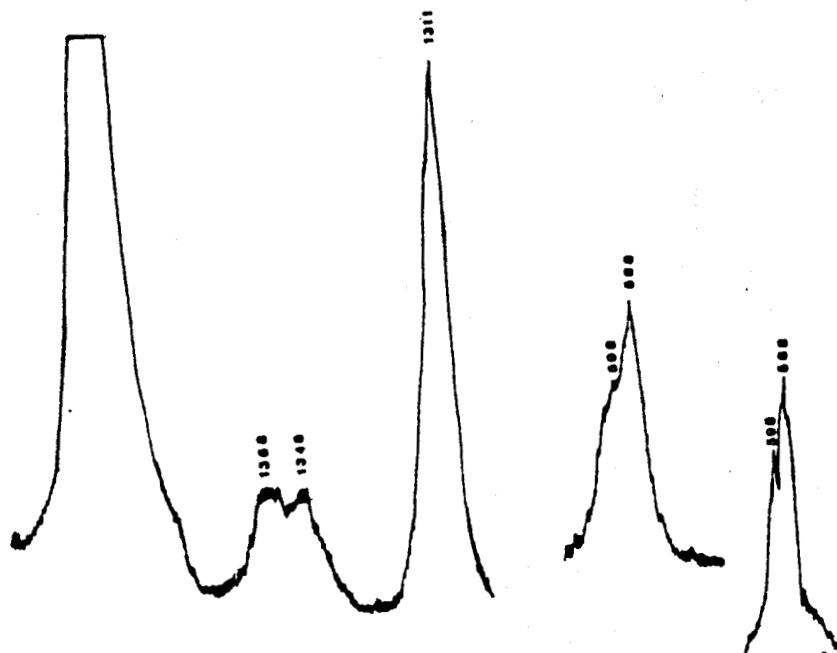


Fig. 9. Raman spectra of GG N-d₄ in the CH₂ wagging, twisting region and the CO₂ out-of-plane bending and amide VI region.

47101 kb 017 tk a1
lagant-biopol-mar

BUS
LILLE

TABLE V
Observed and Calculated Lattice Vibrations and Their Assignment According to the Potential-Energy Distribution^a

Obs	A_g	JPED	$\text{NH}_3^+ \text{CH}_2\text{CONHCH}_2\text{CO}_2^-$ Raman Spectra		PED
			B_g	PED	
145					132 ($0.46T_y + 0.31T_z + 0.16\tau_{C-C} + 0.14\tau_{CO_2}$)
121					122 ($0.3R_A + 0.2T_{J_{N^+C^-}} + 0.22\tau_{NC} + 0.2R_B$)
		103 ($0.31\tau_{C-C} + 0.28T_z + 0.17R_C$)			
98					90 ($0.33T_y + 0.29R_B + 0.27R_A + 0.12\delta_C$)
90					
86			86 ($0.61R_A + 0.2\tau_{C-C} + 0.11R_C + 0.07\tau_{N^+C^-}$)		
78					
66			66 ($0.45T_z + 0.42R_C + 0.13R_B$)		
52					
		61 ($0.36R_B + 0.31T_z + 0.15T_x + 0.12\tau_{C-C} + 0.07T_y$)			44 ($0.43R_B + 0.35R_C + 0.11\tau_{C-C} + 0.1T_y$)
43			43 ($0.35T_z + 0.26R_B + 0.22R_A + 0.17\tau_{C-C}$)		36 ($0.45T_x + 0.2\tau_{C-C} + 0.2R_A + 0.14R_B$)
		28 ($0.37\tau_{C-C} + 0.23T_y + 0.17R_B + 0.14R_C + 0.08T_x$)			20 ($0.39\tau_{C-C} + 0.3R_B + 0.18T_x + 0.13T_z$)
17					
Obs	A_u	JPED	Infrared Spectra		PED
			B_u	PED	
114					117 ($0.28T_y + 0.24R_A + 0.23R_B + 0.15\tau_{C-C} + 0.1\tau_{N^+C^-}$)
101					
		98 ($0.43R_A + 0.2R_B + 0.17\tau_{N^+C^-} + 0.1\delta_d + 0.1\tau_{CO_2}$)			
90					
		87 ($0.35R_C + 0.24\tau_{C-C} + 0.19\tau_{CN} + 0.12R_A + 0.1\tau_{CO_2}$)			95 ($0.4R_A + 0.2T_y + 0.2R_B + 0.1\tau_{N^+C^-} + 0.1\delta_d$)

 47101 45 0.17
 Legend: dipole moment

RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. I

84	66	(0.46R _B + 0.33r _{C-C} + 0.21R _C)	67	(0.61R _C + 0.3R _B + 0.2r _{C-C})
64	55	(0.41R _B + 0.21T _x + 0.2T _y + 0.11R _C + 0.07NH)	52	(0.5R _B + 0.3r _{C-C} + 0.2R _A)
49	28	(0.57T _x + 0.2T _y + 0.12r _{C-C} + 0.11R _A)		

Obs	$\Delta\tau$	ND ₃ CH ₂ CONDCH ₂ CO ₂		PED
		Raman Spectra	PED	
137	138	(0.46r _{C-C} + 0.22r _{NH} + 0.17R _C + 0.15R _B)		118 (0.31R _A + 0.26T _{NH} + 0.16T _y + 0.14R _B + 0.14r _{NC})
117	102	(0.28r _{C-C} + 0.23T _x + 0.22r _{NH} + 0.14R _B + 0.13R _C)		101 (0.31T _y + 0.28r _{C-C} + 0.25R _A + 0.16T _x)
98				89 (0.32T _y + 0.25R _A + 0.22R _B + 0.12R _C + 0.17NH)
87	84	(0.61R _A + 0.2r _{C-C} + 0.11R _C + 0.08r _{NH})		
77				
66	65	(0.41T _x + 0.38R _C + 0.14R _B + 0.05R _A + 0.03r _{NH})		44 (0.44R _B + 0.37R _C + 0.11r _{CN} + 0.07T _y)
	51	(0.35R _B + 0.31T _x + 0.19T _y + 0.16r _{C-C})		36 (0.48T _x + 0.21R _A + 0.19r _{C-C} + 0.12R _B)
60				
36	28	(0.36r _{C-C} + 0.25T _x + 0.16R _B + 0.14R _C + 0.09T _x)		22 (0.39r _{C-C} + 0.27R _B + 0.15T _x + 0.14T _y)
26				
	15			

* T_x , T_y , T_z refer to the translations along the Cartesian crystallographic axes and R_A, R_B, R_C to librations with respect to the principal inertial axes. δ, γ, τ, r are respectively the skeletal deformation, out of plane, bending, torsion, and rocking intramolecular symmetry coordinates. PED, potential energy distribution.

47101 kb 017 x a1
Eagant-biopol-mar

BUS
LILLE

GG, but only one band is seen experimentally in Raman studies, at 1548 and 1571 for the undeuterated and the deuterated samples, respectively. The assignment to the CO₂ symmetric stretching vibration is more complex. In the Raman spectrum a band at 1408 cm⁻¹ and a shoulder at 1390 cm⁻¹ are observed, while only one band at 1408 cm⁻¹ is observed in the ir (since the ir C^aH₂ wagging band is broad). Calculation of the intermolecular interaction constant gives a very small splitting. Similar observations were made by Machida³ for the C-d₂ and C-d₅ derivatives of α -glycine. The unperturbed frequency ν_0 in the case of a Fermi resonance,

$$\nu_0 I = \nu_1 I_1 + \nu_2 I_2$$

where I_1 , I_2 , and I are the integrated intensities for each band, is obtained at 1404 cm⁻¹. Thus, the splitting of the CO₂ symmetric stretching frequency may be explained by a Fermi resonance between the band due to the CO₂ symmetric stretching and a combination band [1007 cm⁻¹ (C^aH₂ rocking) + 396 cm⁻¹ (C^aCN deformation)].

The amide VI vibration and CO₂ out-of-plane bending vibration are assigned to bands observed at 588 and 598 cm⁻¹, respectively.

Lattice Vibrations

Twenty-one lattice modes are optically active (6 A_g + 6 B_g + 5 A_u + 4 B_u). Observed spectra are shown in Figs. 6-8, and the calculated frequencies are displayed in Table V with the corresponding potential-energy distribution. The results in Table IV show a discrepancy between the observed and calculated frequencies for the CO₂ torsion. It must be pointed out that this vibration is strongly coupled with the C^a-C torsion and the lattice vibrations. The N-C^b and C^a-C torsions have been assigned to the bands at 167 and 156 cm⁻¹, respectively.

We are grateful to the Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de l'Université de Lille II for the use of ir facilities. G.V. would like to acknowledge NATO for its grant 1743 and the Fondation de la Recherche Médicale for its financial support during the course of this work. We greatly appreciate our discussions with Dr. Sam Krimm and thank him for his suggestion concerning the study of glycylglycine in the α -crystalline form. We thank John Eggert for assistance with the English text.

References

1. Machida, K., Izumi, M. & Kagayama, A. (1979) *Spectrochim. Acta* **35A**, 1333-1339.
2. Machida, K., Kagayama, A., Saito, Y., Kuroda, Y. & Uno, T. (1977) *Spectrochim. Acta* **33A**, 569-574.
3. Machida, K., Kagayama, A. & Saito, Y. (1979) *J. Raman Spectrosc.* **8**, 133-138.
4. Biswas, A. B., Hughes, E. W., Sharma, B. D. & Wilson, J. N. (1968) *Acta Crystallogr., Sect. B* **24**, 40-50.
5. Freeman, H. C., Paul, G. L. & Sabine, T. M. (1970) *Acta Crystallogr., Sect. B* **26**, 925-932.

47101 kb 017 tk a3
lagant-biopol-mar

RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. I

6. Kvick, A., Al-Karoughouli, R. R. & Koetzle, T. F. (1977) *Acta Crystallogr., Sect. B* 33, 3796-3801.
7. Destrade, C., Dupart, E., Joussot-Dubien, M. & Garrigou-Lagrange, C. (1974) *Can. J. Chem.* 52, 2590-2602.
8. Shimanouchi, T. (1970) in *The Molecular Force Field Physical Chemistry*, Vol. 4, Academic Press, New York.
9. Shimanouchi, T. (1963) *Pure Appl. Chem.* 7, 131.
10. Dwivedi, A. M. & Gupta, V. D. (1972) *Biopolymers* 11, 2091-2098.
11. Suzuki, M. & Shimanouchi, T. (1969) *J. Mol. Spectrosc.* 29, 415.
12. Kitaigorodskii, A. I. (1961) in *Organic Chemical Crystallography*, Consultant Bureau, New York.
13. Moore, W. H. & Krimm, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4933-4935.
14. Moore, W. H. & Krimm, S. (1976) *Biopolymers* 15, 2465-2483.
15. Miyazawa, T. (1960) *J. Chem. Phys.* 32, 1647-1652.

Received February 2, 1982

Accepted August 4, 1982

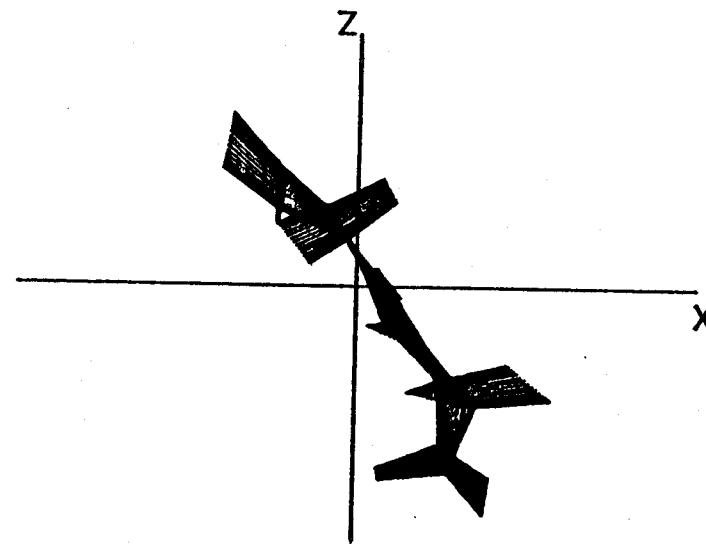
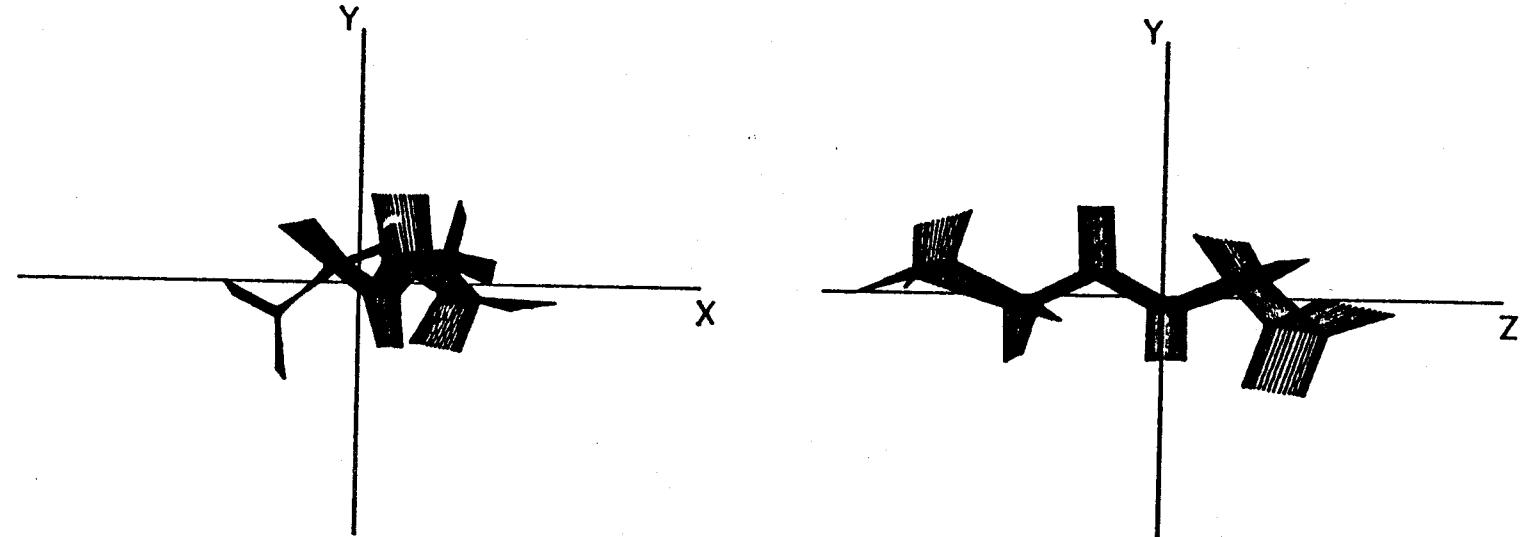
47101 kb 017 tk a1
lagant-biopol-mar

Diglycine Isolée

				ASSIGNMENTS	PCD + (6644)	PCD - (6644)
$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CO}_2^-$	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CONH}_2-\text{CO}_2^-$	Calculated	Observed	Calculated		
3275	3244	2108	2079	H-N Stretch	97 v(C=O) + 3(H---O) Stretch	
3240	3244	2394	2394	$\nu(\text{N-H})$	100 v(C=O)	
3187	3157	2114	2093	$\nu(\text{N-H})$	100 v(C=O)	
3111	3013	2012	2013	$\nu(\text{C=O})$	99 v(C=O)	
2960	2901	2794	2791	$\nu(\text{C=O})$	100 v(C=O)	
2927	2909	2973	2910	$\nu(\text{C=O})$	100 v(C=O)	
2874	2874	2810	2811	$\nu(\text{C=O})$	100 v(C=O)	
1718 w						
1687 w	1647	1643	1647	Im -	59 v(C=O) + 40 v(OH)	
1629 s	1629	1557	1557	$\nu(\text{C=O})$	93 v(C=O) + 6 v(C=O)	
1611 s	1624			$\nu(\text{C=O})$	93 v(C=O) + 6 v(C=O)	
1580	1549	1511 s	1549	$\nu(\text{C=O})$	100 v(C=O)	
1446 s	1446	1400 w	1401	$\nu(\text{C=O})$	13 v(C=O) + 72 v(OH) + 14 v(H---O) + 10 v(C=O) + 9 v(C=O)	
1311 s	1311	1186	1186	$\nu(\text{C=O})$	22 v(C=O) + 22 v(OH) + 10 v(H---O) + 9 v(C=O) + 9 v(C=O)	
1303 w	1303	1196	1195	$\nu(\text{C=O})$	16 v(C=O) + 7 v(C=O)	
1400 w				$\nu(\text{C=O})$	16 v(C=O) + 7 v(C=O)	
1351 s	1351	1350	1350	$\delta(\text{C-H})$	97 v(C=O) + 1 v(C=O)	
1440 s	1440	1433	1433	$\delta(\text{C-H})$	95 v(C=O) + 1 v(C=O)	
1408 w	1408	1403	1406	$\delta(\text{C-H})$	95 v(C=O) + 22 v(C=O) + 22 v(C=O)	
1395 s	1394	1394	1356	$\delta(\text{C-H})$	91 v(C=O) + 14 v(C=O) + 14 v(C=O)	
1381 s	1381	1380	1380	$\delta(\text{C-H})$	90 v(C=O) + 14 v(C=O) + 14 v(C=O)	
1336 w				$\delta(\text{C-H})$	94 v(C=O) + 2 v(C=O)	
1315 s	1315	1310	1313	$\delta(\text{C-H})$	87 v(C=O) + 1 v(C=O) + 4 v(C=O) + 4 v(C=O)	
1248 w	1248	924	929	$\delta(\text{C-H})$	53 v(C=O) + 7 v(C=O) + 7 v(C=O) + 7 v(C=O) + 5 v(C=O)	
1239 s	1242	1238	1238	$\delta(\text{C-H})$	48 v(C=O) + 11 v(C=O) + 11 v(C=O) + 11 v(C=O) + 5 v(C=O)	
1155 s	1156	964	961	$\delta(\text{C-H})$	40 v(C=O) + 10 v(C=O) + 10 v(C=O) + 10 v(C=O) + 5 v(C=O)	
1136 w	1136	1108	1113	$\delta(\text{C-H})$	36 v(C=O) + 10 v(C=O) + 12 v(C=O) + 12 v(C=O) + 6 v(C=O)	
1100 w				$\delta(\text{C-H})$	33 v(C=O) + 10 v(C=O) + 11 v(C=O) + 11 v(C=O) + 7 v(C=O)	
1046 s	1040	982	994	$\delta(\text{C-H})$	26 v(C=O) + 16 v(C=O) + 15 v(C=O) + 15 v(C=O) + 5 v(C=O)	
1001 w	1007	995	994	$\delta(\text{C-H})$	19 v(C=O) + 18 v(C=O) + 18 v(C=O) + 18 v(C=O) + 5 v(C=O)	
968 s	968	975	977	$\delta(\text{C-H})$	16 v(C=O) + 10 v(C=O) + 11 v(C=O) + 11 v(C=O) + 2 v(C=O)	
918 s	918	1020	1026	$\delta(\text{C-H})$	13 v(C=O) + 11 v(C=O) + 10 v(C=O) + 9 v(C=O) + 7 v(C=O)	
910 w	910	1044	1059	$\delta(\text{C-H})$	57 v(C=O) + 22 v(C=O) + 15 v(C=O) + 15 v(C=O) + 5 v(C=O)	
730 s	730	694	716	$\delta(\text{C-H})$	25 v(C=O) + 20 v(C=O) + 16 v(C=O) + 16 v(C=O) + 10 v(C=O)	
718 s	718	504	504	$\delta(\text{C-H})$	45 v(C=O) + 28 v(C=O) + 15 v(C=O) + 9 v(C=O)	
665 w	660	656	623	$\delta(\text{C-H})$	30 v(C=O) + 23 v(C=O) + 14 v(C=O) + 16 v(C=O) + 6 v(C=O)	
589 w	591	595	590	$\delta(\text{C-H})$	24 v(C=O) + 12 v(C=O) + 9 v(C=O) + 4 v(C=O)	
529 w	535	534	563	$\delta(\text{C-H})$	39 v(C=O) + 19 v(C=O) + 17 v(C=O) + 17 v(C=O) + 10 v(C=O)	
524 w	524	564	564	$\delta(\text{C-H})$	55 v(C=O) + 20 v(C=O) + 13 v(C=O) + 13 v(C=O) + 9 v(C=O)	
396 s	401	387	394	$\delta(\text{C-H})$	66 v(C=O) + 17 v(C=O) + 10 v(C=O) + 9 v(C=O) + 6 v(C=O)	
317 w	319	319	306	$\delta(\text{C-H})$	32 v(C=O) + 26 v(C=O) + 16 v(C=O) + 16 v(C=O) + 4 v(C=O)	
296 w				$\delta(\text{C-H})$	44 v(C=O) + 19 v(C=O) + 10 v(C=O) + 9 v(C=O)	
289 w	289	277	277	$\delta(\text{C-H})$	20 v(C=O) + 11 v(C=O) + 11 v(C=O) + 11 v(C=O)	
66 w	70	64	67	$\delta(\text{C-H})$	32 v(C=O) + 32 v(C=O) + 19 v(C=O) + 5 v(C=O)	
52	67			$\delta(\text{C-H})$	67 v(C=O) + 31 v(C=O) + 19 v(C=O)	
17				$\delta(\text{C-H})$	22 v(C=O)	

BUS
LILLE

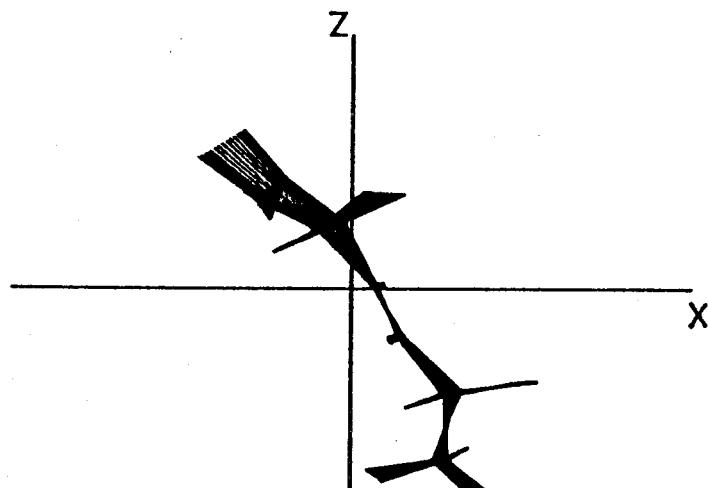
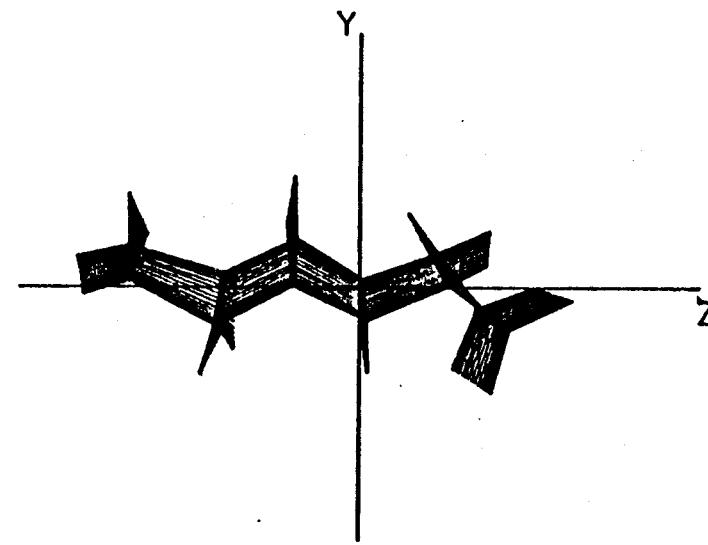
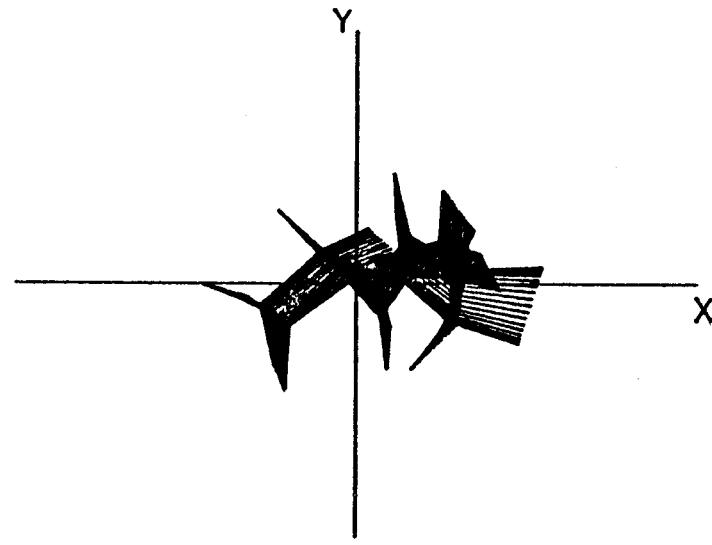
-64-



BUS
ULLE

alpha glycylglycine B₁
FREQUENCE: 22.32 cm⁻¹
AMPLIFICATION: 5

-65-

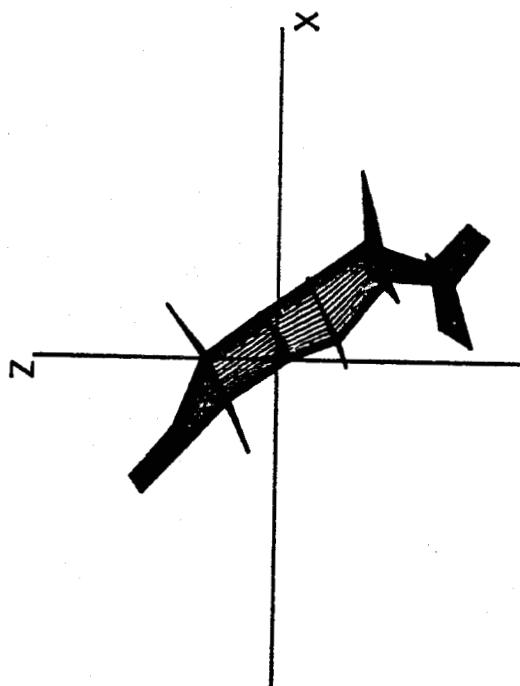
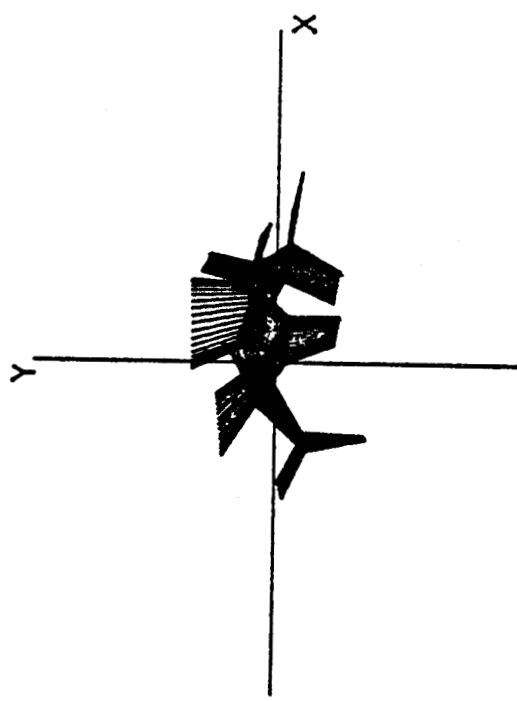
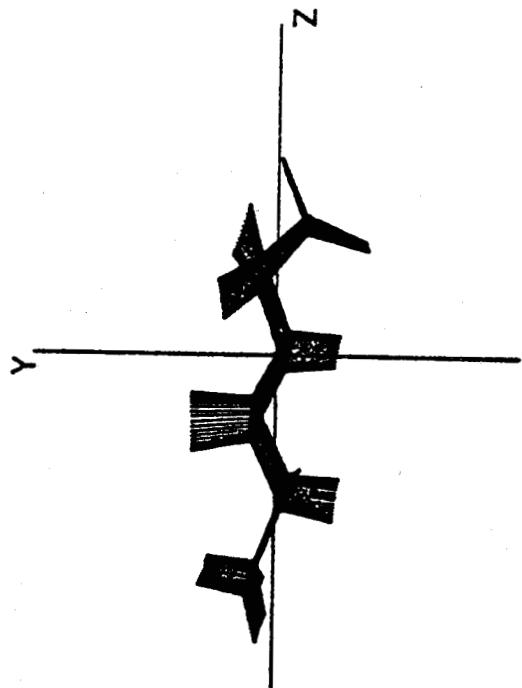


alpha glycylglycine A_g

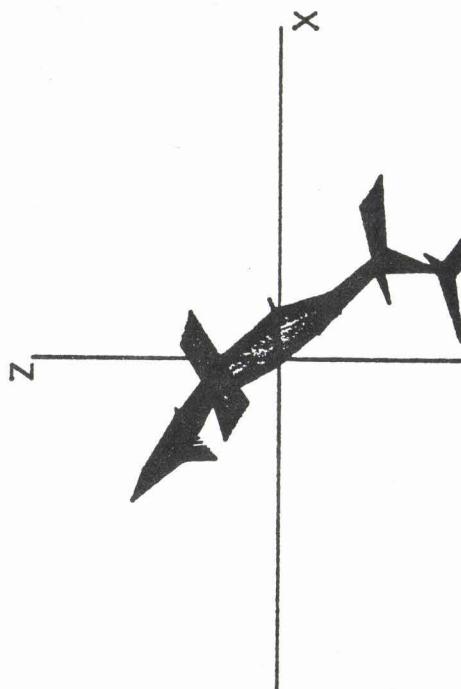
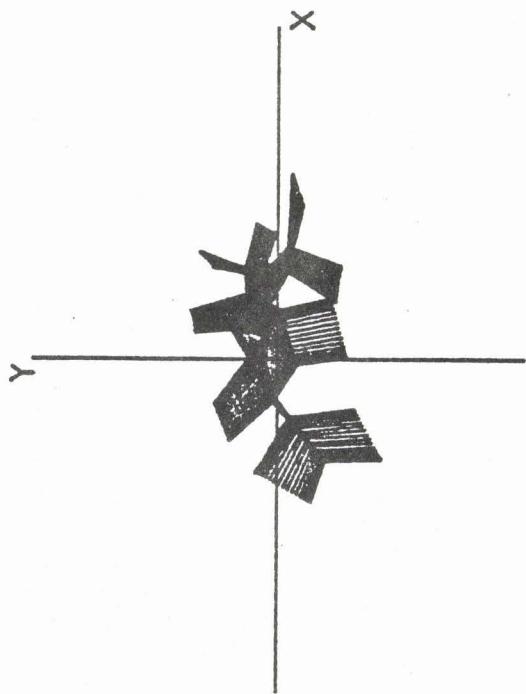
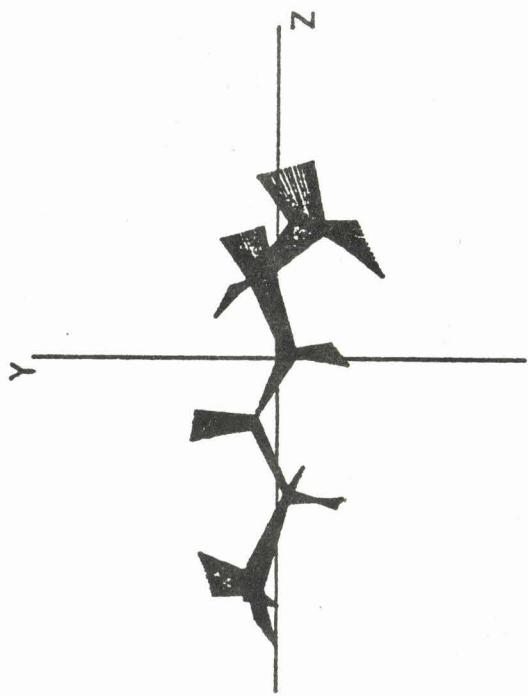
FREQUENCE: 28.67 cm⁻¹

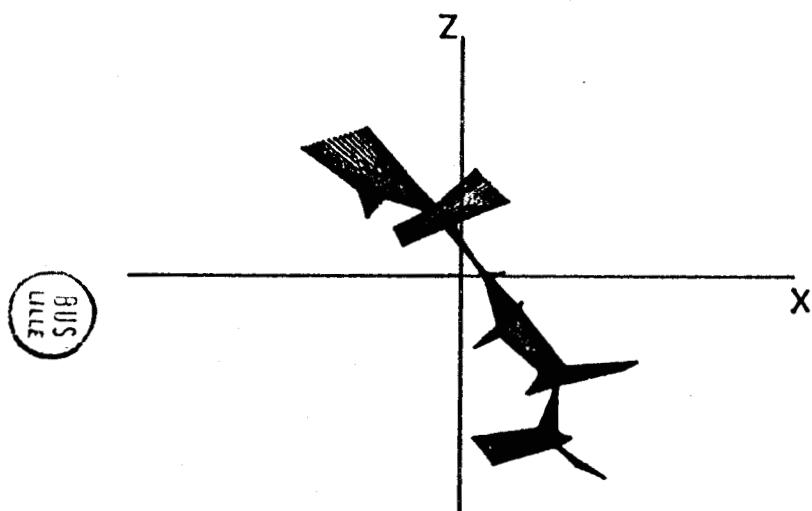
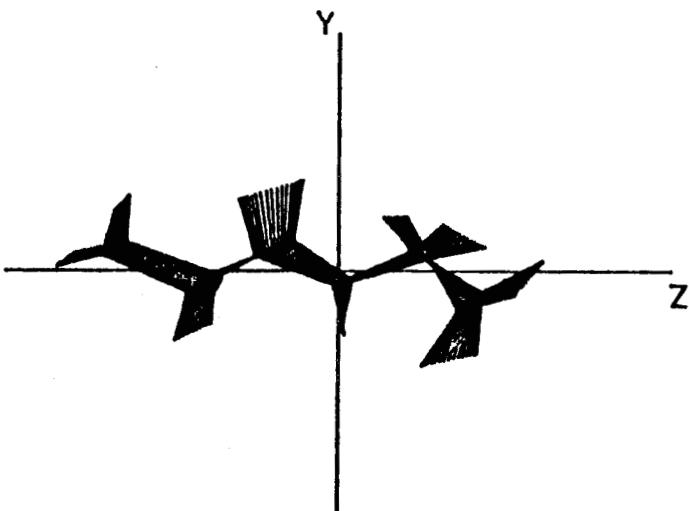
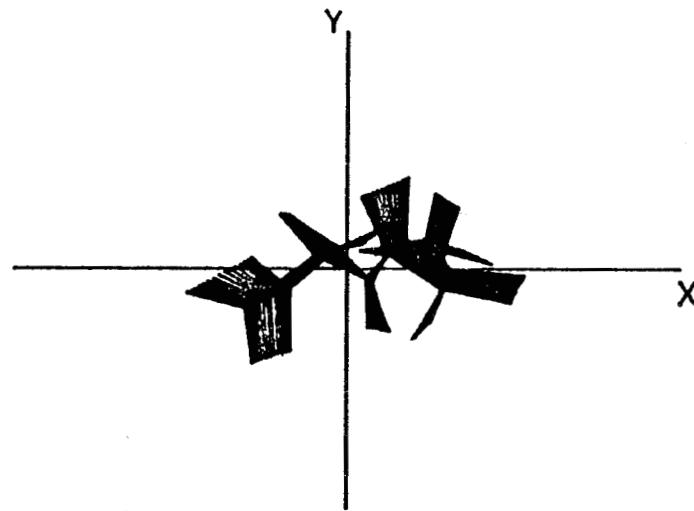
AMPLIFICATION: 5

GLYCYLGLYCINE BG
FREQUENCY: 36.43 cm⁻¹
AMPLIFICATION: 5



GLYCYL GLYCINE A_G
FREQUENCY: 65.56 cm⁻¹
AMPLIFICATION: 5
10 d





ALPHA GLYCYLGLYCINE AU
FREQUENCE: 65.59 cm⁻¹
AMPLIFICATION: 5

CHAPITRE III

ETUDE DU DIPEPTIDE GLYCYL-L-PROLINE

III-1) Isométrie Cis-Trans

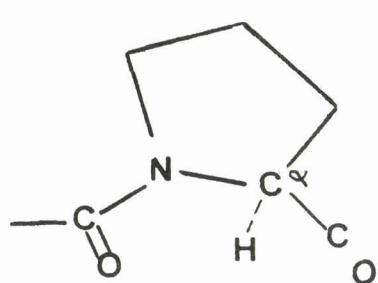
L'étude du dipeptide Glycyl-L-Proline (GP) permet de caractériser le cycle iminoacide .Les dipeptides X-Pro (ici X=Gly) ont fait l'objet de nombreuses études physicochimiques (1,2 et ref article), particulièrement en Résonance Magnétique Nucléaire et en diffraction des Rayons X. Ces études ont montré l'existence d'une isométrie Cis-Trans autour de la liaison peptidique .Le pourcentage de la forme Cis peut atteindre de 10% à 40% .

III-2) Elimination des redondances du cycle:

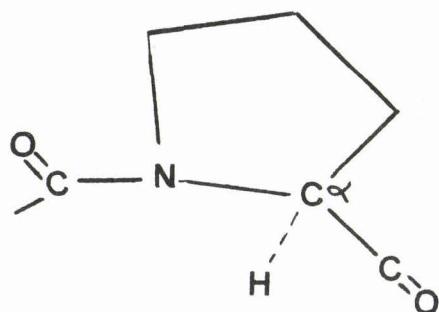
La littérature ne donne aucune donnée cristallographique concernant le dipeptide Gly-L-Pro sous sa forme zwitterion. Par conséquent les calculs de fréquence ont été réalisés sur la molécule isolée (forme Trans).

Le cycle iminoacide n'est pas plan et ne possède aucun élément de symétrie. De ce fait, la difficulté dans le calcul des coordonnées normales, provient de la nécessité d'éliminer les coordonnées redondantes pour obtenir une base réduite de coordonnées de symétrie locale normalisées. L'intérêt théorique d'un tel processus a été décrit dans l'annexe technique 2.

J'ai choisi de travailler non sur le motif proline seul, mais sur le motif Prolyl (8 atomes)



TRANS



CIS

Ceci a été fait dans le but ,une fois la base réduite des coordonnées de symétrie locale obtenue, de pouvoir transférer ce motif à des tétrapeptides possédant ce résidu en 2 ième (i+1) position et adoptant une conformation en coude Béta (l'angle diédral 0 se conservant pour tous les peptides étudiés) .

v

Les groupes méthylènes du cycle ont été traités séparément ,l'élimination des redondances se faisant par la méthode d'OGAWA (1).

Seul a été conservé avec le cycle prolyl le proton H_α . Une fois la redondance arbre du C alpha éliminée ,on détermine $3N=24$ coordonnées de symétrie locale ,chacune étant une combinaison linéaire de 25 coordonnées internes représentant les 8 élongations des liaisons ,les 12 déformations des angles et les cinq torsions du motif.

Puisque l'espace de départ choisi est celui des coordonnées internes ,on aura $3N-6=18$ modes normaux de vibration ce qui signifie que 6 coordonnées de symétrie locales seront identiquement nulles et pourront être exprimées ,pour chacune d'elle ,sous la forme $S_i = f_i(\Delta r_i, \Delta \phi_i, \Delta \tau_i) \equiv 0$ où $\Delta r_i, \Delta \phi_i, \Delta \tau_i$ sont les coordonnées internes entrant en jeu.

Les six coordonnées de symétrie locales du cycle identiquement nulles sont les redondances. J'ai utilisé le programme REDOND de V . TABACIK pour ce calcul. A partir de la matrice B_s qui permet de passer de l'espace des coordonnées cartésiennes à celui des coordonnées de symétrie $S=B_s*X$,on diagonalise le produit $B_s * \tilde{B}_s$ (\tilde{B}_s matrice transposée) . Les valeurs propres nulles mettent en évidence les redondances et les vecteurs propres associés donnent les expressions des redondances .Les 18 coordonnées de symétrie locale de la base réduite sont "renormalisées" et forment des combinaisons linéaires des coordonnées de symétrie de départ qui se confondent dans le cas présent avec les coordonnées internes.

Il faut cependant ,au départ ,préciser les coordonnées de symétrie qui participent à la redondance et aussi la meilleure base de coordonnées cartésiennes indépendantes. J'ai utilisé pour cela le programme RANSET (adapté sur le PDP 11 de la faculté de Pharmacie) pour générer la base des coordonnées cartésiennes indépendantes qui définissent les bases de travail de REDOND .

Enfin dans un dernier temps , la distribution d'énergie potentielle du nouveau système (combinaison de coordonnées de symétrie) est décrite dans l'ancien système (coordonnées internes

qui visualise mieux pour le chimiste les vibrations mises en jeu.

La matrice F_s des constantes de force dans la base réduite des nouvelles coordonnées de symétrie est rétablie dans l'ancien système .Cependant ,uniquement pour le motif Prolyl choisi ,on obtient 328 constantes de force (diagonales et non diagonales). Le trop grand nombre de constantes de force de symétrie locale obtenu m'a empêché de transférer ce champ de force de symétrie locale aux tétrapeptides .Jai donc conservé les constantes de force définies sur les coordonnées internes dans le champ **UREY-BRADLEY** après avoir traduit la matrice des contraintes Z_r .

J'ai d'autre part négligé les contraintes entre les groupes méthylène du cycle proline (g,g',t,t')⁽²⁾ mais conservé les K CH₂ ,L ,et P CH-CH .De plus n'ayant pu utiliser le champ de force de symétrie locale du cycle je ne suis pas arrivé non plus à déterminer numériquement les contraintes dues à la tension du cycle. On peut déterminer théoriquement ces contraintes (qui apparaissent lors de l'élimination des redondances du cycle) en introduisant pour chacune des six redondances une contrainte Kappa Cycle .Ce problème est expliqué au paragraphe suivant.

III-3) Méthode de détermination des relations de redondance

du cycle proline:

L'introduction de 6 contraintes Kappa Cycle inhérentes au cycle seul dérivent de l'élimination des six relations de redondance de type $f_{\alpha}(\Delta r_i, \Delta \phi_i, \Delta \tau_i) = 0$ $\alpha = 1, 6$.Afin d'éliminer les termes linéaires du champ de force de type **UREY-BRADLEY** ,à partir des relations entre paramètres moléculaires du type $f_{\alpha}(\Delta r_{ij}, \Delta \phi_{ij}, \Delta \tau_{ij}) = 0$ on introduit (3) la fonction de redondance :

$$W = W' + W''$$

$$\text{où } W' = \sum \frac{\partial f}{\partial p_{ij}} \Delta p_{ij}$$

fonction de première redondance

p_{ij} paramètre

et

$$W'' = \frac{1}{2} \sum \left[\frac{\partial^2 f}{\partial p_{ij}^2} (\Delta p_{ij})^2 + \sum \frac{\partial^2 f}{\partial p_{ij} \partial p_{kl}} (\Delta p_{ij})(\Delta p_{kl}) + \sum \frac{\partial^2 f}{\partial p_{kl}^2} (\Delta p_{kl})^2 \right]$$

est la fonction de seconde redondance.

L'élimination des termes linéaires dans le champ de force UREY-BRADLEY pour un cycle se traduit par l'introduction de la constante de tension X_{cycle} et la fonction potentielle associée est de la forme /

$$V_{\text{cycle}} = \frac{1}{2} X_{\text{cycle}} W''_{\text{cycle}}$$

On obtient 3 relations de redondances à partir de la relation vectorielle (fig III-1)

$$\vec{R}_1 + \vec{R}_2 + \vec{R}_3 + \vec{R}_4 + \vec{R}_5 + \vec{R}_6 = \vec{0}$$

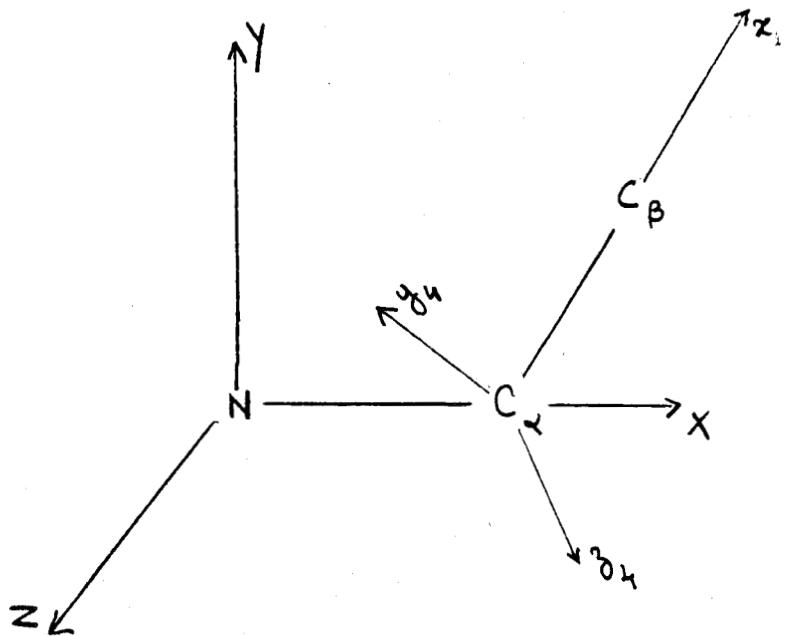
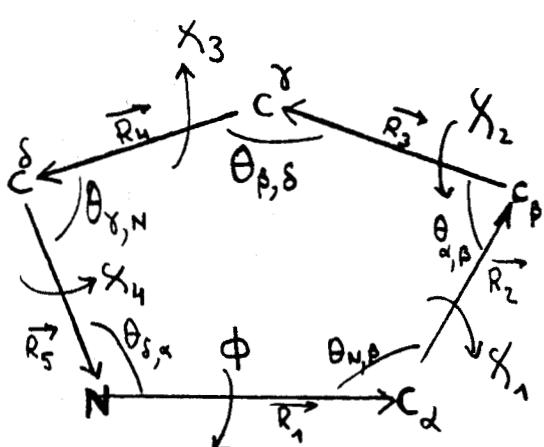


fig III-1

X suivant N-C

Y ⊥ X et dans le plan C N C

Z ⊥ (X, Y) sens du trièdre DIRECT

direct

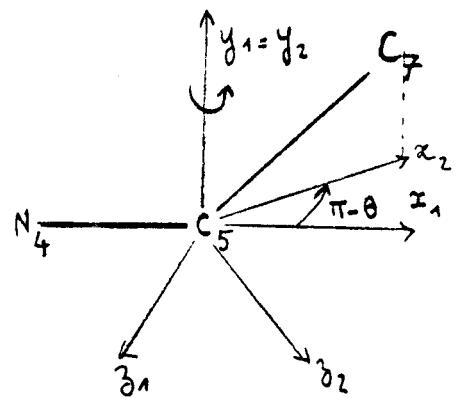
X4 suivant C₁ C₂

Y4 dans le plan N C C

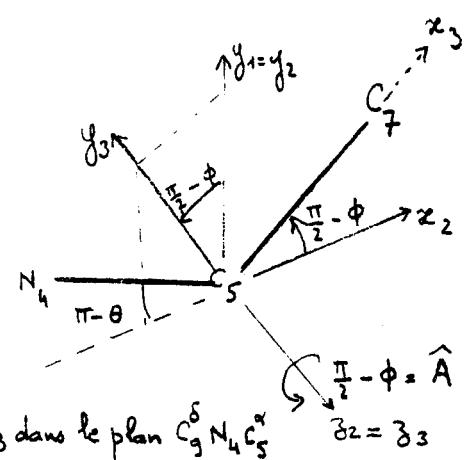
Z4 I (X4, Y4)

etc....

$$\begin{aligned} \begin{pmatrix} x_2 \\ y_2 \\ z_2 \end{pmatrix} &= \underbrace{\begin{pmatrix} \cos(\pi-\theta) & 0 & \sin(\pi-\theta) \\ 0 & 1 & 0 \\ -\sin(\pi-\theta) & 0 & \cos(\pi-\theta) \end{pmatrix}}_{\alpha} \begin{pmatrix} x_1 \\ y_1 \\ z_1 \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} x_1 \\ y_1 \\ z_1 \end{pmatrix} &= \underbrace{\begin{pmatrix} \cos(\pi-\theta) & 0 & -\sin(\pi-\theta) \\ 0 & 1 & 0 \\ \sin(\pi-\theta) & 0 & \cos(\pi-\theta) \end{pmatrix}}_{\alpha^{-1}} \begin{pmatrix} x_2 \\ y_2 \\ z_2 \end{pmatrix} \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} \begin{pmatrix} x_3 \\ y_3 \\ z_3 \end{pmatrix} &= \underbrace{\begin{pmatrix} \cos A & \sin A & 0 \\ -\sin A & \cos A & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}}_B \begin{pmatrix} x_2 \\ y_2 \\ z_2 \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} x_2 \\ y_2 \\ z_2 \end{pmatrix} &= \underbrace{\begin{pmatrix} \cos A & -\sin A & 0 \\ \sin A & \cos A & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}}_{B^{-1}} \begin{pmatrix} x_3 \\ y_3 \\ z_3 \end{pmatrix} \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} \begin{pmatrix} x_4 \\ y_4 \\ z_4 \end{pmatrix} &= \underbrace{\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos B & \sin B \\ 0 & -\sin B & \cos B \end{pmatrix}}_B \begin{pmatrix} x_3 \\ y_3 \\ z_3 \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} x_3 \\ y_3 \\ z_3 \end{pmatrix} &= \underbrace{\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos B & -\sin B \\ 0 & \sin B & \cos B \end{pmatrix}}_{B^{-1}} \begin{pmatrix} x_4 \\ y_4 \\ z_4 \end{pmatrix} \\ \begin{pmatrix} x_4 \\ y_4 \\ z_4 \end{pmatrix} &= \alpha \beta \gamma \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} = Z \begin{pmatrix} x \\ y \\ z \end{pmatrix} \end{aligned}$$

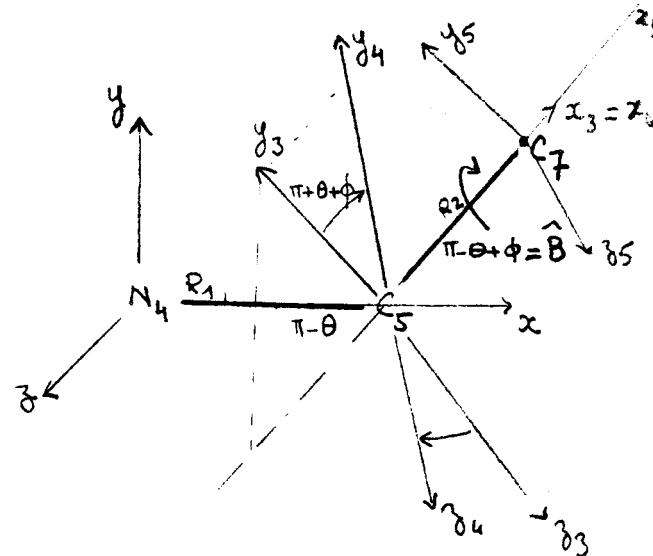


fig III-2

BITS
LILLE

Les positions des atomes du cycle sont repérées en fonction du référentiel (X,Y,Z) et fonction des paramètres R_i , θ_i , τ_i . La figure III-2 donne les matrices de passage pour chacune des rotations autour des axes.

La figure III-3 donne les paramètres et les matrices de passage de chaque référentiel au référentiel précédent.

atome	matrice de passage au au référentiel X ,Y ,Z	paramètres
C5	I (identité)	R_1
C7	Z	$R_1, R_2, \theta_{\alpha}, \phi$
C8	U	$R_2, R_3, \theta_{\beta}, X_1$
C9	W	$R_3, R_4, \theta_{\gamma}, X_2$
N4	$\Omega = I$	$R_4, R_5, \theta_{\delta}, X_3$

(fig III-3)

Les vecteurs R s'expriment dans la base X,Y,Z par:

$$\vec{R}_1 = \begin{pmatrix} R_1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}_{x,y,z}$$

$$\vec{R}_2 = Z \begin{pmatrix} x+R_1 \\ y \\ z \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} R_2 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} R_1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

$$\vec{R}_3 = (U-I) \left[Z \begin{pmatrix} x+R_1 \\ y \\ z \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} R_2 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \right] + \begin{pmatrix} R_3 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

$$\vec{R}_4 = (W - I) \begin{bmatrix} x + R_1 \\ UZ \begin{pmatrix} y \\ z \end{pmatrix} \\ 0 \end{bmatrix} + U \begin{pmatrix} R_2 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} R_3 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} R_4 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

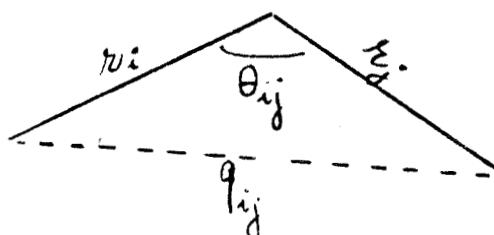
$$\vec{R}_5 = (\Omega - I) WUZ \begin{pmatrix} x + R_1 \\ y \\ z \end{pmatrix} + WU \begin{pmatrix} R_2 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + W \begin{pmatrix} R_3 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} R_4 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} R_5 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

En décomposant suivant les vecteurs unitaires portés par X, Y, Z
on obtient 3 relations en fonction des paramètres :

$$-\Omega WUZ \begin{pmatrix} x + R_1 \\ y \\ z \end{pmatrix} + -\Omega WU \begin{pmatrix} R_2 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + -\Omega W \begin{pmatrix} R_3 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + -\Omega \begin{pmatrix} R_4 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \equiv \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$$

Détermination des autres redondances:

A partir de la relation $\sum \Delta \theta_i = 0$ et de la relation :
 $q_{ij}^2 = r_i^2 + r_j^2 - 2 r_i r_j \cos \theta_{ij}$, on peut obtenir les relations de redondances recherchées.



L'application pour un cycle non plan est trop complexe et n'a pu être menée à bien (détermination des dérivées partielles secondes et mixtes $\frac{\partial^2 f}{\partial P_{ij} \partial P_{ik}}$, $\frac{\partial^2 f}{\partial P_{ij} \partial P_{km}}$)

La détermination numérique des constantes Kappa Cycle n'a pu être effectuée à cause de sa complexité donc il faudra conserver en mémoire l'aspect approché de la détermination des fréquences de vibration du cycle proline lorsqu'on emploie le champ d'UREY-BRADLEY.

Ce problème ne se pose plus aujourd'hui lorsqu'on travaille dans **l'espace des coordonnées cartésiennes**, la dimension des matrices (6 dimensions en plus) n'étant plus un obstacle majeur au traitement des coordonnées normales (mémoire des ordinateurs "pratiquement" infinie).

L'article qui suit résume l'essentiel des calculs effectués sur la Glycyl-L-Proline .

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE III

- 1) T. ASHIDA, I. TANAKA, T. YAMANE, M. KAKUDO
(Biomolecular structure : conformation, function and evolution)
Vol 1 Diffraction and related studies (col; R SRINIVASAN-
Pergamon Press NY 607-620) (1980)
 - 2) T. ASHIDA, M. KAKUDO Bull.Chem.Soc.JAPAN 47 (5) 1129-1133
(1974).
 - 3) T. ONISHI, T. SHIMANOUCHI Spectrochim Acta 20 325- (1964)
-

Raman Spectra and Normal Vibrations of Dipeptides. II. Glycyl-L-Proline

P. LAGANT, M. H. LOUCHEUX-LEFEBVRE,* Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et Unité 124 de L'INSERM, BP 311, F-59020 Lille Cédex; J. P. HUVENNE and G. VERGOTEN, and G. FLEURY, Laboratoire de Physique, Faculté de Pharmacie, F-59045 Lille Cédex; et Centre de Technologie Biomédicale, F-59 Lille ; P. LEGRAND, Université des Sciences et Techniques de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, Cedex, France

Synopsis

Raman and ir spectra of the glycyl-L-proline (GP) dipeptide were recorded. A normal-coordinate treatment was performed on the basis of the experimental spectra, using a modified Urey-Bradley force field (MUBFF). Cyclic redundancies were eliminated, and those due to the ring methylene groups, particularly distorted in regard to the tetrahedral conformation, were treated. An assignment of the experimental frequencies is proposed on the basis of the normal treatment.

INTRODUCTION

The purpose of our study is to calculate the local symmetry force constraints for groups, such as the prolyl ring, and to transpose the results to calculations of more sophisticated edifices such as tetrapeptides, whose experimental spectra are obscured by the great number of frequencies.

First, we calculated the simplest dipeptide, i.e., glycylglycine (GG).¹ In this paper, we will consider the glycyl proline (GP) dipeptide (all amino acids in this study were the L-form). This peptide can assume a *cis-trans* isomerism of the prolyl residue, as shown by Boussard et al.² in ir studies on X-Pro containing peptides (X = Gly or Ala) and by Fermandjian et al.,³ who have determined by ¹³C-nmr the relative amount of *cis* and *trans* conformations in the zwitterionic state of X-P dipeptide (39 and 61%, respectively, for X = Gly). However, in order to simplify our calculations, we treated only the transformation of an isolated molecule.

Calculations were performed using as a model for the pyrrolidine ring the configuration adopted by the prolyl residue in the glycyl prolyl leucyl glycine tetrapeptide (GPLG), whose the geometry was determined by x-ray study by Balasubramanian et al.⁴

* To whom correspondence should be addressed.

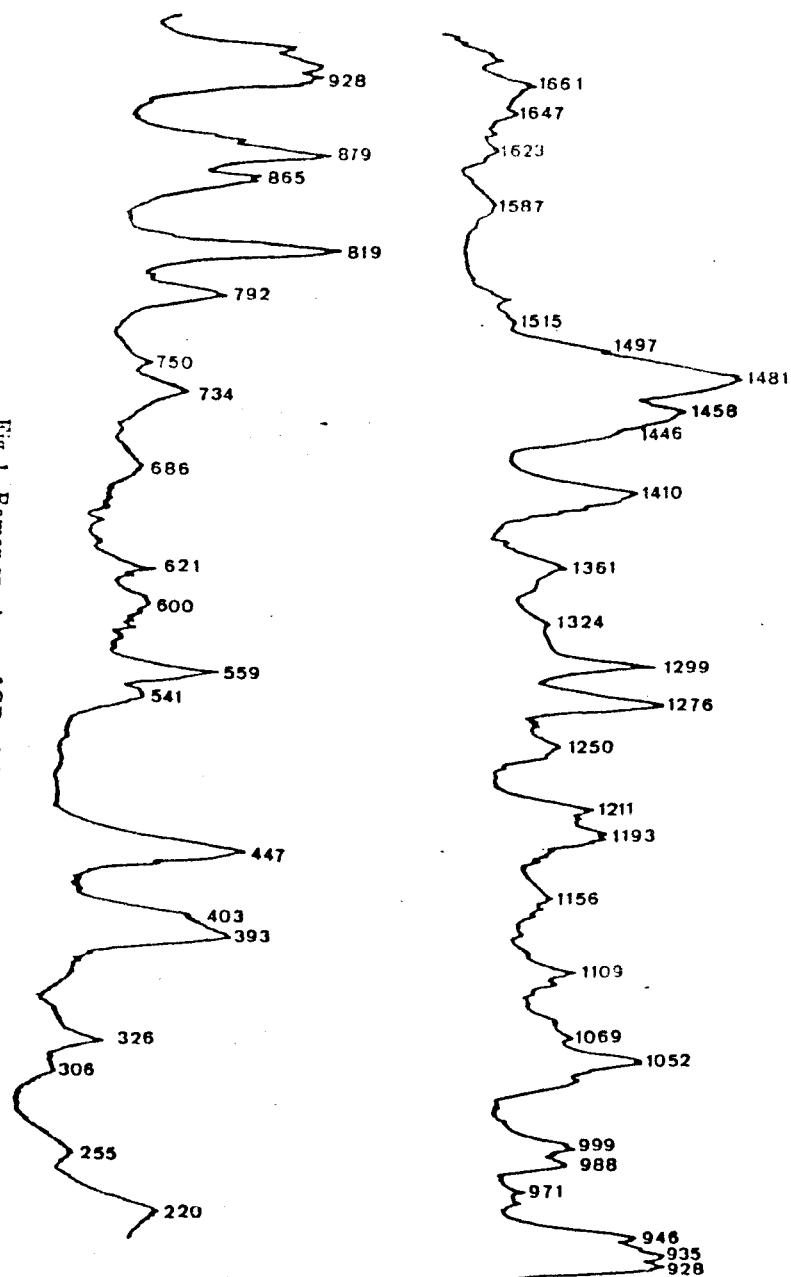


Fig. 1. Raman spectrum of CP solid sample.

47101 kb 021 1k a1
b3207-biopol-mar

BUS
ILLE

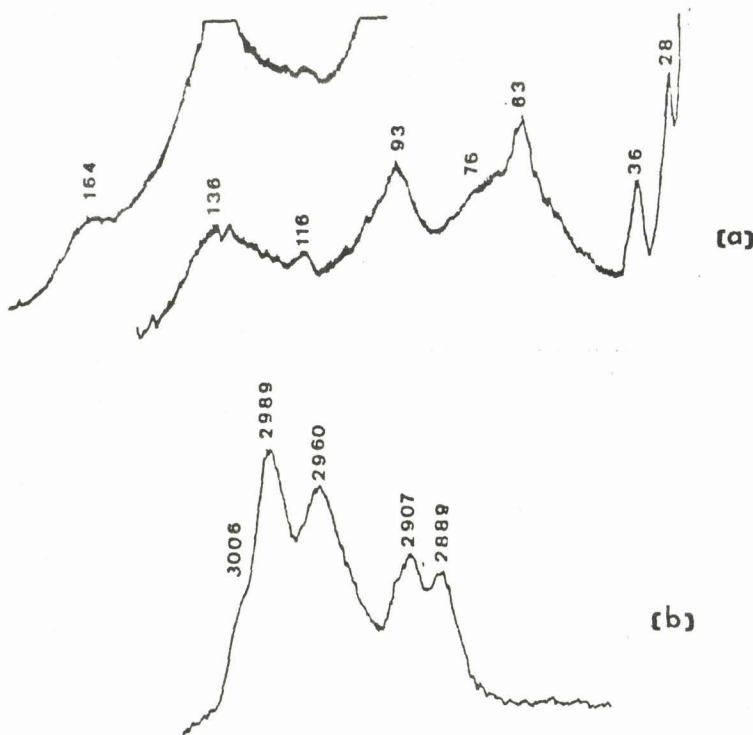


Fig. 2. Low (a) and high (b) Raman frequencies of GP.

METHODS

The solid sample was purchased (Fluka) and purified by dissolution in water or D₂O and precipitated with pure acetone.

Raman spectra were recorded on a Coderg T 800 triple monochromator. The 514.5-nm line of an argon-ion laser was used as the exciting source. Power on the sample was approximately 200 mW; the spectral resolution, 4 cm⁻¹. The ir spectra were recorded in the solid state (KBr disk) on a 621 P.E. spectrometer.

EXPERIMENTAL RESULTS

Raman and ir spectra of the solid sample are displayed in Figs. 1-3. Although the frequencies are comparable, certain differences appear between the ir and Raman spectra and are discussed below.

1. Intensities are particularly different in the 1680-1600-cm⁻¹ amide I region.
2. The weak 1587-cm⁻¹ Raman band of the stretching antisymmetric deformation $\nu_a(\text{CO}_2)$ is observed in ir at 1582 cm⁻¹ with a higher intensity.
3. The degenerate deformation of the NH₃⁺ group $\delta_d(\text{NH}_3^+)$ is observed at 1623 cm⁻¹ in Raman and at 1605 cm⁻¹ in the ir spectra.

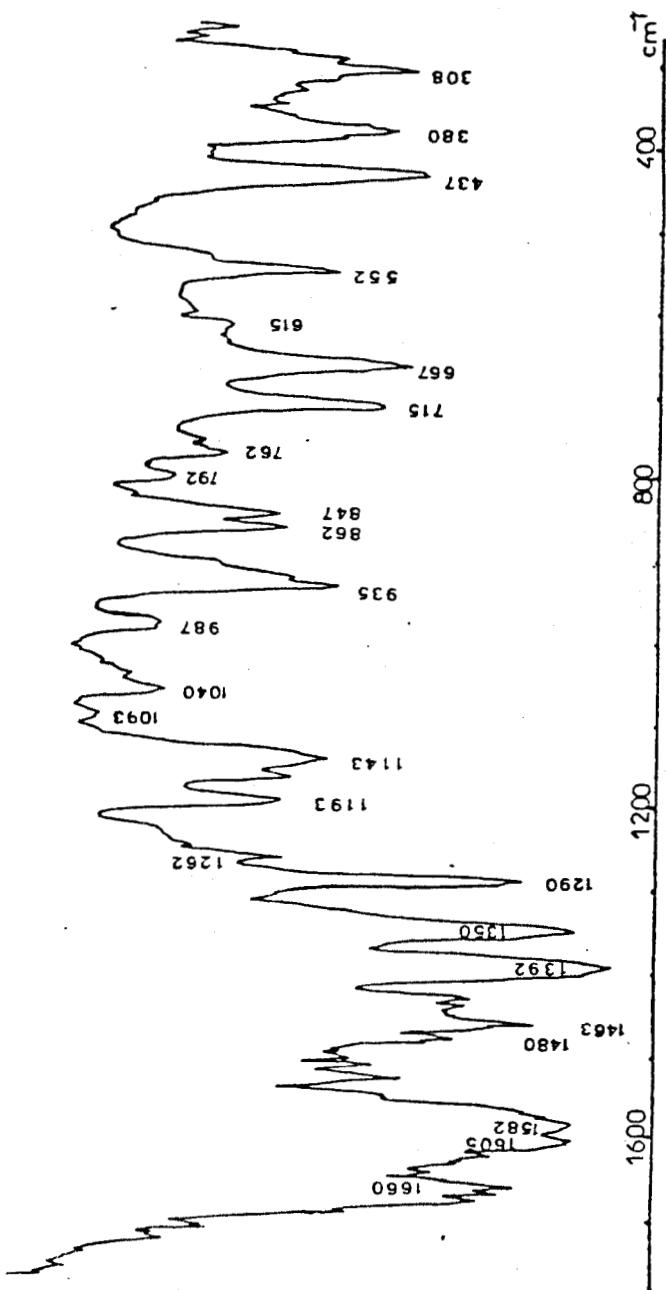


Fig. 3. The ir spectrum of GP (sample in KBr).

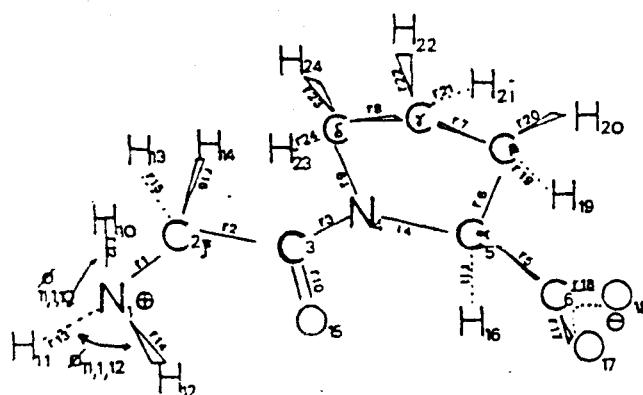


Fig. 4 Schematic representation of the prolyl group whose symmetry coordinates are listed in Table II.

4. In the 1500–1400- cm^{-1} region, where the methylene group deformations [$\delta(\text{CH}_2)$] are expected, Raman and ir spectra frequencies are similar.

5. In the complex peak at about 1410 cm^{-1} , we expected the wagging deformation of the glycyl methylene group $w(\text{CH}_2)$, in accordance with our earlier work on GG.¹ However, this region is obscured by other wagging vibrations of the ring methylene groups.

6. Different vibrations of the methylene groups are expected in the 1400–1200- cm^{-1} region and can be seen at 1361 cm^{-1} for the wagging deformation $w(\text{C}^{\alpha}\text{H}_2)$ and at 1324 cm^{-1} for the twisting deformation $tw(\text{C}^{\beta}\text{H}_2)$ (see Fig. 4 for the localization of C^{α} , C^{β} ... C^{ξ}).

7. The ring stretching vibrations appear with different intensities in the Raman and ir spectra, as can be seen from the 1276- cm^{-1} (Raman) and 1262- cm^{-1} (ir) bands.

8. Ring vibrations in the 1200–1000- cm^{-1} region are expected according to previous studies on the polyproline I and II (PPI and PPII)^{5,6} and the pyrrolidine ring.⁷ The authors assigned their 1087- cm^{-1} (PPI), 1093- cm^{-1} (PPII), and 1096- cm^{-1} (pyrrolidine ring) bands to a ring-stretching vibration. Such bands are present at 1109 and 1093 cm^{-1} in our spectra, and these assumptions are supported by our calculations.

9. The region from 1000 to 700 cm^{-1} is of particular interest because methylene rocking and skeletal vibrations arise in this domain. Strong bands are especially observed in the 945–930- cm^{-1} region. In this composite set of peaks, two bands are observed at 946 and 935 cm^{-1} . Unfortunately, we were unable to do a theoretical assignment of them. It is interesting to observe that previous theoretical and experimental studies^{5–7} did not point out the 946- nor the 935- cm^{-1} frequency. However, Koenig⁸ has reported such bands for the proline amino acid. At this stage, we point out that the geometry of the prolyl residue was taken from the GPLG tetrapeptide and quite possibly does not represent the exact geometry of the dipeptide. Previous calculations of the two polyprolines^{5,6} assigned a 919- cm^{-1} (PPI) band to a ring stretching, a 917- cm^{-1} band (PPII) to a ring deformation, while Evans and Wahr⁷ assigned a 908- cm^{-1} (PPI) band to a ring mode. In our spectra, these bands are observed at 928 cm^{-1} (Raman) and 922 cm^{-1} (ir). However, theoretical analysis gives a combination of stretching mode $\nu(\text{C}^{\xi}\text{C})$ and ring vibration mode for the glycyl residue.

TABLE I
Raman Experimental Frequencies in Solution and for Deuterated Solid*

H ₂ O (20% w/w)	D ₂ O (20% w/w)	Deuterated (solid)	Tentative Assignments
2989 vs	2988 vs		
2962 sh	2960 vs, sh		$\nu_a(\text{CH}_2)$
2934 m, sh	2937 s, sh		
2879 m	2886 m		$\nu_s(\text{CH}_2)$
1652 m, b	1648 m	1653 m, b	Amide I
1620 w			
1598 vw	1594 w		$\nu_a(\text{CO}_2^-)$
		1578 vw	
		1542 vw	
		1505 vw	
1484 vs	1484 vs	1489 vs	
1456 s, sh	1454 s, sh	1469 vs	$\delta(\text{CH}_2)$
1437 m	1441 m, sh		
		1428 w, sh	
1399 m	1402 s	1391 s	$\nu_s(\text{CO}_2^-)$
1361 w			$w(\text{CH}_2\xi)$
1348 w	1350 w	1348 m	
1324 w, sh	1325 vw		$t(\text{CH}_2\xi)$
1316 m, b	1304 m	1298 m	$\delta(\text{CC}^a\text{H})$
1288 m			
	1268 s	1264 s	$\nu(\text{C}^\gamma\text{C}^\gamma) + \text{ring stretch}$
1246 m	1245 m	1241 m	
1193 m	1192 s, b	1193	
1184 m, sh	1183 m, sh	1179	$t(\text{CH}_2\beta, \gamma, \delta)$
1164 w, sh		1160	
	1127 vw		
1098 w	1100 m	1096 m	$\nu(\text{C}^\gamma\text{C}^\gamma) + \nu(\text{C}^\beta\text{C}^\gamma)$
1067			
1043 m	1053 m	1040 vs	$\nu(\text{N}^+\text{C}^\xi) + \delta(\text{NC}^a\text{C})$
	1028 m		
986 m, b	993 m, b	985 m	
	975 m, sh	960 w	$r(\text{CH}_2\delta)$
	930 s, sh		
918 s	906 s	912 s	$\nu(\text{C}^\xi\text{C})$
873 m, sh	875 m		$r(\text{CH}_2\xi)$
862 s, b	857 s	863 s, b	$\delta(\text{CO}_2^-)$
		796 w	
778 m	778 m, b		
		770 m	
715 w, b	717 vw		$r(\text{CH}_2\gamma)$
	696 vw		
	665 s (large)		$\delta(\text{CC}^\gamma\text{C}^\beta)$
581 w, b	573 w	547 w, b	$\gamma(\text{CO}_2^-)$
540 m	539 m, b	490 w	$\delta(\text{C}=\text{O})$ Amide IV
426 m, b	428 m, b	430 m	
383 s	372 s	385 s	
		324 vw	

* Abbreviations: s, m, w: strong, medium, and weak intensity; v: very; sh: shoulder; b: broad; δ , δ_d , γ : in-plane, degenerate, and out-of-plane deformation; w: wagging; tw: twisting; ν_s , ν_a : symmetric, antisymmetric stretching; r: rocking; τ , torsion.

RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. II

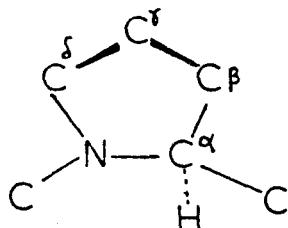


Fig. 5 Internal coordinates of GP.

In the 1000–700-cm⁻¹ domain, two ir intense bands at 879 and 819 cm⁻¹ and a shoulder at 792 cm⁻¹ are also present in the Raman spectra. They were observed by Koenig et al. at 867, 824, and 783 cm⁻¹ for proline and at 871 and 826 cm⁻¹ for PPII in solution.⁹ These frequencies would seem to be characteristic of the proline ring and its methylene groups. Calculations confirm the rocking vibrations of the ring methylene groups at 819 cm⁻¹. The higher-frequency band at 879 cm⁻¹ is partially due to the glycyl methylene group rocking vibration $r(C^{\beta}H_2)$. Such an assignment is consistent with the corresponding vibration for GG in water (884 cm⁻¹ where no interaction takes place with the degenerate rocking vibration of the NH₃⁺ group).¹

The calculated $r(C^{\gamma}H_2)$ vibration expected by calculation at 710 cm⁻¹ is observed at 734 cm⁻¹ (Raman) and 715 cm⁻¹ (ir). Vibration is observed at 730 cm⁻¹ (Raman) in the solid PPII and was assigned to skeletal deformations.⁶

10. In the 700–200-cm⁻¹ frequency range, we expected to observe the out-of-plane vibrations of the carbonyl groups and the deformation of the peptidic skeleton. The particular band at 686 cm⁻¹ (weak in Raman, very strong in ir at 667 cm⁻¹) has not found by Evans and Wahr⁷ for the pyrrolidine ring but was described for PPII at 641 cm⁻¹ by Koenig⁸ and at 678 cm⁻¹ by Gupta et al.^{5,6} Gupta et al. assigned this band to ring deformations only. Our calculations give this assignment for both ring and carboxylate group deformations, but such a vibration appears as an overall vibration when considering the potential-energy

The weak 621-cm⁻¹ Raman band (615 cm⁻¹ in ir) was assigned to the amide IV [$\delta(C=O)$] vibrations as observed by Dwivedi and Gupta¹⁰ for GG].

The intense 447-cm⁻¹ band does not shift by deuteration as expected for the torsion of the ammonium group $\tau(NH_3^+)$. Therefore, in accordance with the 449-cm⁻¹ band on the proline observed by Deveney et al.,¹¹ we assign this band to the CO₂⁻ in plane bending mode $\delta(CO_2^-)$.

TABLE II
Cartesian Coordinates for the Prolyl and Methylen Groups

Atom	X	Y	Z
C ₃	1.98	1.442498	0
N ₄	3.130411	1.605227	0.626478
C ₆	3.835969	2.875616	0.620075
C ₆	4.269444	3.558750	0.678512
C ₇	5.048480	2.559329	1.532879
C ₈	4.755786	1.385320	2.276138
C ₉	3.702189	0.625818	1.545939
H ₁₆	3.213843	3.643001	1.103893
H ₁₉	5.227084	3.400998	2.218221
H ₂₀	5.945271	2.397937	0.916666
H ₂₁	4.395409	1.658952	3.278762
H ₂₂	5.662612	0.770499	2.374436
H ₂₃	2.945687	0.237941	2.243976
H ₂₄	4.138946	0.227394	1.006243

Raman bands at 403 and 393 cm⁻¹ on proline were not reported by Devaney et al.¹¹ Dwivedi and Gupta⁵ report such a band at 400 cm⁻¹ for a ring deformation. Our calculations are in fair agreement with this assumption for the 403-cm⁻¹ band, while the band at 393 cm⁻¹ was assigned to the torsion $\tau(\text{NH}_3^+)$ mode.

In general, lower frequencies are typical of skeletal deformations and torsions. The amide VII frequency $\tau(\text{C}=\text{N})$ occurs at 220 cm⁻¹ but is broadened by ring torsions.

Under 200 cm⁻¹, vibrations result from intermolecular interactions (crystal modes). Since our study was made on the isolated molecule, their frequencies were not calculated.

Table I shows the vibrational frequencies in aqueous and D₂O solutions as well as in the deuterated solid state and gives their tentative assignments.

NORMAL-COORDINATE TREATMENT AND DISCUSSION

Cartesian coordinates for the glycyl-L-proline dipeptide have been taken from crystallographic data given by Balasubramanian et al.⁴ for several prolyl ring conformations obtained from various peptides. In our work the prolyl part of GPLG tetrapeptide was used. This prolyl residue is characterized by a nonplanar ring with its C^γ atom in an *exo* conformation. Different distance and angle values for the prolyl residue (Fig. 5) were considered and refined in order to give a perfect cyclization of the ring.

Table II gives the prolyl and methylene group Cartesian coordinates.

The parameters for the glycyl part have already been determined, and their values were taken from the works of Destrade et al.¹² and Machida et al.¹³ for α -glycine.

Internal coordinates were obtained by Wilson's method.¹⁴ Normal

TABLE III
Symmetry Coordinates for the Glycyl and Carboxylate Groups

<u>In Plane</u>	<u>Assignments</u>
$S_1 = \langle \sigma_1 \rangle$	$\delta_1^{\text{H}} C_2$ stretching $\nu(\text{C}_1^{\text{H}})$
$S_2 = \langle \sigma_2 \rangle$	$C_2 C_3$ stretching $\nu(C_2^{\text{C}})$
$S_{10} = \langle \sigma_{10} \rangle$	C=O stretch. $\nu(\text{C=O})$
$S_{12} = \langle (\sigma_{12} + \sigma_{13} + \sigma_{14})/2 \rangle$	m_3^{H} , sym. stretch. $\nu_g(m_3^{\text{H}})$
$S_{13} = \langle (2\sigma_{12} - \sigma_{13} - \sigma_{14})/2 \rangle$	m_3^{H} , antisym. stretch. $\nu_a(m_3^{\text{H}})$
$S_{14} = \langle \sigma_{15} + \sigma_{16} \rangle/2$	C_2^{H} sym. stretch. $\nu_g(C_2^{\text{H}})$
$S_{15} = \langle \sigma_{17} + \sigma_{18} \rangle/2$	CO_2^- sym. stretch. $\nu_g(\text{CO}_2^-)$
$S_{16} = \langle \sigma_{19} + \sigma_{20} \rangle/2$	C_3^{H} sym. stretch. $\nu_g(C_3^{\text{H}})$
$S_{17} = \langle \sigma_{21} + \sigma_{22} \rangle/2$	C_4^{H} sym. stretch. $\nu_g(C_4^{\text{H}})$
$S_{18} = \langle \sigma_{23} + \sigma_{24} \rangle/2$	C_5^{H} sym. stretch. $\nu_g(C_5^{\text{H}})$
$S_{19} = \langle \alpha(10,1,11) + \alpha(10,1,12) + \alpha(11,1,12) + \alpha(11,1,13) + \alpha(12,1,13) + \alpha(12,1,12) \rangle/6$	m_3^{H} sym. bending $\delta_g(m_3^{\text{H}})$
$S_{20} = \langle 2\alpha(11,1,12) - \alpha(10,1,11) - \alpha(10,1,13) \rangle/6$	m_3^{H} deg. bending $\delta_g(m_3^{\text{H}})$
$S_{21} = \langle 2\alpha(2,1,10) - \alpha(2,1,11) - \alpha(2,1,12) \rangle/6$	m_3^{H} deg. rocking $\tau(m_3^{\text{H}})$
$S_{22} = \langle 5\alpha(1,2,3) - \alpha(13,2,14) - \alpha(1,2,13) - \alpha(1,2,14) - \alpha(3,2,13) - \alpha(3,2,14) \rangle/30$	$\delta_1^{\text{H}} C_2$ bending $\delta_a(1,2,3)$
$S_{23} = \langle 4\alpha(13,2,14) - \alpha(1,2,13) - \alpha(1,2,14) - \alpha(3,2,13) - \alpha(3,2,14) \rangle/20$	$C_2^{\text{H}}_2$ bending $\delta(\text{C}_2^{\text{H}}_2)$
$S_{24} = \langle \alpha(3,2,13) + \alpha(3,2,14) - \alpha(1,2,13) - \alpha(1,2,14) \rangle/2$	$C_2^{\text{H}}_2$ wagging $\omega(\text{C}_2^{\text{H}}_2)$
$S_{25} = \langle 2\alpha(2,3,4) - \alpha(2,3,15) - \alpha(4,3,15) \rangle/6$	$C_2^{\text{H}}_3 C_4$ bending $\delta_a(2,3,4)$
$S_{26} = \langle \alpha(2,3,15) - \alpha(4,3,15) \rangle/2$	C=O in plane bending (100) $\delta(\text{C=O})$
$S_{27} = \langle 2\alpha(5,6,18) - \alpha(5,6,17) - \alpha(5,6,19) \rangle/6$	CO_2^- bending $\delta(\text{CO}_2^-)$
$S_{28} = \langle \alpha(5,6,17) + \alpha(5,6,18) \rangle/2$	CO_2^- tors. $\tau(\text{CO}_2^-)$
<u>Out of Plane</u>	<u>Assignments</u>
$S_1 = \langle \sigma_{12} - \sigma_{13} \rangle/2$	m_3^{H} antisym. stretching $\nu_g(m_3^{\text{H}})$
$S_2 = \langle \sigma_{15} - \sigma_{16} \rangle/2$	$C_2^{\text{H}}_2$ antisym. stretch. $\nu_g(C_2^{\text{H}}_2)$
$S_3 = \langle \sigma_{17} - \sigma_{18} \rangle/2$	CO_2^- antisym. stretch. $\nu_g(\text{CO}_2^-)$
$S_4 = \langle \sigma_{19} - \sigma_{20} \rangle/2$	$C_3^{\text{H}}_2$ antisym. stretch. $\nu_g(\text{CH}_2^{\text{H}})$
$S_5 = \langle \sigma_{21} - \sigma_{22} \rangle/2$	$C_4^{\text{H}}_2$ antisym. stretch. $\nu_g(\text{CH}_2^{\text{H}})$
$S_6 = \langle \sigma_{23} - \sigma_{24} \rangle/2$	$C_5^{\text{H}}_2$ antisym. stretch. $\nu_g(\text{CH}_2^{\text{H}})$
$S_7 = \langle \alpha(10,1,11) - \alpha(10,1,12) \rangle/2$	m_3^{H} deg. bending $\delta_g(m_3^{\text{H}})$
$S_8 = \langle \alpha(2,1,11) - \alpha(2,1,12) \rangle/2$	m_3^{H} deg. rocking $\tau(m_3^{\text{H}})$
$S_9 = \langle \alpha(1,2,13) - \alpha(1,2,14) - \alpha(3,2,13) + \alpha(3,2,14) \rangle/2$	$C_2^{\text{H}}_2$ twisting $\tau(\text{C}_2^{\text{H}}_2)$
$S_{10} = \langle -\alpha(1,2,13) + \alpha(1,2,14) - \alpha(3,2,13) + \alpha(3,2,14) \rangle/2$	$C_2^{\text{H}}_2$ rocking $\tau(\text{C}_2^{\text{H}}_2)$
$S_{17} = \langle \text{C=O} \rangle$	C=O wagging $\nu(\text{C=O})$
$S_{18} = \omega(\text{CO}_2^-)$	CO_2^- wagging $\gamma(\text{CO}_2^-)$
$S_{19} = \tau(\delta_1^{\text{H}} C_2)$	$\delta_1^{\text{H}} C_2$ torsion $\tau(\delta_1^{\text{H}} C_2)$
$S_{20} = \tau(C_2 C_3)$	$C_2 C_3$ torsion $\tau(C_2 C_3)$
$S_{21} = \tau(C_3 H_4)$	$C_3 H_4$ torsion $\tau(CH_4)$
$S_{22} = \tau(C_5 C_6)$	$C_5 C_6$ torsion $\tau(C_5 C_6)$

47101 kb 021 1k a1
b3207-biopol-mar

B6259

TABLE IV
New Symmetry Coordinates of the Prolyl Group

$S_1^H = S_3 = Ar_3$
$S_2^H = S_4 = 0.910652 Ar_6 + 0.036024 Ar_8 + 0.154357 Ar_7 + 0.147325 Ar_9 - 0.079633 Ar_9 + 0.064097 Ar_{3,4,5} + 0.064480 Ar_{2,4,9} - 0.144781 Ar_{9,4,5} + 0.030645 Ar_{9,5,16} + 0.060153 Ar_{4,5,6} - 0.167464 Ar_{4,5,7} + 0.037802 Ar_{6,5,16} + 0.040497 Ar_{7,5,6} + 0.022709 Ar_{7,5,16} + 0.064486 Ar_{5,7,8} + 0.210549 Ar_{8,9,9} + 0.041901 Ar_{8,9,4} - 0.013267 Ar_{8,5} + 0.012968 Ar_{8,7} + 0.045029 Ar_{7,8} + 0.016441 Ar_{8,9} + 0.005447 Ar_{9,4}$
$S_3^H = S_{11} = Ar_{11}$
$S_4^H = S_5 = Ar_5$
$S_5^H = S_6 = 0.911578 Ar_6 + 0.051474 Ar_7 + 0.140511 Ar_8 + 0.146758 Ar_9 - 0.025825 Ar_{3,4,5} - 0.024056 Ar_{3,4,9} + 0.042605 Ar_{5,4,5} + 0.032675 Ar_{4,5,16} + 0.042548 Ar_{4,5,6} + 0.155362 Ar_{4,5,7} + 0.035172 Ar_{6,5,16} + 0.036422 Ar_{5,7,6} + 0.022675 Ar_{7,5,16} - 0.177205 Ar_{5,7,8} + 0.043753 Ar_{7,8,9} + 0.225379 Ar_{8,9,4} - 0.013475 Ar_{4,5} + 0.009988 Ar_{7,8} - 0.043778 Ar_{7,8} - 0.054306 Ar_{8,9} - 0.020470 Ar_{9,4}$
$S_6^H = S_7 = 0.896504 Ar_7 - 0.077128 Ar_8 + 0.172837 Ar_9 - 0.084295 Ar_{3,4,5} + 0.089752 Ar_{3,5,9} + 0.192047 Ar_{9,4,5} - 0.029105 Ar_{4,5,16} + 0.021990 Ar_{4,5,6} + 0.103701 Ar_{4,5,7} - 0.023381 Ar_{6,5,16} + 0.040794 Ar_{7,5,6} + 0.027669 Ar_{7,5,16} - 0.186787 Ar_{5,7,8} - 0.206777 Ar_{7,8,9} + 0.091379 Ar_{8,9,4} + 0.045901 Ar_{7,5} + 0.045524 Ar_{8,7} - 0.016441 Ar_{7,8} + 0.005903 Ar_{8,9} + 0.039196 Ar_{9,4}$
$S_7^H = S_8 = 0.085097 Ar_8 - 0.059164 Ar_9 - 0.041924 Ar_{3,4,5} - 0.040398 Ar_{3,4,9} + 0.103679 Ar_{3,5,9} - 0.045516 Ar_{4,5,16} - 0.083764 Ar_{4,5,6} + 0.268100 Ar_{4,5,7} - 0.060465 Ar_{6,5,16} + 0.057884 Ar_{7,5,6} - 0.045757 Ar_{7,5,16} + 0.074262 Ar_{5,7,8} - 0.239768 Ar_{7,8,9} - 0.209945 Ar_{8,9,4} - 0.008705 Ar_{7,5} - 0.044198 Ar_{7,8} - 0.040891 Ar_{7,8} - 0.006762 Ar_{8,9} - 0.020445 Ar_{9,4}$
$S_8^H = S_9 = 0.879060 Ar_9 + 0.089415 Ar_{3,4,5} + 0.091205 Ar_{3,4,9} - 0.188974 Ar_{3,5,9} - 0.004316 Ar_{4,5,16} - 0.014870 Ar_{4,5,6} + 0.048952 Ar_{4,5,7} - 0.010303 Ar_{6,5,16} - 0.000716 Ar_{7,5,6} - 0.017107 Ar_{7,5,16} + 0.293159 Ar_{5,7,8} + 0.112678 Ar_{7,8,9} - 0.256021 Ar_{8,9,4} + 0.028859 Ar_{4,5} - 0.024102 Ar_{5,7} + 0.062364 Ar_{7,8} + 0.054582 Ar_{8,9} - 0.001981 Ar_{9,4}$
$S_9^H = S_{27} = 0.781615 Ar_{3,4,5} + 0.494911 Ar_{3,4,9} + 0.197241 Ar_{9,4,5} - 0.067641 Ar_{4,5,16} - 0.012810 Ar_{4,5,6} + 0.151084 Ar_{4,5,7} + 0.036749 Ar_{6,5,16} + 0.034440 Ar_{5,5,6} - 0.021435 Ar_{7,5,16} - 0.030270 Ar_{5,7,8} + 0.079605 Ar_{7,8,9} + 0.153859 Ar_{8,9,4} + 0.050740 Ar_{8,5} + 0.093582 Ar_{7,7} - 0.0192278 Ar_{7,8} - 0.153363 Ar_{8,9} - 0.094390 Ar_{9,4}$
$S_{10}^H = S_{28} = 0.604695 Ar_{3,4,9} - 0.414847 Ar_{9,4,5} + 0.175131 Ar_{4,5,16} - 0.034208 Ar_{4,5,6} + 0.318203 Ar_{4,5,7} - 0.075028 Ar_{6,5,16} + 0.099526 Ar_{7,5,6} - 0.016736 Ar_{7,5,16} - 0.062496 Ar_{5,7,8} + 0.1455165 Ar_{7,8,9} + 0.325301 Ar_{8,9,4} + 0.176644 Ar_{4,5} + 0.211586 Ar_{7,8} - 0.052250 Ar_{7,8} - 0.104541 Ar_{8,9} - 0.123449 Ar_{9,4}$

TABLE IV. (Continued from previous page.)

$S_{11}^a = S_{29} = 0.355501 \Delta e_{9,1,1} + 0.092558 \Delta e_{4,5,16} + 0.200562 \Delta e_{4,5,6} + 0.247969 \Delta e_{4,5,7}$
$+ 0.049137 \Delta e_{7,5,16} + 0.026418 \Delta e_{7,5,6} + 0.080555 \Delta e_{7,5,16} + 0.166513 \Delta e_{6,7,8}$
$+ 0.036207 \Delta e_{7,8,9} + 0.792114 \Delta e_{6,9,4} + 0.272012 \Delta e_{4,3} + 0.502624 \Delta e_{5,7}$
$+ 0.005873 \Delta e_{7,8} + 0.474682 \Delta e_{8,9} + 0.294336 \Delta e_{9,4}$
$S_{12}^a = S_{30} = 0.055841 \Delta e_{8,5,16} + 0.199337 \Delta e_{4,5,6} + 0.048914 \Delta e_{4,5,7} + 0.246203 \Delta e_{4,5,16}$
$+ 0.179202 \Delta e_{7,5,6} + 0.217655 \Delta e_{7,5,16} + 0.041122 \Delta e_{5,7,8} + 0.080444 \Delta e_{7,8,9}$
$+ 0.032015 \Delta e_{8,9,4} + 0.016239 \Delta e_{4,3} + 0.164972 \Delta e_{5,7} + 0.163279 \Delta e_{7,8}$
$+ 0.027974 \Delta e_{8,9} + 0.113740 \Delta e_{9,4}$
$S_{13}^a = S_{31} = 0.346417 \Delta e_{6,5,7} + 0.154630 \Delta e_{6,5,16} + 0.090460 \Delta e_{7,5,6} + 0.161744 \Delta e_{7,5,16}$
$+ 0.557752 \Delta e_{5,7,8} + 0.596747 \Delta e_{7,8,9} + 0.339902 \Delta e_{8,9,4} + 0.023641 \Delta e_{4,3}$
$+ 0.159901 \Delta e_{5,7} + 0.109052 \Delta e_{7,8} + 0.016336 \Delta e_{8,9} + 0.001575 \Delta e_{9,4}$
$S_{14}^a = S_{32} = 0.796119 \Delta e_{4,5,6} + 0.028531 \Delta e_{4,5,7} + 0.354535 \Delta e_{6,5,16} + 0.335748 \Delta e_{6,5,7}$
$+ 0.262003 \Delta e_{7,5,16} + 0.046394 \Delta e_{5,7,8} + 0.065106 \Delta e_{7,8,9} + 0.647753 \Delta e_{8,9,4}$
$+ 0.004466 \Delta e_{4,3} + 0.165346 \Delta e_{5,7} + 0.091664 \Delta e_{7,8} + 0.223376 \Delta e_{8,9} + 0.067941 \Delta e_{9,4}$
$S_{15}^a = S_{33} = 0.759973 \Delta e_{6,5,16} + 0.446158 \Delta e_{6,5,7} + 0.444933 \Delta e_{7,5,16} + 0.004397 \Delta e_{4,5,6}$
$+ 0.001828 \Delta e_{7,8,9} + 0.002022 \Delta e_{6,9,4} + 0.003194 \Delta e_{4,3} + 0.013352 \Delta e_{5,7}$
$+ 0.011329 \Delta e_{7,8} + 0.001408 \Delta e_{8,9} + 0.010657 \Delta e_{9,4}$
$S_{16}^a = S_{34} = 0.431197 \Delta e_{4,5,7} + 0.664293 \Delta e_{7,5,16} + 0.043328 \Delta e_{5,7,8} + 0.032675 \Delta e_{7,8,9}$
$+ 0.044668 \Delta e_{8,9,4} + 0.277159 \Delta e_{4,3} + 0.019304 \Delta e_{5,7} + 0.136450 \Delta e_{7,8}$
$+ 0.036237 \Delta e_{6,9} + 0.227313 \Delta e_{9,4}$
$S_{17}^a = S_{37} = 0.177386 \Delta e_{5,7,8} + 0.042776 \Delta e_{7,8,9} + 0.104214 \Delta e_{6,9,4} + 0.369772 \Delta e_{4,5} + 0.574642 \Delta e_{5,7}$
$+ 0.590149 \Delta e_{7,8} + 0.349122 \Delta e_{8,9} + 0.063001 \Delta e_{9,4}$
$S_{18}^a = S_{40} = 0.064482 \Delta e_{7,8,9} + 0.039360 \Delta e_{8,9,4} + 0.056472 \Delta e_{4,5} + 0.145574 \Delta e_{5,7} + 0.231814 \Delta e_{7,8}$
$+ 0.511269 \Delta e_{8,9} + 0.643014 \Delta e_{9,4}$

treatments were performed for an isolated molecule lacking symmetry (Fig. 4). Certain symmetry coordinates for the NH_3^+ , CH_2 , CO_2^- , and CONH groups are already well defined.¹⁵ We have constructed the local symmetry coordinates for the prolyl group constituted by the proline ring with its three CH_2 substituents in addition to the carbonyl and carboxylate carbon atoms (Fig. 5).

After eliminating the cyclic redundancies and those due to the distorted methylene groups, we constructed a reduced set of orthogonal local symmetry coordinates.

TABLE V
Symmetry Coordinates of the Ring Methylenes Groups

	Assignments
$S_{38} = 0.195769 \Delta\phi_{19,7,20} - 0.047383 \Delta\phi_{5,7,20} - 0.047487 \Delta\phi_{8,7,20} - 0.047777 \Delta\phi_{6,7,19} - 0.047691 \Delta\phi_{8,7,19}$	$\delta(\text{CH}_2\beta)$ βCH_2 scissoring
$S_{39} = 0.249658 \Delta\phi_{6,7,20} - 0.249905 \Delta\phi_{8,7,20} + 0.250048 \Delta\phi_{5,7,19} - 0.249704 \Delta\phi_{8,7,19}$	$w(\text{CH}_2\beta)$ βCH_2 wagging
$S'_{11} = 0.250074 \Delta\phi_{5,7,20} + 0.246534 \Delta\phi_{8,7,20} + 0.249471 \Delta\phi_{5,7,19} - 0.246946 \Delta\phi_{8,7,19}$	$t(\text{CH}_2\beta)$ βCH_2 twisting
$S'_{12} = 0.246939 \Delta\phi_{5,7,20} + 0.249671 \Delta\phi_{8,7,20} - 0.245094 \Delta\phi_{5,7,19} - 0.248412 \Delta\phi_{8,7,19}$	$r(\text{CH}_2\beta)$ βCH_2 rocking
$S_{41} = 0.191470 \Delta\phi_{21,8,22} - 0.045849 \Delta\phi_{7,8,22} - 0.045657 \Delta\phi_{9,8,22} - 0.044903 \Delta\phi_{7,8,21} - 0.045153 \Delta\phi_{9,8,21}$	$\delta(\text{CH}_2\gamma)$ γCH_2 scissoring
$S_{42} = 0.250155 \Delta\phi_{7,8,22} - 0.249330 \Delta\phi_{9,8,22} + 0.249281 \Delta\phi_{7,8,21} - 0.249794 \Delta\phi_{9,8,21}$	$w(\text{CH}_2\gamma)$ γCH_2 wagging
$S'_{13} = -0.248687 \Delta\phi_{7,8,22} + 0.244787 \Delta\phi_{9,8,22} + 0.250141 \Delta\phi_{7,8,21} - 0.243750 \Delta\phi_{9,8,21}$	$t(\text{CH}_2\gamma)$ γCH_2 twisting
$S'_{14} = 0.240189 \Delta\phi_{7,8,22} + 0.245960 \Delta\phi_{9,8,22} - 0.244742 \Delta\phi_{7,8,21} - 0.249205 \Delta\phi_{9,8,21}$	$r(\text{CH}_2\gamma)$ γCH_2 rocking
$S_{43} = 0.202310 \Delta\phi_{23,9,24} - 0.052081 \Delta\phi_{8,9,24} - 0.051982 \Delta\phi_{4,9,24} - 0.51701 \Delta\phi_{8,9,23} - 0.051807 \Delta\phi_{4,9,23}$	$\delta(\text{CH}_2\delta)$ δCH_2 scissoring
$S_{44} = 0.250014 \Delta\phi_{8,9,24} - 0.249908 \Delta\phi_{4,9,24} + 0.249889 \Delta\phi_{8,9,23} - 0.249966 \Delta\phi_{4,9,23}$	$w(\text{CH}_2\delta)$ δCH_2 wagging
$S'_{15} = 0.249477 \Delta\phi_{8,9,24} + 0.246819 \Delta\phi_{4,9,24} + 0.250011 \Delta\phi_{8,9,23} - 0.246354 \Delta\phi_{4,9,23}$	$t(\text{CH}_2\delta)$ δCH_2 twisting
$S'_{16} = 0.245401 \Delta\phi_{8,9,24} + 0.248644 \Delta\phi_{4,9,24} - 0.246814 \Delta\phi_{8,9,23} - 0.249876 \Delta\phi_{4,9,23}$	$r(\text{CH}_2\delta)$ δCH_2 rocking

47101 kb 021 uk a2
b3207-biopol-mar

-90-

RAMAN SPECTRA OF DIPEPTIDES. II

13

TABLE VI
Experimental and Calculated Frequency Values of GP

Observed		Calculated	Assignments	PCD (s)
3050		$\nu_g(\text{NH}_3^+)$	100 $\nu_g(\text{NH}_3^+)$	
3250		$\nu_g(\text{NH}_3^+)$	100 $\nu_g(\text{NH}_3^+)$	
3075		$\nu_g(\text{NH}_3^+)$	99 $\nu_g(\text{NH}_3^+)$	
3013		$\nu_g(\text{C}_\alpha\text{H})$	99 $\nu_g(\text{C}_\alpha\text{H})$	
3006	3006	$\nu_g(\text{CH})$	100 $\nu_g(\text{CH}_\beta)$	
2969	2977	$\nu(\text{C}_\alpha\text{H})$	100 $\nu(\text{C}_\alpha\text{H})$	
2960	2968	$\nu_g(\text{C}_\alpha\text{H})$	56 $\nu_g(\text{C}_\alpha\text{H}) + 44 \nu_g(\text{C}_\beta\text{H})$	
	2954	$\nu_g(\text{C}_\beta\text{H})$	56 $\nu_g(\text{C}_\beta\text{H}) + 42 \nu_g(\text{C}_\alpha\text{H})$	
	2924	$\nu_g(\text{C}_\beta\text{H})$	96 $\nu_g(\text{C}_\beta\text{H}) + 4 \nu_g(\text{C}_\alpha\text{H})$	
2907	2911	$\nu_g(\text{CH}_\beta)$	100 $\nu_g(\text{CH}_\beta)$	
2889	2883	$\nu_g(\text{CH}_\gamma)$	48 $\nu_g(\text{CH}_\gamma) + 48 \nu_g(\text{C}_\beta\text{H})$	
	2861	$\nu_g(\text{CH}_\beta)$	52 $\nu_g(\text{CH}_\beta) + 48 \nu_g(\text{C}_\beta\text{H})$	
1677				
+1640 s	1661 w			
	1647 (1652 in H_2O) w	1652	An I	37 $\nu(\text{C=O}) + 32 \nu(\text{CH}) + 22 S_3$
1630			NH_3^+ deg. bend.	95 $\delta_g(\text{NH}_3^+) + 5 \tau(\text{NH}_3^+)$
	1623 w	1623	NH_3^+ deg. bend.	93 $\delta_g(\text{NH}_3^+) + 6 \tau(\text{NH}_3^+)$
1605 vs				
1562 vs	1567 w	1593	$\nu_g(\text{CO}_2^-)$	100 $\nu_g(\text{CO}_2^-)$
	1574	1587	ring stretching	59 $S_3 + 9 \nu(\text{CH}) + 9 S_{31} + 7 S_{28} + 5 S_{32} + 4 S_8$
1530 w	1530 w	1574	NH_3^+ sym. bend.	59 $\delta_g(\text{NH}_3^+) + 16 \nu(\text{CH}_\beta) + 13 \tau(\text{CH}_\beta) + 4 S_9$
1515 w				
	1497 sh	1503	ring stretching	29 $S_3 + 20 \nu(\text{C=O}) + 11 \nu(\text{CH}_\beta) + 7 \delta_g(\text{NH}_3^+) + 7 S_{31} + 4 \delta(\text{CH}_2\text{E})$
1480 w	1481 vs	1489	$\delta(\text{CH}_2\text{E})$	79 $\delta(\text{CH}_2\text{E}) + 6 S_{33} + 6 S_{30} + 3 S_{28} + 3 S_9$
1463 s	1458 s, sh	1461-1459-1455	$\delta(\text{CH}_2\text{E})$	48 $\delta(\text{CH}_2\text{E}) + 29 \delta(\text{CH}_2\text{E}) + 64 \delta(\text{CH}_2\text{E}) + 32 \delta_g(\text{NH}_3^+) + 55 \delta(\text{CH}_2\text{E}) + 39 \delta(\text{CH}_2\text{Y})$
1435 w	1446 s, sh	1444	$\delta(\text{HC}_\alpha\text{H})$	42 $S_{30} + 30 S_{33} + 13 \delta(\text{CH}_2\text{E}) + 6 S_9$
	1410 s	1409	$\nu(\text{CH}_2)_\beta\tau_\beta$	33 $\omega(\text{D}_2\text{Y}) + 20 \nu(\text{CH}_2\text{E}) + 19 \nu_g(\text{CO}_2^-) + 9 S_3 + 6 \delta(\text{CO}_2^-) + 6 \delta(\text{CH}_2\text{Y}) + 5 \delta(\text{CH}_2\text{E})$
1392 vs	1390 sh	1399	$\nu_g(\text{CO}_2^-)$	54 $\nu_g(\text{CO}_2^-) + 10 S_3 + 15 \delta(\text{CO}_2^-) + 15 \nu(\text{CH}_2\text{E})$
		1393	$\nu(\text{CH}_2\text{C})$	70 $\nu(\text{CH}_2\text{C}) + 10 \delta(\text{CH}_2\text{C}) + 8 \nu(\text{CH}_2\text{C}) + 5 S_3(\text{NH}_3^+)$
	1361 w	1365	$\nu(\text{CH}_2\text{E})$	25 $\nu(\text{CH}_2\text{E}) + 20 \nu(\text{CH}_2\text{E}) + 14 S_3 + 8 S_{33} + 5 S_{30}$
1350 s	1349 w, sh			
	1324 w	1320	$\tau(\text{CH}_2\text{C})$	88 $\tau(\text{CH}_2\text{C}) + 4 \tau(\text{NH}_3^+)$
1290 vs	1299 s	1319	$\delta(\text{CC}_\alpha\text{H})$	39 $\nu(\text{CH}_2\text{E}) + 25 S_{33} + 17 S_3 + 16 \nu(\text{CH}_2\text{Y})$
1282 w	1276 s	1267	$\nu(\text{C}_\alpha\text{C}) + \nu(\text{CH})$ $\tau(\text{CH}_2)_\beta\tau(\text{CH}_2)_\beta$	25 $S_3 + 14 \nu(\text{CH}) + 14 S_{30} + 14 S_{34} + 12 S_{33} + 10 \nu(\text{C}_\alpha\text{C})$
1248 w	1250 w			
1230 vw	1211 w	1236	$\tau(\text{CH}_2\text{E})$	50 $\tau(\text{CH}_2\text{E}) + 40 \tau(\text{CH}_2\text{E})$
1193 s	1193 w	1197	$\tau(\text{CH}_2\text{Y})$	63 $\tau(\text{CH}_2\text{Y}) + 19 \tau(\text{CH}_2\text{E}) + 14 \tau(\text{CH}_2\text{E})$
	1186	1183	$\tau(\text{CH}_2\text{E})$	34 $\tau(\text{CH}_2\text{E}) + 34 \tau(\text{CH}_2\text{E}) + 32 \tau(\text{CH}_2\text{E})$
	1183	1183	$\delta(\text{HC}_\alpha\text{H})$	39 $S_{30} + 15 S_{34} + 15 S_3 + 11 S_3 + 10 \nu(\text{C}_\alpha\text{C}) + 9 S_{27} + 5 \nu_g(\text{CO}_2^-)$
1165 s	1156 w	1163	$\delta(\text{C}_\alpha\text{C}_\beta\text{C}_\gamma)$	20 $S_{34} + 17 S_{33} + 10 \nu(\text{CH}_2\text{Y}) + 8 S_3 + 8 \nu(\text{CH}_2\text{E}) + 5 S_3$
1143 s				
	1109 w	1092	$\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_\beta) + \nu(\text{C}_\beta\text{C}_\gamma)$	29 $S_3 + 19 S_3 + 15 S_{34} + 11 S_3 + 7 \nu(\text{CH}_2\text{Y}) + 5 S_3$
1090 w	1100	1089	$\tau(\text{NH}_3^+)$	65 $\tau(\text{NH}_3^+) + 20 \tau(\text{CH}_2\text{C}) + 8 \tau(\text{CH}_2\text{E})$
1060 w	1069 w	1071	$\tau(\text{NH}_3^+)$	72 $\tau(\text{NH}_3^+) + 8 (\delta(\text{C}_\alpha\text{C}_\beta) + 6 S_{1,2,3}) + 5 \nu(\text{CH}_2\text{E})$
1050 vw	1052 s	1045	$\nu(\text{H}^+\text{C}_\beta) + \delta(\text{HC}_\alpha\text{H})$	36 $\nu(\text{H}^+\text{C}_\beta) + 21 S_{32} + 9 \nu(\text{CO}_2^-) + 8 S_3 + 8 \delta(\text{CO}_2^-)$
1040 w	1042 w, sh	1038	$\nu(\text{C}_\beta\text{C}_\gamma) + \nu(\text{H}^+\text{C}_\beta)$	30 $S_3 + 16 \nu(\text{H}^+\text{C}_\beta) + 9 S_3 + 7 \nu_g(\text{CO}_2^-) + 6 S_3 + 6 \delta(\text{CO}_2^-)$
987 w	999 w	1002	$\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_\beta\text{C}_\gamma)$	35 $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}_\beta\text{C}_\gamma) + 12 \delta(\text{CO}_2^-) + 11 S_{32} + 9 S_{34} + 8 \nu(\text{CO}_2^-) + 85_6$
968 w				
971 w	969		$\nu(\text{CH}_2\text{E})$	41 $\nu(\text{CH}_2\text{E}) + 30 (\text{CH}_2\text{Y}) + 21 (\text{CH}_2\text{E})$
946 s				
935 vs	935 s			
922 s	928 s	924	$\nu(\text{C}_\alpha\text{C})$	17 $\nu(\text{C}_\alpha\text{C}) + 13 S_3 + 12 \nu(\text{H}^+\text{C}_\beta) + 10 S_{32}$
906 w, sh	890 w, sh	887	$\tau(\text{CH}_2\text{C})$	66 $\tau(\text{CH}_2\text{C}) + 21 \tau(\text{NH}_3^+) + 7 \tau(\text{C}_\alpha\text{C})$
879 s				
862 s	865 s	863	$\delta(\text{CO}_2^-)$	43 $\delta(\text{CO}_2^-) + 11 S_{32} + 7 \nu(\text{CO}_2^-) + 6 S_3$
847 s				
825 vw	819 s	830	$\tau(\text{CH}_2\text{E})$	50 $\tau(\text{CH}_2\text{E}) + 46 \tau(\text{D}_2\text{Y}) + 2 \tau(\text{CH}_2\text{Y})$

TABLE VI. (Continued from previous page.)

Observed		Calculated	Assignments	PED (%)
IR	Raman			
800 w	792 w			
775 w	750 w			
762 w				
735 vs	734 w	730	$\nu(\text{CH}_2)$	59 $\nu(\text{CH}_2) + 30 \nu(\text{C}_\beta) + 13 \nu(\text{CH}_\beta)$
	710 sh			
667 vs	666 w	646	$\delta(\text{CC}_\beta)$	21 $S_{30} + 12 S_9 + 8 S_{32} + 6 S_6 + 5 S_7 + 5 (\text{OCO})_{\text{pm}}$
615 w	621 w	624	$\gamma(\text{C=O}, \text{Am VI})$	61 $\nu(\text{C=O}) + 13 \nu(\text{C}^\alpha) + 3 \tau(\text{CH})$
600 w				
552 vs	551 w	560	$\nu(\text{CO}_2^-)$	100 $\nu(\text{CO}_2^-)$
535 w, sh	541 w	539	$\delta(\text{C=O})$ Am VI	39 $\delta(\text{C=O}) + 20 \nu(\text{CH}) + 15 \delta_\beta(\text{C}_\beta)$ + 13 $S_5 + 13 S_{34}$
427 vs	447 s	454	$\nu(\text{CO}_2^-)$	38 $\nu(\text{CO}_2^-) + 34 S_{40} + 21 \delta_\beta(\text{C}_\beta) + 21 \nu(\text{CO}_2^-) + 8 S_{37}$
403 s, sh	407		$\tau(\text{C}_\beta)$ + $\tau(\text{C}_\beta \text{C}_\gamma)$	27 $S_{37} + 34 S_{40} + 13 S_{28} + 10 S_{29} + 2 S_{31}$
380 s	393 s		$\tau(\text{CH}_2)$	75 $\tau(\text{CH}_2)$ + 13 $\tau(\text{CH}_2)$ + 7 $\tau(\text{C=O}) + 4 \tau(\text{CH}) + 3 \tau(\text{CH}_2)$
330 w	326 w	327	$\delta(\text{CH}_2)$ + $\delta(\text{C}_\beta \text{H})$	31 $S_{28} + 10 \delta_{(2,3,4)} + 10 S_{29} + 17 \delta_{(1,2,3)} + 8 \tau(\text{CH})$
308 s	304 w	308	$\delta(\text{C}_\beta \text{C})$	43 $\delta_{(1,2,3)} + 23 \delta(\text{C=O}) + 10 \delta_{(2,3,4)} + 8 S_{27} + 4 S_{29} + 4 S_{28} + 3 S_{40}$
255 w	251 w	277	$\delta(\text{C}_\beta \text{C}_\alpha)$ + $\tau(\text{C}_\beta \text{C}_\delta)$	48 $S_{29} + 22 S_{28} + 10 S_{27} + 5 S_{27} + 4 S_{31} + 2 S_{30}$
220 w	225		$\tau(\text{C}_\beta)$ + $\tau(\text{C}_\delta)$	42 $S_{40} + 30 S_{37} + 14 S_{29} + 9 S_{28} + 7 \delta_{(1,2,3)} + 4 S_{31}$
		218	$\tau(\text{CH})$ Am VI	91 $\tau(\text{CH}) + 4 \tau(\text{C=O}) + 2 \tau(\text{C}_\beta \text{C}) + 2 \tau(\text{C}_\beta \text{C})$
164	152		$\nu(\text{C}_\beta \text{CO}_2^-)$	99 $\nu(\text{C}_\beta \text{C})$
136	152		$\delta(\text{C}_\beta \text{C}_\alpha)$	43 $S_{27} + 20 S_{29} + 20 S_{2,3,4} + 7 \delta_{(1,2,3)}$
116	146		$\tau(\text{C}_\beta \text{C})$	92 $\tau(\text{C}_\beta \text{C}) + 1 \tau(\text{CH})$
93				
76				
63				
26				
20				

A modified Urey-Bradley-type force field was used,¹⁶ in which were included intramolecular constraints such as κ , L , and P constants. When cyclic redundancies are eliminated, the new reduced set implies overall vibrations rather than of isolated ones and establishes definitively the potential-energy distribution (PED).

Force constants for the prolyl ring were taken from the works on PPI and PPII by Dwivedi and Gupta⁵ and Gupta et al.⁶

Symmetry coordinates for the glycyl and carboxylate groups are listed in Table III. Table IV gives the reduced set of 18 (3 N-6) symmetry coordinates for the "prolyl" group. These values have been determined by the program REDOND.¹⁷ "Tree" redundancies for the distorted methylene groups of the ring have been determined (Y. Ogawa, personal communication), and Table V displays the normalized symmetry coordinates for the β , γ , and δCH_2 prolyl groups.

The experimental and the calculated values for these frequencies are summarized in Table VI with their corresponding PED. These results correlate particularly well for frequencies such as amide band methylene deformations and for the prediction of a ring stretching frequency at 1567 cm^{-1} , which is observed at 1574 cm^{-1} in Raman spectroscopy with DCl, GP. However, the model for the prolyl group was taken from a tetrapeptide and does not necessarily correspond geometrically to the dipeptide. At lower frequencies, where overall vibrations of the ring occur, a good cor-

TABLE VII
Local Diagonal Symmetry Force Constants for Glycyl-L-Proline (in mdyn/Å and mdyn Å)

$F S_i S_i$		$F S_i S_i$	
1 1	4.55	23 23	0.58
2 2	4.1	24 24	0.83
3 3	6.41	25 25	1.12
4 4	6.33	26 26	1.13
5 5	4.43	27 27	0.78
6 6	4.32	28 28	1.23
7 7	4.09	29 29	0.86
8 8	4.23	30 30	0.84
9 9	6.18	31 31	1.80
10 10	8.49	32 32	1.74
11 11	4.94	33 33	1.13
12 12	5.47	34 34	1.34
13 13	5.76	35 35	1.71
14 14	4.92	36 36	0.95
15 15	11.93	37 37	0.24
16 16	4.76	38 38	0.56
17 17	4.76	39 39	0.72
18 18	4.95	40 40	0.213
19 19	0.62	41 41	0.56
20 20	0.6	42 42	0.71
21 21	0.62	43 43	0.57
22 22	0.87	44 44	0.75

relation appears for the 403-cm^{-1} (calc. 407-cm^{-1}), 326-cm^{-1} (calc. 327-cm^{-1}), and 255-cm^{-1} (calc. 277-cm^{-1}) bands.

Table VII gives the diagonal local symmetry force constants for the prolyl group.

In conclusion, the objective of our study was to apply the transferability property of force constants for different groups such as the prolyl ring to more complex structures such as tetrapeptides. We are currently involved in further explorations in this domain.

We are grateful to the Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses de l'Université de Lille II for the use of its facilities. G.V. would like to acknowledge NATO grant 1743 and the Fondation de la Recherche Médicale for its financial support during the course of this work. We thank John Eggert for assistance with the English text.

References

1. Ligant, P., Vergoten, G., Loucheux-Lefebvre, M. H. & Fleury, G. (1983) *Biopolymers* 22, 000–000.
2. Boussard, G., Marraud, M. & Aubry, A. (1979) *Biopolymers* 18, 1297–1331.
3. Fermandjian, S., Tran-Dinh, S. & Fromageot, P. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 399, 313–338.
4. Balasubramanian, R., Lakshminarayanan, A. V., Sabesan, M. N., Tegoni, G. & Ramachandran, G. N. (1971) *Int. J. Pept. Protein Res.* 3, 25–33.
5. Dwivedi, A. M. & Gupta, V. D. (1972) *Chem. Phys. Lett.* 16, 109–113.
6. Gupta, V. D., Singh, R. D. & Dwivedi, A. M. (1973) *Biopolymers* 12, 1377–1385.

7. Evans, J. C. & Wahr, J. C. (1959) *J. Chem. Phys.* **31**, 655-662.
8. Koenig, J. L. (1972) *J. Polym. Sci., Pt. D*, 59-177.
9. Smith, M., Walton, A. G. & Koenig, J. L. (1969) *Biopolymers* **8**, 173-179.
10. Dwivedi, A. M. & Gupta, V. D. (1972) *Biopolymers* **11**, 2091-2098.
11. Deveney, M. J., Walton, A. G. & Koenig, J. L. (1971) *Biopolymers* **10**, 615-630.
12. Destrade, C., Garrigou-Lagrange, C. & Forel, M. T. (1971) *J. Mol. Struct.* **10**, 203-219.
13. Machida, K., Kagayama, A. & Saito, Y. (1979) *J. Raman Spectrosc.* **8**, 133-138.
14. Wilson, E. B., Decius, J. C. & Cross, P. C. (1955) *Molecular Vibrations*, McGraw-Hill, New York.
15. Kuroda, Y., Saito, Y., Machida, K. & Uno, T. (1972) *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **45**, 2371-2383.
16. Shimanouchi, T. (1970) in *Physical Chemistry*, Vol. 4: *Molecular Properties*, Academic Press, New York.
17. Tabacik, V. (1973) Program Redond, University of Montpellier, France.

Received February 2, 1982

Accepted August 4, 1982

47101 kb 021 tk a1
b3207-biopol-mar

INTRODUCTION AUX B-TURNS

Le champ de force UREY-BRADLEY affiné par les calculs préliminaires sur les dipeptides est transposé à des édifices plus complexes tels les tri et tétrapeptides adoptant des conformations repliées.

A partir des fréquences expérimentales obtenues sur le tripeptide Glycyl-L-ProlylGlycylGlycine (et sur son homologue N et C protégé ZPGGGOMe) adoptant une structure en coude B II à l'état solide ou en solution dans le DMSO ou le Chloroforme, un calcul de fréquences a été réalisé. La bonne concordance des fréquences calculées et expérimentales nous permet dans un premier temps d'analyser la composition des vibrations amide et de comprendre les effets spécifiques de la conformation, des interactions dipolaires, des effets répulsifs entre atomes non liés particulièrement importants dans de telles structures repliées.

Ce travail est rapporté en détail dans le chapitre ayant trait au turn B II.

Si le champ de force est réellement transférable à des structures similaires, les calculs théoriques ne partant que des paramètres obtenus grâce au B turn II, doivent nous donner des prédictions de fréquences de vibration amide relativement correctes.

Ce travail est rapporté dans le chapitre traitant des B-turns I, III et I', II', III' (G-D-PGG D étant le D résidu amino acide).

A ce stade, la comparaison de nos prédictions théoriques aux résultats expérimentaux obtenus par divers auteurs est déterminante. Le second chapitre nous montrera que la transposition du champ de force est tout à fait justifiée.

Si donc, il est possible de simuler des spectres de vibration on peut attendre de dégager des corrélations entre fréquences vibrationnelles et conformations.

Ceci est réalisé dans le chapitre traitant de la relation du type L ORD = f(U) où U est l'angle dièdral de la liaison CC .

La vibration amide III est un mode très complexe de vibration et elle est à ce titre particulièrement importante car ne dépendant que de la conformation locale.

Enfin, dans un dernier temps, nous tenterons de voir jusqu'où la transférabilité du champ de force s'exerce. Ceci est fait dans le dernier chapitre où nous analysons une structure appelée C7C5 (la partie C7 étant encore appelée Y turn). Cette structure avait été envisagée au début de nos expérimentations car elle nous semblait probable pour le tripeptide GPGG.

Les calculs théoriques prenant les mêmes paramètres (constantes de force) que pour les B turns, nous ont conduit à des prédictions que nous avons essayé de dégager de résultats expérimentaux rapportés par d'autres auteurs, particulièrement sur l'octapeptide ANGIOTENSINE II Humaine. La technique de spectrométrie RAMAN apparaîtra à ce moment comme un très utile complément (et même parfois à l'efficacité supérieure) à la méthode physique de Résonance Magnétique Nucléaire. Cependant ces deux techniques n'analysent pas les mêmes données, aussi il apparaît évident que deux méthodes d'analyse valent mieux qu'une.

A la lumière des études RAMAN et RMN, nous proposerons et discuterons de la conformation de cette Hormone.

D'autres études physicochimiques sur la conformation de peptides N-Glycosylables sont actuellement en cours. Ces études expérimentales sont en symbiose avec nos études théoriques; Elles constituent la finalité du travail qui est maintenant exposé.

Introduction au coude β de type II

Ce chapitre traite de la simulation des fréquences de vibration (principalement celles provenant des groupes amide) pour un tripeptide Glycyl-L-Prolyl-Glycylglycine (GPGG) qui adopte une conformation en coude β II dans le solvant DMSO.

A partir de l'identification expérimentale des bandes amide, obtenues en s'aidant des déplacements de fréquence lors des N et C deutérations, nous avons simulé le spectre expérimental de GPGG en utilisant au départ les constantes de force obtenues à partir de l'étude des deux dipeptides précédemment décrits.

Le champ de force (constantes de force) a été affiné pour obtenir le meilleur accord possible entre fréquences expérimentales et fréquences calculées.

Le traitement des coordonnées normales nous permet d'une part:

- *D'examiner la distribution d'énergie potentielle (PED) et de connaître la composition des vibrations

- *De faire la part de l'origine des déplacements des fréquences des groupes amide engagés dans une conformation particulière, plus exactement de donner les contributions au potentiel total des potentiels provenant des interactions dipolaires (amide I), des interactions non liantes entre paires d'atomes, et du potentiel dû aux liaisons intra ou intermoléculaires.

D'autre part :

- *D'affiner les constantes de force qui seront transférées à d'autres conformations similaires pour un calcul totalement théorique.

RAMAN SPECTROSCOPY AND NORMAL VIBRATIONS OF PEPTIDES

CHARACTERISTIC NORMAL MODES OF A TYPE II β -TURN

P.LAGANT, G.VERGOTEN, G.FLEURY, M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE

Institut de recherche sur le cancer U124 INSERM

BP 311 59020 LILLE cedex FRANCE

Laboratoire de Physique Faculté de Pharmacie de LILLE

3 rue du Pr LAGUESSE 59045 LILLE cedex

Centre de technologie Biomédicale INSERM snc4

13,17 rue C.GUERIN 59800 LILLE cedex FRANCE



SUMMARY

Raman and infrared spectra have been recorded on the peptide Gly-L-Pro-GlyGly in its zwitterionic form and on its protected homolog ZGly-L-Pro-Gly-Gly-OMe (Z= N-Benzylloxycarbonyl and OMe Methyl ester). Both peptides adopt a type II β -turn II conformation into appropriate solvents, that is in DMSO-d6 and CHCl3 respectively.

A normal coordinate treatment has been performed on Gly-L-Pro-Gly-Gly using a modified UREY-BRADLEY force field and the characteristic normal modes of vibrations. Their corresponding frequencies have been extracted from experimental investigations.

INTRODUCTION:

β -turns are important conformational features of proteins and peptides. Such structural occurrences would help to explain important biological mechanisms ,as for example in the N- glycosylation phenomenon (1) in which the reverse turn could play the role of a recognition site (2).

Considerable work has been devoted to the study of β -turns (3,4).More recently,different papers were published concerning their study by NMR (5,6,7,8),circular dichroism (9,10) ,infrared and Raman spectroscopy (11,12),and normal modes calculations (13,14,15).

In the present work,we report the experimental and theoretical investigations we carried out on a β turn consisting of four amino acid residues numbered sequentially i to $i+3$ and taking up a C_{10} conformation characterized by the existence of an internal hydrogen bond between the i and $i+3$ residues and specific values of ϕ and ψ angles (Fig1).Our purpose is to relate vibrational group frequencies to a particular set of (ϕ,ψ) dihedral angles.

Therefore,we studied the Gly-L-Pro-Gly-Gly zwitterion peptide and its protected ester homolog Z-Gly-L-Pro-Gly-GLY-OMe which adopts a type II β -turn(17) conformation into Dimethyl sulfoxide (DMSO-d6) and CDCl₃ respectively (5)(Fig I). This is well justified by the high frequency of occurrence of Pro in the $i+1$ position of β turns in proteins (3,18) and because the sequence L-Pro-Gly leads to β turn of type II (8).

	Φ_2	Ψ_2	Φ_3	Ψ_3	Φ_4	Φ_1	Ψ_1
<hr/>							
GPGG	-60°	160°	80±5°	+20°	165±5°	-149°	145°
ZGPGGOMe	-60°		80±5°		75°		
Standard							
values	-60°	120°	80°		0°		
ref(16)							

TABLE I

In this paper, the infrared and Raman spectra of these two peptides were recorded and the assignments of the different bands were accomplished using the N and C specifically deuterated peptides.

The normal modes frequencies were calculated using a modified UREY-BRADLEY force field , the force constants of which were refined using the experimental frequencies.

Such a reverse turn was also previously observed for a peptide in its zwitterion form for CPLG which was studied by TOMA et Al (6) by NMR. This peptide exhibits into DMSO-d6 a type I B-turn conformation stabilized by a end to end interaction of the charges.

MATERIAL AND METHODS

Raman spectra have been recorded using a T 800 triple monochromator CODERG. A 500 mw power of the 514.5 nm line of an Argon ion LASER was used as the exciting source.

Spectral resolution was in the 5-8 cm⁻¹ range for the solid and solution samples respectively.

Infrared spectra were obtained with a FT IR 7190 NICOLET using KBr disks for solid samples and differential spectra from DMSO-d6 were obtained using an 1 mm length NaCl cell.

Peptides were purchased from SIGMA and purity was checked using ¹³C and H¹ NMR (5).

N-deuteration of Gly-L-Pro-Gly-Gly was obtained by successive (4 to 5) dissolutions and lyophilizations from D₂O solutions.

Selective C deuterations of the third and fourth Glycine residues of Z-Gly-L-Pro-Gly-Gly-OMe was performed as described by B. PERLY following a method previously described (5).

For the N-deuteration ,Z-Gly-L-Pro-Gly-Gly-OMe was firstly dissolved in a CH₃OD-NH₄OD solution ,then the solvent was completely evaporated under vacuum. This process was repeated several times (4to5) before the peptide dissolution into CDCl₃.

Solid state spectra always displays the same vibrational frequencies whatever the way used to obtain the sample,either by precipitation (acetone) or by cristallization from H₂O (D₂O) and DMSO-d6 solutions.

DMSO-d6 exhibits no strong vibrational bands into the 1150-1750 cm⁻¹ region.

Normal coordinate treatments were performed using the CVOA program (Pr T.SHIMANOUCHI ,TOKYO).A modified UREY-BRADLEY type force field was used.Primitive force constants and the new reduced symmetry coordinate set for the prolyl ring were obtained from previous works onto dipeptides(19,20).

The peptide model used in these calculations is shown Fig 1.

The dihedral angles at residues 2 and 3 are corresponding to the "standard" values given by VENKATACHALAM (17) (ϕ_{12}, ψ_{12}) = $-60^\circ, 120^\circ$ and (ϕ_3, ψ_3) = $80^\circ, 0^\circ$ in fair agreement with the values found by NMR (5). At the residues 1 and 4, the dihedral angles are those corresponding to an antiparallel pleated sheet that is (ϕ_1, ψ_1) = (ϕ_4, ψ_4) = $-139^\circ, 135^\circ$. In the calculations, the NH group of the $i+3$ th residue was considered as included in a hydrogen bond (Fig 1) while the NH group of the residue $i+2$ is considered as being free.

Additional potentials were taken into account, including dipolar effects (V1), non bonded atom pairs (V2) and terminal group electrostatic interactions (V3).

RESULTS:

A) GLY-L-Pro-Gly-Gly:

RAMAN and IR spectra of the 'solid Gly-L-Pro-Gly-Gly (GPGG) tripeptide and the crystallized GPGG N-d5 are shown in Fig2-4

In the amide A region (NH stretching), the IR spectrum of the undeuterated sample exhibits a sharp band at 3286 and a broad one to 3460 cm⁻¹. They are assigned to the hydrogen bonded and free NH amide group respectively (Fig 1). The shoulder at 3260 cm⁻¹ is due to the NH3+ group stretching vibration and is shifted to 2450 cm⁻¹ by N-deuteration. Complete N-deuteration of the hydrogen bonded NH was unsuccesfull.

In the amide I region (1600-1700 cm⁻¹), which is essentially due to the C=O stretching vibrations, the IR solid state spectra (Fig 2) exhibits relatively complex frequencies i.e there are more bands than carbonyl groups present in the molecule .

These bands appear (IR) at 1685, 1677, 1660 and 1647 cm⁻¹. The two bands at lower frequencies exhibit a twice higher intensity than the others. The corresponding RAMAN frequencies are observed at 1697, 1674, 1655 and 1647 cm⁻¹, the first and third of them being not easily seen. Such slight shifts between the IR and Raman frequencies would be explained in a first approximation by the presence of dipolar interactions due to the crystal nature of the peptide. However, PLETNEV et al (21,22) consider the 1679 cm⁻¹ band they observed for Isoleucynomycin as due to the presence of dimethylformamide impurities arising from peptidic synthesis. No such fact was seen by NMR studies (5). New argumentation will be given below.

The 1635 and 1615-1620 cm⁻¹ IR bands (Fig 2) were assigned to the NH3+ deformation and ,as expected, they disappear on N-deuteration.

In the amide III region two bands disappear upon N-deuteration at 1285 and 1255 cm⁻¹ (IR) (fig 2) and at 1287 and 1255 cm⁻¹ (Raman). The lowest frequency band disappears quickly while the highest frequency one needs several steps into N-deuteration.

Into DMSO-d₆, where the GPGG tripeptide adopts a type II β turn conformation (5), a strong and broad band appears at 1663 cm⁻¹ as observed in the differential IR spectrum (fig 5a) with shoulders at 1647, 1654, and 1697 cm⁻¹. The RAMAN spectrum displays a similar feature with bands at 1645, 1666, 1678 and 1695 cm⁻¹ (fig 6)

NMR studies however have shown the participation of a very little effect of the Gly₁-Pro₂ and Pro₂-Gly₃ cis-trans isomerisms (<10%) into DMSO-d₆ which can not be responsible of the 1678 cm⁻¹ peak.

Comparison with the ZGPGGOMe amide I frequencies lead us to do the following assignments for the GPGG amide I modes, that are 1687 cm⁻¹ for CO(2), 1657 cm⁻¹ for CO (1) and 1647 cm⁻¹ for CO (3).

Fig 5b shows the IR differential spectrum of GPGG into DMSO-d₆ in the amide A region and Fig(6) the Raman amideIII region in the same solvent. As in the solid state, the 3286 cm⁻¹ (amideA) and 1288 cm⁻¹ (amide III) bands disappear slowly by N-deuteration. So, we can assign these vibrations to a hydrogen bonded NH amide group. At the opposite, the 3460 and 1255 cm⁻¹ frequencies were assigned to the analogous vibrations of a free (or solvated) NH amide group (23).

These experimental results disagree regarding the high predicted amide III frequencies previously made by different authors (13,14) in the 1350-1300 cm⁻¹ range.

No such high amide III frequencies were observed for GPGG ; the 1315 to 1303 cm⁻¹ shift observed by N-deuteration (fig 6) has been related to a terminal methylene group twisting vibration. Such an effect has already been observed by us on dipeptides (19-20).

However our calculations will predict a contribution of the amide III vibration of N H (II) (fig 1) to the terminal methylene group vibration wag(C H₂) at 1346 cm⁻¹ (observed at 1348 cm⁻¹ for GPGG N-d5 in its crystalline form).

So a relationship between the calculated amide III frequencies (pure or principal contribution) and the dihedral angle has been found (23).

Caution must be taken to determine the free NH character in the amide A region;Indeed, the GPGG tripeptide is only solubilized in DMSO when lyophilized previously ,so, the presence of residual water can be expected giving rise to some vibrations in the 3570-3400 cm⁻¹ range.

*As well known, N-deuteration is a powerful method to make sure the assignments on the NH amide modes of vibration and their relative contributions in mixed modes.

More especially, the examination of the IR amide A' region for the GPGG N-d5 solid sample (Fig 2) shows two kinds of bands near 2580 cm⁻¹ and in the 2460-2420 cm⁻¹ region.These bands would correspond to the "free" and bound amide ND stretching vibrations respectively. Moreover, in this last range and in the 2260-2220 cm⁻¹ region, specific vibrations of the ND₃⁺ group occur.

For the N-deuterated GPGG zwitterion,only one intense dissymmetric band at 975 cm⁻¹ in RAMAN (fig4a) or at 965 cm⁻¹ (IR) (fig2) appears upon N-deuteration.Examination of the 975 cm⁻¹ RAMAN band in the crystal form of GPGG N-d5 shows a weak shoulder in the lowest frequency side at 955-957 cm⁻¹ (fig4).

In order to make sure the amide III assignments to 1286 cm⁻¹ for NH(II) and 1255 cm⁻¹ for NH(I) groups, the experimental shifts upon N-deuteration would have to be usefully corroborated to the normal coordinate treatment.

Normal coordinate treatment give the calculated amide III' at 980 cm⁻¹ for N D(II) and at 954 cm⁻¹ for N D(I). Another contribution is calculated at 1085 cm⁻¹ (observed at 1093 cm⁻¹ in RAMAN). This last complex contribution is partially due to a mixing of C C_α stretching, CNC_α bending and N D bending vibrations.

* Amide V (and V') originates from the out of plane N-H (N-D) bending. These vibrations are of interest to relate frequencies to particular conformations.'

IR spectra of solid N-deuterated GPGG shows partial disappearance of the 757, 730, and 680 cm⁻¹ peaks and appearance of the 495cm⁻¹ band (am V'). Calculated frequencies would assign the 723cm⁻¹ frequency to the NH(II) amide V mode (calculated at 502 cm⁻¹ for Am V' and observed at 495 cm⁻¹), with calculated contributions at 685 and 701cm⁻¹. The γNH(I) out of plane bending is however calculated to a higher frequency i.d., 771 cm⁻¹ (Am V' calculated at 596 cm⁻¹). This out of plane vibration of the "free" NH(I) group is somewhat complicated by an out of plane γ(C=O) bending mode (Am VI mode).

Normal coordinate analysis of the observed 757 cm⁻¹ frequency mode (calculated at 768 cm⁻¹) gives contribution of skeleton bending vibrations (CNC) and (CNC_α) which are pertubated when N-deuteration occurs (decrease in intensity).

Amide IV and VI principally originate from the C=O in plane and out of plane bendings respectively. Calculated normal modes lead us to assign the following frequencies :Am IV δ(C₁₂=0) 662 cm⁻¹, δ(C₃=0) 624 cm⁻¹, δ(C₆=0) 604cm⁻¹ and 538,614,582 cm⁻¹ to γ(C₁₂=0), γ(C₃=0), γ(C₆=0) respectively.

B) Z-Gly-L-Pro-Gly-Gly-OMe:

Infrared and RAMAN spectra of the solid Z-Gly-L-Pro-Gly-Gly-OMe (ZPGGGOMe) are shown into fig 7,8 . These spectra were recorded onto films cast from solution into CDCl₃ where the peptide adopts a 100% type II β turn (5).

Spectra of specifically α -deuterated analogs in position 3 and 4 of ZPGGGOMe , Z-Gly-Pro-(²H)Gly-Gly-OMe and Z-Gly-Pro-Gly (²H)Gly-OMe, were also recorded and fig 9-10 display their IR and RAMAN spectra.

In the amide I range, ZPGGGOMe exhibits five bands at 1740, 1720, 1695, 1659, 1642 cm⁻¹ (IR) and at 1731, 1716, 1694, 1656, 1639 cm⁻¹ (Raman) are assigned to the carbonyl methyl ester, urethane, and the three amide groups carbonyl stretchings respectively. Analysis of the perturbation in intensity undergone by the carbonyl groups by specifically α -deuterated tetrapeptide (fig 10,11) lead us to attribute the 1694, 1656 and 1636 cm⁻¹ frequencies to the Pro₂Gly₃, Gly, Pro₂ and Gly₂Gly₃ amide I vibrations respectively. These bands shift to 1685, 1652, 1641 cm⁻¹ (Raman) and to 1680, 1650 and 1640 cm⁻¹ (IR) after N-deuteration.

The amide II region displays two bands in the 1540-1560 cm⁻¹ range whose intensities decrease strongly upon N-deuteration while the amide II' region displays appearance of strong IR bands in the 1440-1480 cm⁻¹ range. Such an increase in intensity is not unusual. Bands at 1290-80, 1255 and 1217 cm⁻¹ (IR fig 7) and 1285, 1255, 1230 cm⁻¹ (Raman) (fig 8) disappear onto N-deuteration and they may be assigned to the amide III vibrations. These bands are difficult to put in evidence from the prolyl methylene groups vibrations. Normal treatments onto GPGG N-dS give prediction of amide III' vibration of (NH)Gly₄ both at 1085 and 974 cm⁻¹;

The first band appears experimentally as a sharp peak to 1090 cm⁻¹ in ZPGGGOMe (IR) but the lowest frequency one is not easily seen into the tetrapeptide spectrum (975 cm⁻¹ for GPGG zwitterion). The 1090 cm⁻¹ band is in part due to a mixing of the terminal methylene group vibration with the amide III' mode.

So from our theoretical treatments we can assign the 1290, 1255 and 1217 (1230 cm⁻¹ Raman) frequencies to the amide III modes of NH(Gly)₄, NH(Gly)₃ and to the hydrogen bonded NH urethane respectively.

Complete N-deuteration (see the experimental part) was unsuccessfull as we can see in the amide A region . The 3460, 3340, 3290 cm⁻¹ (IR fig7) and 3362, 3316 (RAMAN fig8b) bands shift into the 2420-2480 cm⁻¹ region (Am A') on N-deuteration. The amide B (3100 -3080) and the amide V (680-730) cm⁻¹ regions do not mark great changes in intensity upon N-deuteration.

* When dissolved into DMSO-d₆ ,ZPGGGOMe shows principally two kinds of spectra in the amide I range. About 30 mn are spent between the two recordings a and b (fig12).NMR studies (5) have put in evidence the destabilization of the type II B turn when dissolution in DMSO-d₆ occurs.

As expected, the spectrum recorded just after the dissolution (Fig 12 a) is reminiscent of the one obtained in the solid state (Fig8) and is characteristic of a type II B turn.The spectrum recorded 30 minutes later shows important pertubations in both the amide I and III modes (Fig 12 b),the frequencies of which are now characteristic of a desorganized structure.

Bands arising from the methyl ester carboxylate end would give contributions in the 1260-1230 cm⁻¹ region (γ (C-O) and γ_a (C-O-C) ,1050 cm⁻¹ for γ_s (C-O-C) and in the 645-630 cm⁻¹ for δ (CO₂).Another band at 1480-70 cm⁻¹ would be due to the δ (OMe) vibration.

* Effects of specifically α -deuterations of ZGPGGOMe on the Raman spectra have to be compared with the unlabelled peptide frequencies fig 10. For the Gly₃ labelled sample (Fig 10) the bands at 1427, 958, 883, 826, 570 and 539 cm⁻¹ disappear onto deuteration while bands at 904, 804 (weak) appear. It is interesting to compare these results with the calculations we carried out for the GPGG zwitterion and which allow us to do the following assignments: $\delta(\text{CH}_2)$ gly₃ at 1485 cm⁻¹, wag(CH_2)gly₃ at 1435 cm⁻¹ tw(CH_2)gly₃ at 1367 cm⁻¹ and r(CH_2) gly₃ at 843 cm⁻¹ (observed at 888 cm⁻¹ where there is a small contribution of $\delta(\text{C}_6=\text{O})_{\text{Pro}}$).

For the Gly₄ labelled sample (fig 11) bands at 1344, 1302, 1140-25 859, 527 cm⁻¹ disappear while a strong band at 871 cm⁻¹ appears. Calculated values for GPGG would give the following assignments: 1337 cm⁻¹ for wag(CH_2)gly₄, 1311 for tw(CH_2)gly₄, 942 cm⁻¹ for r(CH_2)gly₄ and 1480 cm⁻¹ for $\delta(\text{CH}_2)$ gly₄.

In the case of a FERMI resonance involving the 859 and 883 cm⁻¹ frequencies (intensities are 1 and 2 respectively) the frequency of the unperturbed frequency would be calculated at about $\nu^* = 857$ cm⁻¹ ($r(\text{CH}_2)_4$). For GPGG zwitterion where this methylene group has a greater degree of liberty, this normal mode is calculated to 942 cm⁻¹.

NORMAL COORDINATE TREATMENT:

Table I gives the calculated frequencies for the GPGG zwitterion peptide and their corresponding PED. These normal mode calculations have been performed using experimental frequencies obtained from a 5% solution in DMSO-d₆. -110-

NMR studies (5) have put in evidence the presence of a hydrogen bond between the i and i+3 residues to form a type II B-turn structure (C_{10} conformation fig 1). The NH group of the third residue has been shown as being "free" but the NH group of the fourth residue is included in an intramolecular hydrogen bond.

In order to draw more educated conclusions from these results, let us now consider some vibrations; concerning the amide III modes, Fig 6 allows to observe a decrease in intensity of the 1244-1255 cm⁻¹ and 1288 cm⁻¹ Raman frequencies by N-deuteration of ZPGGGOMe. The normal coordinate treatment does not give such a low frequency contribution at 1240 cm⁻¹ to the amide III mode for the 1255 cm⁻¹ band in despite of the fact that this contribution exists for others turns (as type I and III and for G-D-PGG)(24). However DMSO is well known to solvate strongly the free amide NH groups. Our calculations have been carried out in order to calculate the free NH amide III mode at 1257 cm⁻¹ to fix in the same time the 1288 cm⁻¹ frequency of the intramolecularly hydrogen bonded group NH(Gly)₄. So, in our mind, the 1240-44 cm⁻¹ band decrease in intensity (put in evidence upon N-deuteration) could be related to the existence of an equilibrium between two states of the NH group of the third Gly residue, free and solvated, since it is well known that DMSO strongly solvates the free amide NH groups.

Previous works, principally those carried out on the C-terminal part of oxytocin Pro-Leu-Gly-NH₂ (type II B turn) by HSEU and CHANG (11), FOX & al (12), and NAIK et al(13) relate the presence of bands at 1235, 1255-65 , 1285 cm⁻¹ (and 1320cm⁻¹ for ref 13) which would be assigned to the amide III modes.

Therefore we must consider the conditions in which the spectrum was recorded, i.e the state of the sample (solid, crystal, solution) as well as the spectral resolution to obtain the best assignments of the frequencies.

The IR experimental values of the amide I mode in the solid state (fig) are observed at 1685,1677,1660 and 1647 cm⁻¹ . The calculations were performed from these values considering that a FERMI resonance can exist in DMSO-d6. (see below). Dipolar interactions between carbonyl groups and the non-bonded atom pair potential have been included. The value of the dipolar moment ($\delta\mu/\delta S = 12.6$ Debye/Å where μ is the dipolar moment) was taken from a previous work (19). The $f_{R_i R_j}$ force constants (R_i, R_j are the internal coordinates of the C=O amide I vibration) were included into our calculations according the KRIMM's method (15,16).

Analysis of the Jacobian contributions allows us to distinguish between the dipolar and non-bonded interaction effects onto the frequencies values. Table II gives these calculated contributions.

Calc.	1684	1654	1646
Exp	1687	1657	1647
Assign.	(C=O)Pro ₂	(C=O)Gly ₁	(C=O)Gly ₃
 calculated			
dipolar	*	+10	-1
effects (cm ⁻¹)			+5
 calc. non bonded			
interactions		+9	+11
effects (cm ⁻¹)			+3

*with $f_{C=O_1, C=O_2} = -0.031$

$f_{C=O_1, C=O_3} = -0.095$ D/Å and $\delta\mu/\delta S = 12.6$ D/Å

$f_{C=O_2, C=O_3} = 0.21$

TABLE II

Into DMSO-d₆, the RAMAN and IR amide I bands of GPGG are observed at 1695, 1666-1678, 1645-50 cm⁻¹ and at 1695, 1665, 1654 cm⁻¹ respectively (fig 5,6). Comparing with the solid state spectrum (Fig 5 and 2) of GPGG, one can observe that the 1677 cm⁻¹ band disappears in the IR spectrum of GPGG in DMSO-d₆. As the cis-trans isomerism around the Gly-Pro₂ (or in Pro₂Gly₃) bond in a weak proportion (5) this last effect does not explain the strong 1677 cm⁻¹ shoulder of the 1687 IR cm⁻¹ band whose intensities are comparable while the 1657 and 1647 cm⁻¹ ones are twice in intensity. From the 1677 cm⁻¹ (intensity 1) and the 1657 cm⁻¹ band (intensity 21), the effect of a FERMI resonance would positionne the non pertubated frequency to about 1664 cm⁻¹.

Such an effect is not astonishing to consider for the C=O stretching mode into a molecule having no symmetry. Often are implied harmonics for the pertubating band which would positionne approximatively to 832 cm⁻¹ in the region of the r(CH₂) vibrations.

Cristal state effects would not explain the similarity between the RAMAN and IR frequencies (and intensities) of GPGG when we compare with the corresponding amide I vibration of ZGPGGOMe. Such an effect can be easily seen when we observe ZGPGGOMe into DMSO-d₆ (fig 12).

As seen by NMR studies (5), the B-turn II structure is not retained into DMSO-d₆. Fig 12 displays the amide I and III region of ZGPGGOMe just after dissolution into DMSO (part a) and part b displays the same region thirty minutes after. Comparison of the two kinds of spectra shows a slow desorganization of the B-turn structure into DMSO-d₆.

EFFECTS OF HYDROGEN BONDS AND OTHER INTERACTIONS:

The effects of the various potentials such as hydrogen bond, C=O dipolar interactions, non bonded atoms pair interaction and terminal group electrostatic interactions are of interest to discuss in more details to examine the differents shifts in frequencies accompanying the disappearance of the B-turn structure.

For the amide I vibrations, the $\gamma(C=O)$ Pro 1688 cm⁻¹ frequency would shift at 1669 cm⁻¹ upon the β -turn destruction (loss of contacts -9 cm⁻¹ and loss of dipolar interactions -10 cm⁻¹) (see table II). The 1656 cm⁻¹ frequency would shift at 1646 cm⁻¹ and the 1647 cm⁻¹ one is downshifted to 1639 cm⁻¹.

For ZCPGGGMe into DMSO, the 1692 cm⁻¹ band (fig 12) may arise from the urethane group. Other calculated effects such as hydrogen bonds are somewhat rather weak (-3 to -5 cm⁻¹ per H bond).

Amide II vibrations are very sensitive to the state of hydrogen bond and to the contact effects of the non-bonded atoms. For the (NH)Gly₄ group, disappearance of the intramolecular hydrogen bond would shift by about -40 cm⁻¹ the amide II frequency. In another part, if the contacts are lost, a -17 cm⁻¹ shift occurs while the terminal electrostatic part would arise the frequency by 9 cm⁻¹ and the Gly₄ amide II frequency would decrease to 1529 cm⁻¹.

The 1546 cm⁻¹ (IR) frequency of the (Gly)₃ amide II mode would increase by 10 to 20 cm⁻¹ (H (NH---O) +0.02 to 0.05 mdyn/Å) upon formation of an external hydrogen bond while loss of contacts (loss of the β -turn structure) would decrease by -10 cm⁻¹ this frequency; the electrostatic part gives a -3 cm⁻¹ contribution when the β -turn structure is lost. So, the NH Gly₃ amide II frequency would be in the 1545-1550 cm⁻¹ range when external hydrogen bonds (solvation) would destroy the folded structure.

The amide III region displays a great sensitivity to the state of hydrogen bond i.e. loss of the C₁₀ conformation would decrease the amide III NH(Gly)₄ frequency by -13 cm⁻¹ (hydrogen bond), by -24 cm⁻¹ (loss of contacts) and by -3 cm⁻¹ for the electrostatic contribution of the terminal groups. So loss of the β -turn conformation would decrease the Gly₄ amide III frequency in the 1245-1250 cm⁻¹ range. External hydrogen bond on the NH(Gly)₃ would increase the amide III by 8 to 15 cm⁻¹. If the 1240-44 cm⁻¹ band of GPGG into DMSO-d6 is due to the NH "free" group, the corresponding "solvated" group would be in the 1250-1259 cm⁻¹ range, but the β -turn structure destruction would decrease this frequency by 10 to 15 cm⁻¹.

For the corresponding IR amide III' vibrations, external hydrogen bond would arise the 954 cm⁻¹ frequency (NH Gly)₃ to 970 cm⁻¹. This fact may be related with the dissymmetric amide III' band observed in the cristal form of GPGG N-d5 (fig4).

The low frequency region is of interest to consider. A pure hydrogen bond vibration onto NH(Gly)₄ is calculated at 126 cm⁻¹ (and at 21 cm⁻¹). For the NH(Gly)₃, external hydrogen bond would be predicted at 143 cm⁻¹ (linear bend). Such effects of external hydrogen bonds (originating from cristal structure or from the solvent) are of interest, despite their various strengths and have been studied by AUBRY et al(25) for the solvation of B-turns and by GENEST et al(26) in their empirical calculations onto the water-peptide interactions.

CONCLUSION:

Conformational dependent frequencies of a B turn II structure have been predicted and examination of the Potential Energy Distribution and the corresponding Jacobian explained the composition of the observed amide frequencies. So, our calculations were performed using an "isolated" peptide model with no side chain (apart the imino residue) to give the principal contributions of the skeleton vibrations. Further works (22) will attempt to transfert the force field to similar conformations. In this case Raman spectroscopy may be an usefull complement of other technical ways of investigations onto peptide structures.

REFERENCES

- 1) J.P AUBERT, N. HELBECQUE, M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE
Arch.Biochem.Biophys (1981) 208 20-29
- 2) J.P AUBERT, M. CHIROUTRE, J.P KERCKAERT, N. HELBECQUE , M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE Biochem.Biophys.Res.Commun (1982) 104 1550- 1559
- 3) J.A SMITH ,L.G PEASE Crit.Rev.Biochem (1980) 8 315-399
- 4) C. TONIOLDI Crit.Rev.Biachem (1980) 1 1-44
- 5) B. PERLY, N. HELBECQUE, A. FORCIONI, M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE
Biopolymers In Press
- 6) F. TOMA,LAM-THANH HUNG,F. PIRIOU,M.C HEINDL,K. LINTNER,S. FERMANDJIAN Biopolymers (1980) 19 781-804
- 7) R. MAYER,G. LANCELOT J.A.C.S (1981) 103 4738-4742
- 8) L.M GIERASCH,C.M DEBER,V. MADISON,C.H NIW,E.R BLOUT
Biochemistry (1981) 20 4730-4738
- 9) S. BRAHMACHARI,V.S ANANTHANARAYANAN,S. BRAHMS,J. BRAHMS, R.S RAPAKA, R.S BHATNAGAN Biochem.Biophys.Res.Commun. (1979) 86 605 612
- 10) S. BRAHMS,J. BRAHMS J. Mol.Biol (1980) 138 149-178
- 11) T.H HSEU,H. CHANG Biochim.Biophys.Acta 624 (1980) 340-345
- 12) J.A FOX,A.T TU,V.J HRUBY,H.I MOSBERG Arch.Biochem.Biophys (1981) 211 (2) 628-631
- 13)V.M NAIK,J. BANDEKAR,S. KRIMM VII ITH ICORS OTTAWA Aug.1980
- 14) J. BANDEKAR,S. KRIMM, Proc.Natl.Acad.Sci US. 76 (2) 774-777 (1979)
- 15) S. KRIMM,J. BANDEKAR Biopolymers (1980) 19 1-29
- 16) J. BANDEKAR,S. KRIMM Biopolymers (1980) 19 31-36
- 17) C.M VENKATACHALAM Biopolymers (1968) 6 1425-1436
- 18) P.Y CHOU,G.D FASMAN (1977) J.Mol.Biol. 115 135-
- 19) P. LAGANT,G. VERGOTEN,G. FLEURY,M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE
Biopolymers in press

20) P. LAGANT, J.P. HUVENNE, G. VERGOTEN, G. FLEURY, M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE, P. LEGRAND

Biopolymers in press

21) PLETNEV V.Z., GALITSKII NM, IVANOV V.T., OVCHINNIKOV V.T., YU A.

Biopolymers 18 2145-2166 (1979)

22) PLETNEV V.Z., GALITSKII G.D., G.D. SMITH, C.M. WEEKS, W.L. DUAX

Biopolymers 19 1517-1534 (1980)

23) P. LAGANT, G. VERGOTEN, G. FLEURY, M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE

To be published

24) P. LAGANT, G. VERGOTEN, G. FLEURY, M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE

To be published

25) A. AUBRY, B. VITOUX, G. BOUSSARD, M. MARRAUD

Int.J.Pept.Prot.Res 18 (1981) 195-202

26) M. GENEST, F. VOYELLE, M. PTAK Biochimie (1981) 63 941-944

ACKNOLEDGMENTS:

We are grateful to Dr W.L. PETICOLAS (EUGENE OREGON UNIVERSITY USA) for his helpful suggestions for N-deuteration of protected peptides.

The authors thanks the C.U.M.A (Centre Universitaire de Mesures et d' Analyses Faculty of Pharmacy LILLE FRANCE) for the Infrared recordings on peptides.

TABLES AND FIGURES CAPTIONS

FIG 1 : Internal coordinates of GPGG

FIG 2 : Infrared spectra of solid GPGG and crystallized GPGG in the 1800-400 cm⁻¹ region (b) and in the amide A region (a).

FIG 3 : RAMAN spectrum of GPGG in the solid state.

FIG 4 : RAMAN spectra of GPGG N-d5 (crystal)(4a) and the corresponding low frequencies region (4b).

FIG 5 : Infrared Differential spectra of GPGG into DMSO-d6
5a) Amide I region and 5b) Amide A region

FIG 6 : RAMAN spectra of GPGG and GPGG N-d5 in DMSO-d6
6a) Amide I and 6b) Amide III ranges

FIG 7 : IR spectra of ZGPGGOMe (a) and N-deuterated ZGPGGOMe (b). (films cast from CHCl₃)

FIG 8 : RAMAN spectrum of solid ZGPGGOMe (from CHCl₃) 8a) High frequency and amide A regions b) The 1200-1350 cm⁻¹ range of N- deuterated ZGPGGOMe.

FIG 9 : IR spectra of the C-deuterated ZGPGGOMe .D3 and D4 are the corresponding C deuterated methylene groups (Gly) and (Gly) respectively.a) H₃H₄ b) D₃H₄ c) H₃D₄

FIG 10: RAMAN spectrum of the specifically (Gly)₃ C-deuterated ZGPGGOMe (solid from CHCl₃).D3H₄

FIG 11: RAMAN spectrum of H₃D₄

FIG 12: RAMAN spectrum of ZGPGGOMe and N-deuterated ZGPGGOMe in DMSO-d6
12a) Amide I range

12b) Amide III range

TABLE I: Values of the dihedral angles obtained for GPGG and ZGPGGOMe

TABLE II: Effects of dipolar interactions and non bonded atom pairs interactions for the calculated amide I mode of GPGG.

TABLE III : Calculated frequencies of GPGG and their corresponding PED

TABLE IV : Principal force constants for GPGG

COORDONNÉES DE SYMÉTRIE DES β -TURNS

STRETCHINGS

S 1 = ΔR_1	S 18 = ΔR_{21}
S 2 = ΔR_2	S 19 = $\Delta R_{22} = S_3$ nouv
S 3 = ΔR_3 $= S_1$ nouv	S 20 = $\Delta R_{23} = S_5$ nouv
S 4 = ΔR_4 $= S_2$ nouv	S 21 = $\Delta R_{24} = S_6$ nouv
S 5 = ΔR_5 $= S_4$ nouv	S 22 = $\Delta R_{25} = S_7$ nouv
S 6 = ΔR_6	S 23 = $\Delta R_{26} = S_8$ nouv
S 7 = ΔR_7	S 24 = $(\Delta R_{27} + \Delta R_{28})/\sqrt{2}$ Vs(CH2)
S 8 = ΔR_8	S 25 = $(\Delta R_{29} + \Delta R_{30})/\sqrt{2}$ Vs(CH2)
S 9 = ΔR_9	S 26 = $(\Delta R_{31} + \Delta R_{32})/\sqrt{2}$ Vs(CH2)
S 10 = ΔR_{10}	S 27 = ΔR_{33}
S 11 = ΔR_{11}	S 28 = $(\Delta R_{34} + \Delta R_{35})/\sqrt{2}$ Vs(CH2)
S 12 = $(\Delta R_{12} + \Delta R_{13})/\sqrt{2}$ Vs(CO2-)	S 29 = $(\Delta R_{36} + \Delta R_{37} + R_{38})/\sqrt{3}$ Vs(NH3+)
S 13 = $(\Delta R_{14} + \Delta R_{15})/\sqrt{2}$ Vs(CH2)	S 30 = $(2\Delta R_{36} - \Delta R_{37} - \Delta R_{38})/\sqrt{6}$ Vd(NH3+)
S 14 = ΔR_{16}	S 31 = ΔR_{39}
S 15 = ΔR_{17}	S 32 = ΔR_{40}
S 16 = $(\Delta R_{18} + \Delta R_{19})/\sqrt{2}$ Vs(CH2)	S 33 = ΔR_{41}
S 17 = ΔR_{20}	S 34 = ΔR_{42}
S 80 = $(\Delta R_{12} - \Delta R_{13})/\sqrt{2}$ Va(CO2-)	S 84 = $(\Delta R_{29} - \Delta R_{30})/\sqrt{2}$ Va(CH2)
S 81 = $(\Delta R_{14} - \Delta R_{15})/\sqrt{2}$ Va(CH2)	S 85 = $(\Delta R_{31} - \Delta R_{32})/\sqrt{2}$ Va(CH2)
S 82 = $(\Delta R_{18} - \Delta R_{19})/\sqrt{2}$ Va(CH2)	S 86 = $(\Delta R_{34} - \Delta R_{35})/\sqrt{2}$ Va(CH2)
S 83 = $(\Delta R_{27} - \Delta R_{28})/\sqrt{2}$ Va(CH2)	S 87 = $(\Delta R_{37} - \Delta R_{38})/\sqrt{2}$ Vd(NH3+)

BENDINGS B-TURNS

S 35 = $(-\Delta\phi_{1,36} - \Delta\phi_{1,37} - \Delta\phi_{1,38} + \Delta\phi_{36,37} + \Delta\phi_{36,38} + \Delta\phi_{37,38})/\sqrt{6}$	δs (NH3+)
S 36 = $(2\Delta\phi_{2,38} - \Delta\phi_{2,37} - \Delta\phi_{2,38})/\sqrt{6}$	δd (NH3+) //
S 37 = $(2\Delta\phi_{4,36} - \Delta\phi_{4,37} - \Delta\phi_{4,38})/\sqrt{6}$	$r //$ (NH3+)
S 38 = $(5\Delta\phi_{4,2} - \Delta\phi_{4,34} - \Delta\phi_{4,35} - \Delta\phi_{34,35} - \Delta\phi_{2,34} - \Delta\phi_{2,35})/\sqrt{30}$	δ (N1C2C3)
S 39 = $(4\Delta\phi_{3,35} - \Delta\phi_{1,34} - \Delta\phi_{1,35} - \Delta\phi_{2,34} - \Delta\phi_{2,35})/\sqrt{20}$	δ (CH2) α
S 40 = $(\Delta\phi_{1,34} + \Delta\phi_{4,35} - \Delta\phi_{2,34} - \Delta\phi_{3,35})/2$	Wag(CH2) α
S 41 = $(2\Delta\phi_{2,3} - \Delta\phi_{2,33} - \Delta\phi_{3,33})/\sqrt{6}$	δ (C2C3N4)
S 42 = $(\Delta\phi_{2,33} - \Delta\phi_{3,33})/\sqrt{2}$	δ (C3=0)
S 43 = S_9 nouv	δ (C3N4C5)
S 44 = S_{10} nouv	δ (C3N4C9)
S 45 = S_{11} nouv	δ (C9N4C5)
S 46 = S_{12} nouv	δ (N4C5H26)
S 47 = S_{13} nouv	δ (N4C5C7)
S 48 = S_{14} nouv	δ (N4C5C6)
S 49 = S_{15} nouv	δ (C6C5H26)
S 50 = S_{16} nouv	δ (C6C5C7)
S 51 = S_{17} nouv	δ (C5C7C8)
S 52 = $0.195769\Delta\phi_{23,28} - 0.047383\Delta\phi_{23,28} - 0.047487\Delta\phi_{24,28}$	δ (CH2) β
	$- 0.047777\Delta\phi_{23,27} - 0.047691\Delta\phi_{24,27}$
S 53 = $0.249658\Delta\phi_{23,28} - 0.249905\Delta\phi_{24,28} + 0.250048\Delta\phi_{23,27}$	Wag(CH2) β
	$- 0.249704\Delta\phi_{24,27}$

B15
LILLE

S54	= S18 nouv	$\delta(C_7C_8C_9)$
S55	= $0.191470 \Delta\phi_{29,30} - 0.045849 \Delta\phi_{24,30} - 0.045657 \Delta\phi_{25,30}$ $- 0.044903 \Delta\phi_{24,29} - 0.045153 \Delta\phi_{25,29}$	$\delta(CH_2) \gamma$
S56	= $0.250155 \Delta\phi_{24,30} - 0.249330 \Delta\phi_{25,30} + 0.249281 \Delta\phi_{24,29}$ $- 0.249794 \Delta\phi_{25,29}$	$Wag(CH_2) \gamma$
S57	= $0.202310 \Delta\phi_{34,32} - 0.052081 \Delta\phi_{25,32} - 0.051982 \Delta\phi_{26,32}$ $- 0.051701 \Delta\phi_{25,31} - 0.051807 \Delta\phi_{26,31}$	$\delta(CH_2) \delta$
S58	= $0.250014 \Delta\phi_{25,32} - 0.249908 \Delta\phi_{36,32} + 0.249889 \Delta\phi_{25,31}$ $- 0.249966 \Delta\phi_{26,31}$	$Wag(CH_2) \delta$
S59	= $(2 \Delta\phi_{5,6} - \Delta\phi_{5,24} - \Delta\phi_{6,24}) / \sqrt{6}$	$\delta(C_5C_6N1O)$
S60	= $(\Delta\phi_{5,21} - \Delta\phi_{6,24}) / \sqrt{2}$	$\delta(C_6=O)$
S61	= $(2 \Delta\phi_{6,7} - \Delta\phi_{6,20} - \Delta\phi_{7,20}) / \sqrt{6}$	$\delta(C_6N1OC11)$
S62	= $(\Delta\phi_{6,20} - \Delta\phi_{7,20}) / \sqrt{2}$	$\delta(N1O-H)$
S63	= $(5 \Delta\phi_{7,8} - \Delta\phi_{7,18} - \Delta\phi_{7,19} - \Delta\phi_{8,19} - \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{8,19}) / \sqrt{30}$	$\delta(N1OC11C12)$
S64	= $(4 \Delta\phi_{8,19} - \Delta\phi_{7,18} - \Delta\phi_{7,19} - \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{8,19}) / \sqrt{20}$	$\delta(CH_2)_{11}$
S65	= $(\Delta\phi_{7,18} + \Delta\phi_{7,19} - \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{8,19}) / 2$	$Wag(CH_2)_{11}$
S66	= $(2 \Delta\phi_{8,9} - \Delta\phi_{8,17} - \Delta\phi_{9,17}) / \sqrt{6}$	$\delta(C11C12N13)$
S67	= $(\Delta\phi_{8,17} - \Delta\phi_{9,17}) / \sqrt{2}$	$\delta(C12=O)$
S68	= $(2 \Delta\phi_{9,10} - \Delta\phi_{9,16} - \Delta\phi_{10,16}) / \sqrt{6}$	$\delta(C12N13C14)$
S69	= $(\Delta\phi_{9,16} - \Delta\phi_{10,16}) / \sqrt{2}$	$\delta(N13-H)$
S70	= $(5 \Delta\phi_{10,11} - \Delta\phi_{10,14} - \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{11,14} - \Delta\phi_{11,15}) / \sqrt{30}$	$\delta(N13C14C15)$
S71	= $(4 \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{10,14} - \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{11,14} - \Delta\phi_{11,15}) / \sqrt{20}$	$\delta(CH_2)_{14}$
S72	= $(\Delta\phi_{10,14} + \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{11,14} - \Delta\phi_{11,15}) / 2$	$Wag(CH_2)_{14}$
S73	= $(2 \Delta\phi_{12,13} - \Delta\phi_{11,12} - \Delta\phi_{11,13}) / \sqrt{6}$	$\delta(CO2-)$
S74	= $(\Delta\phi_{11,12} - \Delta\phi_{11,13}) / \sqrt{2}$	$r(CO2-)$
S75	= $\Delta\phi_{33,39}$	$\delta(C3=O--H)$
S76	= $\Delta\phi_{46,39}$	$\delta(N13-H--O)$
S88	= $(\Delta\phi_{36,37} - \Delta\phi_{36,38}) / \sqrt{2}$	$\delta d_\perp(NH_3+)$
S89	= $(\Delta\phi_{4,37} - \Delta\phi_{4,38}) / \sqrt{2}$	$r_\perp(NH_3+)$
S90	= $(\Delta\phi_{4,34} - \Delta\phi_{4,35} - \Delta\phi_{2,34} + \Delta\phi_{2,35}) / 2$	$Tw(CH_2)_2$
S91	= $(\Delta\phi_{4,34} - \Delta\phi_{4,35} + \Delta\phi_{2,34} - \Delta\phi_{2,35}) / 2$	$r(CH_2)_2$
S92	= $0.250074 \Delta\phi_{23,28} + 0.246534 \Delta\phi_{24,28} + 0.249471 \Delta\phi_{23,27}$ $- 0.246946 \Delta\phi_{24,27}$	$Tw(CH_2)_\beta$
S93	= $0.246939 \Delta\phi_{23,28} + 0.249671 \Delta\phi_{24,28} - 0.245094 \Delta\phi_{23,27}$ $- 0.248412 \Delta\phi_{24,27}$	$r(CH_2)_\beta$
S94	= $-0.248687 \Delta\phi_{24,30} + 0.244787 \Delta\phi_{25,30} + 0.250141 \Delta\phi_{24,29}$ $- 0.243750 \Delta\phi_{25,29}$	$Tw(CH_2) \gamma$
S95	= $0.240189 \Delta\phi_{24,30} + 0.245960 \Delta\phi_{25,30} - 0.244742 \Delta\phi_{24,29}$ $- 0.249205 \Delta\phi_{25,29}$	$r(CH_2) \gamma$
S96	= $-0.249477 \Delta\phi_{25,32} + 0.246819 \Delta\phi_{26,32} + 0.250011 \Delta\phi_{25,31}$ $- 0.246354 \Delta\phi_{26,31}$	$Tw(CH_2) \delta$
S97	= $0.245401 \Delta\phi_{25,32} + 0.248644 \Delta\phi_{26,32} - 0.246814 \Delta\phi_{25,31}$ $- 0.249876 \Delta\phi_{26,31}$	$r(CH_2) \delta$
S98	= $(\Delta\phi_{7,18} - \Delta\phi_{7,19} - \Delta\phi_{8,18} + \Delta\phi_{8,19}) / 2$	$Tw(CH_2)_{11}$
S99	= $(\Delta\phi_{7,18} - \Delta\phi_{7,19} + \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{8,19}) / 2$	$r(CH_2)_{11}$
S100	= $(\Delta\phi_{10,14} - \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{11,14} + \Delta\phi_{11,15}) / 2$	$Tw(CH_2)$
S101	= $(\Delta\phi_{10,14} - \Delta\phi_{10,15} + \Delta\phi_{11,14} - \Delta\phi_{11,15}) / 2$	$r(CH_2)$

LINEAR BENDS B-TURNS

In plane LB

$$\begin{aligned} S77 &= \Delta\phi_{17,42} \\ S78 &= \Delta\phi_{20,41} \\ S79 &= \Delta\phi_{24,41} \end{aligned}$$

Out of plane

$$\begin{aligned} S102 &= Y_{17,42} \\ S103 &= Y_{20,41} \\ S104 &= Y_{24,40} \end{aligned}$$

CUT OF PLANE WAGGING

$$\begin{aligned} S105 &= Y_{33} \\ S106 &= Y_{21} \\ S107 &= Y_{20} \\ S108 &= Y_{17} \\ S109 &= Y_{16} \\ S123 &= Y_{11} \end{aligned}$$

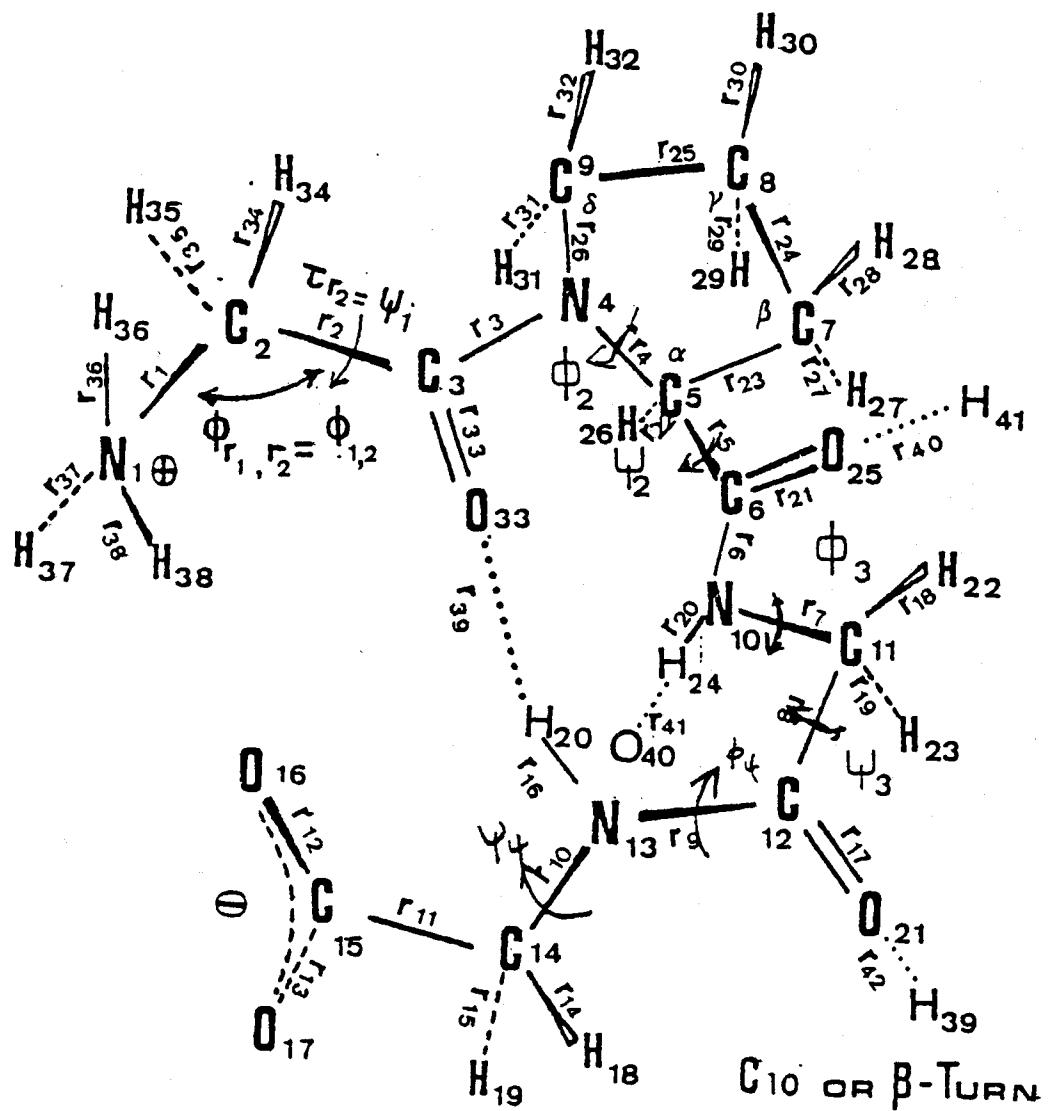
REDUNDANCY SYMMETRY COORDINATES

$$\begin{aligned} \text{Scycle} &= \Delta\phi_{25,26} \\ \text{Scycle} &= \Delta\tau_4 \\ \text{Scycle} &= \Delta\tau_{23} \\ \text{Scycle} &= \Delta\tau_{24} \\ \text{Scycle} &= \Delta\tau_{25} \\ \text{Scycle} &= \Delta\tau_{26} \\ \text{Scycle} &= \Delta\phi_{22,23} \end{aligned}$$

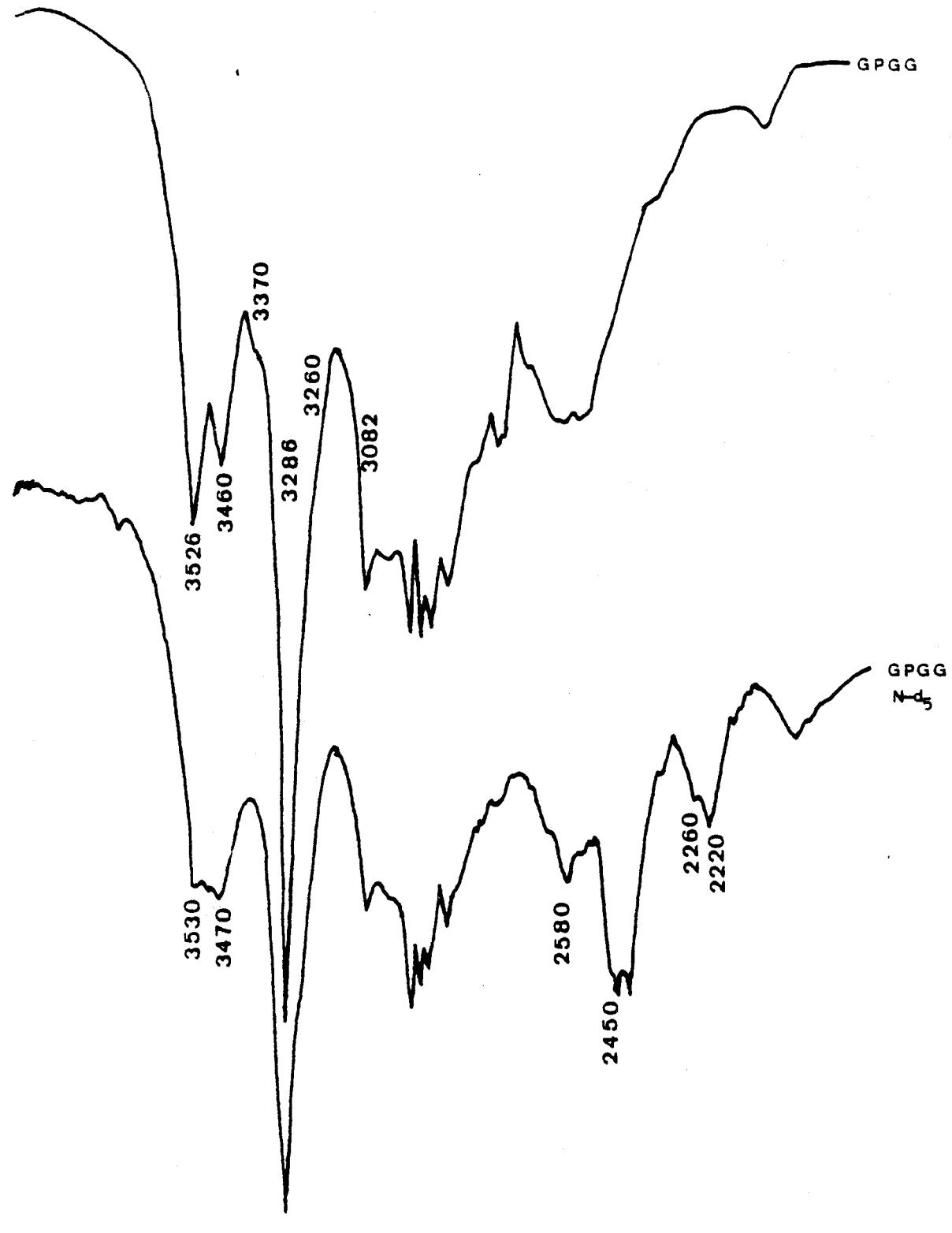
TORSIONS

$$\begin{aligned} S110 &= \Delta T_1 \\ S111 &= \Delta T_2 \\ S112 &= \Delta T_3 \\ S113 &= \Delta T_5 \\ S114 &= \Delta T_6 \\ S115 &= \Delta T_7 \\ S116 &= \Delta T_8 \\ S117 &= \Delta T_9 \\ S118 &= \Delta T_{10} \\ S119 &= \Delta T_{11} \\ S120 &= \Delta T_{33} \\ S121 &= \Delta T_{39} \\ S122 &= \Delta T_{16} \end{aligned}$$

Fig 1

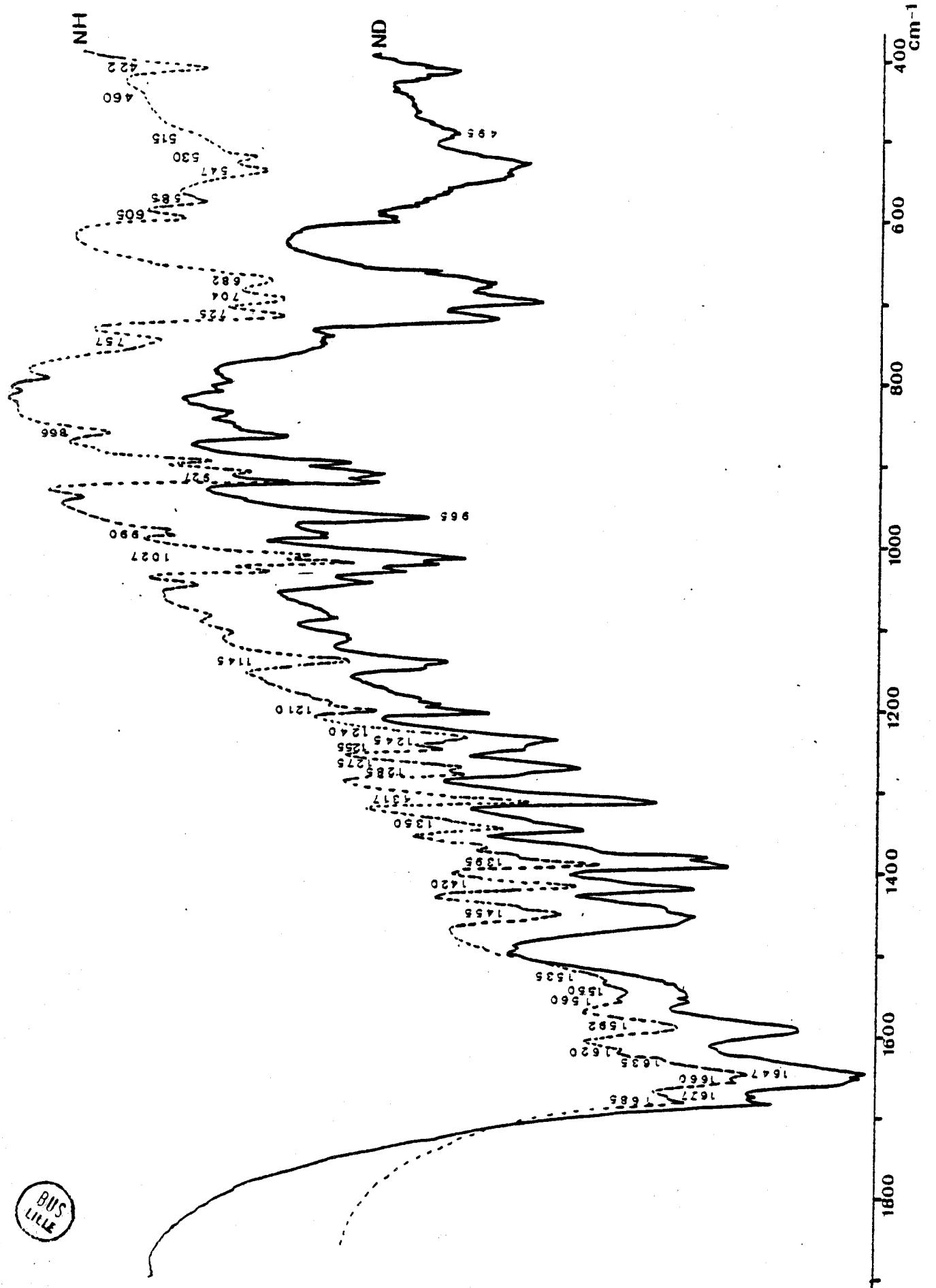


BUS
VILLE



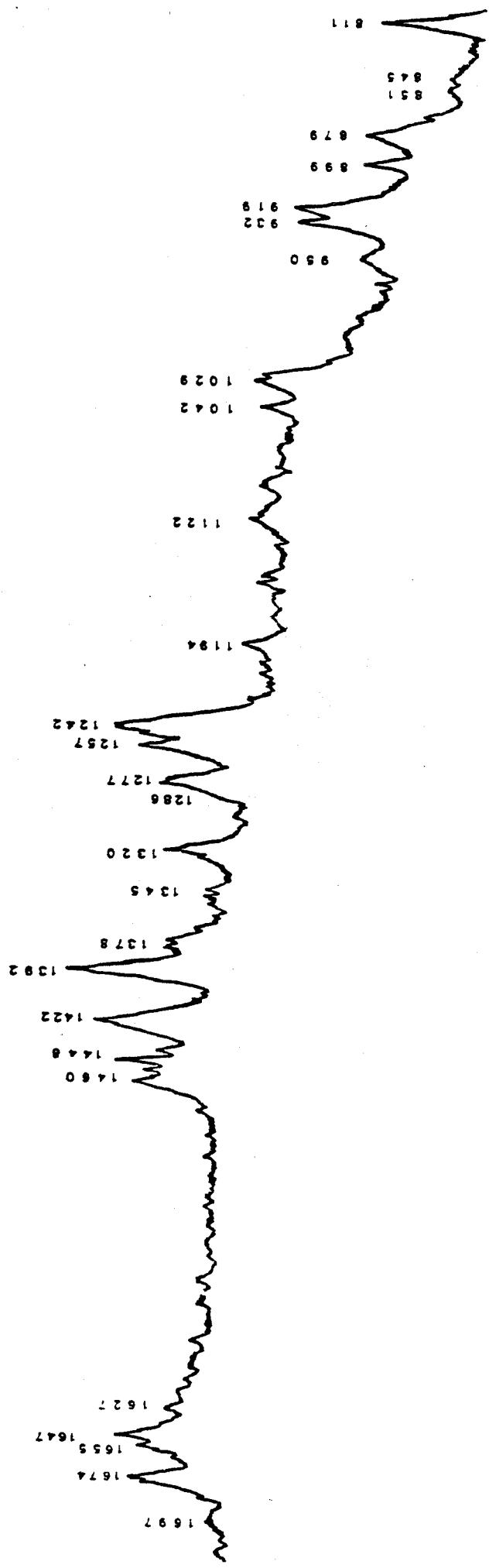
BHS
1964

FIG 2 a



BUS
VILLE

Fig 3 Raman spectrum of GPGG (solid)



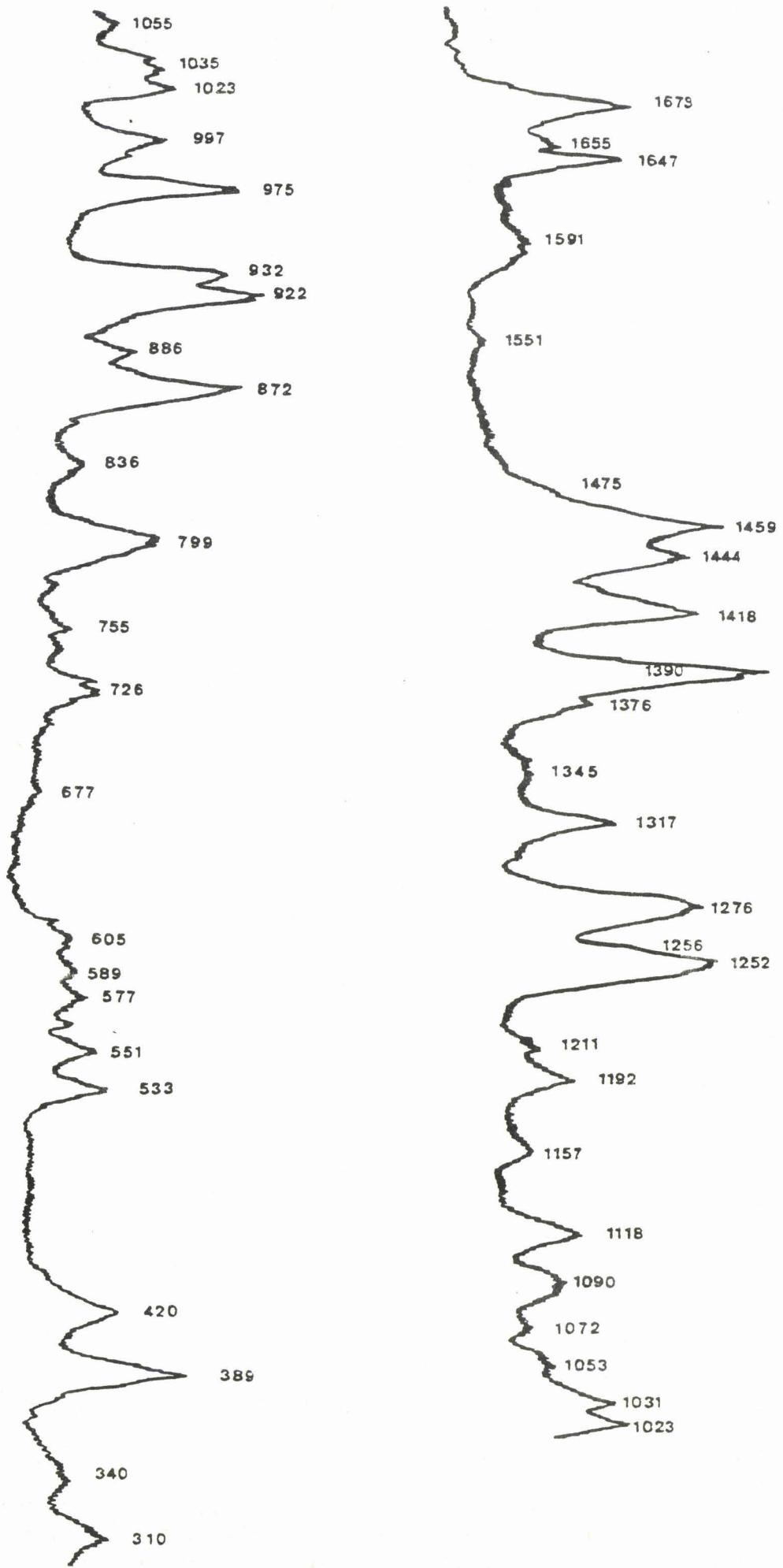
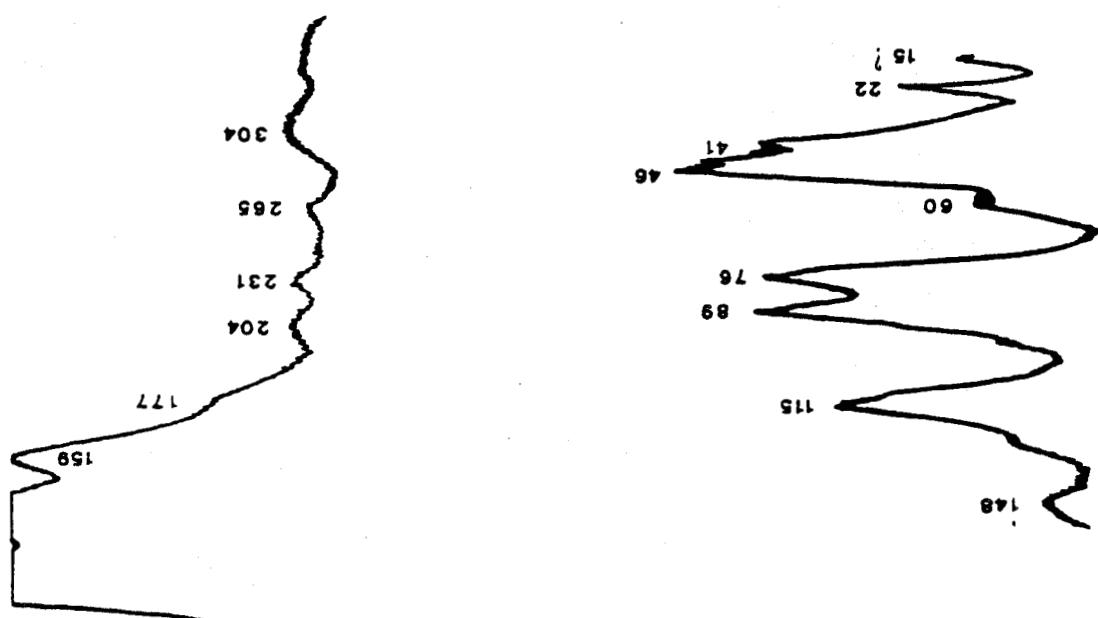


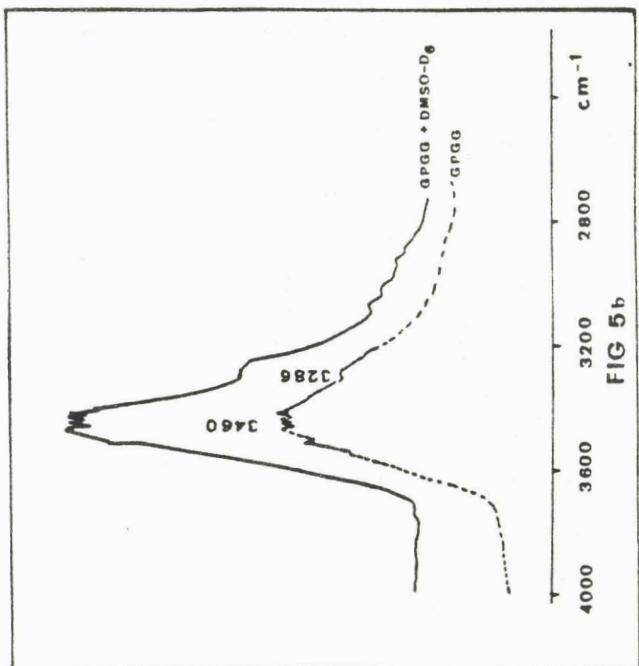
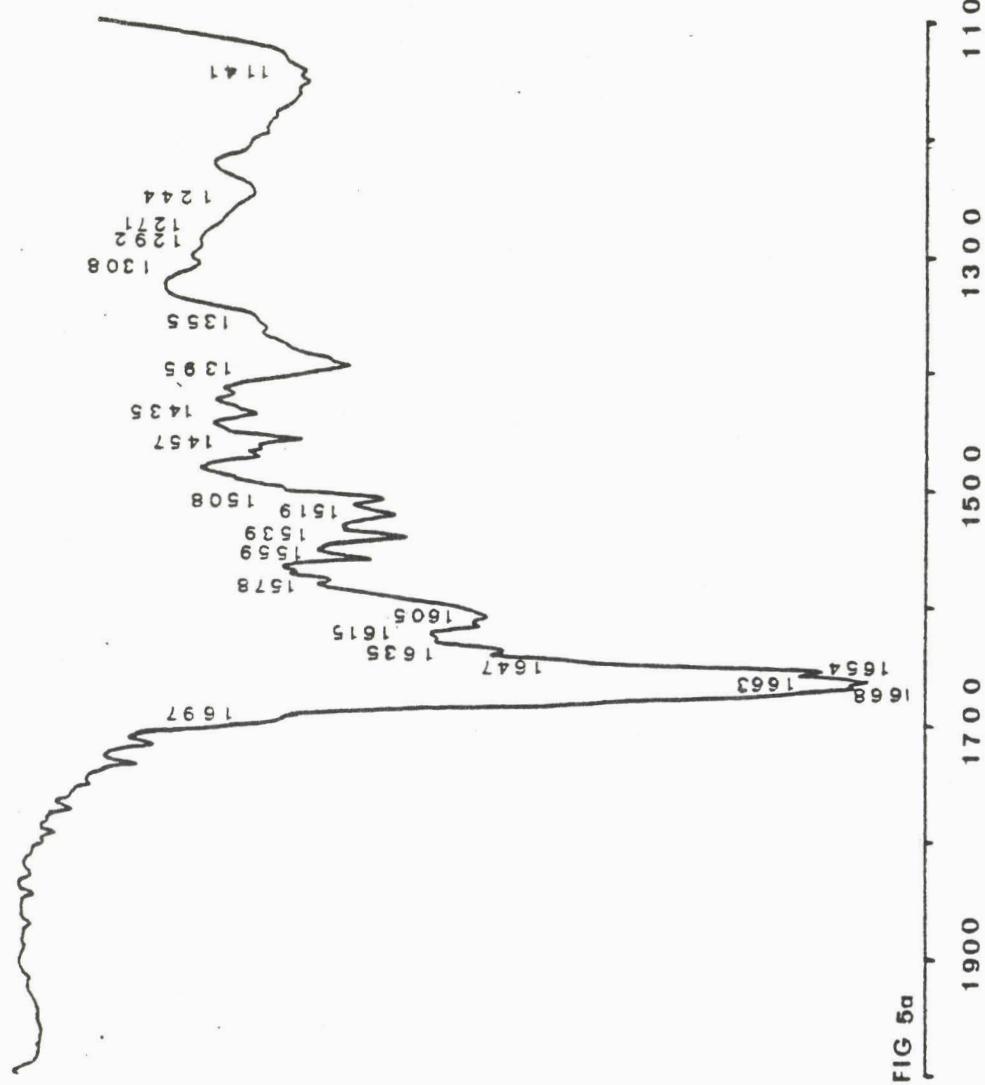
Fig 4a

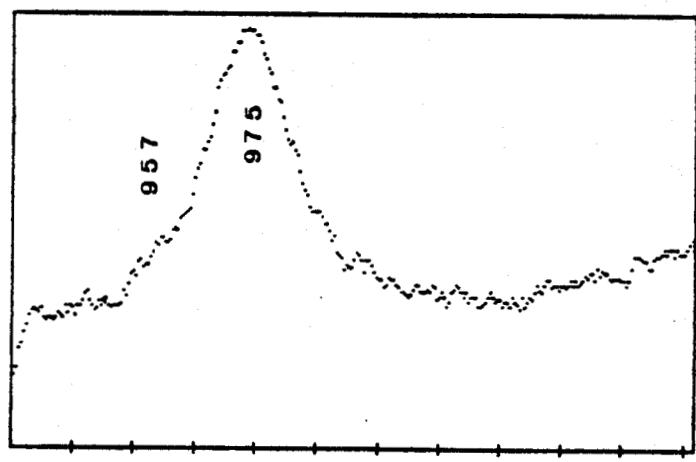
N-SP GPGG

Fig 4b: Low frequency region



IR differential spectrum a) amide I b) amide A (in transmittance)





945 GPGG Nd₅ (crystal from DMSO dg)

AMIDE III' RANGE

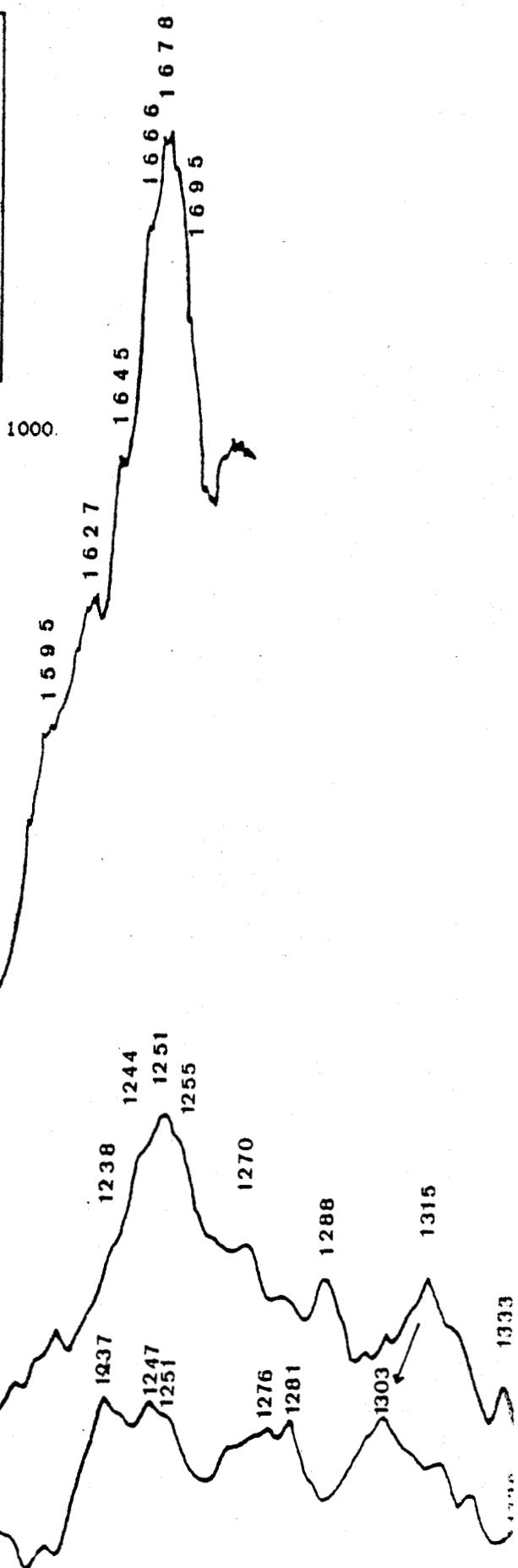


FIG 6a

A) GPGG

B) GPGG - d₅

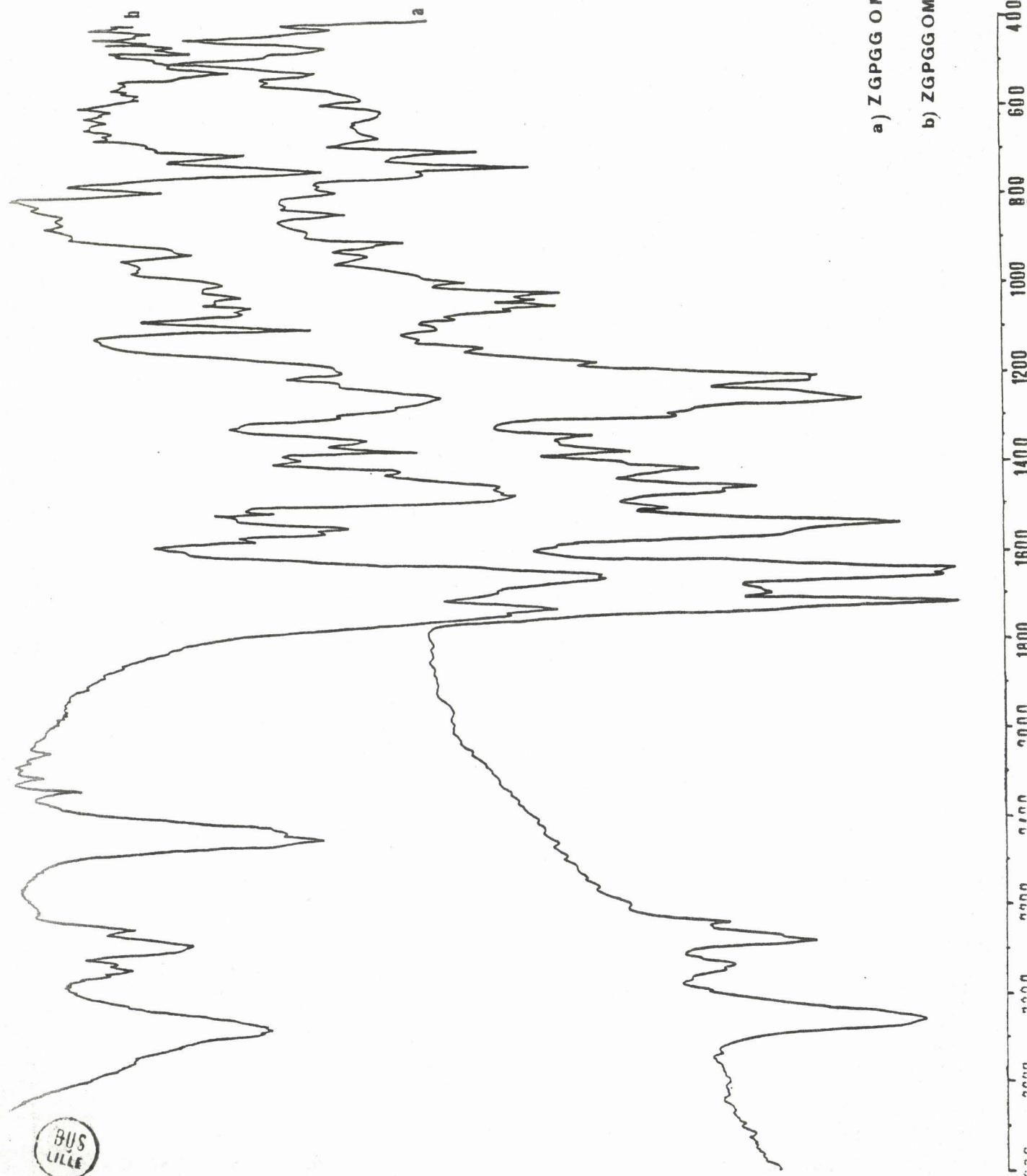
5% in
36 acc.

DM 2

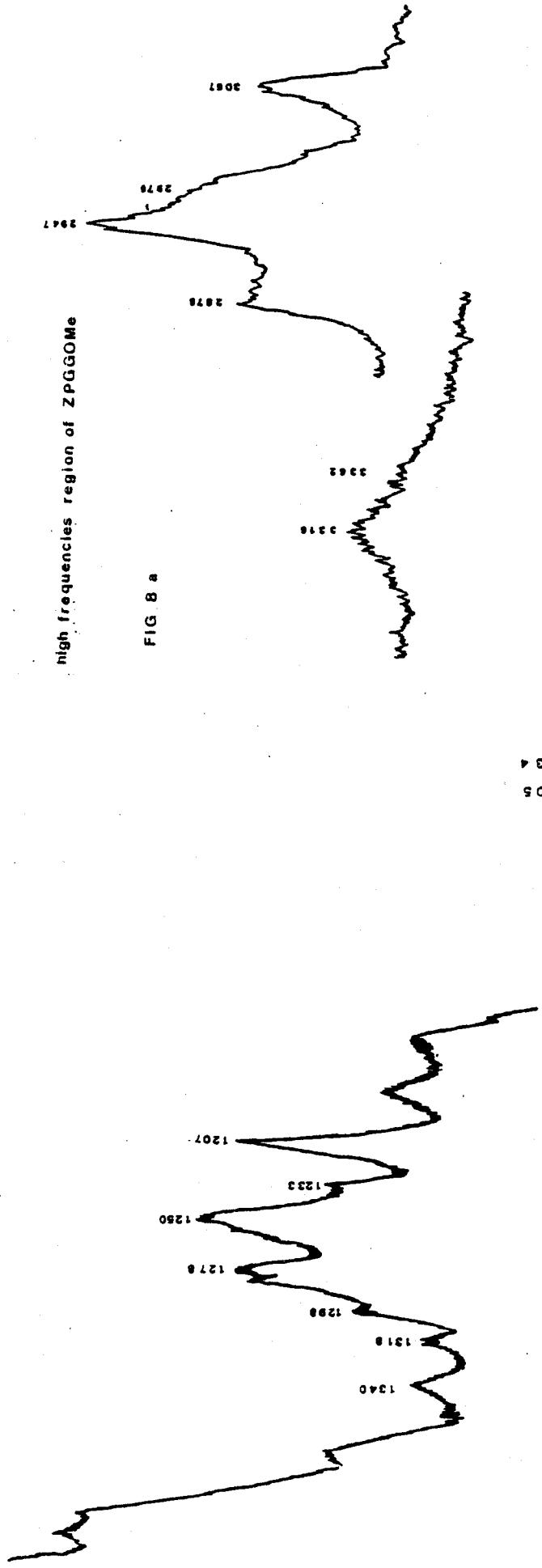
DMSO - d₆

FIG 6b

FIG. 7

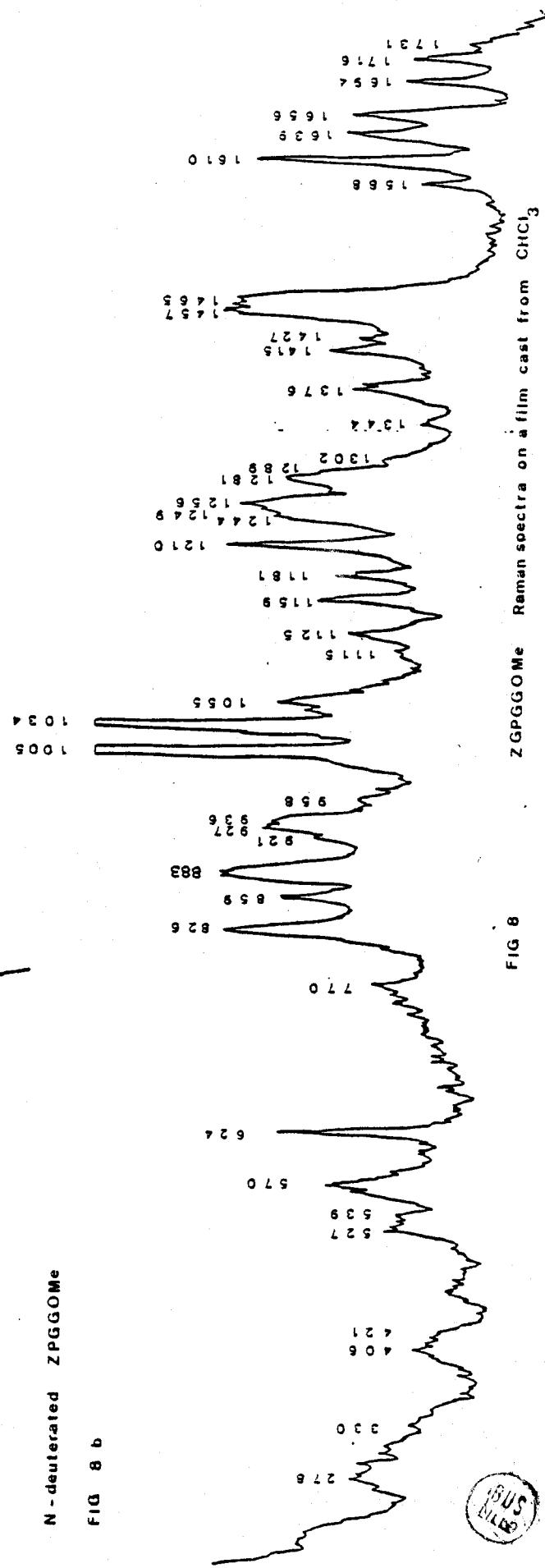


BUS
VILLE



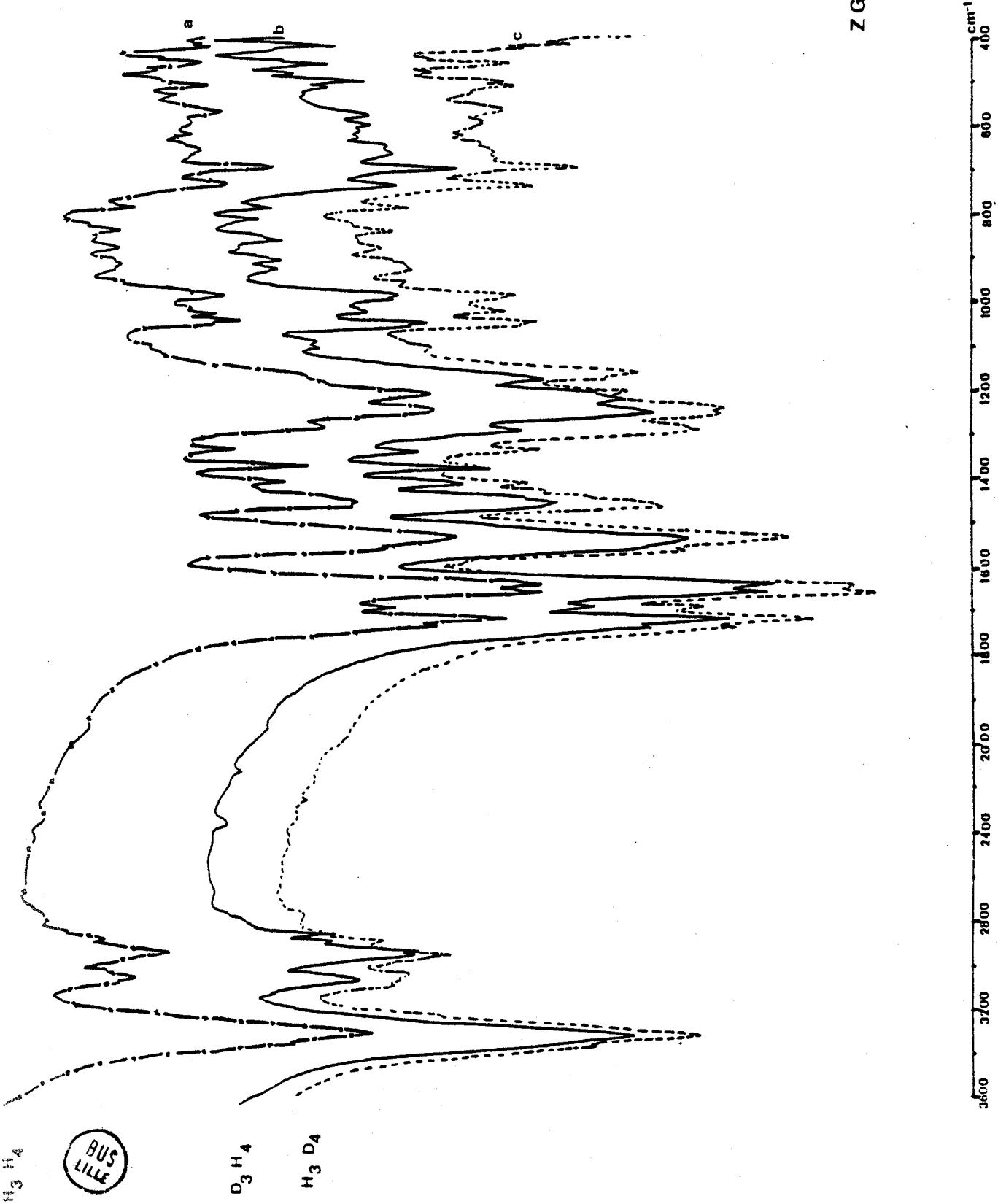
N - deuterated ZPGGOMe

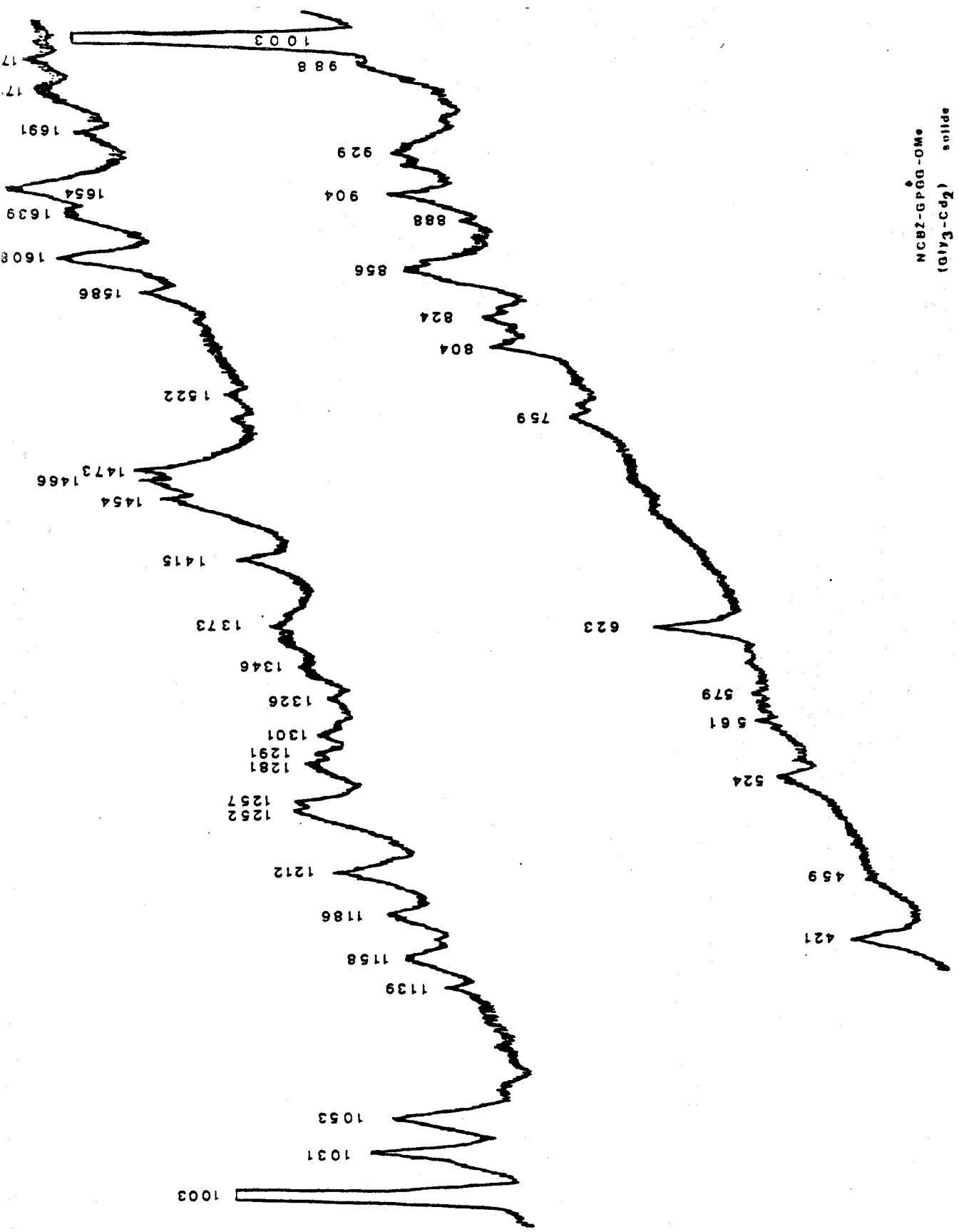
FIG. 8 b



Z GPGGOMe film from CHC

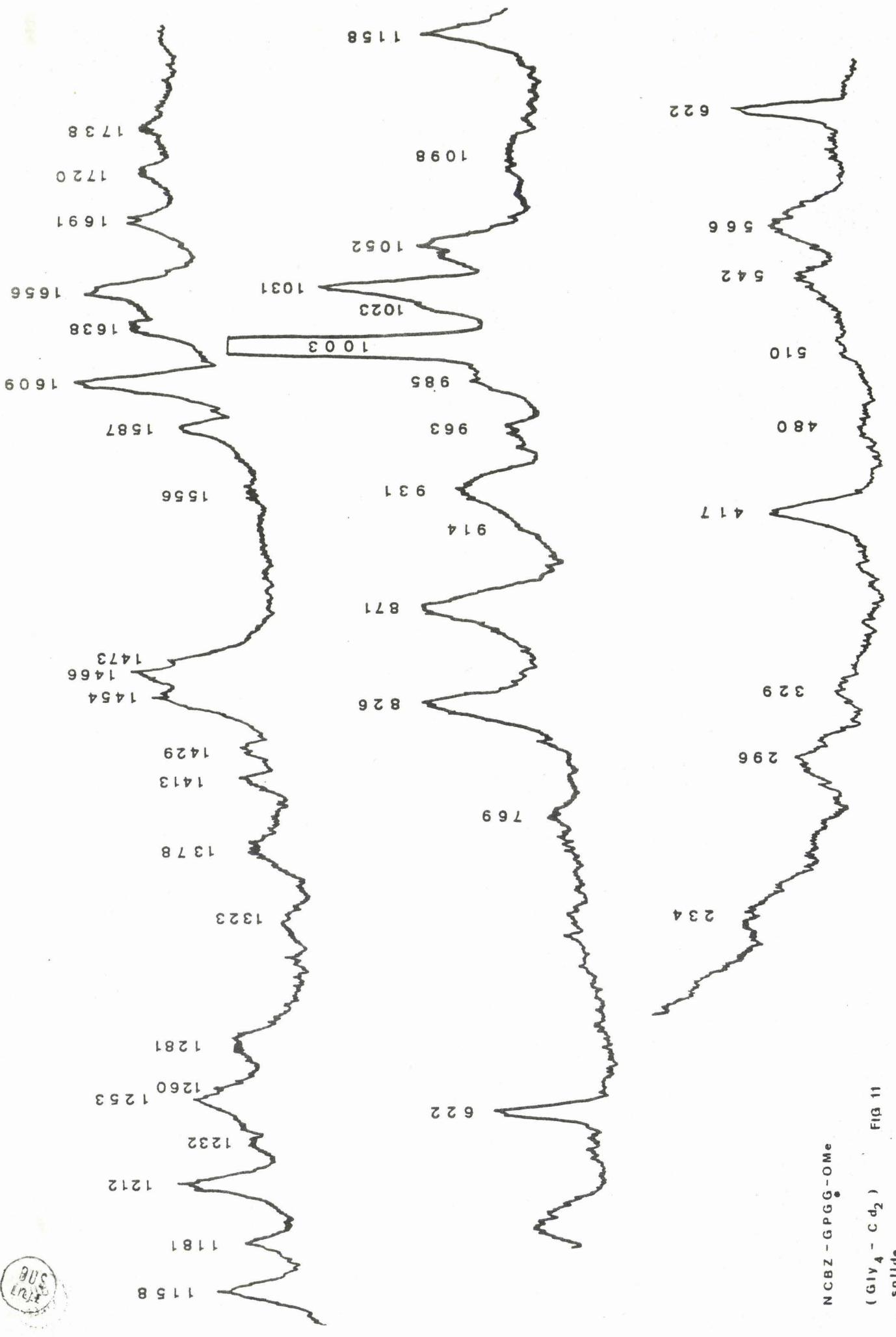
FIG 9

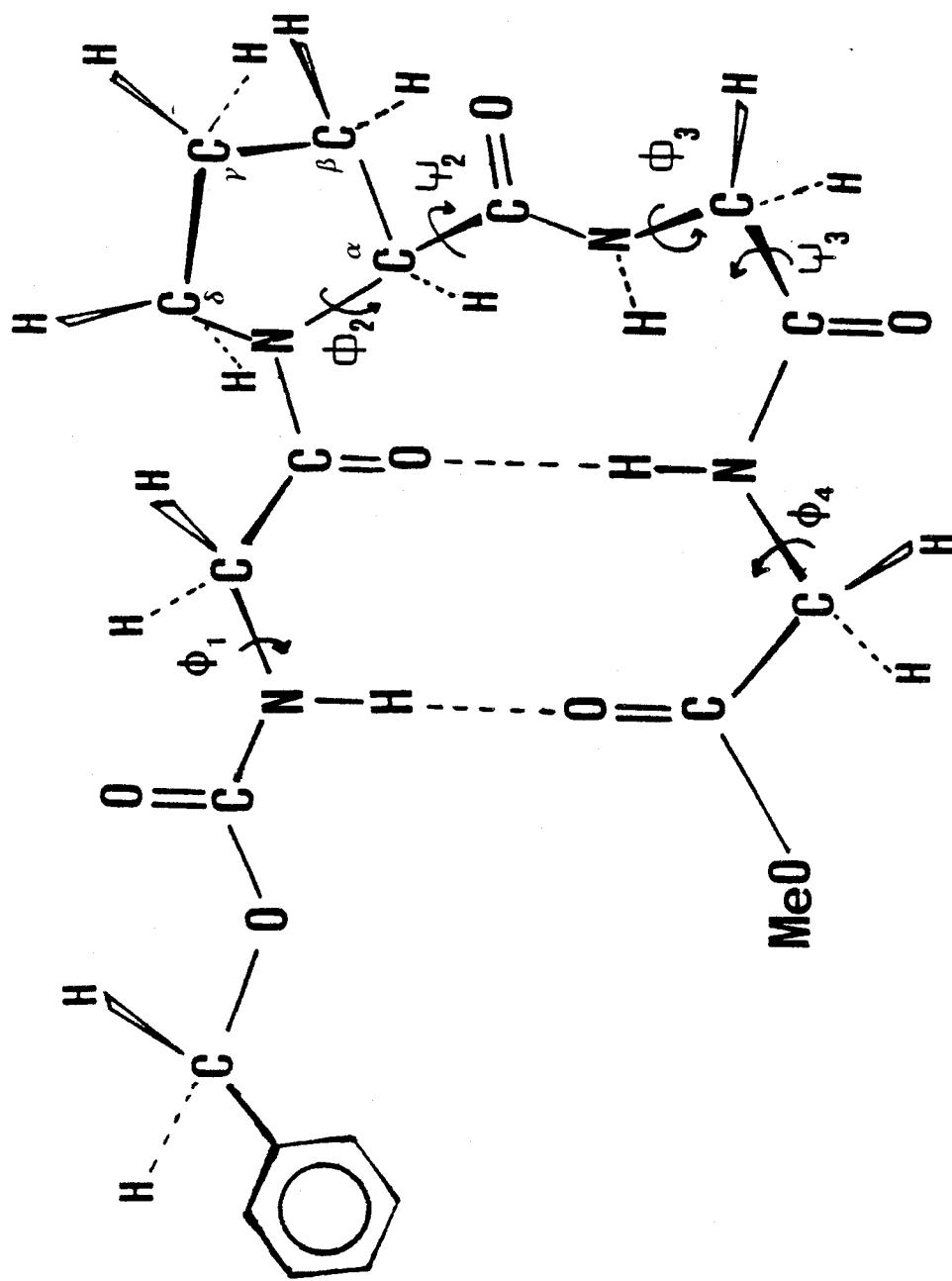




NCB2-GPGG-O-Me
(d133-Cd2)
solid





$\phi_1 = 175^\circ$ $\phi_2 = 60^\circ$ $\phi_3 = 75^\circ$ $\phi_4 = 175^\circ$ 

N-Cbz-GPGG-OMe

(B_{II} TURN)

Calc.	1684	1654	1646
Exp	1687	1657	1647
Assign.	$(C_6=O)Pro_2$	$(C_3=O)Gly_1$	$(C_{12}=O)Gly_3$
calculated			
dipolar * effects (cm^{-1})	+10	-1	+5
calc. non bonded interactions effects (cm^{-1})	+9	+11	+3

*with $f_{C_3=O, C_6=O} = -0.031$

$f_{C_3=O, C_{12}=O} = -0.095 \text{ D}/\text{\AA}$ and $\partial k/\partial S = 12.6 \text{ D}/\text{\AA}^2$

$f_{C_6=O, C_{12}=O} = 0.21$

TABLE II

FREQUENCIES OF GPGG B-Turn 2

Calc.

PED

3470 (2580)	100 ν (N10H)
3285 (2460)	93 ν (N13H) + 7 ν (O--H)
3264 (2420)	90 ν_d (NH3+) + 10 ν_d (NH3+)
3262 (2409)	10 ν_d (NH3+) + 90 ν_d (NH3+)
3112 (2229)	100 ν_s (NH3+)
2992	98 ν_a (C δ H)
2983	100 ν_a (NH3+)
2978	100 ν_a (C ₂ H)
2959	100 ν_a (C ₁₁ H)
2946	45 ν_a (C β H) + 55 ν_a (C γ H)
2932	55 ν_a (C β H) + 45 ν_a (C γ H)
2927	100 ν_a (C ₁₄ H)
2906	95 ν_s (C δ H) + 4 ν_s (C γ H)
2872	99 ν_s (C H)
2853	100 ν_s (C H)
2852	48 ν_s (C ₂ H) + 48 ν_s (C γ H)
2830	51 ν_s (C β H) + 48 ν_s (C γ H)
2817	100 ν_s (C ₁₄ H)
1684 AM I	64 ν (C ₆ =O) + 24 δ (NH--O) + 11 ν (C ₆ N)
1654 AM I	52 ν (C ₃ =O) + 33 ν (C ₃ N ₄) + 13 δ (C ₂ N ₃ C ₄)
1646 AM I	45 ν (C ₁₂ =O) + 18 ν (C ₁₂ N) + 11 δ (C ₁₂ N) + 10 δ (CN ₁₃ C) + 10 δ (NH--O) + 9 δ (N13H)
1635	80 δ_{II} (NH3+) + 12 δ_L (NH3+) + 6 τ (NH3+)
1615	13 δ_L (NH3+) + 76 δ_{II} (NH3+) + 5 τ (NH3+)
1601	91 ν_a (CO)
1577 AM II	50 δ (N13H) + 45 δ (NH--O) + 2 ν (C ₁₂ N) + 2 ν (C ₁₃ N)
1558	42 S ₂ cycle
1550 AM II	49 δ (N10H) + 25 ν (C ₆ N ₁₀) + 9 ν (N10C α) + 8 ν (C ₃ N ₄) + 6 S ₂ cycle
1533	93 δ_s (NH3+) + 2 ν (N+C α) + 2 S ₂ cycle
1528	16 S ₂ cycle + 40 δ (C ₂ H ₂) + 39 δ (CH ₂) + 12 S ₈ cycle
1498	35 S ₂ cycle + 38 δ (C δ H ₂) + 22 S ₁₅ cycle + 20 S ₁₄ cycle
1485	84 δ (C ₁₁ H ₂) + 10 Wag (C ₁₁ H ₂) + 5 ν (N10C α)
1480	72 δ (C ₁₄ H) + 12 Wag (C ₁₄ H ₂) + 9 δ (NH--O) + 6 ν (N13C)
1470	40 δ (C δ H ₂) + 39 δ (C ₂ H ₂) + 11 δ (C β H ₂) + 8 S ₈ cycle
1456	43 S ₁₃ cycle + 39 S ₁₅ cycle + 17 S ₈ cycle
1449	77 δ (C H ₂) + 15 δ (C H ₂) + 3 S ₆ cyle
1447	83 δ (C β H) + 17 δ (C γ H)
1434	38 Wag (C ₁₁ H ₂) + 19 δ (NH--O) + 15 δ (N13H) + 12 δ (C ₂ H ₂) + 8 Wag (C ₂ H ₂)
1405	49 ν_s (CO ₂) + 25 ν (C α C ₁₅) + 25 δ (CO ₂)
1367	87 Tw (C ₁₁ H ₂) + 3 Tw (C ₂ H ₂) + 3 (N10H)
1364	52 Wag (C ₂ H ₂) + 44 Tw (C ₂ H ₂)
1346	52 Wag (C ₁₄ H ₂) + 22 δ (NH--O) + 15 δ (C ₁₄ H ₂) + 12 δ (N13H)
1331	45 Wag (C ₇ H ₂) + 18 S ₁₅ cycle + 13 S ₁₆ cycle + 12 S ₁₂ cycle + 7 S ₁₃ cycle + 5 ν (C ₃ N ₄)
1328	34 Wag (C δ H ₂) + 30 δ (C δ H ₂) + 14 S ₆ cycle + 8 S ₈ cycle + 6 ν (C ₃ N ₄) + 5 ν (C α C ₃)

BUS
VILLE

1312	85 Tw(C ₁₄ H ₂) + 12 r(C ₁₄ H ₂) + 3V(C _α N13)
1302	27 Wag(C ₉ H ₂) + 28 S7 cycle + 16 S5 cycle + 13 Wag(C _β H ₂)
1283 AM III	48 δ(NH--O) + 21 δ(N13H) + 10 V(C12N) + 5V(N13C _α) + 5V(C _α C ₁₂)
1275	35 Tw(C _δ H ₂) + 34 δ(NH--O) + 16 δ(N13H) + 7V(C12N) + 5 S5 cycle
1255 AM III	26 V(C ₆ N10) + 22 δ(C ₆ N10C) + 15 δ(C ₆ =O) + 23 Tw(C _δ H ₂) + 9 V(C _α C ₆)
1246	30 Wag(C _δ H ₂) + 23 Tw(C _δ H ₂) + 15 S16 cycle + 12 S6 cycle + 11 S7 cycle + 8 Tw(C _β H ₂)
1218	65 Tw(C _β H ₂) + 20 S5 cycle + 9 S16 cycle + 6 V(C3N4)
1207	92 Tw(C _γ H ₂) + 4 S15 cycle
1185	25 S16 cycle + 16 S12 cycle + 11 S6 cycle + 25 Tw(C _β H ₂) + 11 Tw(C _γ H ₂)
1177	28 r//(NH3+) + 29 V(N10C) + 15 δ(C3=O) + 13 V(C3N4) + 12 r(C ₂ H ₂)
1155	56 r(NH3+) + 32 r(C ₂ H ₂) + 9 V(N10C)
1147	53 V(N13C _α) + 22 δ(N13C _α C) + 11 δ(CN13C _α) + 11 V(C _α C ₁₂) + 4 δ(C _α Ci2N)
1131	42 r(NH3+) + 17 V(N10C _α) + 23 r(C ₁₁ H ₂) + 11 δ(N13C _α C) + 6 V(C6N10)
1123	41 r(NH3+) + 33 r(C ₁₁ H ₂) + 14 Wag(C _β H ₂) + 9 Wag(C _γ H ₂)
1107	26 r(C _δ H ₂) + 22 r(C ₈ H ₂) + 22 r(NH3+) + 22 v(N+C _α)
1099	35 Wag(C _γ H) + 32 r(C _η H ₂) + 32 S7 cycle
1085	26 δ(CO ₂) + 25 V _s (CO ₂) + 16 V(C _α C) + 15 (CN13C _α) + 13 (N13C _α C)
1072	33 V(N+C _α) + 29 S5 cycle + 20 S7 cycle + 6 V(C2C3) + 12 V(C _α C ₁₂)
1041	50 V(N+C _α) + 18 S8 cycle + 24 r(C _δ H ₂) + 7 Wag(C _β H ₂)
1027	35 δ(CN13C _α) + 31 r(C ₁₄ H ₂) + 9 Tor(N+C _α) + 7 V(C _α C ₁₂) + 6 (C ₁₂ =O)
1008	57 S6 cycle + 25 r(C _δ H ₂) + 17 V(N+C _α)
974 AM III'	51 δ(ND--O) + 38 δ(N13D) + 6 δ(C ₁₃ NC _α) + 2 V(C ₁₂ N) + 2V(N ₁₃ Cd)
955	20 V(C _α C ₆) + 18 r(C _β H ₂) + 18 r(C _γ H ₂) + 18 r(C ₁₁ H ₂) + 8 V(C ₂ C ₃)
954 AM III'	42 δ(N10D) + 26 δ(ND--O) + 13 δ(N13D) + 10 V(N ₁₀ C) + 9 V(C ₂ C ₃)
942	65 r(C ₁₄ H ₂) + 18 Tor(N ₁₃ C _α) + 12 δ(N ₁₃ C _α C) + 4 δ(CN ₁₃ C _α)
927	21 V(C _α C ₃) + 17 δ(C ₃ =O) + 16 S13 cycle + 16 S14 cycle + 12 v(C _α C ₆) + 11 r(C _β H ₂)
926	31 r(C _β H ₂) + 26 r(C _δ H ₂) + 22 r(C ₂ H ₂) + 21 r(C _γ H ₂)
872	49 S14 cycle + 31 r(C _γ H ₂) + 20 r(C _β H ₂)
768	24 δ(N ₁₃ C _α C) + 17 V(C ₁₄ C) + 17 S12 cycle + 14 S14 cycle + 11 δ(CN ₁₃ C _α) + 12 V(C ₃ =O)
738	50 δ(N ₁₃ C _α C) + 20 δ(CO ₂) + 15 V(C ₁₄ C) + 10 δ(CN ₁₃ C _α)
724 AM V	38 Tor(N ₁₃ C _α) + 34 V(N ₁₃ H) + 18 δ(NH--O) + 10 Tor(H--O)
690 AM V	39 V(N ₁₀ H) + 34 Tor(C ₆ N) + 24 Tor(N ₁₀ C _α)
662 AM IV	34 v(C _α C) + 20 δ(N ₁₀ C _α C) + 17 δ(C ₁₂ =O) + 17 δ(C _α C ₁₂ N) + 11 V(CO ₂)
624 AM IV	32 δ(C ₃ =O) + 23 V(C ₃ =O) + 31 V(C _α C ₃) + 14 δ(N ₁₃ C ₁₄ C)
614 AM VI	84 V(C ₃ =O) + 16 TOR(N+C _α)
604 AM IV	51 δ(C ₆ =O) + 35 δ(C ₆ NC _α) + 16 Tor(N+C _α)
582 AM VI	38 V(C ₆ =O) + 22 V(N ₁₀ H) + 12 S ₅ + 9 r(C _β H ₂) + 6 S ₄
538 AM VI	47 δ(NC ₁₄ C) + 25 δ(C ₁₂ =O) + 15 TOR(N ₁₃ C _α) + 13 δ(C _α Ci2N)
489	65 r(CO ₂) + 25 Tor(N ₁₃ C _α) + 10 δ(N ₁₃ C ₁₄ C)

444 $\delta(C_2C_3N_4) + 30 S_9 \text{ cycle} + 34 \gamma(C_6=O)$
 419 $Tor(N+C) + 9 \tau(C_2H_2) + 6 Tor(C_3N_4)$
 374 $58 \delta(N_{13}C_{14}C) + 13 \delta(N_{13}H) + 12\tau(CO_2) + 11\tau(C_6=O) + 8 \delta(N_{10}H)$
 348 $84 \delta(CN_{13}C) + 9 \delta(N_{10}C_\alpha C) + 7 Tor(N_{13}C_\alpha)$
 334 $55 \delta(C_2C_3N_4) + 15 Tor(N+C_\alpha) + 12 \delta(C_6NC_\alpha) + 8 Tor(C_\alpha C_3)$
 $+ 7 \gamma(C_6=O)$
 316 $29 S_{17} \text{ cycle} + 26 S_{18} \text{ cycle} + 18 \delta(N+C_\alpha C) + 14 \delta(CN_{13}C_\alpha)$
 $+ 13 \delta(NH--O)$
 301 $29 \delta(N_{13}C_\alpha C) + 19 S_{18} \text{ cycle} + 17 S_{17} \text{ cycle} + 12 \delta(CN_{13}C_\alpha)$
 $+ 9 \delta(NH--O) + 6 \delta(N+C_\alpha C)$
 293 $38 \delta(CN_{13}C_\alpha) + 32 \delta(N+C_\alpha C) + 12 \delta(C_6NC_\alpha) + 10 S_{16} \text{ cycle}$
 $+ 8 Tor(C_3N_4)$
 269 $74 \delta(N_{13}C_\alpha C) + 8 \delta(CN_{13}C_\alpha) + 7 \delta(NH--O) + 7 \gamma(N_{13}H)$
 259 $49 \delta(C_5C_6N) + 35 \delta(N_{13}C_\alpha C) + 16 S_{18} \text{ cycle}$
 218 $31 \delta(C_\alpha C_{12}N) + 26 Tor(C_\alpha C_{15}) + 18 \delta(N_{13}C_\alpha C) + 15 \delta(N_{10}C_\alpha C)$
 $+ 13 \delta(CN_{13}C_\alpha)$
 188 $49 S_{17} \text{ cycle} + 25 Tor(C_3N_4) + 15 \delta(NH--O) + 10 S_{14} \text{ cycle}$
 160 $43 S_9 \text{ cycle} + 30 \delta(NH--O) + 17 Tor(C_\alpha C_6) + 10 Tor(C_\alpha C_3)$
 155 $61 \nabla(O_{33}--H) + 17 Tor(C_3N_4) + 12 Tor(C_\alpha C_3) + 10 Si \text{ cycle}$
 148 $81 LB C_{12}=O + 19 Tor(N_{13}C_\alpha)$
 126 $42 Tor(N_{13}C_\alpha) + 39 \delta(NH--O) + 8 Tor(C_\alpha C_{15}) + 6 \delta(CN_{13}C_\alpha)$
 122 $49 Tor(N_{13}C_\alpha) + 15 Tor(C_\alpha C_3) + 12 Tor(C_3=O) +$
 $12 Tor(C_\alpha C_{12}) + 11 LB(C_2=O)$
 109 $66 Tor(N_{13}C_\alpha) + 20 \delta(N_{13}C_\alpha C) + 7 LB C_2=O + 6 \gamma(N_{13}H)$
 97 $47 LB C_6=O + 26 \nabla(O_{33}--H) + 13 Tor(N_{13}C_\alpha) + 12 S_{11} \text{ cycle}$
 87 $65 Tor(N_{13}C_\alpha) + 17 \gamma(N_{13}H) + 17 \delta(N_{13}C_\alpha C)$
 74 $76 Tor(N_{13}C_\alpha) + 24 \delta(NH--O)$
 66 $30 Tor(N_{13}C_\alpha) + 16 Tor(C_\alpha C_6) + 41 \nabla(O_{33}--H) + 13 LB C_6=O$
 42 $66 Tor(N_{13}C_\alpha) + 16 \delta(NH--O) + 9 \nabla(O_{33}--H)$
 32 $100 LB//N_{10}H$
 21 $49 \delta(NH--O) + 31 Tor(N_{13}H) + 20 \delta(C_3O--H)$
 17 $51 LB N_{10}H + 13 S_{11} \text{ cycle} + 13 Tor(C_\alpha C_6) + 13 Tor(N_{13}C_\alpha)$

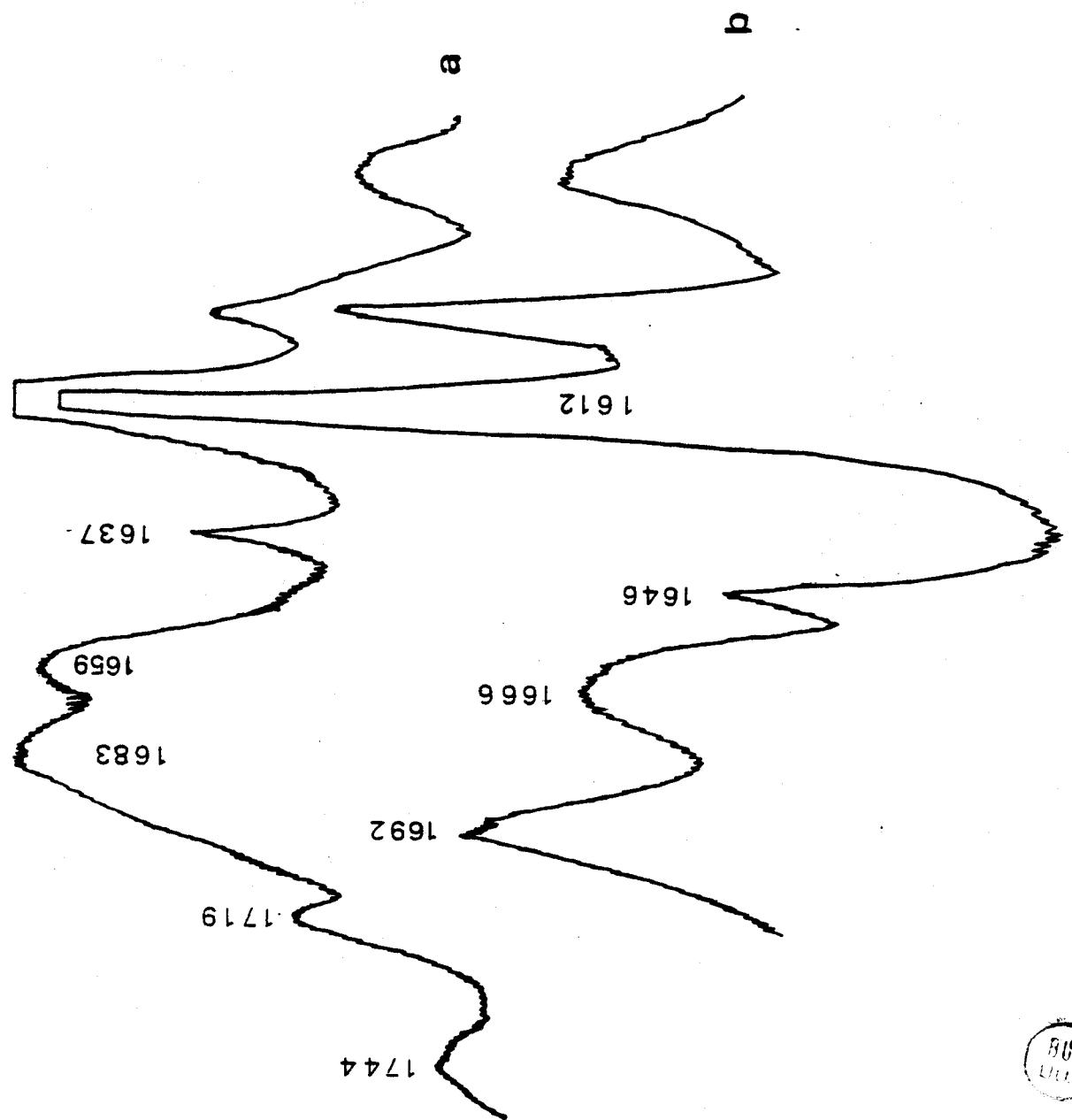


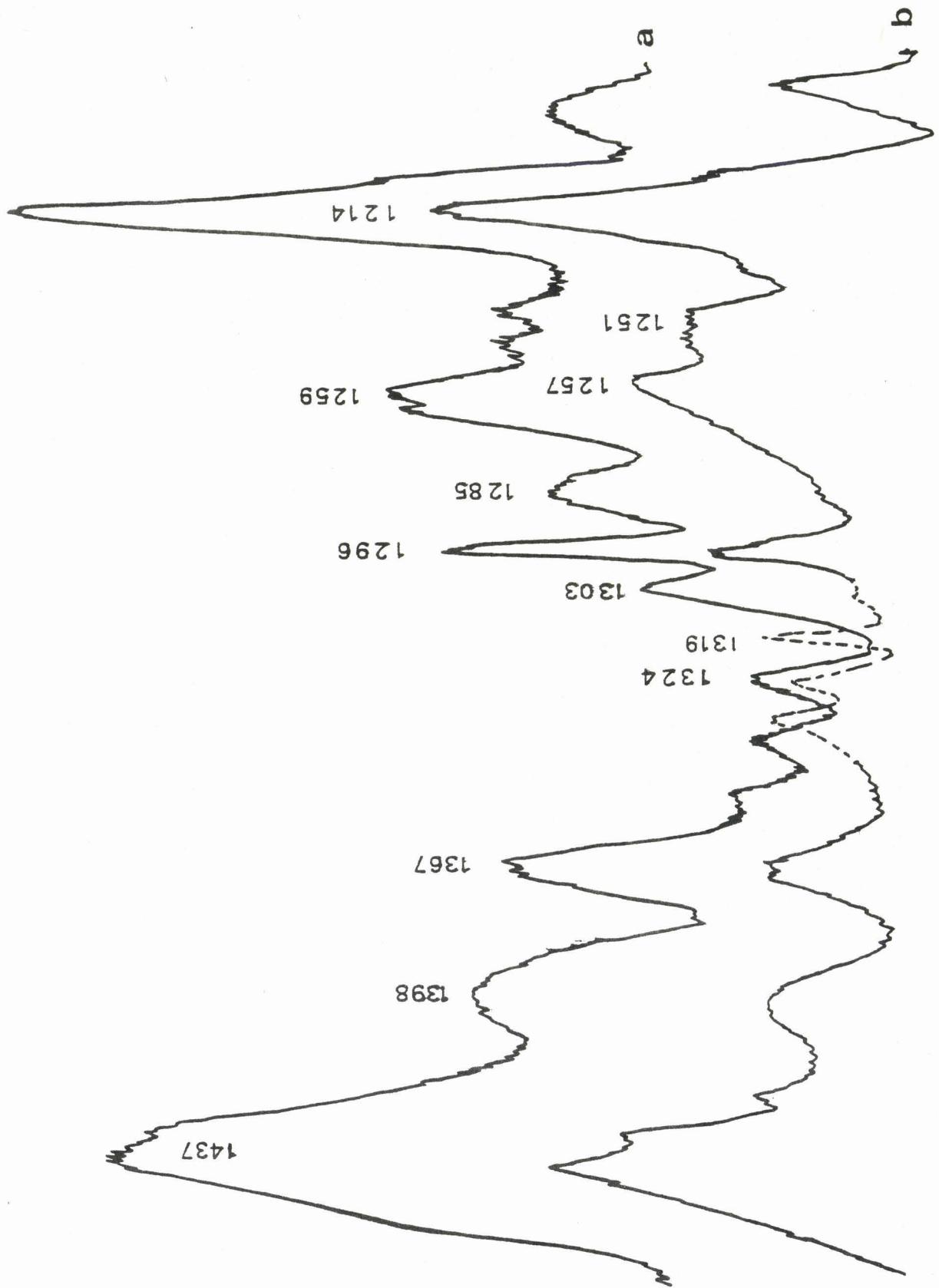
FORCE CONSTANTS FOR GPCG (B-TURN)

K (C=O)	8.65	K (C3=O)	7.88 (Pro)
K (NC _α)	4.19	K (CO--H)	0.19
K (C _α C)	1.92	K (C=N)	5.13
H (C _α CN)	0.3	F (C _α CN)	0.7
H (C _α C=O)	0.46	F (C _α C=O)	0.5
H (NC=O)	0.4	F (NC=O)	1.76
H (CNC _α)	0.37	F (CNC _α)	0.79
H (CNH)	0.296	F (CNH)	0.24
H (C NH)	0.233	F (C _α NH)	0.201
H (NC _α C)	0.16	F (NC _α C)	0.5
H (NC _α H)	0.33	F (NC _α H)	0.48
H (CO--H)	0.02	H (NH--O)	0.02
H CO--H	0.05	H CO--H	0.02
H NH--O	0.02	H NH--O	0.02
W (C=O)	0.42	W (NH)	
Tor(C _α C)	0.17	Tor(C3=N)	0.69
Tor(C=N)	0.274	Tor(NC _α)	0.1
Kappa NH3	-0.05	Kappa CH2	-0.02
P CH-CH	-0.11	P NH-NH	-0.11

Table iv

Z-G-L-PGG-OMe
5 % In DMSO-d₆





Conclusion:

Les fréquences caractéristiques des principales liaisons amide incluses dans un coude de type B II ont été étudieres expérimentalement et de façon théorique.

Certaines fréquences comme celles reliées aux vibrations amide III different des résultats obtenus par d'autres auteurs. Ces auteurs proposent la region 1300-1330 cm⁻¹ comme étant caractéristique de la vibration amide III pure. Nos calculs prévoient cette vibration à des fréquences inférieures 1255-1285 cm⁻¹ avec des contributions du mode amide III aux vibrations des groupes méthylène vers 1320-1340 cm⁻¹. Nous verrons au chapitre suivant l'importance de l'étude de cette vibration particulière.

Les constantes de force finales peuvent maintenant être transfereees à des conformations proches du modèle précis étudié ici.

Introduction aux coudes β

Les constantes de force obtenues à partir de la simulation par traitement des coordonnées normales sur un peptide modèle (GPGG) adoptant une conformation en coude β II sont transférées au même peptide dans les diverses conformations "standard" des coudes β (I, III pour G-L-PGG et I', II', III' pour G-D-PGG) .

Les fréquences vibrationnelles des groupes amide ont été calculées pour chaque type de coude β .

Les effets des différents potentiels ont été dégagés.

Des relations diédrales liant les fréquences de vibration amide III et amide V en fonction des angles Ψ (angle de torsion des liaison NC_αCN) ont été mises en évidence.

Une comparaison est faite entre nos prédictions de fréquence de vibration et les fréquences obtenues expérimentalement par plusieurs auteurs sur des peptides adoptant des conformations repliées .

VIBRATIONAL NORMAL MODES OF FOLDED PROLYL-CONTAINING

PEPTIDES: APPLICATION TO β -TURNS

Philippe LAGANT, Gérard VERGOTEN, Guy FLEURY, Marie-Henriette
LOUCHEUX-LEFEBVRE

Laboratoire de Physique , Faculté de Pharmacie de LILLE
3 rue du Pr LAGUESSE 59045 LILLE cedex FRANCE

Institut de Recherche sur le Cancer U 124 INSERM
BP 311 59020 LILLE Cedex FRANCE

Laboratoire de Physique Faculté de Pharmacie de LILLE
3 rue du Pr LAGUESSE 59045 LILLE cedex FRANCE
Centre de Technologie Biomédicale INSERM SCn4
13,17 rue C. GUERIN 59800 LILLE cedex FRANCE

Abbreviations:

GP:Glycyl-L-Proline,GPGG:Glycyl-L-Prolyl-GlycylGlycine, Z:
Benzoyloxycarbonyl group,OMe: Methyl ester,NMR: Nuclear Magnetique
Resonance, normal mode of vibration,P.E.D : Potential Energy
Distribution

SUMMARY:

Normal mode analysis of standard β -Turns have been performed using the refined force field obtained from a type II β Turn like conformation frequencies.

Effects of various potentials are discussed and theoretical predictions are compared to the experimental results of various authors.

INTRODUCTION:

Raman and infrared spectra are of great help to determine folded structures in complex edifices as globular proteins. In a previous work, we determinated the refined force field (1) obtained from normal mode calculations of a type II β turn (2,3,4) like structure using the peptide Gly-L-Pro-Gly-Gly (GPGG) which adopts a type II β turn conformation (3) as model. Moreover we analyse the conformation amide III normal mode relationship.

In the present work different standard β turns (2) characterized by a set of dihedral angles (Φ, Ψ), were considered. More especially their amide frequencies were calculated using the results previously obtained with the type II β turn refined force field determination (4). A calculated amide frequencies-dihedral angles relationship was established for the type I and type III β turn as well as for their corresponding mirror arrangements, the so-called β -turns of type I', II' and III' the dihedral angles of which were given by VENKATACHALAM (2).

This way is a good opportunity to relate amide group frequencies to various conformational states depending on their (Φ, Ψ) dihedral angles as previously done by KRIIMM and BANDEKAR (5,6) and LORD (7).

MATERIAL AND METHODS:

The theoretical normal modes have been calculated using a modified UREY-BRADLEY force field. Additional potentials were taken into account including dipolar effects (V_1 term), non bonded atom pairs (V_2 term) and terminal group electrostatic interaction (V_3 term). The force constants set obtained from the type II β turn normal mode calculations (1) was used without modification.

The schematic representation of a β -turn was drawn in Fig 1 and the dihedral angles of the different types of turn we consider are given in Table 1. The four residues of the peptide Gly-L-Pro-Gly-Gly were numbered sequentially i to i+3. The three distinct carbonyl groups corresponding to the i, i+1 and i+2 residues were written $(CO)_1$, $(CO)_2$ and $(CO)_3$ respectively and the two i+2 and i+3 NH groups NH(I) and NH(II) respectively.

RESULTS:

Table 1 displays the calculated amide group frequencies for each standard β turn according to the VENKATACHALAM notation (2). For this calculation, the (NH)I group was considered as being free, that is without external hydrogen bond, while the (NH)II group was included in an intramolecular hydrogen bond in order to stabilize the C_{10} structure (β turn). -150-

Since it is well known that the presence or lacking of hydrogen bonds has a significant effect on the amide I and amide III frequencies (5) (increasing the frequency when the NH groups are hydrogen bonded), the frequencies were also calculated for the NH(I) group included in a hydrogen bond and for the NH(II) when its intramolecular bond is disrupted. One observes that the resulting calculated frequency shifts are not similar for the two NH groups and this result is at variance with previous works (5).

Table 2 gives the relative contributions to the potentials of the dipolar (V_1) interactions, non bonded interactions (V_2) and hydrogen bond (V_3).

The amide I modes associated with the C=O stretching vibration is very sensitive to both the V_1 and V_2 potentials, but the contributions to the frequencies of the V_3 potential can be neglected. At the opposite, the amide II, III and amide V modes are highly sensitive to both the V_2 and V_3 potentials. Unfortunately, the IF amide II bands, the intensities of which are very important, are overlapping to the bands arising from the prolyl ring vibrations in the 1540-1580 cm⁻¹ range and therefore, in our case, can not be used to identify the turn structure. On the other hand, it must be remembered that the amide III is sensitive to the backbone conformation and to the side chain composition.

This fact is shown in table 3 where the Potenti Energy Distribution corresponding to the amide I modes is given.

One can observes that these frequencies are high dependent of the (C_4H_2) group for the NH(II) group and the prolyl ring vibrations for NH(I).

So it is possible to obtain a $\bar{\nu}(\text{amide III}) = f(\underline{Y})$ relationship for the model peptide we study i.e., GPGG even in distinguishing between the different types of turns. However, for all the types of turn we examined, a band located at between 1284 and 1291 cm^{-1} has to be considered attentively since the NH deformation contribution to its frequency is higher than 50% (Table 2). Therefore this band could be characteristic of a β turn folded structure but without possibility to distinguish between the different types of turns.

The amide V modes, which are essentially arising from the NH deformations have been shown to be particularly sensitive to the conformation (8). Fig 2 displays the $\bar{\nu}(\text{amide V}) = f(\underline{Y})$ relationship corresponding to the NH(I) group either free or included into a hydrogen bond. The shape of this curve is reminiscent of this one we previously obtained in the case of the amide III band (4). Such dependences suggested to us a $(\bar{\nu} \text{amide III}/\bar{\nu} \text{amide V}) = f(\underline{Y})$ relationship (Fig 3) characterized by a "linear" representation.

This fact is shown in table 3 where the Potential Energy Distribution corresponding to the amide III modes is given.

One can observes that these frequencies are highly dependent of the (C_4H_2) group for the NH(II) group and of the prolyl ring vibrations for NH(I).

So it is possible to obtain a $\bar{\nu}(\text{amide III}) = f(\psi)$ relationship for the model peptide we study i.e., GPGG even in distinguishing between the different types of β turns. However, for all the types of turn we examined, one band located at between 1284 and 1291 cm⁻¹ has to be considered attentively since the NH deformation contribution to its frequency is higher than 50% (Table 2). Therefore this band could be characteristic of a β turn folded structure but without possibility to distinguish between the different types of turns.

The amide V modes, which are essentially arising from the NH deformations have been shown to be particularly sensitive to the conformation (8). Fig 2 displays the $\bar{\nu}(\text{amide V}) = f(\psi)$ relationship corresponding to the NH(I) group either free or included into a hydrogen bond. The shape of this curve is reminiscent of this one we previously obtained in the case of the amide III band (4). Such dependences suggested to us a $(\bar{\nu}\text{amide III}/\bar{\nu}\text{amide V}) = f(\psi)$ relationship (Fig 3) characterized by a "linear" representation.

DISCUSSION:

Let us now do a comparison between our calculated frequencies and the numerous experimental Raman and infrared studies which have been performed on folded peptides. These experimental studies principally consider the amide A and amide I frequencies to identify the conformational features. Moreover, only few of them were carried out using N-deuteration to correlate the amide mode frequencies to the local conformation. We will successively consider the experimental results with the different types of β turns.

Type I turns:

KAWAI and FASHMAN (9) have performed a study of Z-Gly-L-Ser (OtBu)-L-Ser-Gly-O-Stearyl ester by circular dichroism and infrared spectroscopy and they concluded to the presence of a type I β turn. This result was judged as equivocal by SMITH and PEASE (10). However, it is interesting to observe that their amide I mode frequencies (1695, 1635 cm⁻¹ with a 1665 cm⁻¹ shoulder) obtained onto a film cast from cyclohexan are in fair agreement with the frequencies we calculated (Table I) (1695, 1663 and 1643 cm⁻¹).

HAN et al (11) studied the peptide Z-Gly-Pro-Leu-Gly in the crystal form, the X-ray determination of which was carried out. This peptide exhibits a type I β turn. The authors reported the 1683, 1651 and 1637 cm^{-1} bands as arising from the amide I modes that is at lower frequencies than expected for our calculated type I turn. This discrepancy could be due to the fact that their experimental spectrum was recorded on a crystal. The examination of the frequencies of the bands arising from other amide modes would allow to gain some information in this case. Unfortunately, the 1336-1349 cm^{-1} bands that they attributed as arising from the amide III mode were not corroborated using N deuteriation. From another peptide obtained in a crystal form, S-Benzyl-Cys-Pro-Leu-Gly- NH_2 , FOX et al (12) identified a type I β turn (crystallographic data (13)) and they observed the amide I mode frequencies at 1664 cm^{-1} and the amide III frequencies at 1235, 1261 and 1294 cm^{-1} . These values have to be compared with those we calculated from the normal coordinate treatments on GPGG for a type I β turn i.d for the amide III modes 1274 and 1284 cm^{-1} with contributions at 1236 and 1339 cm^{-1} .

Type II β turns:

Several experimental studies were also performed on β turns of type II.

ISHIZAKI et al (14) have reported the 1668 cm⁻¹ (amide I) and 1286 cm⁻¹ (amide III) bands corresponding to the peptide tBoc-Cys-Pro-Val-Cys-CO-NH-CH₃ the secondary structure of which was distinguished as a type II β turn by NMR spectroscopy. FOX et al (12) observed for Pro-Leu-Gly-NH₂ (crystal) which adopts a type II β turn structure (X-Ray data(15)) the amide I bands at 1688 and 1649 cm⁻¹ and the amide III bands at 1238, 1266 and 1283 cm⁻¹. HSEU and CHANG (16) carried out a study on the same peptide Pro-Leu-Gly-NH₂ either in the solid state or in solution (H₂O and DMSO). Their results are similar to those obtained by FOX et al for this type II β turn structure ; the amide I frequencies are observed at 1687 and 1650 cm⁻¹ (solid state) and at 1669 cm⁻¹ in DMSO and the amide III bands at 1259 cm⁻¹ (pH 2) and 1242 cm⁻¹ (pH 12) in aqueous solution.

An experimental work carried out by ISHIZAKI et al (17) on Anthopleurin A reported the 1677 cm⁻¹ (amide I) and 1254, 1260 and 1272 cm⁻¹ (amide III) bands as arising from a mixing of type II β turn and antiparallel β sheet structures as determinated by ¹³C NMR studies.

BANDEKAR et al (18) studied the cyclo(L-Ala-D-Ala-aminocaproyl) whose the structure was identified as being a β turn of type II by NMR and circular dichroism studies. They observed the amide I band at 1669 cm⁻¹ (Raman) and 1641 cm⁻¹ (IR).

They reported the calculated amide I at 1656 cm⁻¹ as arising from a mixed state of β turns of types II and I'.

NAIK et al (19) studied Pro-Leu-Gly-NH₂. They reported the amide I bands at 1698, 1688 and 1653 cm⁻¹ and the amide III mode bands in the 1290-1330 cm⁻¹ range.

Type III β turn:

ISHIZAKI et al (14) and RAO et al (20) in their studies on Z-Aib-Pro-CO NHCH₃, and on Alamethicin fragments found the typical amide I and III bands at 1677, 1286 cm⁻¹ and 1658, 1646 cm⁻¹ respectively. These values are in fair agreement with those we calculated for the type III β turn (Table I) as expected in this case since the structure exhibited by these peptides and determinated by X-ray is a β turn of type III (21).

SUCHARDA-SOBTCZYK et al (22) studied Tuftsin, a tetrapeptide with the sequence Thr-Lys-Pro-Arg and its analogs. They attributed the bands at 1685, 1655 (diffuse) and 1630 cm⁻¹ as arising from the amide I mode. They characterized this folded structure using ¹³C NMR and circular dichroism and found a β Turn III structure (23).

In conclusion of this compilation, (table 4) the following remarks have to be done:

* Despite the slight differences between our predicted amide frequencies and those previously done (5), a fairly good agreement is observed. Comparison between our calculated values and the experimental ones obtained from IR and Raman spectra recorded on peptides taking up a folded structure are relatively satisfying.

* The amide I mode does not appear as the best one to identify whatever the type of β turn. In particular, we did not find any band characteristic of neither a type I nor a type II β turn.

* No amide III mode frequencies were calculated in the 1300-1330 cm⁻¹ range. However, high frequency contributions were predicted by us in the 1335-1350 cm⁻¹ region as well as at lower frequencies in the 1240-1255 cm⁻¹ region.

* Last, but not the least, it is important to point out that the frequencies are sensitive to the skeleton conformation, of course, but also to the side chain composition of the peptide considered. In other words, the calculated frequencies are depending of the peptidic model used for the calculations. As an example of this observation, the role played by the non-bonded atom pair interactions we have taken into account in our calculations is well illustrated by the following studies.

The Gly-Pro-Leu-Gly in its zwitterionic form adopts in solution in DMSO-d₆ a type I β turn structure as evidenced by NMR study (24) when the peptide Gly-Pro-Gly-Gly in the same conditions exhibits a type II β turn (3). So non-bonded interactions of the Leu residue side chain determines the type of folding present in the molecule and have not to be neglected.

Amide frequencies were also calculated for the mirror arrangements of the type I, II and III β turns and the so-called types I', II' and III' (2) using the Gly-D-Pro-Gly-Gly model. The calculations were carried out using the same force constants that those used for the types I, II and III. Therefore, the differences between the frequencies calculated for one type of β-turn and its mirror arrangements could be essentially attributed to the dipolar and non-bonded interaction potentials. The work of HAN et al (25) which recorded a Raman spectra on (Leu⁵) Enkephalin which adopts a type I' β turn allows to do a comparison with our calculated values. These authors found a broad band located at 1674 cm⁻¹ they assigned to the amide I mode frequency. Our corresponding predicted amide I frequencies are 1663, 1661 and 1656 cm⁻¹. On the other hand, they observed the amide III modes at 1255, 1271, 1282 and 1325 cm⁻¹ (calculated values at 1284, 1293 cm⁻¹ and contribution at 1225 cm⁻¹).

This discrepancy between the calculated and observed amide I and III frequencies may be explained as arising from the side chain effects.

Many experimental works were carried out on proteins having a folded structure. PLETNEV et al (26) studied Isoleucinomycin and they observed bands at 1655 and 1663 cm⁻¹. TAKAMATSU et al (27), HARADA et al (28), YU et al (29) studied neurotoxins and snake venom components. In all cases the results can be interpreted as arising from a mixture of different structures in which the percentage of B antiparallel pleated sheet structure would be very important. Sometimes, the presence of the amide III frequencies in the 1250-1266 cm⁻¹ range would suggest presence of folded conformations. ISHIZAKI et al (17) when studying Anthopleurin A observed the presence of bands at 1677, 1254, 1260 and 1272 cm⁻¹ using N-deuteration which were tentatively assigned to the presence of a type II B turn structure.

CONCLUSIONS:

The comparison between predicted frequencies calculated from experimental results onto a B turn II conformation and frequencies obtained by other workers lead us to be confident of Raman spectroscopy.

Previous work (4) has shown a LOR'D's like relationship for the amide III (and III') modes. Much attention will be further carried on such relations and experiments would be of the best possible resolution. In another part N-deuteration is necessary to make sure assignments of the NH amide group vibrations which seem very conformational dependent

Our studies were performed on a prolyl containing peptide and this fact may explain that our calculated frequencies would differ slightly from previous authors' ones (5). However, their results and ours would be taken as theoretical predictions for experimental determinations of folded conformations.

In the present work, a $\bar{v}(\text{amide V}) = f(\Psi)$ relationship was developped as well as a $\bar{v}_{\text{am III}}/\bar{v}_{\text{am V}} = f(\Psi)$ variation. Much attention would be further carried out to determine experimental frequencies with the best possible resolution. Especially, the assignments of the NH amide group vibrations which seem very conformational dependent will have to be sure using N-deuterations.

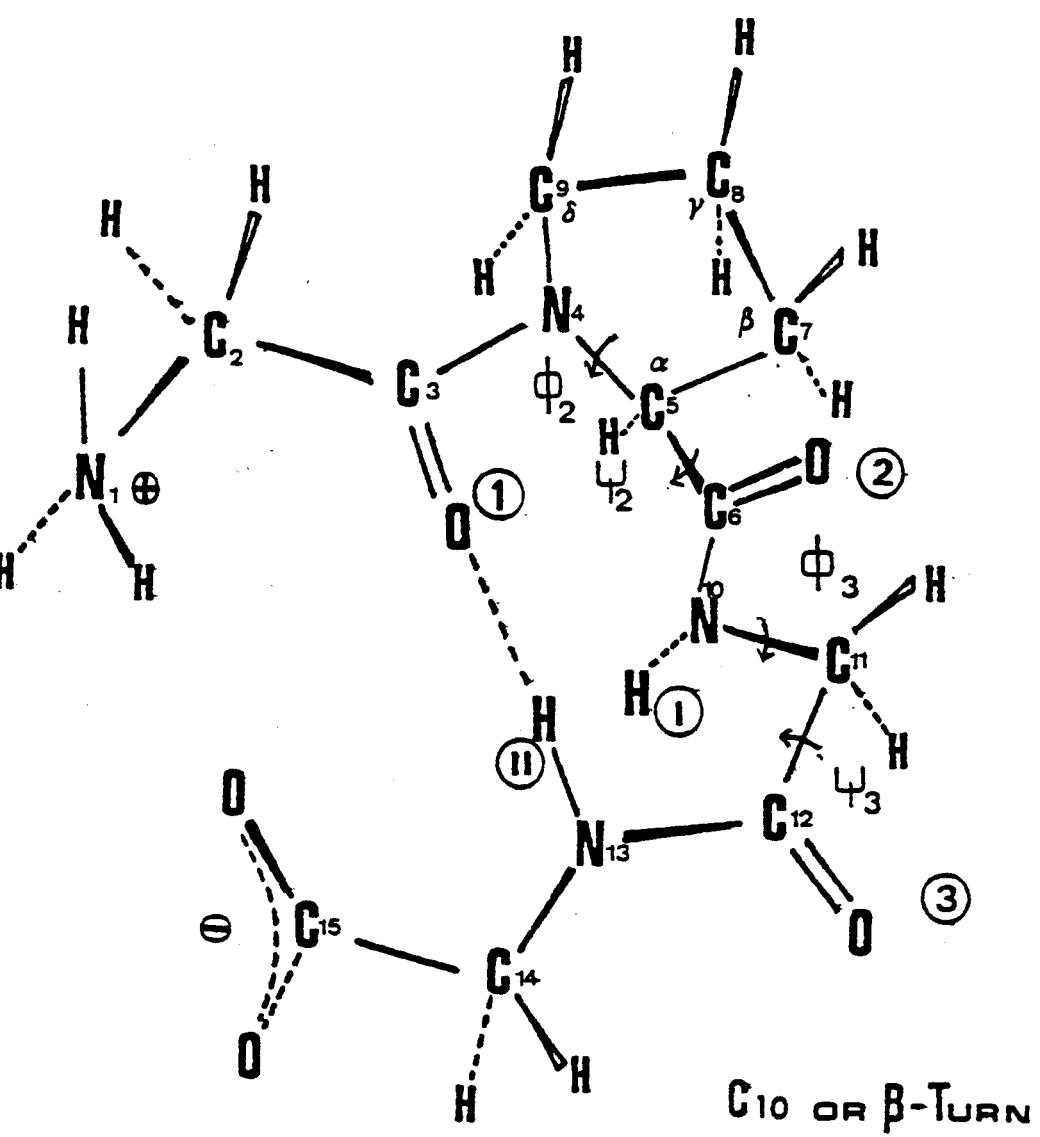
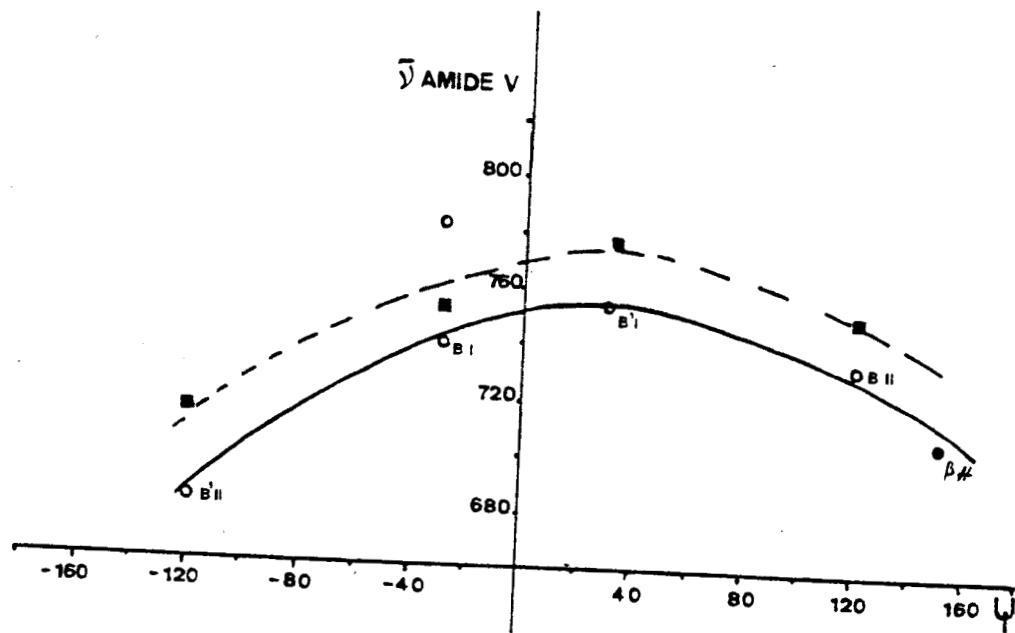


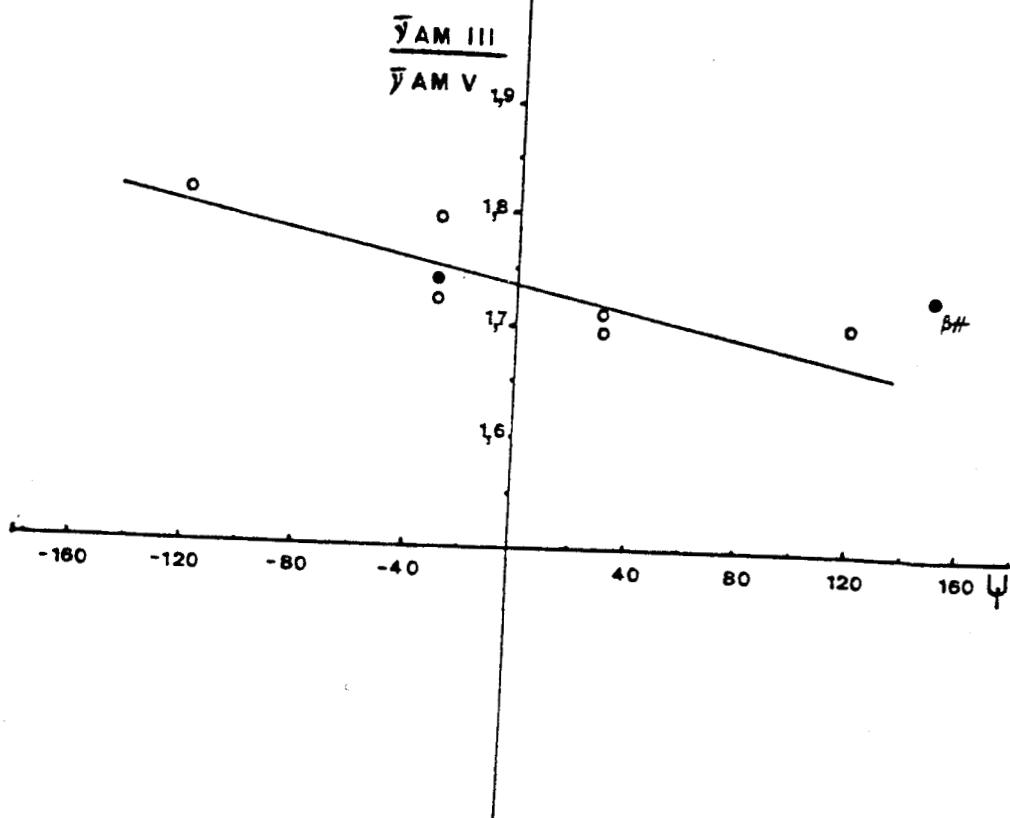
FIG 1

BUS
LILLE



○ (NH)_I FREE

■ (NH)_I BOUND



BUS
LILLE

Type of B Turn	B I	B II		B III	B I'	B II'	B III'
		Calc. Obs.					
Normal mode		1695	1684	1687	1697	1656	1687
Am I		1663	1654	1657	1658	1661	1667
		1643	1646	1647	1630	1663	1646
Am II		1520	1546		1518	1543	1523
		1562	1567		1573	1567	1577
Am II'		1470	1486		1456	1468	1488
		1490	1492		1494	1491	1492
Am III		1284	1283	1287	1289	1284	1291
		1274	1255	1254	1277	1293	1239
Am III'		979	980	975	992	976	978
		952	954	955	946	963	924
Am IV		585	624		612	581	588
		609	604		575	636	667
		613	614		658	664	562
Am V		740	735		767	754	683
		716	728		784	708	728
Am V'		553	570		527	539	530
		521	507		604	507	496
Am VI		586	614		595	602	624
		588	582		602	573	598
		549	538		516	536	537
Φ_2		-60°	-60°		-60°	60°	60°
W_2		-30°	120°		-30°	30°	-120°
Φ_3		-90°	00°		-60°	90°	-80°

normal mode		$\Lambda_m V_1$			$\Lambda_m V_2$			$\Lambda_m V_3$		
Type of turn		(2)	(1)	(3)	(1)	(11)	(1)	(11)	(1)	(11)
I	V ₁	11	3	-14						
	V ₂	5	6	2	11	25	9	19	26	23
	V ₃		2	11-27	35	4-10	12	10	10	10
II	V ₁	10	1	-9						
	V ₂	9	8	2	10	17	15	24	10	12
	V ₃			10-20	40	6-14	13	14	5	5
III	V ₁	10	-9	-1						
	V ₂	5	-16	17	12	48	6	24	14	70
	V ₃			11-28	30	4-11	4	37	30	30
IV	V ₁	-7	2	8						
	V ₂	4	11	7	21	14	16	18	22	9
	V ₃	-1	-1	0	9-20	39	4-10	21	9-22	14
IV'	V ₁	12	-1	-11						
	V ₂	6	13	3	38	37	11	3	11	15
	V ₃			8-20	14	5-12	21	30	6	6
IV''	V ₁	2	-5	4						
	V ₂	5	13	1	17	30	20	25	20	15
	V ₃		-2	22	4	0	4	20	150	150

- a) $r(c_1=0, c_2=0)$
 b) $r(c_1=0, c_3=0)$
 c) $r(c_2=0, c_3=0)$

V_1 dipolar interaction, V_2 non bonded atom pair interaction, V_3 hydrogen bond potentials.
 a, b, c are the dipolar force constants in mdyn/ \AA .
 Different values for V_3 are given for the force constant $R(C_2-C_3)=0.02-0.05 \text{ mdyn}/\text{\AA}$.

Table 3

Wavelength, δ banding, ν wavenumber, ν , stretching, ν group frequency, ν group frequencies and corresponding P.E.O.

CALCULATED AMIDE III GROUP FREQUENCIES AND CORRESPONDING P.E.O.

$\bar{\nu}$	P.E.O.	$\bar{\nu}$	P.E.O.	$\bar{\nu}$	P.E.O.	$\bar{\nu}$	P.E.O.	$\bar{\nu}$	P.E.O.	$\bar{\nu}$	P.E.O.	$\bar{\nu}$	P.E.O.																																				
1339	(NH) _{ii}	0.5 ν (C ₁₁₂) + 0.15 ν (C ₁₂) + 0.23 δ (NH---O) + 0.13 δ (NH ₃ H)	1284	(NH) _{ii}	0.408 (NH ₁₁ -O) + 0.223 (NH ₁₂) + 0.17 ν (C ₁₂ N) + 0.06 γ (NH ₃ H) + 0.05 ν (C ₁₂ C ₁₂)	1236	(NH) _{ii}	0.358 (NH ₁₁) + 0.253 (NH ₁₂) + 0.19 ν (C ₁₂ N) + 0.11 δ (C ₁₁₂) + 0.11 δ (NH ₃ H) + 0.05 ν (N ₁₃ C ₁₂)	1337	(NH) _{ii}	0.5 ν (C ₁₁₂) + 0.23 δ (NH---O) + 0.15 ν (C ₁₁₂) + 0.17 ν (C ₁₂ N) + 0.06 γ (NH ₃ H) + 0.05 ν (N ₁₃ C ₁₂)	1255	(NH) _{ii}	0.19 ν (C ₆ N ₁₀) + 0.168 (NH ₃ H) + 0.161 ν (C ₉ H ₂) + 0.11 δ (NH ₃ H) + 0.05 ν (N ₁₃ C ₁₂)	1235	(NH) _{ii}	0.238 (NH ₁₁) + 0.25 ν (C ₆ C ₆) + 0.17 ν (C ₇ H ₂) + 0.12 ν (C ₈ H ₂) + 0.08 ν (C ₉ H ₂) + 0.05 δ (NH ₁₁ -O)	1277	(NH) _{ii}	0.288 (NH ₁₁) + 0.203 (NH ₁₂) + 0.14 ν (C ₁₂ N) + 0.12 ν (C ₁₁₂) + 0.078 (C ₁₁₂) + 0.078 (C ₁₂ N) + 0.04 ν (N ₁₃ C ₁₂)	1241	(NH) _{ii}	0.24 ν (C ₆ C ₆) + 0.16 ν (C ₆ N) + 0.15 δ (C ₁₁₂) + 0.07 ν (C ₅ C ₆) + 0.01 ν (C ₆ N ₁₀)	1225	(NH) _{ii}	0.47 ν (C ₇ H ₂) + 0.16 ν (C ₈ H ₂) + 0.17 ν (C ₉ H ₂) + 0.11 ν (C ₁₀ C ₁₀) + 0.098 (NH ₃ H) + 0.05 ν (N ₁₃ C ₁₂)	1291	(NH) _{ii}	0.498 (NH ₁₁ -O) + 0.163 (NH ₁₂) + 0.158 (C ₁₁₂) + 0.098 (NH ₃ H) + 0.05 ν (N ₁₃ C ₁₂)	1277	(NH) _{ii}	0.311 ν (C ₇ H ₂) + 0.21 δ (NH ₁₁) + 0.15 ν (C ₆ N ₁₀) + 0.07 ν (C ₃ N ₄) + 0.07 ν (C ₂ C ₃)	1209	(NH) _{ii}	0.358 (NH ₁₁) + 0.278 (NH ₁₂) + 0.161 ν (C ₁₁₂) + 0.067 (C ₁₁₂) + 0.07 ν (C ₆ N) + 0.07 ν (N ₁₃ C ₁₂)	1111													

EXPERIMENTAL FREQUENCIES FOR FOLDED PEPTIDES

	Amide I	Amide III	Amide V
B I	1695, 1663, 1643 ^a 1695, 1635, 1665(sh) ^b 1683, 1651, 1637 ^c 1664 ^d	1284, 1274, 1236 ^a 1235, 1261, 1294 ^d	740, 716 ^a
B II	1687, 1657, 1647 ^a 1691, 1654, 1639 ^e 1668 ^f 1664, 1695, 1654 ^g 1669(R), 1641(IR) ^h 1698, 1688, 1653 ⁱ 1683, 1650 (IR) ^o 1688, 1649 ^o 1687, 1650 ^p 1669 ^q	1287, 1255 ^a 1286 ^f 1336, 1318, 1297, 1257 ⁱ 1237, 1259, 1283 ^o 1238, 1266, 1283 ^o 1259(PH2), 1242(PH12) ^p 1234, 1268 ^p	728, 735 ^a 625-690 ⁱ
B III	1697, 1658, 1630 ^a 1677 ^l , 1658 ^m , 1646-1632 ^m 1685, 1655, 1630(IR) ⁿ	1289, 1277 ^a 1286 ^l	784, 714 ^a
B I'	1642, 1674 ^r 1691 ^s 1657 ^t	1255, 1271, 1282, 1325 ^r	
a) calculated frequencies: this work and ref 2			
b) KAWAI & al (9) ZGly-L-Ser(OBut)-L-Ser-Gly-OStearyl ester (film from CHCl ₃)			
c) HAN & al (11) ZGly-L-Pro-L-Leu-Gly (crystal)			
d) FOX & al (12) SBenzyl-L-Cys-L-Pro-L-Leu-GlyNH ₂ (crystal)			
e) our work (2) ZGly-L-Pro-GlyGlyOMe (film from CHCl ₃)			
f) ISHIZAKI & al (14) tBoc-L-Cys-L-Pro-L-Val-L-Cys-CONHCH ₃ (solid and into D ₂ O)			
g) our work (2) Gly-L-Pro-GlyGly into DMSO-d ₆			
h) BANDEKAR & al (18) cyclo(L-Ala-D-Ala-ε-aminocaproyl) (solid and in solution. A calculated frequency at 1656 cm ⁻¹ was obtained for a B turn II-B turn I' mixture.)			
i) NAIK & al (12) L-Pro-L-Leu-Gly-NH ₂ (solid)			
l) ISHIZAKI & al (14) Z-Aib-L-Pro-CONHCH ₃ (solid)			
m) RAO et al (20) (solid and solution)			
n) SUCHARDA-SOBCZYK et al (22) Tuftsin and its analogs (IR)			
o) FOX et al (12) H-Pro-Leu-Gly-NH ₂ (crystal)			
P) HSEU, CHANG (16) H-Pro-Leu-Gly-NH ₂ (solid and H O)			
q) HSEU, CHANG (16) H-Pro-Leu-Gly-NH ₂ (in DMSO)			
r) HAN et al Leu -Enkephalin (25)(crystal), s) in DMSO, t) in D ₂ O			

Table 4

PROTEINS WITH FOLDED STRUCTURES

Amide I
1655, 1663^a

Amide III
1252-1266^b

1677^c
1666, 1663^d

1254, 1260, 1272^c
1255, 1272^d

a) PLETNEV et al (26) Isoleucinomycin

b) TAKAMATSU et al (27), HARADA et al (28), YU et al (29) on snake venom neurotoxins

c) ISHIZAKI et al (17) Anthopleurin A

d) TU et al (30) Oxytocin and derivatives

TABLE 4

**CORRESPONDING PROLYL RING SYMMETRY COORDINATES
BETWEEN GP AND GPGG (B-TURN)**

Glycyl-L-Proline

Glycyl-L-ProlylGlycylGlycine(B-Turn)

S 3	S 3
S 4	S 4
S 5	S 5
S 6	S 20
S 7	S 21
S 8	S 22
S 9	S 23
S 11	S 19
S 27	S 43
S 28	S 44
S 29	S 45
S 30	S 46
S 31	S 47
S 32	S 48
S 33	S 49
S 34	S 50
S 37	S 51
S 40	S 54

Table 5

REFERENCES

1. LAGANT,P.,VERGOTEN,G.,FLEURY,G.,LOUCHEUX-LEFEBVRE,M.H.
Submitted for publication to Eur.J.Biochem.
2. VENKATACHALAM,C.M., (1968) Biopolymers,6,1425-1436
3. PERLY,B.,FORCHIONI,A.,HELBECKQUE,N.,LOUCHEUX-LEFEBVRE,M.H.
Submitted for publication to Biopolymers.
4. LAGANT,P.,VERGOTEN,G.,FLEURY,G.,LOUCHEUX-LEFEBVRE,M.H.
Submitted for publication to J.Amer.Chem.Soc.
5. KRIMM,S.,BANDEKAR,J. (1980) Biopolymers,19,1-29.
6. BANDEKAR,J.,KRIMM,S. (1980) Biopolymers,19,31-36.
7. LORD,R.C. (1977) Appl.Spectroscopy,31,187-194.
8. MIYAZAWA,T. (1967) Poly- -amino acids,FASMAN,G.D.,Ed.DEKKER YORK,p.69
9. KAWAI,M.,FASMAN,G. (1978) J.Am.Chem.Soc.,100,3630-3632.
10. SMITH,J.A.,PEASE,L.G. (1980) Crit.Rev.Biochem.,8,315-399.
11. HAN,S.L.,STIMSON,E.R.,MAXFIELD,F.R.,SCHERAGA,H.A.
(1981) Int.J.Peptide.Protein.Res.,17,297-315.
12. FOX,J.A.,TU,A.T.,HRUBY,V.J.,MOSBERG,H.I.
(1981) Arch.Biochem.Biophys.,211,628-631.
13. RUDKO,A.D.,LOW,B.W. (1975) Acta.Crystallogr.,B31,713-715.
14. ISHIZAKI,H.,BALARAM,P.,NAGARAJ,R.,VENKATACHALAPATHI,Y.V.,
TU,A.T. (1981) Biophys.J.,509-517.
15. REED,L.L.,JOHNSON,P.L. (1973) J.Am.Chem.Soc.,95,7523-7525.
16. HSEU,T.H.,CHANG,H. (1980) Biochem.Biophys.Acta.,624,340-345.
17. ISHIZAKI,H.,KAY,R.Mc.,NORTON,T.R.,YASUNOBU,K.T.,LEE,J.,TU,A.T.
(1979) J.Biol.Chem.,254,9651-9656.
18. BANDEKAR,J.,EVANS,D.J.,KRIMM,S.,LEACH,S.J.,LEE,S.,AINE,Jr.Mc.,
MINAMASIAN,G.,NEMETHY,G.,POTTEL,M.S.,SCHERAGA,H.A.,STIMSON,E.R.
WOODY,R.W. (1982) Int.J.Peptide.Protein.Res.,19,187-205.
19. NAIK,V.M.;BANDEKAR,J.,KRIMM,S. 7 th ICORS OTTAWA (1980) 596-597.
20. RAO,CH.P.,NAGARAJ,R.,RAO,C.N.R.,BALARAM,P.
(1980) Biochemistry,19,425-431.
21. PRASAD,B.V.V.,SHAMALA,N.,NAGARAJ,R.,CHANDRASEKARAN,R.,BALARAM ,P.
Biopolymers,18,1635-1646.
22. SUCHARDA-SOBCZYK,A.,SIEMION,I.Z.,KONOPINSKA,D.
(1979) Eur.J. Biochem.,96,131-139.
23. SIEMION,I.Z.,LISOWSKI,M.,KONOPINSKA,D.,NAWROCKA,E.
(1980) Eur.J.Biochem.,112,339-343.
24. TOMA,F.,THANH,H.L.,PIRIOU,F.,HEINDL,M.C.,LINTNER,K.,FERMANDJIAN,S
(1980) Biopolymers,19,781-804.
25. HAN,S.L.,STIMSON,E.R.,MAXFIELD,F.R.,SCHERAGA,H.A. (1980)
Int.J.Peptide.Protein.Res.,16,173-182.
26. PLETNEV,V.Z.,GALITSKII,G.D.,SMITH,G.D.,WEEKS,C.M.,DUAX,W.L.
(1980) Biopolymers,19,1517-1534.
27. TAKAMATSU,T.,HARADA,I.,HAYASHI,K.(1980) Biochim.Biophys.Acta
622,189-200.
28. HARADA,I.,TAKAMATSU,T.,SHIMANOUCHI,T.,MIYAZAWA,T.,TAMIYA,N.
(1976) J.Phys.Chem.,80,1153-1156.
29. YU,N.T.,LIN,T.S.,TU,A.T. (1975) J.Biol.Chem.,250,1782-1785.
30. TU,A.T.,BJARNASON,J.B.,HRUBY,V.J. (1978) Biochem.Biophys.Acta
533,530-533.

TABLE CAPTIONS

Table 1: Calculated values of the amide frequencies expressed in cm⁻¹. These frequencies were obtained using the refined force field of a type II B turn (1). NH(I) is considered without external hydrogen bond and NH(II) is included in an intramolecular hydrogen bond to form the B turn structure.

Table 2: Calculated contributions of the V₁, V₂ and V₃ potentials expressed in cm⁻¹ to the amide group frequencies.

Table 3: Calculated amide III frequencies for the various standard B turns and corresponding P.E.D

Table 4: Experimental frequencies for folded peptides.

Table 5: Corresponding Prolyl ring symmetry coordinates between GP and GPGG.

FIGURE CAPTIONS

Fig 1: The C₁₀ conformation for GPGG as taken for a model for standard B turns.

Fig 2: $\gamma(\text{amide V}) = f(\psi)$ relationship of the NH(I) group for standard B turns. The calculated amide V frequencies were given in table I. On the figure, the amide V frequency corresponding to an antiparallel B pleated sheet structure ($\psi=142^\circ$) is also shown.

Fig 3: $\bar{\gamma}(\text{am III})/\bar{\gamma}(\text{am V}) = f(\psi)$

Conclusion:

La comparaison entre nos prédictions de fréquence de vibration des groupements amide pour chaque conformation en coude β et les fréquences expérimentales prises dans la littérature pour des conformations analogues s'avère bonne.

La simulation des fréquences semble être efficace pour l'analyse de peptides coudés.

Les modes amide I ($C=O$ stretching), jusqu'ici très employés pour l'identification de la présence et du type de coude β donnent comparativement moins d'informations que les fréquences amide III. En effet les fréquences des modes amide I pour les β turns sont dans le même domaine que celles obtenues pour les chaînes β antiparallèles et les régions amide I peuvent se recouvrir si il existe plusieurs types de coudes β en même temps. Par contre la vibration amide III (et amide III') semble plus liée au type de coude β et dépend moins de la nature de la chaîne latérale que la vibration amide I.

Ceci nous conduit à étudier particulièrement la vibration amide III.

Introduction à l'amide III

Les fréquences calculées pour plusieurs types de coudes β nous ont mené à considerer les possibles relations dièdrales reliant les angles Ψ ou Φ à la fréquence caractéristique des groupes amide engagés dans une conformation particulière.

Ce chapitre décrit la relation dièdralement entre les fréquences prédictes et l'angle dièdral particulier Ψ_2 .

Le mode amide III (et III') apparaît comme une plus sûre mise en évidence de la présence de coudes β que ne le fait le mode amide I. Ce mode amide III a en effet un domaine de fréquence situé dans la région 1250-1300 cm⁻¹ à l'écart des bandes correspondantes des structures organisées telles que l'hélice α , les chaînes β parallèles ou antiparallèles ou encore hors du domaine "typique" des structures non organisées.

RAMAN SPECTROSCOPIC EVIDENCE FOR β -TURN CONFORMATION

P. LAGANT^x, G. VERGOTEN⁺, G. FLEURY⁺ AND M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE^{x Δ}

^xInstitut de Recherches sur le Cancer de Lille et Unité 124 de l'INSERM, BP 311, 59020 Lille Cédex, France

⁺Laboratoire de Physique, Faculté de Pharmacie, Rue du Professeur Laguesse, 59045 Lille Cédex, France
Centre de Technologie Biomédicale INSERM SNC4, 13-17, Rue C. Guérin, 59800 Lille Cédex, France

Δ To whom correspondence should be addressed.

Synopsis

A correlation connecting the well known amide III band frequency of the peptide bond with the torsional angle ψ is proposed.

Introduction

The determination of the secondary structure of proteins is generally based on the assumption of a three-state model consisting of α -helix, β -sheet and unordered structures. This last component, usually referred to as a "random coil" includes the β -turn structure.

However, β -turns are a relatively specific structure which constitutes a significant portion of the protein, and therefore its determination has not to be neglected. Raman spectroscopy seems to be a power tool to study such a structure and we will see in this paper that it allows to observe and to identify the peptide folding type.

We report here the result we obtained from Raman spectroscopy studies of the free peptide H-Gly-L-Pro-Gly-Gly-OH (GPGG) in DMSO- d_6 and its protected form Z-Gly-L-Pro-Gly-Gly-OMe (ZGPGGOMe) in CDCl₃. Both peptides adopt a reverse turn conformation which was identified as a type II β -turn¹ according to the Venkatachalam's classification².

This type II β -turn corresponds to one out the three main types of β -turns present in proteins and described as β -turns of types I, II and III (Fig. 1) by this author. Their corresponding mirror arrangements, the so-called β -turns of types I' II' and III' were also described.

Results and Discussion

In a previous work³, the type II β -turn normal modes of vibrations were calculated, from experimental results, using a modified UREY-BRADLEY type force field.

Primitive force constants were obtained from our previous works on dipeptides^{4,5}. Effects due to hydrogen bonds, dipolar and non-bonded atoms pair interactions were taken into account.

A good agreement was obtained between experimental and simulated spectra of GPGG and the refined force field was transposed to other folded conformations type I, III, I', II' and III' β -turns.

The region of amide III vibration provides a good opportunity to identify secondary structures. This mode of vibration gives medium Raman intensity frequencies arising from a mixed mode involving the N-H bond bending and the C-N bond stretching amide group vibrations. Its frequency is environment dependent, so Lord built up a $\nu(\text{amide III}) = f(\psi)$ relationship⁶, ψ being defined as the C-C bond rotational angle. Different ψ values were taken into account by Lord but they were centered at - 57° (α -helix) and 142° (β -antiparallel pleated sheet) for the ideal values of these structures.

Our aim was to establish this relation $\nu(\text{amide III}) = f(\psi)$ for the β -turn structures. Figure 2 displays the amide III region spectra of GPGG and N-deuterated GPGG (GPGG N-d₅) in DMSO-d₆ (no solvent bands appear in this region).

Frequencies of the main contributions to the calculated amide III vibrations are given Table I. Indeed our normal coordinate treatments lead us to calculate higher and lower frequency contributions to the amide III vibration as in the $1330-1350\text{ cm}^{-1}$ and $1230-1250\text{ cm}^{-1}$ ranges where mixing of amide III-neighbour methylene group vibrations occur.

In the $1330-1300\text{ cm}^{-1}$ range, the frequencies mainly originate from the C-terminal methylene vibrations whose shifts in frequencies upon N-deuteration reflect change in hydrogen bond forces of the carboxyl group.

This fact lead us to be in opposition with the β -turn amide III frequencies previously predicted by Krimm and Bandekar^{7,8}.

Therefore, appearance (or disappearance) of the amide NH hydrogen bond character lead to an increase (or decrease) of the amide III frequency. This effect results from two complementary facts :

- a frequency shift due to the loss of the hydrogen bonding ;
- a frequency shift due to the difference into the $\cdot V_2$ term³ arising from the destruction of non-bonded pair atom interactions.

Examination of possible correlations between the calculated amide III frequencies for six types of turns (Table I) and their respective ψ and ϕ dihedral angles was carried out and the following observations have to be done :

- Concerning the NH($i+3$) frequency, that is the band corresponding to the hydrogen bonded NH (Fig. 1), it is interesting to observe that this value is constant whatever the (ϕ , ψ) angles (Table I).

- No correlation exists between the amide III frequencies and ϕ . This was expected since Lord mentioned that for the secondary structure determination (for α and β structures) the ψ dihedral angle is the single parameter to consider.

- A variation of the NH($i+2$) frequencies versus ψ is difficult to establish since four out of the six values of ψ are nul. However it has to point out that this vibration is very sensitive to the type of β -turn considered.

- A plot $v(NH(i+2)) = f(\psi)$ was drawn as shown fig. 3. From this representation one observes that this NH($i+2$) frequency allows to discriminate between 1) type I and III β -turn amide III bands observed at about 1275 cm^{-1} and 2) type II β -turn at 1255 cm^{-1} .

The normal modes frequencies were also calculated for the amide I, II, III', V and V' vibrations of the six standard types of β -turns. These normal coordinate treatments were performed using the intramolecular hydrogen bond effect (V1 potential) non-bonded atom pair interactions (V2) and dipolar interactions between carbonyl amide groups (V3).

For amide I vibration (essentially due to the C=O stretching) our calculations lead to conclude that the amide I shifts arise mainly from the difference in the conformational states and/or the V2 potential. At the opposite, dipolar interactions (V3) have relatively smaller effects than predicted in previous works.

Conclusion

Raman spectroscopy and normal coordinate treatment of folded peptides provide good informations on amide group frequency conformational dependence. Further experiments are in progress to investigate more complex structures.

Legends

Figure 1. Schematic representation of β -turn of Gly-Pro-Gly-Gly (GPGG) in its zwitterionic form. The ϕ , ψ values corresponding to the types I, II and III of β -turns are indicated.

Figure 2. Raman spectra of Gly-Pro-Gly-Gly (GPGG) -A- and its N-deuterated homolog (GPGG N-d₅) -B- in DMSO-d₆ (C = 5 %). Amide III frequency range.

Figure 3. The ν (amide III) = f (ψ) relationship for the β -turns of types I, II, III, I', II' and III'.

Table I. Calculated amide III frequency of type I, II, III, I', II', III' β -turns. Only frequencies corresponding to the main contribution to the amide III band are given.
NH(i+2) is free ; NH(i+3) is hydrogen bonded (Fig. 1).
 ϕ and ψ values (Fig. 1) are taken from reference 2.

Table I

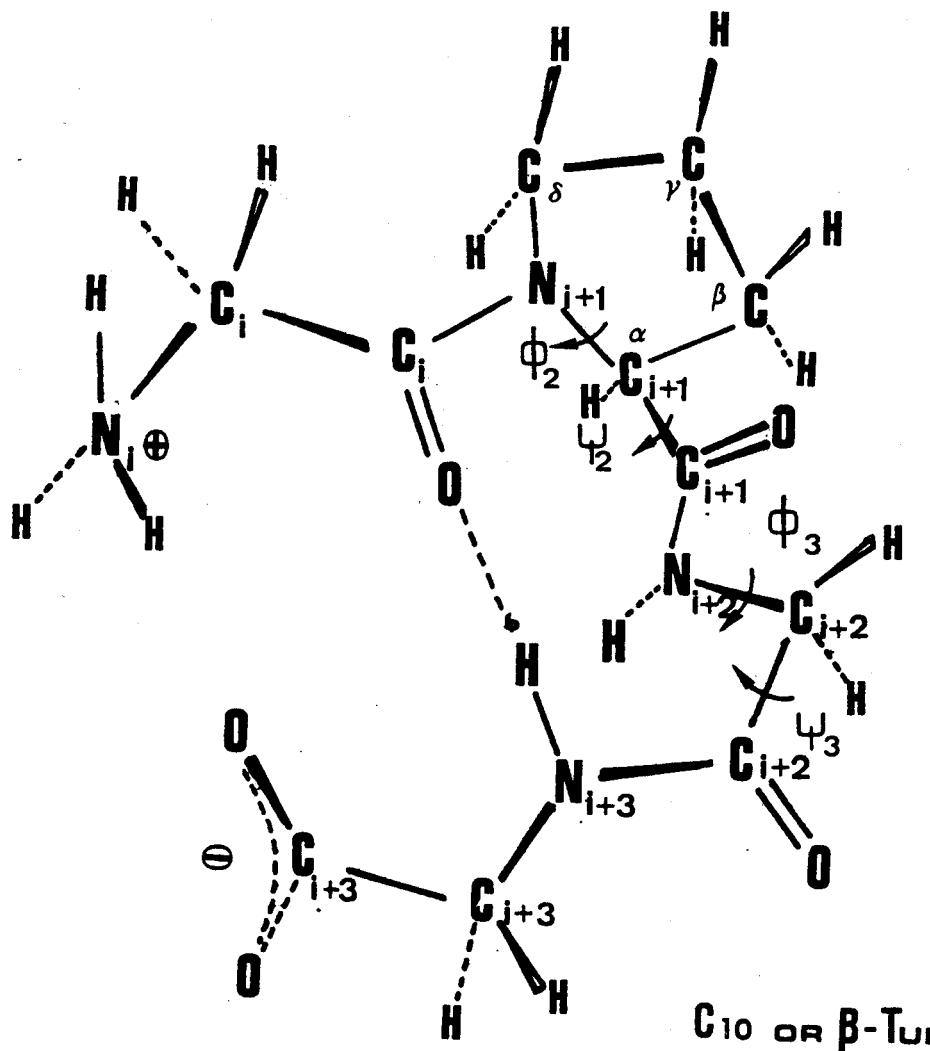
Type of β -turn	ϕ_2	ψ_2	$\bar{v}_{\text{NH}(i+2)}$ in cm^{-1}	ϕ_3	ψ_3	$\bar{v}_{\text{NH}(i+3)}$ in cm^{-1}
I	- 60	- 30	1274	- 90	0	1284
II ^x	- 60	120	1255	80	0	1287
III	- 60	- 30	1277	- 60	- 30	1289
I'	60	30	1293	90	0	1284
II'	60	- 120	1239	- 80	0	1291
III'	60	30	1277	60	30	1289

^x from reference 3.



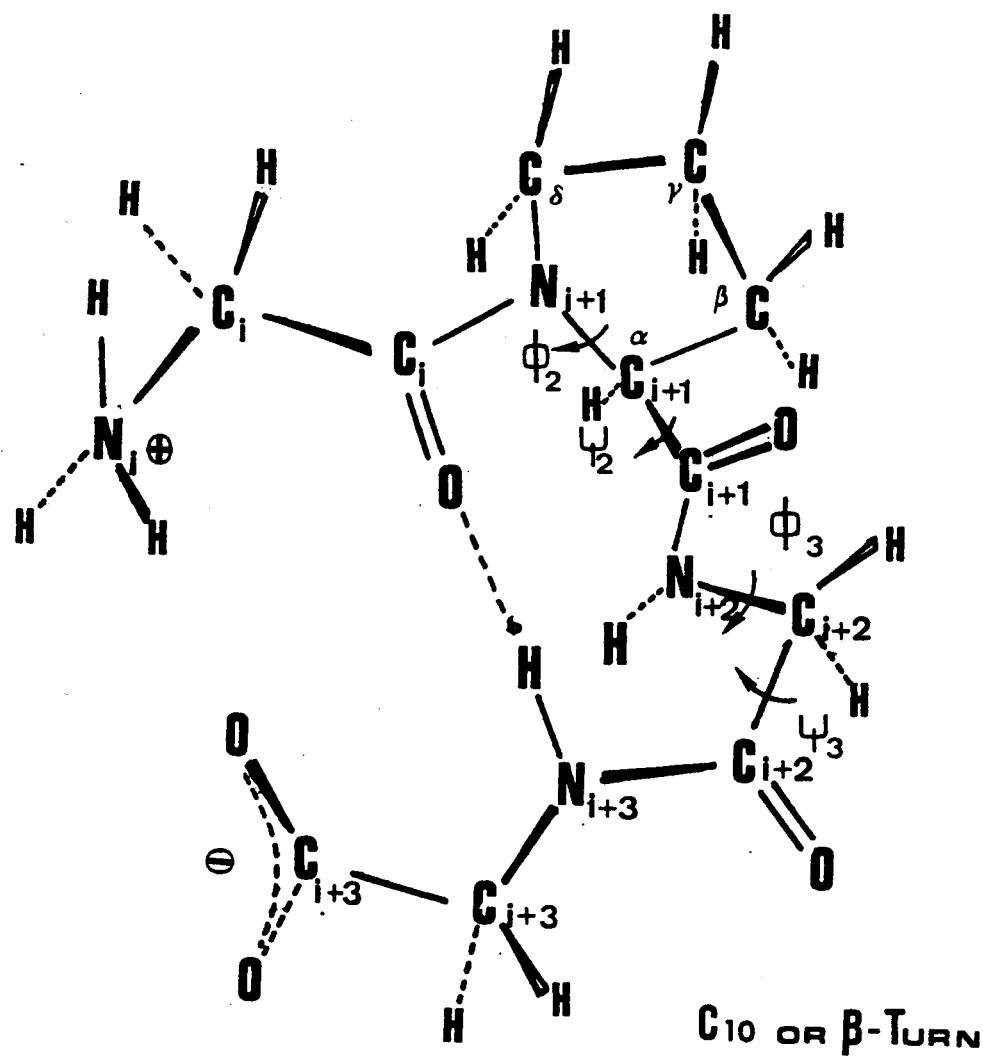
References

- (1) Perly, B.; Forchioni, A.; Helbecque, N.; Loucheux-Lefebvre, M.H. *Biopolymers*, in press.
- (2) Venkatachalam, C.M. *Biopolymers* 1968, 6, 1425-1436.
- (3) Lagant, P.; Vergoten, G.; Fleury, G.; Loucheux-Lefebvre, M.H. To be submitted.
- (4) Lagant, P.; Vergoten, G.; Fleury, G.; Loucheux-Lefebvre, M.H. *Biopolymers*, in press.
- (5) Lagant, P.; Vergoten, G.; Fleury, G.; Loucheux-Lefebvre, M.H. *Biopolymers*, in press.
- (6) Lord, R.C. *Applied Spectrosc.* 1977, 31, 187-194.
- (7) Bandekar, J.; Krimm, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979, 76, 774-777.
- (8) Krimm, S.; Bandekar, J. *Biopolymers* 1980, 19, 1-29 and 31-36.



	β I	β II	β III	
ϕ_2	-60°	-60°	-60°	$\text{H}_3^+ \text{N}_1 \text{P}_2 \text{G}_3 \text{G}_4 \text{CO}_2^-$
ψ_2	-30°	120°	-30°	
ϕ_3	-90°	80°	-60°	
ψ_3	0°	0°	-30°	

BUS
LILLE



	βI	βII	βIII	
ϕ_2	-60°	-60°	-60°	$\text{H}_3^+ \text{N} \text{G}_1 \text{P} \text{G}_2 \text{G}_3 \text{G}_4 \text{CO}_2^-$
ψ_2	-30°	120°	-30°	
ϕ_3	-90°	80°	-60°	
ψ_3	0°	0°	-30°	

BUS
LILLE

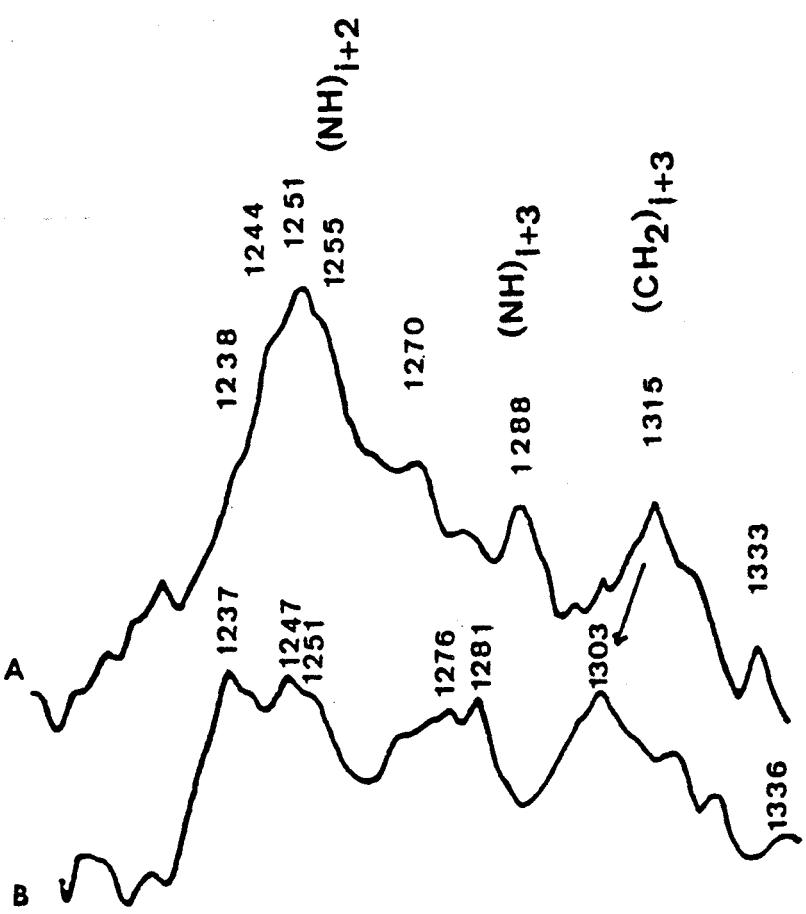
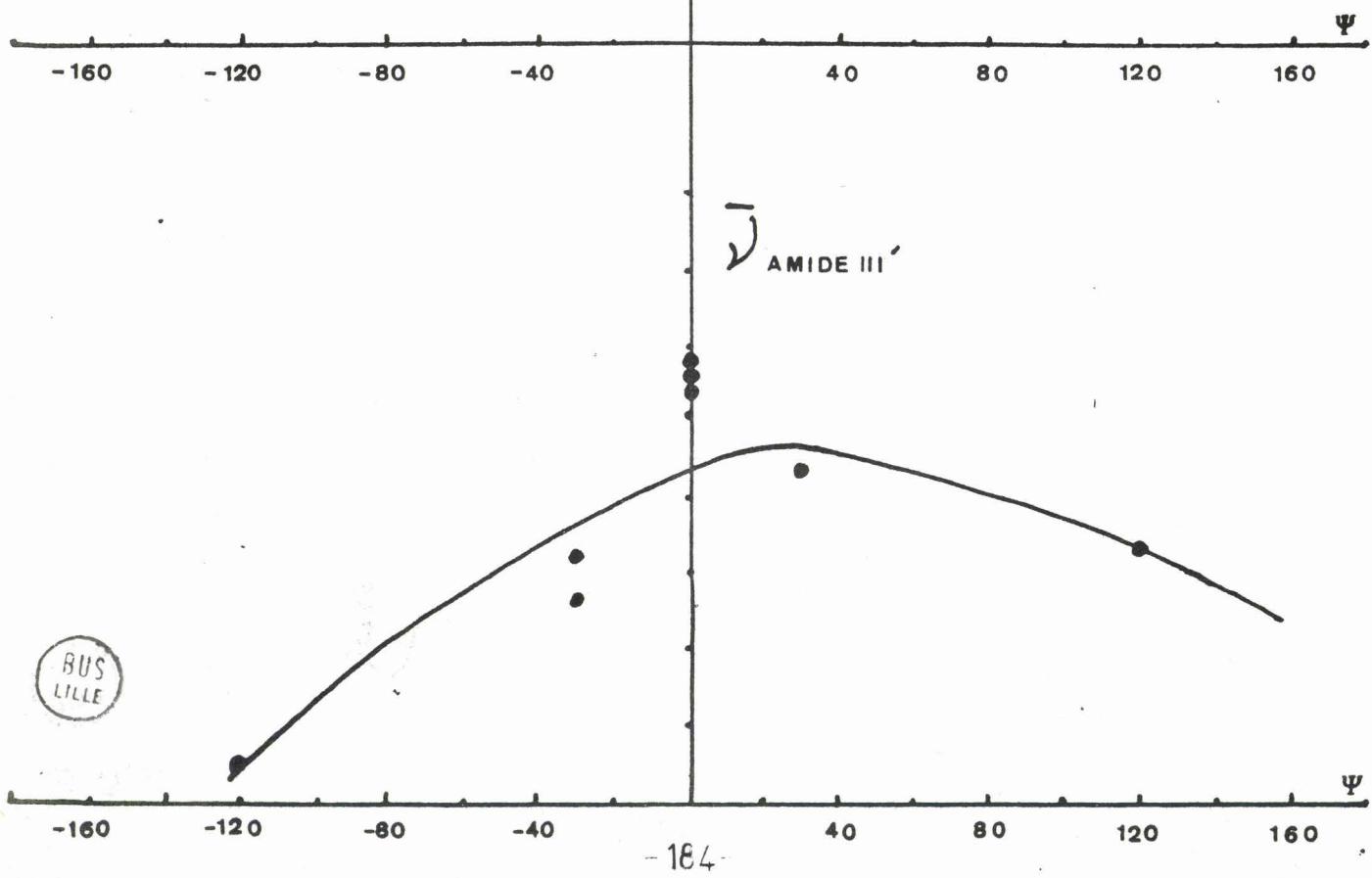
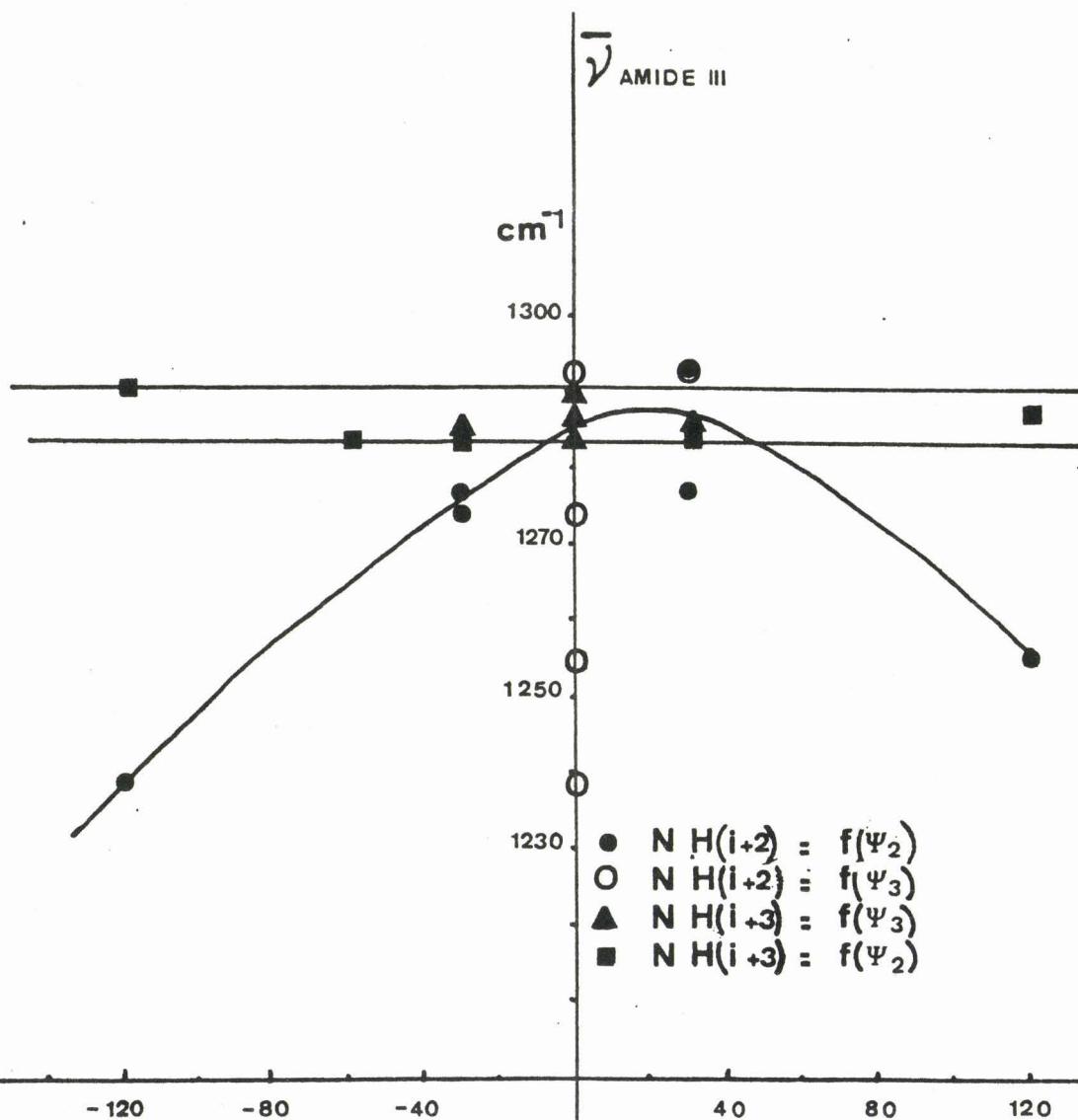


Fig 2

BUS
LILLE



Introduction au coude C7C5

La bonne concordance entre nos prédictions et les travaux expérimentaux d'autres auteurs nous a mené à pousser les propriétés de transférabilité du champ de symétrie locale à une conformation de GPGG un peu différente (C7C5).

Ce modèle avait été choisi primitivement comme étant une conformation possible (sous forme de dimère adoptant une conformation partielle en chaîne β ~~+/~~), car les fréquences des modes amide I des β turns sont comparables aux modes correspondant à ces chaînes β ~~+/~~. Aussi, la vibration amide III semble-t-elle aussi intéressante à étudier.

Le traitement des coordonnées normales pour C7C5 à partir des mêmes constantes de force des β turns nous permet de prédire des fréquences amide hors du domaine des β turns.

Une comparaison de nos fréquences prédictes avec celles , expérimentales ,d'un peptide cyclique cyclo(ProlylGlycyl)₃ et avec les fréquences d'un peptide hormonal pour lequel la RMN suggère la présence d'une conformation en coude β ou en C7C5 ,a été effectuée.

NORMAL VIBRATIONS OF AN ANGIOTENSIN MODEL PEPTIDE:

THE C7C5 CONFORMATION

P. LAGANT, G. VERGOTEN, G. FLEURY, M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE

Institut de Recherche sur le cancer de LILLE

U 124 INSERM BP 311 59020 LILLE cedex FRANCE

Laboratoire de Physique, Faculté de Pharmacie

Rue du Pr LAGUESSE 59045 LILLE cedex FRANCE

Centre de Technologie Biomédicale INSERM snc4

Rue C. GUERIN 59000 LILLE cedex FRANCE

SYNOPSIS:

A normal coordinate treatment has been performed onto the C7C5 conformation using a modified UREY-BRADLEY force field refined from previous studies onto β -Turns. Predicted frequencies are compared to the experimental ones onto the peptide hormone Human Angiotensin II. The presence of both a β -turn and a C7C5 conformation in solid and aqueous solution is discussed here.

INTRODUCTION:

Reverse turns are a major component of the secondary structure of globular proteins. The most common are the β -turns (1) and many works have been devoted to their studies (2). Moreover their characteristic frequencies have been recorded or predicted (3-5).

Other kinds of turns than the β ones have to be studied and their occurrence are not always recognizable from the "standard" ones.

Our purpose is to calculate the normal modes of a model taking the so-called C7C5 conformation ($\psi_2 = 75^\circ$ inverse γ turn Fig I) to find its own conformational dependent amide group frequencies and to identify the presence of such a folded structure among a whole range of other conformations.

EXPERIMENTAL:

RAMAN spectra have been recorded using the 514,5 nm line of an Argon ion LASER. Power was about 300 mw at the sample and spectral resolution was 5 cm⁻¹.

The Human Angiotensin II sample was purchased from SIGMA Chem.Comp. under its acetate salt.

Deuterated solutions were obtained by direct dissolution into D2O.

NORMAL COORDINATE TREATMENT:

The peptide chosen to represent a C7C5 conformation is Gly-L-Pro-Gly-Gly that is this one we used to calculate the normal modes of a type II β -turn.

Such a folded structure is schematically represented in Fig 1, in which the atom numerotation is indicated.

The normal coordinate treatment was done using a modified UREY-BRADLEY type force field (3,5) and the force constants are corresponding to the refined force constants we obtained for the type II B-turns. Only the K(O--H) force constant for the NH(I) group was taken half its value since this group is implicated in a bifurcated hydrogen bond (Fig 1)

Lastly the potentials V₁,V₂ and V₃ were taken into account. They correspond to the contributions of the dipolar interactions, non bonded atom pair interactions and hydrogen bond respectively (3).

RESULTS:

Table I gives the calculated frequencies for the C7C5 structure. As previously observed (3) it seems that the amide I frequencies are relatively characteristic of this kind of folding. In the present case, they are calculated to 1711, 1671 and 1665 cm⁻¹. The amide II frequencies are predicted at 1574 cm⁻¹ for NH(I) and at 1558 cm⁻¹ for NH(II). No effects of the dipolar interactions were seen for the amide II mode but a relatively high contribution of the V₃ potential is predicted: the 1574 cm⁻¹ frequency is lowered to 1556 cm⁻¹ for the C7 conformation alone and to 1567 cm⁻¹ for the C5 structure. The 1558 cm⁻¹ NH (II) frequency would downshift to 1538 cm⁻¹ upon destruction of the external hydrogen bond.

Amide III vibrations are predicted at 1318 cm⁻¹ for NH (I) and at 1281 cm⁻¹ for the externally hydrogen bonded NH(II) group.

Other small contributions to the amide III mode are calculated at 1337 cm⁻¹ for NH(I) and at 1261 cm⁻¹ for NH(II) and correspond to a mixing with methylene group vibrations. One observes from table I that in both cases the contribution of the NH bending vibration to the amide III mode is low. More especially for the NH(I) group, the 1318 cm⁻¹ amide III predicted frequency is composed almost exclusively by the $\nu(\text{CN}) + \nu(\text{C}_\alpha\text{C})$ contributions.

The amide V region gives a somewhat relatively high calculated frequency at 767 cm⁻¹ for NH(I) and at 712 cm⁻¹ for the corresponding NH(II) mode. This last frequency is lowered to 688 cm⁻¹ upon the destruction of the external hydrogen bond while the NH(I) amide V for a C7 structure alone is predicted to 743 cm⁻¹ (γ turn) and to 724 cm⁻¹ for the C5 structure.

The amide III' modes are predicted at 1001 cm⁻¹ for ND(I) group (and contributions in the 1138-1095 cm⁻¹ range) and at 958 cm⁻¹ for the ND(II) group (945 cm⁻¹ when no external hydrogen bond occurs).

The amide V' modes give the predicted frequencies at 559 cm⁻¹ for the ND(I) (551 cm⁻¹ for C7 and 533 cm⁻¹ for C5) and 516 cm⁻¹ for ND(II) (485 cm⁻¹ for the corresponding free group).

DISCUSSION:

Few Raman experimental works have been devoted, to the study of the γ turn (C7) (ref 6) and the C7C5 structure. BOUSSARD et al (7) carried out IR studies about a serie of model peptides, the structure of which were established by NMR.

On the other hand ,many investigations have focused their efforts on the important variety of methods used to study this hormone ,such as Potential Energy Calculations (8,9),Circular dichroism (10,11), H¹NMR (12-15), C¹³NMR (16,17) infrared and Raman spectroscopy (18,19),no consensus on its solution conformation has been reached.We present below our contribution to this problem doing a comparison between observed amide frequencies and their calculated values.

ASHER et al (6) have reported the Raman spectra of the cyclic hexapeptide cyclo-(L-ProlylGlycyl) and its Na⁺,K⁺ and Ca⁺⁺ complexes.This peptide exhibits in CHCl₃ the presence of 3 intramolecular i+3→i hydrogen bonds (γ turns) (C3 structure). For the NaSCN complexe into CHCl₃-CH₃OH solutions,they noted the 1706,1674 and 1655-1639 cm⁻¹ frequencies for the amide I mode and the 1288 cm⁻¹ (solid) and 1264 cm⁻¹ (aqueous solution) for the amide III modes.These last bands are unchanged upon cation complexation.At the opposite, the prolyl carbonyl vibrations are modified by complexation and are upshifted by 20-30 cm⁻¹ (in the 690-1700 cm⁻¹ range).The Glycyl carbonyl band is unaffected by Na⁺ complexation and upshifted by 15 cm⁻¹ upon K⁺ complexation and downshifted to 1619 cm⁻¹ by Ca⁺⁺ complexation.

BOUSSARD et al (7) have observed and predicted the 1665 and 1635-1620 cm⁻¹ bands in their studies onto the C7C5 and β -turn structures.

ANGIOTENSIN II CONFORMATION:

Various models were proposed (8,9) for the conformation of the Human Angiotensin II in solution.This peptide is a linear octapeptide hormone whose the primary structure is Asp₁-Arg₂-Val₃-Tyr₄-Ile₅-His₆-Pro₇-Phe₈.

The more recent results include the cross β conformers (18), β turns, γ turn and C7C5 structures (13-15). Among these models, the key feature is the existence of one or more intramolecular hydrogen bonds which stabilize the three dimensional structure of the hormone.

From their work, LENKISKI et al have studied the conformation of Human angiotensin II (13-15) and concluded to the presence of a C7C5 conformation rather than a distorted type I β -turn . However FOX et al(19) showed the presence of such a β -turn conformation involving an intramolecular hydrogen bond between Val3 CO and His6 NH. Other experimental work made by FERMANDJIAN et al(18) would suggest the presence of β H structure. Fig 2 shows the spectrum of human Angiotensin II (acetate salt) in the solid state and Fig 3 and Fig 4 display the amide III (and III') region in the solid state and in aqueous solution respectively.

In the solid state (Fig 3) ,bands at 1233,1253 and 1320 cm⁻¹ disappear upon N-deuteration while in H₂O (Fig 4), bands at 1262,1283-1270 and 1313 cm⁻¹ decrease strongly when dissolution into D₂O occurs. The 1233 cm⁻¹ band was first reported by FERMANDJIAN et al (18) but not by FOX and TU (19) . This band may be due to the $\delta(\text{OH})$ of the tyrosine group (20) while the 1253 cm⁻¹ one could be related to the Histidine NH arising from a partial neutralization of the imidazolium group (23). Examination of our experimental results of the amide III region (presence of a 1312-1320 cm⁻¹ band) would at first time be consistent with a C7C5 structure as predicted by LENKINSKI et al(13) involving hydrogen bonds between the NH of His6 and the CO of Tyr 4 , and the His 6 NH and the His6 CO carbonyl group.

The 1270-75 cm⁻¹ amide III region decreases in intensity (aqueous solution) upon N-deuteration and such a frequency may be related to the presence of a β -turn (distorted type I as described by FOX and TU).

However, the amide I region displays only a strong and broad band at 1668 cm⁻¹ (with shoulders at 1678, 1656 cm⁻¹) and would be also consistent with the presence of a β turn I like conformation as discussed by FOX and TU (19). The presence of a small 1704 cm⁻¹ (solid) or 1702 cm⁻¹ (solution) amide I band could be indicative of a small amount of C7C5 structure; the 1724 cm⁻¹ band being due to a partial neutralization of the carboxylate end. The observed 1320 cm⁻¹ amide III band may only be a qualitative estimation of the amount of the C7C5 structure, the small intensity being the result of the small contribution of the NH in plane bending vibration to the amide III vibration. However this contribution is not calculated for β -turns in our previous studies (5) despite theoretical calculations made by other authors (4).

Non bonded atom interaction contributions to the calculated 1339 cm⁻¹ frequency are about 12 cm⁻¹ for the skeleton, and the presence of side chains would perhaps affects and down-shifts the observed frequency.

TYROSINE FERMI RESONANCE:

The FERMI resonance of the tyrosine residue gives rise to the 853 and 828 cm⁻¹ bands. According to their relative intensities and comparing to the SIAMWIZA's work (21) and FOX et al(19), the tyrosine hydroxyle group would be exempt from any hydrogen bond.

According the Mc HALE's work(22), we found a polarizability ratio value K = 0.01 indicating the lacking of hydrogen bond on the tyrosine hydroxyle. The 417 cm⁻¹ Raman frequency would be the non zero out of plane ring vibration whose the first overtone would perturb the totally symmetric ring breathing mode calculated at 343 cm⁻¹.

PIRIDOU et al (24) have performed a conformational analysis of the side chain using NMR experiments on the Human Angiotensin II . Despite a correlation between the chemical shifts of Tyr 4 upon titration of Asp 1 and the carboxylate end , no hydrogen bond character between these two side chains was found according the Raman investigations of FOX et al (19).

So the possibility for the peptide to adopt a folded conformation (without internal hydrogen bond) in the N-terminal part is discarded to place the Tyrosine4 and Asp, side chains in contact. However SCHILLER et al (25) using Angiotensin homologs by fluorescence transfert experiments found average distances of 8 Å for Trp1-Tyr4 and 12 Å for Tyr4- Trp8 . They concluded that no end to end interaction occurs and put in evidence the presence of a folded conformation into the N terminal part and to a less extent in the C terminal part of the peptide.

The observed low intensities of the 1315 cm⁻¹ (solution) or 1320 cm⁻¹ (solid) amide III bands would not give a quantitative estimation of the C7C5 structure according the very weak hydrogen character of this vibration (Table I). However the intensity of the 1704 cm⁻¹ (solid) or 1702 cm⁻¹ (solution) bands would be more indicative of the relative amount of such a structure. The presence of a 1283-70 cm⁻¹ amide III and 1668-57 cm⁻¹ activities would be more indicative of the presence of a B-turn but distorsion of such a structure would downshift the amide III frequency by 5-10 cm⁻¹ the calculated corresponding 1284 cm⁻¹ value for a B-turn I(5). In another way, no typical Raman 1695-1690 cm⁻¹ band is seen but only a 1678 one indicative of a C7 structure as discussed by ASHER et al. However Infrared spectra show a very weak shoulder in the 1690-1680 cm⁻¹ region.

It is well known that a N-methylation in position 5 would pertube the activity of the hormone (occurence of a cis-trans isomerism) and substitution of the Ileu 5 residue by a Pro one would keep a great part of the activity.

The presence of a C7C5 conformation (or C7 confor mation alone) would stabilize the local conformation in a better way than a distorted β turn.

The simultaneous presence of the two structures would be related to the proper hormone activity .This dynamical beha viour may be however dependent of many factors such as tempe rature and PH. Studies on the influence of the PH on the Tryp topophen fluorescence made by SCHILLER (25) or kinetics studies made by DEGANI et al(14) indicate that the Angiotensin II optimal transport speed of the Mn⁺⁺ ions occurs in the range of PH 7-8.In these experimental conditions,some conformational changes may occur to stabilize the N and C terminal ends of the hormone and to change the relative amounts of C7C5 and β -turn structures in the core structure (Fig 5).

CONCLUSION:

Predicted frequencies obtained from normal coordinate treatments allow to distinguish between several types of folding from their experimental frequencies.Such a fact would provide a new conformational probe for biological products.

REFERENCES:

- 1) C.M VENKATACHALAM Biopolymers (1968) 6 1425-1436
- 2) J.A SMITH,L.G PEASE Crit.Rew Biochem.(1980) 8 issue 4 315-399
- 3) P. LAGANT,G. VERGOTEN,G. FLEURY,M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE
Submitted for publication to Eur.J.Biochem
- 4) S. KRIMM,J. BANDEKAR Biopolymers (1980) 19 1-29,31-36
- 5) P. LAGANT,G. VERGOTEN,G. FLEURY,M.H LOUCHEUX-LEFEBVRE
Submitted for publication to Eur.J.Biochem
- 6) I.M ASHER,G.D.J PHILLIES,R.B GELLER,H.E STANLEY Biochemistry (1980) 19 1805-1813
- 7) G. BOUSSARD,M. MARAUD,A. AUBRY Biopolymers (1979) 18 1297-1331
- 8) J.L DE COEN,E.RALSTON Biopolymers (1977) 16 1929-1943
- 9) S. PREMILAT,B. MAIGRET Biochem.Biophys.Res.Commun. (1979) 91 534-539
- 10)D. GREFF,S. FERMANDJIAN,P. FROMAGEOT,M.C KHOSLA,R.R SMEBY, F.M BUMPUS Eur.J.Biochem (1976) 61 297-305
- 11) K. LINTNER,S. FERMANDJIAN,P. FROMAGEOT,M.C KHOSLA,R.R SMEBY,F.M BUMPUS Biochemistry (1977) 16 806-812
- 12) J.D GLICKSON,J. DADOK,G.R MARSHALL Biochemistry (1974) 13 11-
- 13) R.E LENKINSKI,R.L STEPHENS,N.R KRISHNA Biochemistry (1981) 20 3122-3126
- 14) H. DEGANI,R.E LENKINSKI Biochemistry (1980) 19 3430-3434
- 15) R.E LENKINSKI,R.L STEPHENS,N.R KRISHNA BBA 667 (1981) 157-167
- 16) S.ZIMMER,W. HAAR,W. MAURER,H. RUTERJANS,S. FERMANDJIAN,P. FRONAGEOT Eur.J.Biochem. (1972) 29 80-
- 17) R. DESLAURIERS,E. RALSTON,R.L SOMORJAI J.Mol.Biol.(1977) 113 697-
- 18) S. FERMANDJIAN,P. FROMAGEOT,A.M TITSCHENKO,J.P LEICKNAM,M. LUTZ Eur.J.Biochem. (1972) 28 174-182
- 19) J.W FOX,A.T TU Arch.Biochem.Biophys (1980) 201 (2) 375-383
- 20) S.L HAN,E.R STIMSON,F.R MAXFIELD,S.J LEACH,H.A SCHERAGA
Int.J.Peptide Protein Res. (1980) 16 183-190
- 21) M.N M.N SIAMWIZA,R.C LORD,M.C CHEN,T. TAKAMATSU,I. HARADA,
H. MATSURA,T. SHIMANOUCHI Biochemistry (1975) 14 4870-4876

- 22) J.L Mc HALE Journal of Raman Spectroscopy (1982) 13(1) 21-24
- 23) I. ASHIKAWA,K. ITOH Biopolymers (1979) 18 1859-1876
- 24) F. PIRIOU,K. LINTNER,S. FERMANDJIAN,P. FROMAGEOT,M.C KHOSLA
R.R SNEBY,F.M BUMANS PNAS (1980) 77 82-86
- 25) P.W SCHILLER Int.J.Peptide Protein Res. (1980) 15 259-266

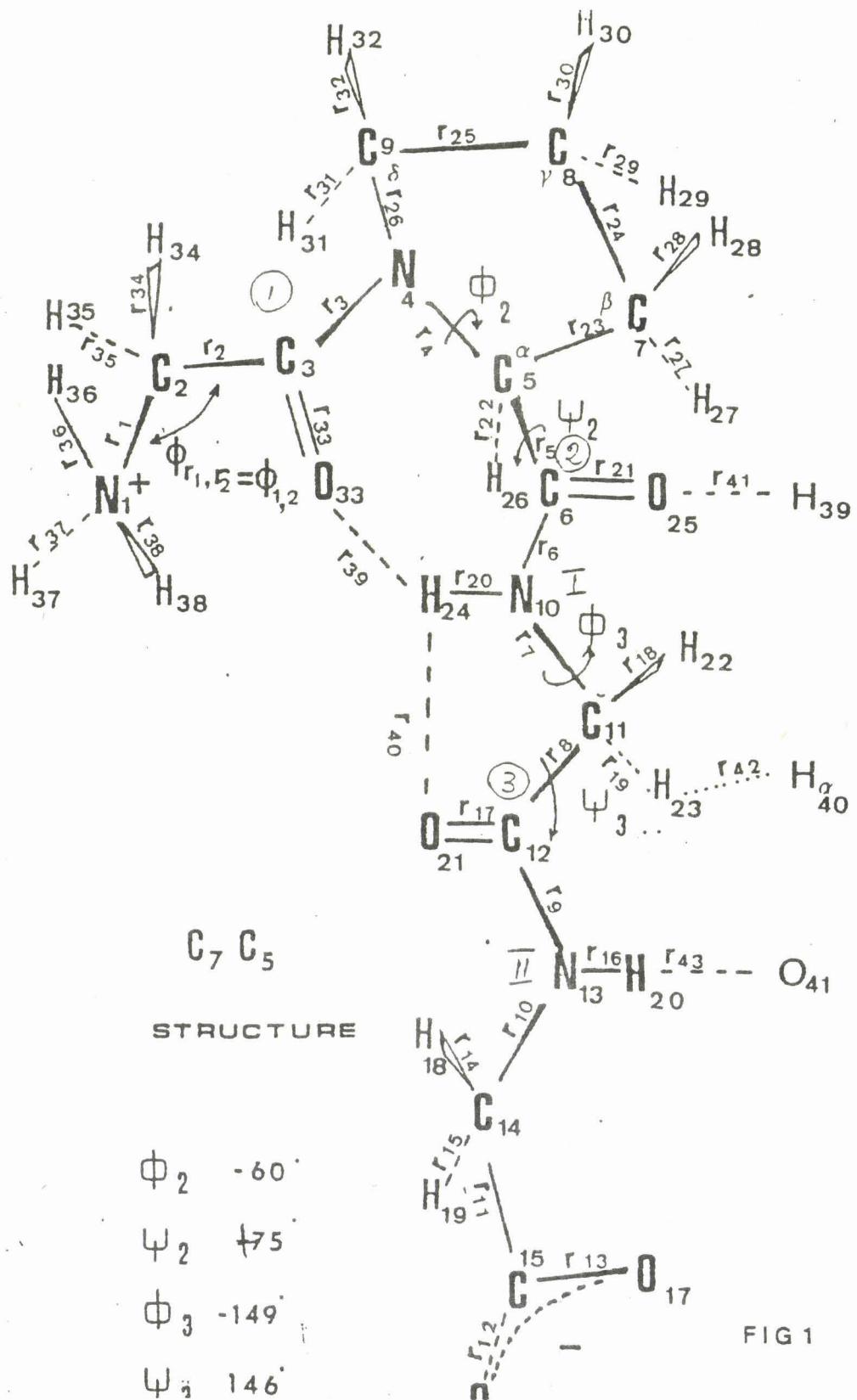
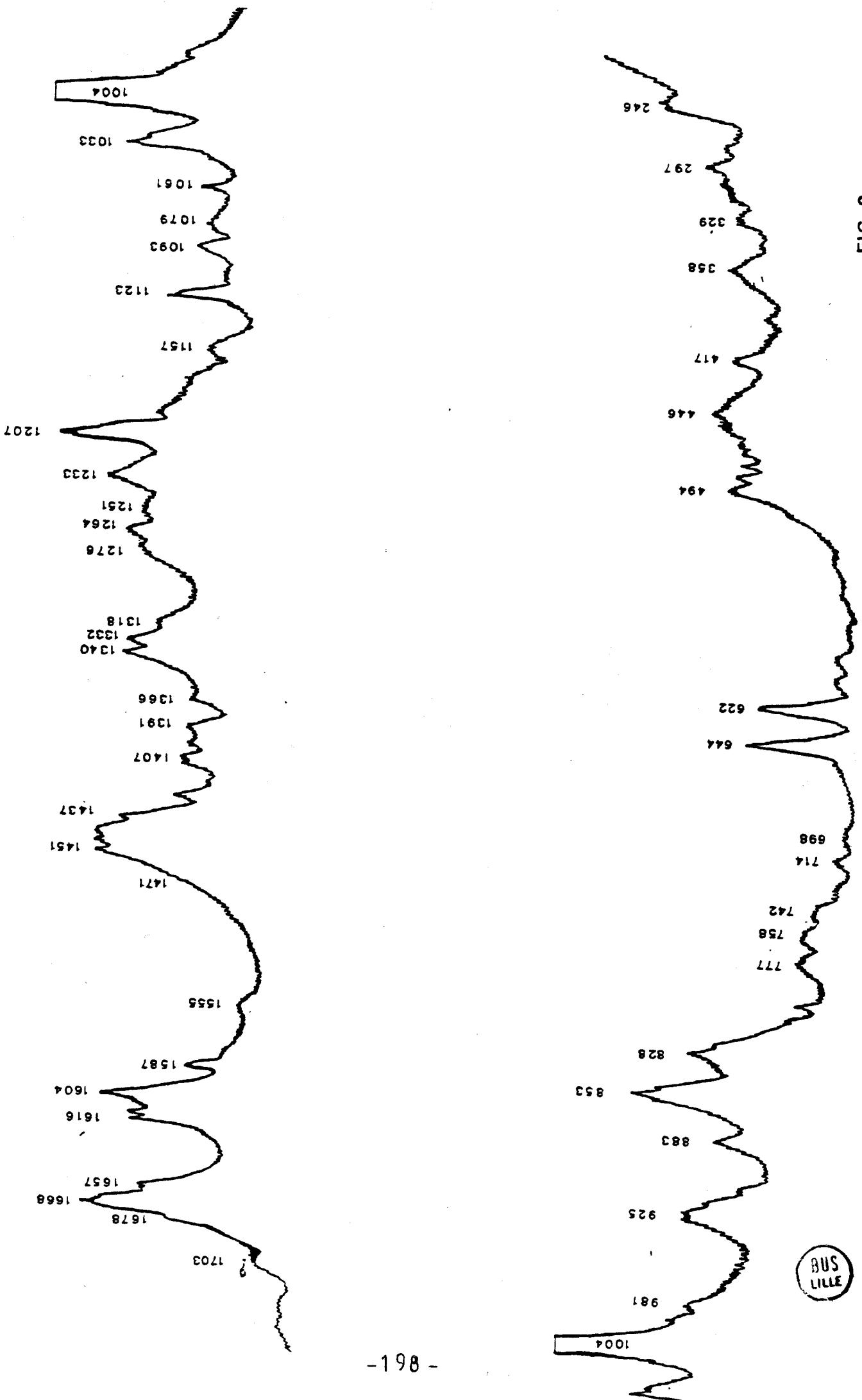
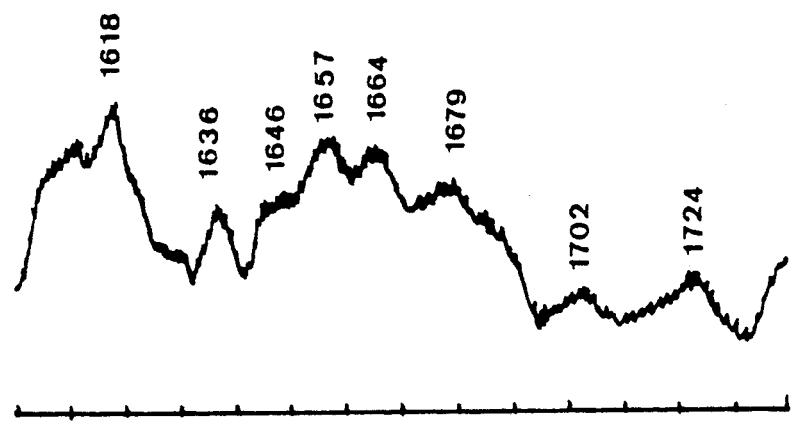


FIG 1



FIG 2





ANGIOTENSIN II
solid (lyoph.)
16 scans
 9 cm^{-1} resol.

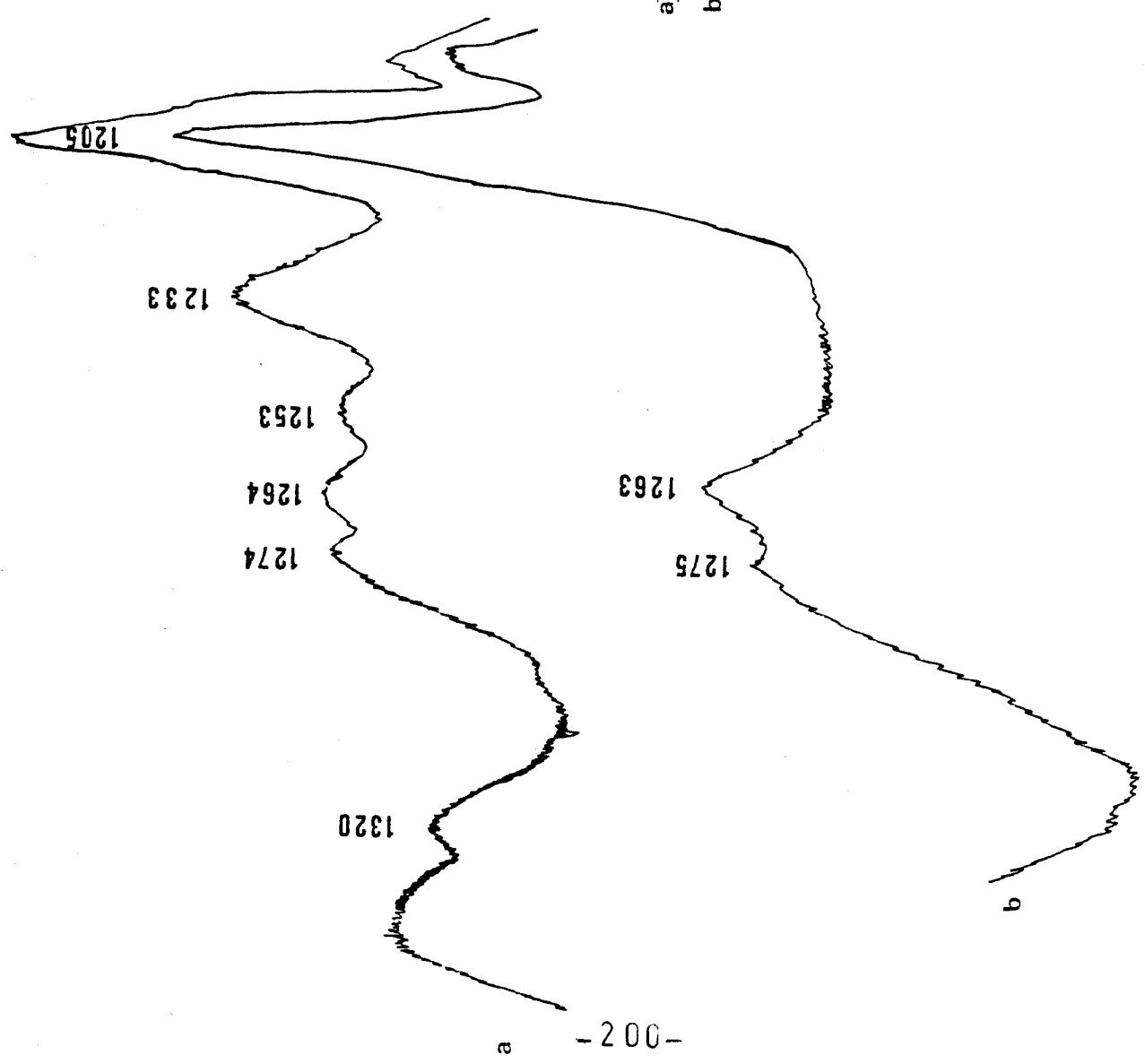
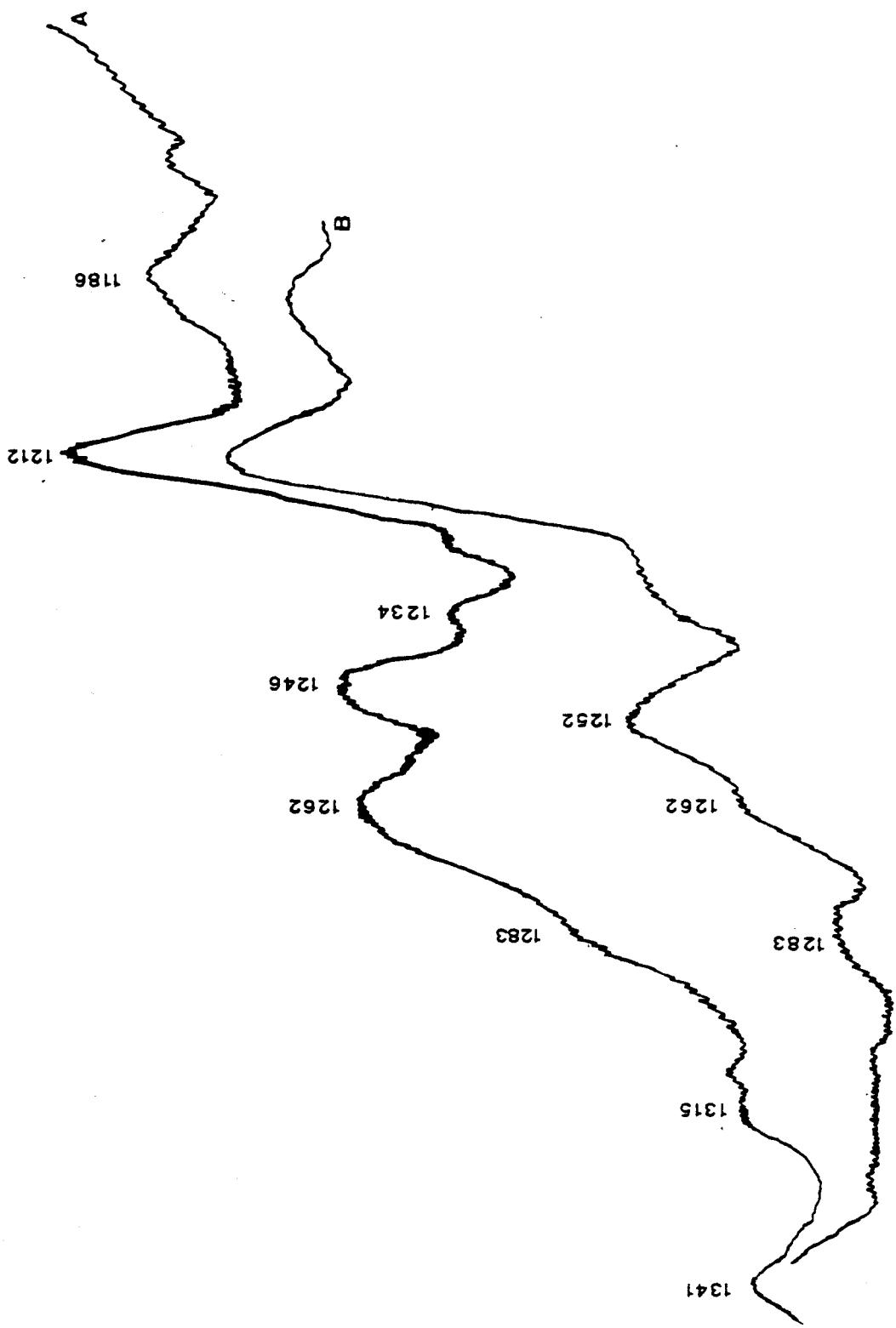


FIG 3

598
LILLE

FIG 4

ANGIOTENSIN II
acetate salt
in H_2O
 D_2O
95%
5%



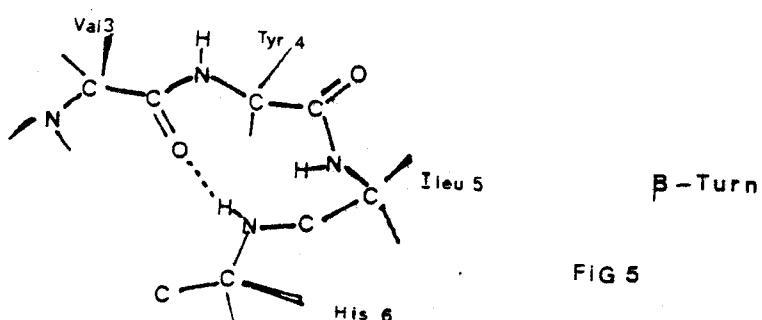
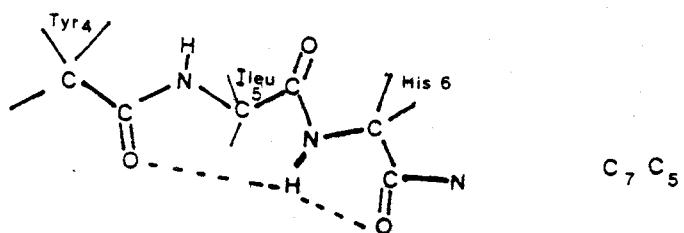
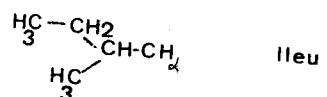
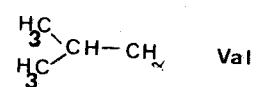
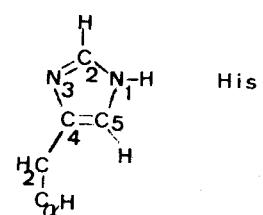
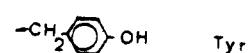


FIG 5



BUS
VILLE

COORDONNEES DE SYMETRIE DE C7-C5 BENDING

Stretchings

S1 = ΔR_1	S23 = S8 nouv
S2 = ΔR_2	S24 = $(\Delta R_{27} + \Delta R_{28})/\sqrt{2}$ $\nu_s(CH_2)$
S3 = S1nouv = ΔR_3	S25 = $(\Delta R_{29} + \Delta R_{30})/\sqrt{2}$ $\nu_s(CH_2)$
S4 = S2nouv	S26 = $(\Delta R_{31} + \Delta R_{32})/\sqrt{2}$ $\nu_s(CH_2)$
S5 = S4nouv = ΔR_5	S27 = ΔR_{33}
S6 = ΔR_6	S28 = $(\Delta R_{34} + \Delta R_{35})/\sqrt{2}$ $\nu_s(CH_2)$
S7 = ΔR_7	S29 = $(\Delta R_{36} + \Delta R_{37} + \Delta R_{38})/\sqrt{3}$ $\nu_s(NH_3^+)$
S8 = ΔR_8	S30 = $(2\Delta R_{36} - \Delta R_{37} - \Delta R_{38})/\sqrt{6}$ $\nu_d(NH_3^+)$
S9 = ΔR_9	S31 = ΔR_{39}
S10 = ΔR_{10}	S32 = ΔR_{40}
S11 = ΔR_{11}	S33 = ΔR_{41}
S12 = $(\Delta R_{12} + \Delta R_{13})/\sqrt{2}$ $\nu_s(CO_2)$	S34 = ΔR_{42}
S13 = $(\Delta R_{14} + \Delta R_{15})/\sqrt{2}$ $\nu_s(CH_2)$	S35 = ΔR_{43}
S14 = ΔR_{16}	S83 = $(\Delta R_{12} - \Delta R_{13})/\sqrt{2}$ $\nu_a(CO_2^-)$
S15 = ΔR_{17}	S84 = $(\Delta R_{14} - \Delta R_{15})/\sqrt{2}$ $\nu_a(CH_2)$
S16 = $(\Delta R_{18} + \Delta R_{19})/\sqrt{2}$ $\nu_s(CH_2)$	S85 = $(\Delta R_{18} - \Delta R_{19})/\sqrt{2}$ $\nu_a(CH_2)$
S17 = ΔR_{20}	S86 = $(\Delta R_{27} - \Delta R_{28})/\sqrt{2}$ $\nu_a(CH_2)$
S18 = ΔR_{21}	S87 = $(\Delta R_{29} - \Delta R_{30})/\sqrt{2}$ $\nu_a(CH_2)$
S19 = S3nouv	S88 = $(\Delta R_{31} - \Delta R_{32})/\sqrt{2}$ $\nu_a(CH_2)$
S20 = S5nouv	S89 = $(\Delta R_{34} - \Delta R_{35})/\sqrt{2}$ $\nu_a(CH_2)$
S21 = S6nouv	S90 = $(\Delta R_{37} - \Delta R_{38})/\sqrt{2}$ $\nu_d(NH_3^+)$
S22 = S7nouv	

COORDONNEES DE SYMETRIE DE C7C5 BD

Bendings

$$S36 = (-\Delta\phi_{4,36} - \Delta\phi_{4,37} - \Delta\phi_{4,38} + \Delta\phi_{36,37} + \Delta\phi_{36,38} + \Delta\phi_{37,38}) / \sqrt{6}$$

$$S37 = (2\Delta\phi_{37,38} - \Delta\phi_{36,37} - \Delta\phi_{36,38}) / \sqrt{6}$$

$$S38 = (2\Delta\phi_{4,36} - \Delta\phi_{4,37} - \Delta\phi_{4,38}) / \sqrt{6}$$

$$S39 = (5\Delta\phi_{1,2} - \Delta\phi_{1,34} - \Delta\phi_{1,35} - \Delta\phi_{34,35} - \Delta\phi_{2,34} - \Delta\phi_{2,35}) / \sqrt{30}$$

$$S40 = (4\Delta\phi_{34,35} - \Delta\phi_{1,34} - \Delta\phi_{1,35} - \Delta\phi_{2,34} - \Delta\phi_{2,35}) / \sqrt{20}$$

$$S41 = (\Delta\phi_{1,34} + \Delta\phi_{1,35} - \Delta\phi_{2,34} - \Delta\phi_{2,35}) / 2$$

$$S42 = (2\Delta\phi_{2,3} - \Delta\phi_{2,33} - \Delta\phi_{3,33}) / \sqrt{6}$$

$$S43 = (\Delta\phi + \Delta\phi) / \sqrt{6}$$

$$S44 = S^{\text{now}}_9$$

$$S45 = S^{\text{now}}_1\phi$$

$$S46 = S^{\text{now}}_{11}$$

$$S47 = S^{\text{now}}_{12}$$

$$S48 = S^{\text{now}}_{14}$$

$$S49 = S^{\text{now}}_{13}$$

$$S50 = S^{\text{now}}_{15}$$

$$S51 = S^{\text{now}}_{16}$$

$$S52 = S^{\text{now}}_{17}$$

$$S53 = 0.195769\Delta\phi_{27,28} - 0.047383\Delta\phi_{23,28} - 0.047487\Delta\phi_{24,28} - 0.047777\Delta\phi_{23,27} - 0.047691\Delta\phi_{24,27}$$

$$S54 = 0.249658\Delta\phi_{23,28} - 0.249330\Delta\phi_{24,28} + 0.249281\Delta\phi_{23,27} - 0.249794\Delta\phi_{24,27}$$

$$S55 = S^{\text{now}}_{18}$$

$$S56 = 0.191470\Delta\phi_{29,30} - 0.045849\Delta\phi_{24,30} - 0.045657\Delta\phi_{25,30} - 0.044903\Delta\phi_{24,29} - 0.045153\Delta\phi_{25,29}$$

$$S57 = 0.250155\Delta\phi_{24,30} - 0.249330\Delta\phi_{25,30} + 0.249281\Delta\phi_{24,29} - 0.249794\Delta\phi_{25,29}$$

$$S58 = 0.202310\Delta\phi_{34,32} - 0.052081\Delta\phi_{25,32} - 0.051982\Delta\phi_{26,32} - 0.051701\Delta\phi_{35,31} - 0.051807\Delta\phi_{31,32}$$

$$S59 = 0.250014\Delta\phi_{25,32} - 0.249908\Delta\phi_{26,32} + 0.249889\Delta\phi_{25,31} - 0.249966\Delta\phi_{26,31}$$

$$S60 = (2\Delta\phi_{5,6} - \Delta\phi_{5,21} - \Delta\phi_{6,21}) / \sqrt{6}$$

$$S61 = (\Delta\phi_{5,21} - \Delta\phi_{6,21}) / \sqrt{2}$$

BUS
LILLE

$$\begin{aligned}
S62 &= (2\Delta\phi_{6,7} - \Delta\phi_{6,20} - \Delta\phi_{7,20})/\sqrt{6} \\
S63 &= (\Delta\phi_{6,20} - \Delta\phi_{7,20})/\sqrt{2} \\
S64 &= (5\Delta\phi_{7,8} - \Delta\phi_{7,18} - \Delta\phi_{7,19} - \Delta\phi_{18,19} - \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{8,19})/\sqrt{30} \\
S65 &= (4\Delta\phi_{18,19} - \Delta\phi_{7,18} - \Delta\phi_{7,19} - \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{8,19})/\sqrt{20} \\
S66 &= (\Delta\phi_{7,18} + \Delta\phi_{7,19} - \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{8,19})/2 \\
S67 &= (2\Delta\phi_{8,9} - \Delta\phi_{8,17} - \Delta\phi_{9,17})/\sqrt{6} \\
S68 &= (\Delta\phi_{8,17} - \Delta\phi_{9,17})/\sqrt{2} \\
S69 &= (2\Delta\phi_{9,10} - \Delta\phi_{9,16} - \Delta\phi_{10,16})/\sqrt{6} \\
S70 &= (\Delta\phi_{9,16} - \Delta\phi_{10,16})/\sqrt{2} \\
S71 &= (5\Delta\phi_{10,11} - \Delta\phi_{10,14} - \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{14,15} - \Delta\phi_{11,14} - \Delta\phi_{11,15})/\sqrt{30} \\
S72 &= (4\Delta\phi_{14,15} - \Delta\phi_{10,14} - \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{11,14} - \Delta\phi_{11,15})/\sqrt{20} \\
S73 &= (\Delta\phi_{10,14} + \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{11,14} - \Delta\phi_{11,15})/2 \\
S74 &= (2\Delta\phi_{11,12} - \Delta\phi_{11,12} - \Delta\phi_{11,13})/\sqrt{6} \\
S75 &= (\Delta\phi_{11,12} - \Delta\phi_{11,13})/\sqrt{2} \\
S76 &= \Delta\phi_{33,39} \\
S77 &= \Delta\phi_{20,39} \\
S78 &= \Delta\phi_{20,40} \\
S79 &= \Delta\phi_{17,40} \\
S80 &= \Delta\phi_{19,42} \\
S91 &= (\Delta\phi_{36,37} - \Delta\phi_{36,38})/\sqrt{2} \\
S92 &= (\Delta\phi_{1,37} - \Delta\phi_{1,38})/\sqrt{2} \\
S93 &= (\Delta\phi_{1,34} - \Delta\phi_{1,35} - \Delta\phi_{2,34} + \Delta\phi_{2,35})/2 \\
S94 &= (\Delta\phi_{1,34} - \Delta\phi_{1,35} + \Delta\phi_{2,34} - \Delta\phi_{2,35})/2 \\
S95 &= 0.250074\Delta\phi_{23,28} + 0.246534\Delta\phi_{24,28} + 0.249471\Delta\phi_{23,27} - 0.246946\Delta\phi_{24,27} \\
S96 &= 0.246959\Delta\phi_{23,28} + 0.249671\Delta\phi_{24,28} - 0.245094\Delta\phi_{23,27} - 0.245412\Delta\phi_{24,27} \\
S97 &= -0.248667\Delta\phi_{24,30} + 0.244787\Delta\phi_{25,30} + 0.250141\Delta\phi_{24,29} - 0.243750\Delta\phi_{25,29} \\
S98 &= 0.240189\Delta\phi_{24,30} + 0.245960\Delta\phi_{25,30} - 0.244742\Delta\phi_{24,29} - 0.249205\Delta\phi_{25,29} \\
S99 &= -0.249477\Delta\phi_{25,32} + 0.246819\Delta\phi_{26,32} + 0.250011\Delta\phi_{25,31} - 0.246554\Delta\phi_{26,31} \\
S100 &= 0.245401\Delta\phi_{25,32} + 0.248644\Delta\phi_{26,32} - 0.246814\Delta\phi_{25,31} - 0.249876\Delta\phi_{26,31} \\
S101 &= (\Delta\phi_{7,18} - \Delta\phi_{7,19} - \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{8,19})/2
\end{aligned}$$

$$S102 = (\Delta\phi_{2,18} - \Delta\phi_{7,19} + \Delta\phi_{8,18} - \Delta\phi_{9,19})/2$$

$$S103 = (\Delta\phi_{10,14} - \Delta\phi_{10,15} - \Delta\phi_{11,14} + \Delta\phi_{11,15})/2$$

$$S104 = (\Delta\phi_{10,14} - \Delta\phi_{10,15} + \Delta\phi_{11,14} - \Delta\phi_{11,15})/2$$

LINEAR BENDINGS:

in plane:

$$S81 = \Delta\phi \quad \delta(C_6=O--H)$$

$$S82 = \Delta\phi \quad \delta(N13H--O)$$

out of plane:

$$S105 = \Delta\gamma(C_6=O--H)$$

$$S106 = \Delta\gamma(N13H--O)$$

OUT OF PLANE WAGGINGS:

$$S107 = \gamma(C_5=O)$$

$$S108 = \gamma(C_6=O)$$

$$S109 = \gamma(N10-H)$$

$$S110 = \gamma(C12=O)$$

$$S111 = \gamma(N13-H)$$

$$S112 = \gamma(CO_2-)$$

TORSIONS:

$$S113 = \Delta\tau_{\alpha_1} = \Delta\tau(NH_3+)$$

$$S114 = \Delta\tau_{\alpha_2}$$

$$S115 = \Delta\tau_{\alpha_3}$$

$$S116 = \Delta\tau_{\alpha_5}$$

$$S117 = \Delta\tau_{\alpha_6}$$

$$S118 = \Delta\tau_{\alpha_7}$$

$$S119 = \Delta\tau_{\alpha_8}$$

$$S120 = \Delta\tau_{\alpha_9}$$

$$S121 = \Delta\tau_{\alpha_{10}}$$

$$S122 = \Delta\tau_{\alpha_{11}} = \Delta\tau(CO_2-)$$

$$S123 = \Delta\tau_{\alpha_{33}}$$

$$S124 = \Delta\tau_{\alpha_{39}}$$

$$S125 = \Delta\tau_{\alpha_{20}}$$

$$S126 = \Delta\tau_{\alpha_{40}}$$

$$S127 = \Delta\tau_{\alpha_{17}}$$





P.E.D	v _{m10} , v	3579	3260	3088	2992	2978	2959	2946	2926	2907	2873
0.97v(R ₃ , H) + 0.03v(0-H)	0.451 (3406 c/s)	3579	3260	3088	2992	2978	2959	2946	2926	2907	2873
0.98v(H ₀ , H) + 0.02v(0-H)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _d (HII ₃ ⁺)	0.98v _s (C ₃ H)	0.95v _s (C ₃ H)
0.44v _s (C ₃ H) + 0.55v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	1 v _s (C ₃ H)	0.99v _s (C ₃ H)

2054

1 $v_s(C_6H_2)$ 0.48v_s(C₆H₂) + 0.48v_s(C₆H) + 0.03v_s(O₂H)

2055

0.51v_s(C₆H₂) + 0.48v_s(C₆H)

2059

1 $v_s(C_{14}H_2)$

1711 nm I

0.7v(C₆=0) + 0.18v(C₆N) + 0.13δ(C₆C₆N)

1671 nm I

0.66v(0₁₂=0) + 0.11v(C₁₂H) + 0.11δ(C₁₂H) + 0.06δ(W₁₃H) + 0.04δ(CNC₁₄)

1665 nm I

0.49v(C₃=0) + 0.36v(C₃N) + 0.15δ(C₂C₃N₄)

1629

0.63δ(WH₃⁺) + 0.27δ(WH₃⁺) + 0.04γ(WH₃⁺)

1624

0.66δ(WH₃⁺) + 0.27δ(WH₃⁺)

1574 nm II

0.94v_s(CO₂) + 0.05δ(CO₂)

1562

0.55δ(W₁₀H) + 0.13v(C₃=0) + 0.1v(C₃N₄) + 0.08v(C₆H) + 0.06v(W₁₀C_α)

1558 nm II

0.39g₄ + 0.23v(C₃N₄) + 0..14(S₄₅) + 0.14w(C₂W₂)

1554 nm II

0.47δ(W₁₃H) + 0.32v(C₁₂H) + 0.2v(WC_α)

1528

0.3δ(C₂W₂) + 0.29δ(WH₃⁺) + 0.27δ(C_δW₂) + 0.16g₄

1491

0.43δ(C_δW₂) + 0.22g₅₀ + 0.16g₄₇ + 0.14g₄₈

1460

0.42δ(C₂W₂) + 0.27δ(C_δW₂)

1469

0.96δ(C₁₁W₂) + 0.03v(NC_α)

1453

0.93δ(C₁₄W₂) + 0.05v(W₁₃C_α)

1449	$0.89\delta(C_pH_2) + 0.05v(C_\beta C_p) + 0.04v(C_\beta C_\delta)$
1446	$0.62\delta(C_\beta H_2) + 0.13\delta(C_2H_2) + 0.12 S_{50} + 0.09 S_{47} + 0.02v(C_\alpha C_\beta)$
1441	$0.34 S_{47} + 0.29 S_{60} + 0.18v(NC_\delta) + 0.05 S_4 + 0.07\delta(C_\beta H_2) + 0.05\delta(C_\gamma H_2)$
1429	$0.2\delta(C_2H_2) + 0.2tw(O_2H_2) + 0.17w(C_2H_2) + 0.13 v(C_3=0) + 0.11 (C_6H_2) + 0.11v(C_\delta H)$
1408	$0.52v_s(CO_2) + 0.26v(C_{14}C) + 0.2\delta(CO_2)$
1404	$0.83v(C_{11}H_2) + 0.11v(N_{10}C_\alpha) + 0.06v(C_\alpha C_{12})$
1365	$0.55 tw(C_2H_2) + 0.45\delta(C_2H_2)$
1359	$0.88 tw(C_{11}H_2') + 0.1 w(C_{11}H_2) + 0.02\delta(C_{12}=0)$
1337	$0.18 w(C_\beta H_2) + 0.16v(C_\beta N) + 0.15 S_{50} + 0.12w(C_6C_\delta) + 0.11s(C_6=0)$
1326	$0.35 w(C_\delta H_2) + 0.26 w(C_\beta H_2) + 0.15 S_{50} + 0.1v(C_\beta C_\gamma)$
1318 am III	$0.35v(C_\theta N) + 0.28w(C_\beta H_2) + 0.13v(C_\delta C_\theta) + 0.11v(N_{10}C_\alpha) + 0.08\delta(C_\delta=0) + 0.03\delta(H_{10}=0)$
1305	$0.24w(C_\delta H_2) + 0.24v(C_\gamma C_\delta) + 0.18v(C_\alpha C_\beta) + 0.16w(C_\beta H_2) + 0.09w(C_\gamma H_2) + 0.08 S_{50}$
1281 am III	$0.33v(C_{12}N) + 0.27tw(C_{14}H_2) + 0.15\delta(H_{13},H) + 0.13\delta(C_{12},=0) + 0.13v(C_\alpha C_{12})$
1268	$0.7tw(C_\delta H_2) + 0.13tw(C_\beta H_2) + 0.09w(C_\beta H_2) + 0.04w(C_\beta H_2)$
1261	$0.6tw(C_{14}H_2) + 0.1v(N_{13}C_\alpha) + 0.08v(C_{12}N) + 0.07\delta(C_{12},=0) + 0.04v(C_\alpha C_{12})$
1246	$0.3w(C_\delta H_2) + 0.12w(C_\beta H_2) + 0.12v(C_\gamma C_\delta) + 0.12v(C_\beta C_\gamma) + 0.1tw(C_\beta H_2)$
1219	$0.47tw(C_\beta H_2) + 0.17v(C_\alpha C_\beta) + 0.1v(C_\alpha H) + 0.1v(C_2C_3) + 0.07v(C_\beta C_\gamma)$
1209	$0.79tw(C_\gamma H_2) + 0.2tw(C_\beta H_2)$
1190	$0.27 S_{67} + 0.24tw(C_\beta H_2) + 0.18tw(C_\gamma H_2) + 0.18 S_{47} + 0.15v(H_{10}C_\alpha)$
1168	$0.35v(NH_3+) + 0.29v(N_{10}C_\alpha) + 0.27r(C_2H_2) + 0.09v(C_\alpha C_\delta)$

1154	$0.5r(MH_3) + 0.33r(O_2H_2) + 0.17v(NC_\alpha)$
1133	$0.26w(C_pH_2) + 0.22r(MH_3) + 0.18v(C_2O_3) + 0.12w(C_\beta H_2) + 0.1(C_3 = 0) + 0.1r(MH_3)$
1120	$0.3r(MH_3) + 0.3v(N_{13}C_{14}) + 0.2w(C_\beta H_2) + 0.1v(C_5C_6) + 0.06v(C_pC_\delta)$
1114	$0.8r(MH_3) + 0.08(N + C_\alpha O) + 0.07v(N_{13}C_\alpha)$
1109	$0.32v(N_{13}O_\alpha) + 0.24v(N_{10}C_\alpha) + 0.19w(C_\beta H_2) + 0.24w(C_pH_2)$
1077	$0.46v(C_pC_\delta) + 0.2v(C_\alpha O_\beta) + 0.14w(C_\beta H_2) + 0.1(C_6 NC_\alpha)$
1053	$0.4v(N + O_\alpha) + 0.15v(C_\alpha C_\beta) + 0.23r(C_{11}H_2) + 0.08(O_K NC)$
1042	$0.37v(N + C_\alpha) + 0.28r(C_{11}H_2) + 0.19v(O_pO) + 0.17r(C_8H_2)$
1020	$0.28v(OO_2) + 0.26v(C_1NC) + 0.26\delta(ONC_{14}) + 0.14v(C_\alpha C_{12}) + 0.12\delta(O_{42} = 0)$
1009	$0.52v(O_\beta C_p) + 0.32r(C_8H_2) + 0.13v(N + O_\alpha)$
1003	$0.29r(O_{14}H_2) + 0.21v(O_{14}C) + 0.2v_s(OO_2) + 0.11v(O_xC_{12}) + 0.07s(C_{12} = 0)$
1001 am III	$0.4\delta(N_{10}D) + 0.21v(C_\alpha O_6) + 0.07v(C_6N_{10}) + 0.07v(O_C) + 0.06\delta(O -- H) + 0.05\delta(O -- H)$
966	$0.48r(C_{11}H_2) + 0.16v(C_C) + 0.12v(C_6N) + 0.11S_{48} + 0.08r(C_{14}H_2) + 0.08r(O_3 = 0)$
958 am III	$0.48\delta(N_{13}D) + 0.15S_{49} + 0.12v(C_{12}N) + 0.05v(C_\alpha C_{12}) + 0.05v(C_{12} = 0) + 0.05v(N_{13}C)$
952	$0.58r(C_2H_2) + 0.42r(MH_3)$
929	$0.34r(O_{14}H_2) + 0.24r(C_8H_2) + 0.17r(C_\beta H_2) + 0.16S_{50} + 0.06R_{62}$
925	$0.01r(C_{14}H_2) + 0.17v(O_xC_{12})$
910	$0.25v(C_\alpha C_2) + 0.23S_{48} + 0.2\delta(C_3 = 0) + 0.2v(C_\alpha C_\beta) + 0.11r(C_\delta H_2)$
878	$0.38r(C_\beta H_2) + 0.28S_{48} + 0.24r(C_pH_2) + 0.1S_{48}$
767 am V	$0.37r(H_{10}H) + 0.3v(O_{33} -- H) + 0.21\text{tor}(C'_6N) + 0.07\text{tor}(NC_\alpha)$



100

736		$0.44\delta(CO_2) + 0.22v(C_4C) + 0.18v(C_\alpha C_{12}) + 0.15\delta(NC_{14}C)$
723 am VI		$0.24v(C_3=0) + 0.24B_{46} + 0.2B_{48} + 0.2r(CH_2) + 0.1r(C_4C_{12}) + 0.1r(C_6C_6)$
712 am V		$0.54v(N_{13}H) + 0.27\text{tor}(C_{12}N) + 0.1r(C_4H_2) + 0.08v(C_\alpha C_{12})$
681 am IV		$0.36\delta(C_{12}=0) + 0.32v(C_2C_3) + 0.18\delta(N_{10}C_\alpha C) + 0.18\delta(CO_2)$
678 am IV		$0.23\delta(C_6=0) + 0.19B_{49} + 0.1B_{48} + 0.1\delta(C_6C_6N) + 0.1\delta(C_6NC) + 0.1r(C_4H_2) + 0.07v(CC)$
622 am IV		$0.69\delta(C_3=0) + 0.16\text{tor}(N+C) + 0.15\delta(C_2C_3N_4)$
595 am VI		$0.48v(C_{12}=0) + 0.3v(O_{25}-H) + 0.07\delta(C_5CO_2N) + 0.06\delta(C_6^2=0)$
561 am VI		$0.5v(C_6=0) + 0.36r(C_{12}=0) + 0.14v(O_{28}^H-H)$
550		$0.6r(CO_2) + 0.2\delta(NC_{14}C) + 0.16\delta(C_{12}=0)$
471		$0.51r(CO_2) + 0.49\delta(C_1CN)$
421		$0.89\text{tor}(N+C) + 0.11v(C_3=0)$
378		$0.63r(CO_2) + 0.24\delta(C_6NC) + 0.13\delta(C_6=0)$
361		$0.34\delta(C_2C_3N_4) + 0.16\delta(C_6=0) + 0.16r(CO_2) + 0.14v(C_5C_6)$
344		$0.47\delta(C_2C_3N_4) + 0.18\delta(C_6NO) + 0.13\delta(C_6=0) + 0.13\delta(CNO_{14}')$
315		$0.57\delta(N+C_\alpha C) + 0.26B_{55} + 0.17B_{52}$
301		$0.57B_{55} + 0.43B_{52}$
295		$0.38\delta(CHC_{14}') + 0.34r(CO_2) + 0.27\delta(CH'CN)$
282		$0.45\delta(NC_{14}C) + 0.21r(CO_2) + 0.21\text{tor}(C_{14}C) + 0.13\text{tor}(C_{12}H)$
263		$0.33\delta(NC_{14}C) + 0.28r(CO_2) + 0.22\delta(C_5C_6N) + 0.19\delta(C_6NC_6)$
220		$0.66v(O_{33}-H) + 0.27v(N_{10}H) + 0.07\text{tor}(O_{12}H) + 0.05\text{tor}(C_4C)$

204

 $\delta(C_6=0)$ Linear Bend

197	$0.45 \text{tor}(C_2 C_3) + 0.27 \text{tor}(C_6 N) + 0.16 (N_{10} C_6 C) + 0.15 (C_5 C_6 N)$
194	$0.34 S_{52} + 0.3 \text{tor}(C_3 N_4) + 0.16 S_{46} + 0.15 S_{45}$
167	$0.54 S_{44} + 0.24 \text{tor}(C_3 N_4) + 0.24 S_{55}$
153	$0.97 v(N_{13} H--0) + 0.03 v(N_{13} H)$
128	$0.52 \text{tor}(C_2 C_3) + 0.25 \delta(0_6=0) + 0.17 S_{65} + 0.03 \text{tor}(C_3 H_4)$
114	$0.86 \text{tor}(C_0 C_2) + 0.14 S_{46}$
112	$0.72 \delta(C_6=0--H) + 0.26 \text{tor}(C_2 C_3)$
99	$0.37 \text{tor}(N_{13} C) + 0.35 \delta(C_6=0) + 0.3 \text{tor}(C C_{12})$
87	$0.3 \delta(C_6 0--H) + 0.2 \text{tor}(C_5 C_6) + 0.2 \text{tor}(N_{10} C) + 0.15 \delta(0_6 0--H) + 0.13 \delta(N_{13} H)$
73	$0.3 S_{46} + 0.49 \delta(N_{13} H--0) + 0.22 v(N_{13} H)$
64	$0.3 S_{46} + 0.16 \delta(N_{13} H--0) + 0.24 \text{tor}(C_{11} C) + 0.2 \text{tor}(N_{13} 0) + 0.15 \text{tor}(C_{14} C)$
54	$0.4 \delta(N_{13} H--0) + 0.4 S_{46} + 0.18 S_{45}$
39	$0.26 \delta(N_{13} H) + 0.13 \text{tor}(N_{10} C) + 0.54 \text{tor}(N_{13} C) + 0.09 \text{tor}(C_{14} C)$
30	$0.39 \delta(H_{13} H) + 0.14 \text{tor}(0_3 H--H) + 0.13 \text{tor}(C_5 C_6)$
24	$0.19 v(N_{10} H) + 0.21 \text{tor}(C_{14} C) + 0.18 \text{tor}(N_{13} 0) + 0.11 v(0_2 H--H) + 0.04 v(0_{33} H--H)$
18	$0.34 \delta(N_{13} H--0) + 0.28 \text{tor}(N_{10} C) + 0.16 \text{tor}(C_{11} C) + 0.05 \text{tor}(C_{12} N)$



CORRESPONDING SYMMETRY COORDINATES OF THE PROLYL GROUP
BETWEEN GP AND GPGG (STRUCTURE C7C5)

GP GPGG (C7C5)

S3	S3
S4	S4
S5	S5
S6	S20
S7	S21
S8	S22
S9	S23
S11	S19
S27	S44
S28	S45
S29	S46
S30	S47
S31	S48
S32	S49
S33	S50
S34	S51
S37	S52
S40	S55



Conclusion:

La structure C7C5 a des fréquences de vibration amide très différentes de celles des β turns.

L'analyse vibrationnelle de la structure C7C5 prédit une majorité de conformation C7C5 pour l'Angiotensine II humaine lorsque l'on considère les fréquences des modes amide III alors que les bandes amide I seraient plus en faveur pour une structure en coude β , nous retrouvons ici les problèmes amenés par les études en Resonance Magnétique Nucléaire.

CONCLUSION GENERALE

A partir de modèles simples ,on peut simuler les spectres de vibration de peptides adoptant une structure repliée.

La différenciation entre les différentes structures coudées n'est cependant pas toujours évidente.

Conjointement à la RMN, la spectrométrie Raman apparaît comme étant une technique physicochimique intéressante. En effet en RMN on obtient facilement des informations sur l'angle dièdral Θ alors qu'en Raman c'est l'angle dièdral complémentaire Ψ que l'on atteint assez facilement.

Des relations empiriques \tilde{V} amide III, $V = f(\Psi)$ ont été mises en évidence par les calculs de fréquences de vibration.

Les calculs de fréquences de vibration apparaissent comme un guide précieux pour l'attribution expérimentale des fréquences et permet souvent d'éviter des interprétations erronées. La mise en évidence de fréquences calculées mais non observées prouve que l'exploitation des spectres expérimentaux n'est pas toujours optimum.

Les calculs de fréquences de la molécule dans son contexte cristallin (à partir des données RX) seront toujours souhaitables quand celà s'avère possible.Ceci permet de prendre en compte tous les paramètres et d'en abandonner lorsqu'on passe à la molécule isolée.

Les peptides sont particulièrement difficiles à étudier (systèmes amorphes,intensités très faibles,fluorescence forte parfois).

Cependant, il faut maintenant considérer que la vibration c'est la vie. En effet, une molécule biologique n'a pas une conformation statique.Les mouvements de vibration participent à l'activité biologique et ne sont pas seulement une propriété de la molécule .Cet aspect dynamique de voir les choses doit être approfondi .

Le domaine des basses fréquences décrivant surtout les vibrations d'ensemble est un domaine très peu étudié dans le domaine des peptides.

La spectrométrie de vibration RAMAN est un domaine à ouvrir largement aux biochimistes principalement dans le domaine de résonance Raman .Aux physicochimistes de faire l'effort de toujours garder en vue l'aspect biologique des phénomènes ,de considérer la molécule isolée qu'il étudie comme faisant partie intégrante d'un système.

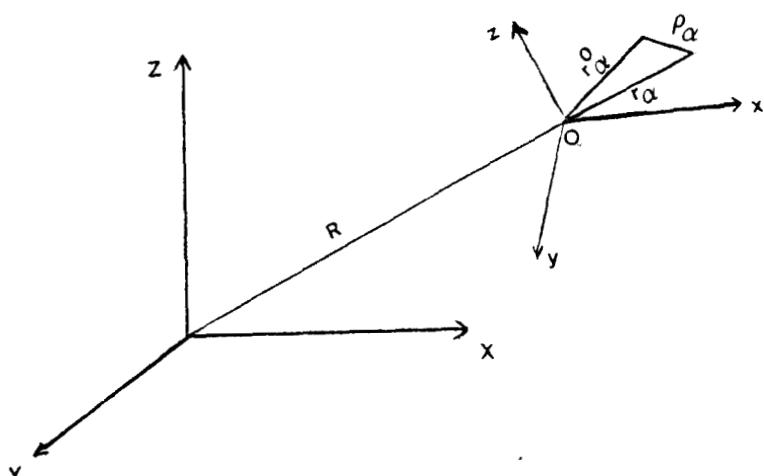
ANNEXE TECHNIQUE I

EQUATION SECULAIRE ET BASES DE L'ANALYSE DES VIBRATIONS NORMALES

DECOMPOSITION DE L'ENERGIE CINETIQUE TOTALE D'UNE MOLECULE:

Dans l'approximation de BORN-OPPENHEIMER où la séparation des déplacements électroniques et nucléaires dépend de la grande différence entre masses des électrons et des noyaux , les mouvements des noyaux d'une molécule apparaissent comme le résultat de la superposition de translations, de rotations et de vibrations simultanées.

Examinons l'expression de l'énergie cinétique d'une molécule dont le centre de masse O de coordonnées $(X^{\circ}, Y^{\circ}, Z^{\circ})$ par rapport à un système de référence fixe (X, Y, Z) est l'origine d'un système d'axes tournants (x, y, z) .



Si le vecteur $\vec{r}_{\alpha}(x_{\alpha}, y_{\alpha}, z_{\alpha})$ repère la position à un moment donné du noyau dans le système tournant et si $\vec{r}_{\alpha}^{\circ}(x_{\alpha}^{\circ}, y_{\alpha}^{\circ}, z_{\alpha}^{\circ})$ repère la

position du même noyau à sa position d'équilibre , le déplacement instantané du α ième noyau de sa position d'équilibre est dans le système tournant défini par le vecteur \vec{r}_α .

$$\vec{r}_\alpha = \vec{r}_\alpha^0 - \vec{r}_\alpha^* \quad \vec{r}_\alpha^* (\Delta x_\alpha = x_\alpha - x_\alpha^0, \Delta y_\alpha, \Delta z_\alpha)$$

La vitesse totale de ce noyau est alors

$$\vec{V}_\alpha = \vec{R} + \vec{\omega} \wedge \vec{r}_\alpha + \vec{\rho}_\alpha$$

$\vec{\omega}$ étant la vitesse angulaire du système tournant
L'énergie cinétique s'exprime alors par

$$2T = \sum_\alpha m_\alpha \vec{V}_\alpha \cdot \vec{V}_\alpha = R^2 \sum_\alpha m_\alpha + \sum_\alpha m_\alpha (\vec{\omega} \wedge \vec{r}_\alpha)^2 + \sum_\alpha m_\alpha \dot{\rho}_\alpha^2 + 2R \vec{\omega} \wedge \vec{r}_\alpha \cdot \vec{\rho}_\alpha + 2R \sum_\alpha m_\alpha \vec{\rho}_\alpha \cdot \vec{\rho}_\alpha$$

Les trois premiers termes représentent les énergies cinétiques pures translationnelle ,rotationnelle et vibrationnelles. Les trois termes restants représentent les énergies d'interaction correspondantes ;celles ci peuvent être éliminées par l'intermédiaire des deux **conditions de SAYVETZ- ECKART.**

1ère condition: $\sum_\alpha m_\alpha \vec{r}_\alpha = 0$ et $\sum_\alpha m_\alpha \vec{\rho}_\alpha = 0$

Pendant une vibration moléculaire le centre de masse de la molécule est immobile. Les couplages translation- rotation et translation - vibration sont alors éliminés.

2ième condition: $\sum_\alpha m_\alpha \vec{r}_\alpha \wedge \vec{r}_\alpha = 0$ et $\sum_\alpha m_\alpha \vec{r}_\alpha \wedge \vec{\rho}_\alpha = 0$

Lorsque les déplacements atomiques produits lors d'une vibration moléculaire tendent à produire une rotation de la molécule ,le système tournant se réoriente alors afin d'éliminer la composante du mouvement rotatif. L'énergie cinétique est alors:

$$2T = R^2 \sum_\alpha m_\alpha + \sum_\alpha m_\alpha (\vec{\omega} \wedge \vec{r}_\alpha) + \sum_\alpha m_\alpha \dot{\rho}_\alpha^2 + 2\vec{\omega} \sum_\alpha m_\alpha \vec{\rho}_\alpha \wedge \vec{\rho}_\alpha$$

Le dernier terme de cette équation représente l'**énergie de CORIOLIS** et représente le couplage Energie vibrationnelle - Energie rotationnelle . Sa faible contribution comparée à celle de l'énergie vibrationnelle sera ignorée.

ainsi $2T = R^2 \sum_\alpha m_\alpha + \sum_\alpha m_\alpha (\vec{\omega} \wedge \vec{r}_\alpha) + \sum_\alpha m_\alpha \dot{\rho}_\alpha^2$ représente la somme des énergies cinétiques translationnelle, rotationnelle ,et vibrationnelle pures.

ETUDE DES VIBRATIONS D'UNE MOLECULE:

Les vibrations d'une molécule peuvent être traitées séparément des mouvements translationnels et rotationnels en utilisant un système de coordonnées lié à la molécule et satisfaisant aux conditions de **SAYVETZ** .

En prenant les vecteurs des $3N$ déplacements cartésiens par rapport à la position d'équilibre (vecteurs α de composantes x, y, z), l'énergie cinétique prend la forme :

$$2T = \sum_\alpha m_\alpha (\dot{x}_\alpha^2 + \dot{y}_\alpha^2 + \dot{z}_\alpha^2) \quad m_\alpha \text{ étant la masse du } \alpha \text{ ième atome de la molécule .}$$

En notant par X_i les déplacements cartésiens cette équation devient :

$$2T = \sum_{i=1}^{3N} m_i \dot{X}_i \quad \text{soit sous forme matricielle}$$

$2T = \ddot{\mathbf{X}}^T M \dot{\mathbf{X}}$ où $\ddot{\mathbf{X}}$ est la dérivée de \mathbf{X} par rapport au temps

$\ddot{\mathbf{X}}$ sa matrice transposée
 M matrice diagonale d'ordre $3N$ dont les éléments sont les masses atomiques des N atomes.

En utilisant les coordonnées cartésiennes pondérées $q_i = \sqrt{m_i} X_i$ on a $2T = \frac{1}{2} \sum q_i^2$. L'énergie cinétique du système est une fonction des vitesses uniquement. L'énergie potentielle du système quant à elle ne possède pas de forme analytique simple. Cependant quelques remarques sont nécessaires:

L'énergie potentielle V est une fonction des déplacements atomiques seuls.

Pour de faibles déplacements, on peut exprimer V par un développement en série au voisinage de la configuration d'équilibre des coordonnées de déplacements:

$$V = V^* + \sum_{i=1}^N \left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right) q_i + 1/2 \sum_{i,j=1}^N \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) q_i q_j + 1/6 \sum_{i,j,k=1}^N \left(\frac{\partial^3 V}{\partial q_i \partial q_j \partial q_k} \right) q_i q_j q_k + \dots$$

q_i ($i=1, 2, \dots, N$) représentant dans n'importe quel système de coordonnées indépendantes l'écart à la position d'équilibre.

La valeur absolue de l'énergie est inconnue mais on connaît sa variation avec la coordonnée q_i , ainsi on prendra pour origine du potentiel $V^* = 0$.

La configuration à l'équilibre étant prise par définition au minimum d'énergie potentielle, on a :

$$F_i = \left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right)_0 = 0$$

Pour de très faibles déplacements atomiques, les termes cubiques et supérieurs peuvent être négligés (**approximation Harmonique**) et

$$2V = \sum_{i,j=1}^N \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) q_i q_j = \sum_{i,j=1}^N F_{ij} q_i q_j$$

avec $F_{ij} = \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 = F_{ji}$ constante de force associée représentant le facteur de proportionnalité entre les déplacements nucléaires et les forces qui ramènent la configuration à son état d'équilibre.

Le système mécanique que constitue la molécule obéit à la fonction de **LAGRANGE** $L=T-V$ et à l'équation du mouvement:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{\partial T}{\partial \dot{q}_i} \right) - \left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right) = 0 \quad i=1, 2, \dots, 3N$$

Si on utilise les expressions de T et V obtenues précédemment pour chaque q_i , on obtient un système de $3N$ équations de la forme:

$$\ddot{q}_i + \sum_j F_{ij} q_j = 0$$

dont les solutions sont les fonctions des oscillateurs harmoniques:
 $q_i = A_i \cos(2\pi\nu t + \phi)$

ν fréquence de vibration en cm^{-1} , ϕ facteur de phase et A_i déplacement (amplitude) maximal de l'atome.

En remplaçant q_i dans l'équation différentielle, on obtient un système de $3N$ équations linéaires de la forme :

$$\begin{aligned} \text{soit } & \sum_j F_{ij} A_j - 4\pi^2 c^2 \nu^2 A_i = 0 \\ & \sum_j (F_{ij} - \lambda \delta_{ij}) A_j = 0 \\ \text{et } \lambda = & 4\pi^2 \nu^2 c \quad \delta_{ij} = 1 \text{ si } i=j \\ & = 0 \text{ si } i \neq j \end{aligned}$$

si on élimine la solution triviale $A_j = 0$, on obtient le déterminant séculaire :

$$\left| \begin{array}{ccc|ccc} f_{1,1} & & f_{1,2} & \dots & f_{1,3N} & & \\ f_{1,2} & & f_{2,2} & \dots & f_{2,3N} & & \\ \dots & & \dots & & \dots & & \\ f_{1,3N} & & f_{2,3N} & \dots & f_{3N,3N} & & \end{array} \right|$$

Il y a donc $3N$ valeurs de λ , c'est à dire $3N$ fréquences harmoniques ν_k .

L'établissement de l'équation amène à plusieurs réflexions:

a) Si la matrice F était diagonale, le problème de la détermination des fréquences vibrationnelles serait très simple. Nous aurions alors $3N$ équations de mouvement séparées $(F_{ii} - \lambda) A_i = 0$ $i=1,2,\dots,3N$. Le fait que cette matrice ne soit pas diagonale entraîne qu'il n'est pas possible de séparer le problème vibrationnel en $3N$ problèmes séparés.

*On ne peut employer les coordonnées q_i car l'équation de SCHRÖDINGER pour l'oscillateur harmonique ne peut être résolue que si les énergies cinétique et potentielle forment des termes séparés, chacun étant une fonction d'une simple coordonnée. Ce problème sera évoqué dans le paragraphe suivant traitant de l'oscillateur harmonique.

b) Dans une translation pure ou une rotation pure il n'y a pas de variation dans les distances interatomiques de la molécule et donc il n'y a pas de contribution à l'énergie potentielle des 6 coordonnées de translation et de rotation. Ceci se traduira dans l'équation séculaire par la présence de six racines nulles.

c) On définit alors une **nouvelle base de coordonnées appelées coordonnées normales** qui répondent aux conditions

suitantes :

* Les matrices énergie potentielle et cinétique sont diagonales et satisfont aux conditions de **SAYVETZ**.

* T et V prennent les formes matricielles simples suivantes:

$$2T = \tilde{Q} \Lambda Q$$

$$2V = \tilde{Q} \Lambda Q$$

Λ est une matrice diagonale dont les paramètres sont les fréquences normales $\lambda_k = 4\pi^2 c^2 \nu_k^2$

* Le passage des $3N$ coordonnées cartésiennes à aux $3N-6$ coordonnées normales pour une molécule à N atomes s'opère par la matrice unitaire L

$$Q = L^{-1} q$$

* Pour chaque solution de l'équation séculaire (λ_k) c'est à dire pour chaque coordonnée normale Q_k , tous les atomes impliqués par cette coordonnée se meuvent en phase à la fréquence ν_k avec des amplitudes différentes A_{ik} .

Ce mode de vibration est appelé **mode normal de vibration** et la fréquence associée est la fréquence normale ou encore fréquence fondamentale.

* La matrice F des constantes de force est alors diagonale.

RELATIONS ENTRE COORDONNÉES NORMALES ET OSCILLATEUR HARMONIQUE:

L'opérateur Hamiltonien vibrationnel Hv peut être défini à partir des coordonnées normales Q_i et de son moment associé P_i .

$$P_i = (\frac{\partial T}{\partial Q_i}) = Q_i$$

$$H = T + V = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} (P_i^2 + \lambda_i Q_i^2)$$

$$Hv = -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{i=1}^{3N-6} \left(\frac{\partial^2}{\partial Q_i^2} - \frac{\lambda_i}{\hbar^2} Q_i^2 \right)$$

Comme les coordonnées normales Q_i forment une base de $3N-6$ variables indépendantes, la fonction d'onde vibrationnelle totale peut être mise sous la forme d'un produit de $3N-6$ fonctions d'onde indépendantes $\Psi_{Vi}(Q_i)$

$$\Psi_v(Q_1, \dots, Q_{3N-6}) = \prod_{i=1}^{3N-6} \Psi_{Vi}(Q_i)$$

: $E_v = \sum_{i=1}^{3N-6} E_i$, alors l'application de $Hv E_v = E_v \Psi_v$ conduit au système de $3N-6$ équations indépendantes du type :

$$-\frac{\hbar^2}{2} \frac{\partial^2 \Psi_{Vi}}{\partial Q_i^2} + \frac{\lambda_i}{\hbar^2} Q_i^2 \Psi_{Vi} = E_{Vi} \Psi_{Vi}$$

cette relation est l'équation de **SCHRÖDINGER** pour un oscillateur harmonique unidimensionnel (vibration non dégénérée)

Les valeurs propres seront obtenues pour $E_i = hc\nu_i$ ($\nu_i + 1/2$) ν_i nombre quantique vibrationnel ($0, 1, \dots$)

Les fonctions propres de l'opérateur répondent aux conditions d'orthogonalité $\langle \psi_{vi} | \psi_{vj} \rangle = \delta_{ij}$ et les éléments matriciels $(Q_i)v_{i,j} = \langle \psi_{vi} | Q_i | \psi_{vj} \rangle$ seront différents de zéro pour les valeurs $j=i\pm 1$

$$(Q_i)v_{i,i+1} = \gamma_i^{-1/2} (\underline{v_i}_2^2 + 1)^{1/2}$$

$$(Q_i)v_{i,i-1} = \gamma_i^{-1/2} (\underline{v_i}_2^2 - 1)^{1/2}$$

* Si toutes les coordonnées normales ont leur nombre quantique $v_i=0$ alors l'énergie du système dans l'état fondamental est $E^0 = 1/2 \hbar c \sum \gamma_i v_i$

* Si tous les nombres quantiques $v_i = 0$ sauf $v_j=1$, le niveau E_j est un niveau fondamental. Il y a $3N-6$ niveaux fondamentaux correspondant chacun à l'excitation d'un mode simple.

* Si tous les $v_i=0$ sauf v_j et $v_j \neq 1$, les niveaux d'énergie correspondants sont les niveaux harmoniques .

* Si 2 nombres quantiques sont différents de 0 ,les niveaux correspondants sont des niveaux de combinaison .

* Si deux modes normaux de vibrations Q_i et Q_j ont la même fréquence (même énergie vibrationnelle), les vibrations sont dites dégénérées . Ceci est relié au fait de la présence d'éléments de symétrie dans la molécule .L'équation séculaire a 2 racines égales $\lambda_{i1} = \lambda_{i2}$; les valeurs propres de l'énergie seront alors données par $E_{v_i} = \hbar c \gamma_i (v_i + 1)$ avec $v_i = v_i + v_j$

* Les transitions entre les niveaux d'énergie fondamental et simplement excité sont repérées par leur nombre quantique respectif v_0 et v_1 et données par $\nu_{v_1} - \nu_{v_0} = (E_{v_1} - E_{v_0}) / \hbar c$.

ANNEXE TECHNIQUE II

BASES DE L'ANALYSE DES VIBRATIONS NORMALES:

Les justifications de l'emploi des vibrations normales pour décrire les modes de vibrations d'une molécule ont été données en Annexe technique I . Cependant si ce choix apparaît judicieux de prime abord , il est en fait difficile à utiliser dans la pratique à cause de la complexité des expressions même des coordonnées normales .

On doit se rappeler par ailleurs que la structure de la matrice F des constantes de force dépend du choix du système de coordonnées .

Le système de coordonnées choisi doit permettre de transférer les constantes de force obtenues pour une molécule à d'autres édifices moléculaires similaires. Or, les coordonnées normales ne décrivent que le cas spécifique étudié et les constantes de force ne sont pas adaptables à d'autres situations.

Plusieurs bases de coordonnées sont possibles pour approcher l'étude en analyse normale et les diverses propriétés que l'on veut conférer à cette analyse comme par exemple la simplification de l'expression de l'équation séculaire ,la transférabilité des constantes de force exigée plus haut.

Cependant l'utilisation de nouveaux espaces de coordonnées aura pour effet d'assujettir ces nouvelles coordonnées à des contraintes pour que l'utilisation de l'approximation harmonique de l'énergie potentielle reste valable (introduction de coordonnées redondantes).

Examinons les expressions des énergies cinétique et potentielle dans les espaces de coordonnées suivants:

***Système de coordonnées cartésiennes :**

Soit X un vecteur formé des $3N$ composantes cartésiennes des N atomes d'une molécule . L'énergie cinétique est alors :

$$2T = \dot{X} M \dot{X}$$

\dot{X} matrice dont les éléments sont les dérivées des éléments de la matrice X par rapport au temps

\dot{X} matrice transposée

M matrice diagonale des N masses atomiques ($3N$ éléments).

*Système des coordonnées internes:

Les coordonnées internes décrivent les changements des longueurs de liaisons ou des angles entre les liaisons chimiques. Ces coordonnées sont appelées internes car elles ne sont pas affectées par les translations et les rotations de la molécule entière. L'espace des coordonnées internes alors se réduit à $3N-6$ composantes.

La nature de ces coordonnées est de la forme:

*Elongation des liaisons (Bond stretching)

*Variation des angles dans le plan (in plane
Bending)

*Variation des angles hors du plan peptidique
(out of plane bending)

*Torsion des liaisons (variation de l'angle dièdre entre les plans contenant trois liaisons consécutives liant quatre atomes).

Ces variations peuvent être décrites en termes de variation des coordonnées de déplacements cartésiens .

Soient:

R vecteur des coordonnées internes

B matrice de passage des coordonnées cartésiennes
R aux coordonnées internes

On a en notation matricielle

$$R = B_R X \quad X = B_R^{-1} R$$

La matrice B n'est pas en général une matrice carrée et ne peut être inversée. La transformation inverse est décrite conjointement au processus d'obtention des projections cartésiennes des modes à l'annexe technique V .

$$\text{Alors } 2T = \widetilde{B}^{-1} \widetilde{R} M \left(\widetilde{B}_R^{-1} \dot{R} \right)^{-1} = \widetilde{R} \widetilde{G}_R^{-1} \dot{R}$$

avec $\widetilde{G}_R = \widetilde{B}_R M^{-1} \widetilde{B}_R$ matrice carrée symétrique

Dans l'approximation harmonique (voir annexe 1) , l'énergie potentielle est

$$2V = \widetilde{R} F_R R$$

F matrice carrée symétrique dont les éléments F_{ij} sont les constantes de force $F_{ij} = \frac{\partial^2 V}{\partial R_i \partial R_j}$

A partir de l'équation de LAGRANGE (annexe 1) on obtient l'équation séculaire:

$$G_R F_R L = L \Lambda$$

avec Λ matrice diagonale des valeurs propres λ_i

$$\lambda_i = 4\pi^2 c^2 \nu_i^2$$

L matrice des vecteurs propres

La construction de la matrice B est effectuée à l'aide des vecteurs S de WILSON (ref. G.VERGOTEN Thèse d'état es sciences physiques LILLE 1977

Le produit $G_R F_R$ dans l'espace des coordonnées internes est une matrice non symétrique .cette diagonalisation s'effectue en deux temps:

*diagonalisation de G_R ce qui donne la matrice des valeurs propres et des vecteurs propres associés L_G

$$\tilde{L}_G G_R L_G = \Lambda_G$$

G_R est alors transformée en une matrice unité par l'intermédiaire de la matrice de transformation $L_G^* = L_G \Lambda_G^{-1/2}$

$$\tilde{L}_G^* G_R L_G^* = E$$

La matrice F_R est dans un deuxième temps transformée par L_G^* en une matrice symétrique F_C .

$$F_C = \tilde{L}_G^* F_R L_G^*$$

F_C est ensuite diagonalisée .On obtient les valeurs propres Λ_C tels que :

$$\tilde{L}_C F_C L_C = \Lambda_C$$

Les transformations de F et G conduisent aux valeurs propres et vecteurs propres du produit $G.F$ telles que :

$$\Lambda = \Lambda_C$$

$$L = L_G^* L_C$$

La matrice des vecteurs propres L définit, à partir de l'espace des coordonnées internes R ($3N-6$ dimensions) , le vecteur Q dont les composantes sont les $3N-6$ coordonnées normales .

$$R = L Q$$

Remarque:

Dans l'espace cartésien ($3N$ dimensions) la matrice GF est au départ symétrique .Une seule étape suffit pour sa diagonalisation .De plus , le problème des redondances traité au prochain chapitre n'apparaît plus. Cependant il a fallu attendre le développement des grosses capacités des mémoires des calculateurs actuels pour pouvoir travailler dans l'espace des coordonnées cartésiennes .

APPROCHE DES COORDONNEES NORMALES:

SYSTEME DES COORDONNEES DE SYMETRIE

Les coordonnées normales ne sont pas exploitables directement pour les raisons énoncées au début de cette annexe . La définition d'un espace intermédiaire entre les coordonnées internes et normales devient nécessaire et doit répondre à plusieurs conditions (

Selon T.SHIMANOUCHE (1) :

Cet espace est celui des **coordonnées de symétrie Si**

*Les coordonnées doivent être indépendantes les unes des autres.

*Expressions simples entre coordonnées de symétrie et coordonnées internes .

*Expressions rapprochées des coordonnées normales; Dans ce cas, les constantes de force non diagonales F_{ij} sont très petites (mais non nulles comme dans le cas des coordonnées normales) par rapport aux constantes diagonales .

*Chacune des coordonnées de symétrie est un vecteur propre de l'équation séculaire , dont la valeur propre correspondante est associée à la fréquence de la vibration associée à cette coordonnée de symétrie.

*Ces coordonnées doivent être symétriques , antisymétriques ou dégénérées par rapport aux opérations de symétrie locale (mouvements des groupements moléculaires) mais pas forcément par rapport aux opérations de symétrie de la molécule entière.

Une combinaison linéaire des coordonnées internes selon les propriétés de symétrie locales évoquées définit le vecteur S appelé: **coordonnée de symétrie**

$$S = U R$$

La matrice de passage des coordonnées internes aux coordonnées de symétrie est une matrice orthonormée

$$\tilde{U} U = E$$

ceci entraîne: $R = \tilde{U} S$

La ième ligne de U représente les coefficients des coordonnées internes impliquées dans la coordonnée de symétrie Si .Les énergies cinétique et potentielle deviennent :

$$2V = \tilde{R} F R = \tilde{S} U F \tilde{U} S = \tilde{S} F_S S$$

$$2T = \tilde{R} G^{-1} R = \tilde{S} U G^{-1} \tilde{U} S = \tilde{S} G^{-1} S$$

La matrice $G_S F_S$ se relie alors à $G F$ par

$$G_S F_S = U G F \tilde{U}$$

Les valeurs propres sont conservées

$$L^T G_S F_S L = \lambda$$

Les vecteurs propres associés sont alors

$$L = \tilde{U} L_S$$

L'emploi des coordonnées de symétrie , outre la définition d'un bon champ de force mène à une factorisation de T et V suivant les

propriétés de symétrie de la molécule . Les termes non diagonaux subsistants n'apparaissent plus qu'entre coordonnées de symétrie de même espèce .

Le nombre d'éléments de G et F est alors très réduit par rapport aux nombre d'éléments des memes matrices exprimées dans le système cartésien .

CHAMP DE FORCE ET COORDONNÉES REDONDANTES

A) Coordonnées redondantes:

Le passage de la description des vibrations moléculaires d'une molécule à N atomes dans un référentiel cartésien au système de coordonnées normales ou de symétrie abaisse le nombre de degrés de liberté de vibrations de $3N$ à $3N-6$. En partant du premier système pour aboutir au second , on définit trop de coordonnées qui ,de ce fait ,ne sont pas indépendantes . Ces conditions se regroupent en un système de 6 relations du type :

$$\sum_{i=1}^6 a_i X_i = 0$$

Ces conditions sont appelées **CONDITIONS DE REDONDANCE**

Dans le cas d'un cycle ,la forme globale des six redondances s'exprime sous la forme d'une combinaison linéaire de vecteurs orientés suivant les liaisons. La relation

$$\sum_{i=1}^6 \vec{R}_i = \vec{0} \quad (\text{Redondance primaire})$$

traduit la fermeture du cycle .

L'approximation harmonique qui est à la base de notre méthode de calcul stipule que les dérivées premières du potentiel sont nulles .(Mouvements de vibration de faible amplitude autour de la position d'équilibre).

$$V = V^0 + \sum_{i=1}^6 \left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right) q_i + 1/2 \sum_{i,j=1}^6 \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) q_i q_j + \dots$$

$$V = V^0 + \sum_{i=1}^6 F_i q_i + 1/2 \sum_{i,j=1}^6 F_{ij} q_i q_j$$

$$\left(\frac{\partial V}{\partial q_i} \right) = 0 \quad \text{approximation harmonique}$$

$$V^0 = 0 \quad \text{référence de l'énergie potentielle}$$

Mills a montré () que dans un système de coordonnées de coordonnées linéaires R_i ,la présence d'une relation de redondance $\sum_i a_i R_i = 0$ n'a pas d'effet sur l'expression du potentiel harmonique .

Cependant lorsque les déplacements ne sont plus infinitésimaux par rapport aux dimensions atomiques , les déplacements doivent être exprimés dans un système de coordonnées curvilignes Os.

Ce système est relié aux coordonnées linéaires par:

$$\rho_s = \sum_i t_{is} R_i + 1/2 \sum_{i,j} t_{is} R_i R_j + \dots$$

Si la base n'est pas redondante (s'il n'y a pas plus de 3N-6 coordonnées) alors

$$V = \frac{1}{2} \sum_{s,t} f_{st} \rho_s \rho_t \text{ et la constante de force est égale à: } F_{ij} = \sum_{s,t} t_i^s t_j^t f_{st}$$

S'il existe une relation de redondance, alors

$$V = \sum_s (f_s - \lambda \Phi_s) \rho_s + \frac{1}{2} \sum_{s,t} (f_{st} - \lambda \Phi_{st}) \rho_s \rho_t$$

Le paramètre λ est appelé **tension interne**

Il représente la tension à l'équilibre résultant de la contrainte. Il intervient dans la partie quadratique de l'énergie potentielle et est donc déterminable.

L'approximation harmonique impose alors :

$$f_s - \lambda \rho_s = 0 \quad s=1, 2, \dots, 3N-5$$

Les constantes de force F_{ij} seront du type

$$F_{ij} = f_{ij} - \lambda \Phi_{ij}$$

si les coefficients t_s sont ceux de la matrice identité.

Une redondance dans les coordonnées curvilignes introduit une tension intramoléculaire dans le champ de force harmonique.

CHAMP DE FORCE D'UREY-BRADLEY ET FONCTIONS DE REDONDANCE:

Afin d'obtenir une description complète de l'énergie potentielle permettant d'employer un minimum de paramètres lorsqu'on veut utiliser de grosses molécules de symétrie réduite, nous avons choisi d'utiliser le champ de force d'UREY-BRADLEY (3). Ce champ tient compte d'interactions du type VAN DER WAALS entre atomes non reliés par des liaisons chimiques. L'emploi de ces interactions permet d'éliminer les termes non diagonaux de la matrice F .

L'expression de ce potentiel en fonction des coordonnées internes a la forme générale suivante:

$$V = \sum_i (K_i r_i \Delta r_i + \frac{1}{2} K_i (\Delta r_i)^2) + \sum_{i < j} (H_{ij} r_{ij} (\Delta \theta_{ij}) + \frac{1}{2} H_{ij} r_{ij} (\Delta \theta_{ij})^2) + \sum_{i,j} (F_{ij} q_{ij} (\Delta q_{ij}) + \frac{1}{2} F_{ij} (\Delta q_{ij})^2)$$

L'élimination des termes linéaires (présence de tensions internes) est effectuée par l'introduction de fonctions de redondance. Les références (2,3) décrivent les fonctions de redondance particulières au champ d'**UREY-BRADLEY- SHIMAHOUCHI** et de leur application à la suppression des coordonnées redondantes q_{ij} . L'énergie potentielle devient alors une forme quadratique des coordonnées internes R telles que

$$2 V = R^T F R$$

Les éléments de la matrice F sont des fonctions linéaires des constantes de force d'**UREY-BRADLEY** Φ_k telles que:

$$F_{ij} = \sum_k a_{ij} \Phi_k$$

soit sous forme matricielle

$$F = Z \Phi \quad Z \text{ matrice des contraintes}$$

La contribution de chaque constante de force du champ d'UREY-BRADLEY à un mode normal est exprimée par la relation matricielle :

$$\Delta J Z \Phi^*$$

$$J \text{ jacobien par rapport à l'élément } F_{ij} \quad J_{ij} = \frac{\partial \psi}{\partial F_{ij}}$$

Φ^* matrice diagonale des constantes de force.

Les éléments du produit matriciel représentent les contributions fractionnaires de chaque coordonnée dans le champ d'U.B à la fréquence $\lambda_i = 4\pi^2 c^2 \bar{y}_i^2$.

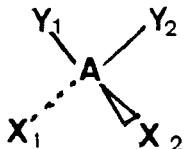
Les méthodes de raffinement des constantes de force a été parfaitement décrite par G.FLEURY (4) et T.SHIMANOUCI(5).

COORDONNEES DE SYMETRIE LOCALE.

TRANSFERABILITE DU CHAMP DE FORCE

Mon principal travail a été de trouver un champ de force correct et d'éprouver sa transférabilité comme nous le verrons dans le chapitre expérimental consacré à l'étude de dipeptides et du transfert du champ de force à des tétrapeptides.

Le manque de symétrie moléculaire ainsi que la volonté d'obtenir une base fiable de constantes de force transférables m'ont poussé à utiliser la notion de champ de force de symétrie locale (LSSF). En général, les constantes de force de groupes moléculaires tels que NH₃ (C_{3v}) ou CH₂ (C_{2v}) ne sont influencés que par les atomes immédiatement voisins. Considérons par exemple un groupement de symétrie C_{2v}



Y₁, Y₂ et X₁, X₂ sont de même nature coordonnées internes

$$\begin{array}{c} \alpha \\ \beta \\ \gamma_{ij} \end{array} \quad \begin{array}{c} \text{modification de} \\ Y_1 \ A \ Y_2 \\ X_1 \ A \ Y_j \end{array}$$

En combinant linéairement ces coordonnées suivant les opérations de symétrie du groupe C_{2v} (E, C₂, 2σ_v), on obtient les coordonnées de symétrie suivantes (ici normalisées)

$$S_1 = (\alpha + \beta + \gamma_{11} + \gamma_{21} + \gamma_{12} + \gamma_{22}) / \sqrt{6}$$

$$S_2 = (5\alpha - \beta - \gamma_{11} - \gamma_{21} - \gamma_{12} - \gamma_{22}) / \sqrt{30}$$

$$S_3 = (4\beta - \gamma_{11} - \gamma_{21} - \gamma_{12} - \gamma_{22}) / \sqrt{20}$$

$$S_4 = (\gamma_{11} + \gamma_{21} - \gamma_{12} - \gamma_{22}) / 2$$

bending X₁A X₂

bending Y₁A Y₂

Y₁A Y₂ rocking



$$S_5 = (\gamma_{11} - \gamma_{21} - \gamma_{12} + \gamma_{22})/2$$

~~Y₁A Y₂~~ twisting

$$S_6 = (\gamma_{11} - \gamma_{21} + \gamma_{12} - \gamma_{22})/2$$

~~Y₁A Y₂~~ wagging

or les fonctions de redondance expriment la relation de redondance sous la forme:

$$\sum_{n=1}^6 a_n \alpha_n = 0 \quad \alpha_n \text{ coordonnée interne de déformation de l'angle } \theta_{ij}$$

Prendre la coordonnée de symétrie S₁ comme coordonnée de redondance implique que les coefficients α_D de la relation $D_{ijkl} = 0$ soient égaux. Ceci n'est vrai que si les six angles sont égaux (tétraèdre parfait), or, si les atomes X et Y sont différents (C et H par exemple) la coordonnée S₁ n'est pas la coordonnée redondante. En symétrie C_{2v} la relation de redondance sera de la forme :

$$A\alpha + B\beta + C(\gamma_{11} + \gamma_{21} + \gamma_{12} + \gamma_{22}) = 0$$

or la relation matricielle qui lie le passage des coordonnées internes aux coordonnées de symétrie $S = UR$ se fait par la matrice U orthogonale, c'est à dire que les coordonnées de symétrie sont orthogonales entre elles.

Ainsi l'exclusion d'une coordonnée de symétrie redondante (qui est souvent une combinaison linéaire des autres coordonnées de symétrie) affecte-t-elle l'expression des autres coordonnées qui lui sont orthogonales.

Il sera donc nécessaire de procéder à une renormalisation dans la **base réduite des coordonnées de symétrie** (base ne comportant plus de coordonnées de symétrie redondantes).

L'expression matricielle de l'énergie potentielle dans l'espace des coordonnées de symétrie

$$2V = \tilde{S} F_S S$$

montre qu'une mauvaise détermination de l'expression des coordonnées redondantes influe sur le champ de force et qu'il ne faudrait alors n'y accorder aucun crédit et aucune propriété de transférabilité. De plus, la description des coordonnées mises en jeu lors d'une vibration normale (PED Potential Energy Distribution) serait alors erronée et l'attribution des bandes faussée.

Motions de symétrie locale d'un cycle:

Les notions précédemment introduites sont valables pour des molécules "ouvertes". Est-il possible d'attacher une notion de symétrie locale à un cycle? Est-il possible de définir pour ce cycle un champ de force transférable à toute molécule qui contiendrait un cycle de même géométrie et que les grandeurs qui caractérisent ce cycle ne dépendraient que des éléments propres au cycle indépendamment des substituants?

J.P.HUVERNE (6) a montré dans des travaux sur les

redondances de cycles comme le Cyclohexane , du Glucose et d'hétérocycles minéraux , qu'un cycle à N atomes possède bien $3N-6$ coordonnées de symétrie caractéristiques du groupement qu'il constitue et transférables avec lui . Cependant le traitement des redondances du cycle est possible, mais beaucoup plus complexe que dans le cas des redondances arbre . Elle est toutefois facilité si le cycle comporte des éléments de symétrie.

Nous verrons dans le cas d'un cycle PROLIFIQUE non plan que l'expression de la base réduite est d'une grande complexité

ANNEXE TECHNIQUE III

RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DES PEPTIDES

INTRODUCTION:

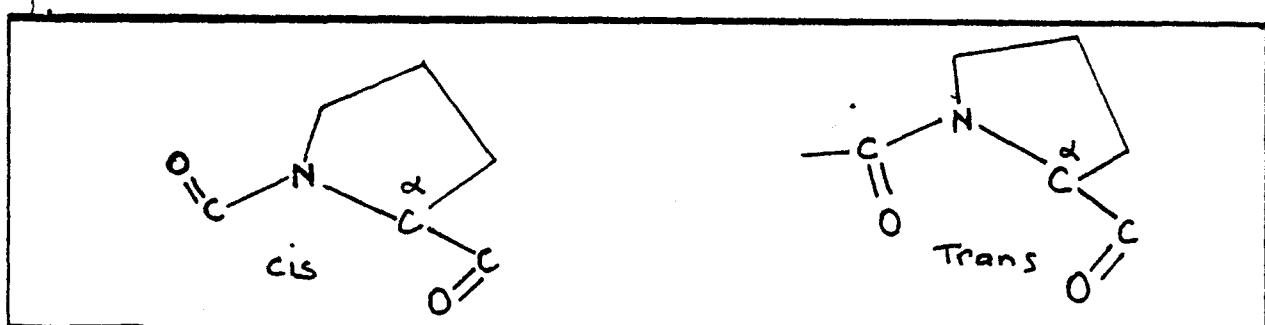
Les résultats des nombreux travaux tant expérimentaux que théoriques en Résonance Magnétique Nucléaire nous ont permis de déterminer la structure de nos peptides modèles et de montrer qu'ils adoptaient une structure coudée dans certaines conditions de solvant.

J'ai tenu ici à donner les principaux résultats obtenus en RMN sur le tripeptide Glycyl-L-Prolyl-Glycylglycine (GPGG) et son homologue protégé ZGPGGOMe (Z:Benzylloxycarbonyl) afin d'apporter une cohérence à l'ensemble des études effectuées en spectrométrie vibrationnelle.

Ces travaux en RMN ont été effectués par l'équipe de Mme M.H LOUCHEUX en collaboration avec B.PERLY (Equipe du Pr C. CHACHATY au C.E.N de SACLAY)(1).

ISOMERIE CIS-TRANS:

L'Isométrie Cis-Trans autour de la liaison peptidique X-PRO a été particulièrement bien mise en évidence par de nombreux travaux (2).



Une telle isométrie a été observée sur le tripeptide GPLG (Glycyl-L-ProlylGlycylGlycine sous forme zwitterion) dans le DMSO-d6 par TOMA et AL (2).

A) CONDITIONS EXPERIMENTALES:

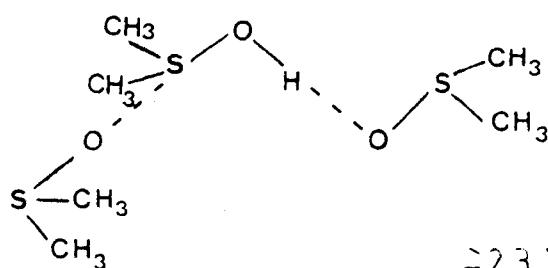
A-1) Utilisation du solvant DMSO-d6:

Ce solvant a été utilisé pour plusieurs raisons:

* Il n'a pas de réactions d'échange avec les protons mobiles (NH amide ou OH).

* C'est un solvant assez polaire qui solvate les protons amide NH et n'entraîne pas d'agrégation notable jusqu'à une concentration élevée de 0,2M.

* Ce solvant se caractérise par une auto-association due à son moment dipolaire élevée et à l'encombrement des molécules (3).



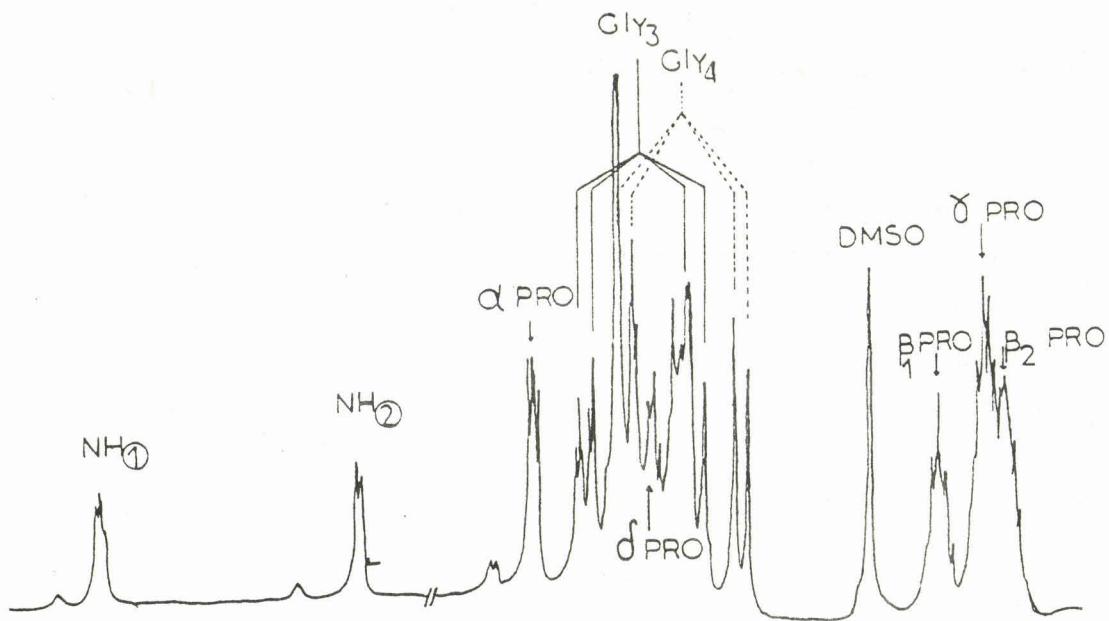


Fig III-1

Déplacements Chimiques de GPGG (zwitterion) dans le DMSO-d₆. Ref: TMS conc. 6mg/ml DMSO-d₆
1H RMN 250 MHz

les raies N1-H sont à bas champ (quadruplet).

T°C	17	30	40	50	60	70	80	pente X 10 ppm/°C
δ N1H cis	8,64	8,57	8,51	8,46	8,41	8,34	8,28	-5,68
δ N1H Trans	8,43	8,37	8,32	8,28	8,24	8,18	8,13	-4,73
δ N2H cis	7,42	7,43	7,44	7,46	7,48	7,49	7,50	+1,28
δ N2H Trans	7,07	7,12	7,14	7,17	7,22	7,24	7,28	+3,27
cis								
-----	710	0,11	0,13	0,15	0,16	0,19	0,21	
cis+Trans								

N 1:N du résidu 5

N 2:N du résidu 4

$$\begin{aligned} J^3 \text{ HN1-H} &= 8,0 \pm 0,4 \text{ Hz} \quad \theta = -80^\circ \text{ ou } 40^\circ \\ J^3 \text{ HN1-H} &= 5,0 \pm 0,2 \text{ Hz} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} J^3 \text{ HN2-H} &= 6,0 \pm 0,2 \text{ Hz} \quad \theta = -165^\circ \\ J^3 \text{ HN2-H} &= 1,7 \pm 0,2 \text{ Hz} \end{aligned}$$

305
1985

Table III-1

A-2) Appareillage:

Les spectres RMN du proton H ont été enregistrés sur CAMECA TSN 250 (250 MHz) à 20° et en ¹³C sur VARIAN CFT 20 (20MHz) à 32°. Les mesures des temps de relaxation longitudinaux T ont été effectuées sur BRUCKER WH 90 (27° et $T \pm 1^\circ$) à 22,63 MHz.

B) ETUDES DU TRipeptIDE GPGG:

Les raisons du choix de ce peptide modèle ont été évoquées dans le chapitre I. La formule développée de ce tripeptide ainsi que la notation des résidus est montrée dans la figure 1

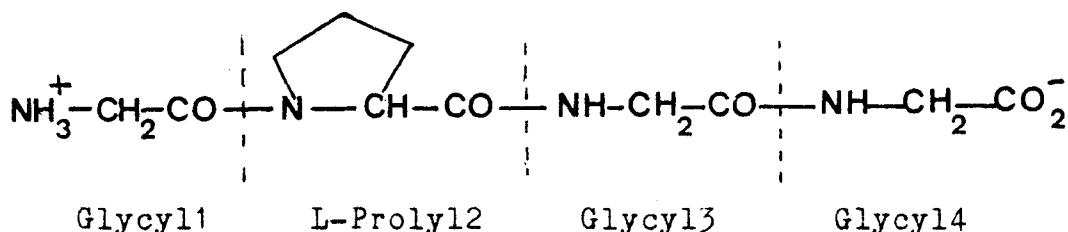


FIG 1

* Dans l'eau, ce tripeptide existe simultanément sous plusieurs conformations (isomérie Cis-Trans).

* Dans le DMSO-d₆, le tripeptide NH₃⁺GPGG CO₂⁻ (zwitterion) possède une structure fortement organisée. Ce fait est mis en évidence par plusieurs résultats expérimentaux:

-Faible pourcentage de forme Cis autour de la liaison Gly1-Pro2 (<10%).

-Il existe une très forte inéquivalence des deux protons pour chacun des groupes méthylènes Gly3 et Gly4.

-Le coefficient de température $\Delta d/\Delta T$ est positif pour l'un des NH amide ($\Delta d/\Delta T$: variation du déplacement chimique en fonction de la température).

B-1) Analyse du spectre en RMN H de GPGG dans le DMSO-d₆:

Les spectres ¹H ont été enregistrés à 250 MHz à 20° (référence: TMS).

L'examen de la figure III-1 permet de montrer que:

* Les signaux des protons de Gly1 sont partiellement masqués par HDO résiduelle.

* Les valeurs des déplacements chimiques des protons NH et CH (et les constantes de couplage) ont été obtenues par simulation du spectre de la forme Trans seule.

Ces valeurs ont été confirmées par la deutération sélective CD₂ du résidu Glycyl3 (Table III-1).

B-2) Analyse des coefficients de température:

On sait qu'une forte dépendance des déplacements chimiques des protons amide NH en fonction de la température est typique, soit d'une exposition de ce proton au solvant, soit à sa participation dans une liaison Hydrogène.

Le déplacement du bas champ à une position à champ plus fort se produit en augmentant la $T^\circ \Delta d/\Delta t < 0$.

A l'opposé, un faible coefficient de T° caractérise une forte liaison Hydrogène intramoléculaire $\Delta d/\Delta T > 0$.

La table III-2 donne les valeurs des coefficients de T° pour les groupes NH amide de GPGG.

$\Delta d/\Delta T$ (ppm/°)	NH Gly3	NH Gly4
Cis	$-5,63 \cdot 10^{-3}$	$1,28 \cdot 10^{-3}$
Trans	$-4,73 \cdot 10^{-3}$	$3,27 \cdot 10^{-3}$

Table III-2

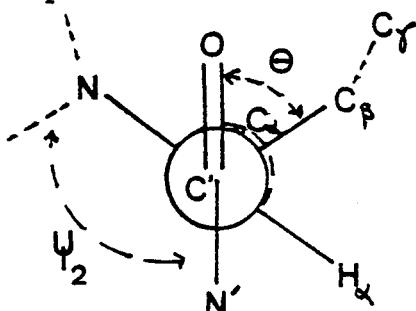
NH Gly4 est protégé du solvant.

Remarque:

Les raies s'élargissent lors de l'augmentation de T° . Ceci peut être dû à une interconversion entre conformations.

B-3) Détermination de l'angle dièdre Ψ_2 (Pro) par RMN 13C:

SIEMON et AL(4) ont mis en évidence une relation linéaire entre les déplacements chimiques des C et C et l'angle dièdre C-C-C'.



Ces auteurs proposent la relation suivante pour les isomères Cis et Trans:

$$\Delta\delta = 0,081 |\theta| + 2,47 \quad \text{isomère Cis}$$

$$\Delta\delta = 0,036 |\theta| + 0,73 \quad \text{isomère Trans}$$

Pour chacun des 2 isomères, les valeurs expérimentales RMN sont proches des valeurs théoriques accordées à une conformation en coude B ($U = +160^\circ$ ou -40°).

Remarque:

- les résultats sont assujettis à deux contraintes
- Les mesures sont effectuées à 32°
- La précision de la loi de SIEMON qui reste très empirique.

L'application de ces deux relations au tripeptide NH3+ GPGG CO2- donne à $T=32^\circ$

$$\Delta\delta_{\beta\gamma}(\text{cis}) = 9,42 \text{ ppm d'où } |\theta| = 86^\circ \text{ et } \Psi = 145^\circ \text{ ou } -25^\circ$$

$$\Delta\delta_{\beta\gamma}(\text{trans}) = 4,49 \text{ ppm d'où } |\theta| = 100^\circ \text{ et } \Psi = 160^\circ \text{ ou } -40^\circ$$

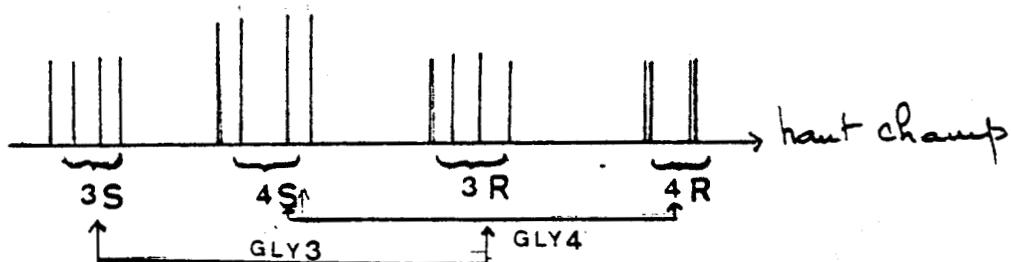
B-4) Détermination du type de repliement:

La détermination des angles dièdre ϕ est assujettie à l'**hypothèse suivante**

Le proton CH Gly situé à bas champ est de configuration S. (Travaux de KAINOSH0 et AL (5), MARRAUD et AL (6)).

De nombreuses observations permettent d'étayer ce **LEMME**

Le diagramme des déplacements et couplages des protons C H des groupes Gly3 et Gly4 de GPGG peut être alors schématisé comme suit:

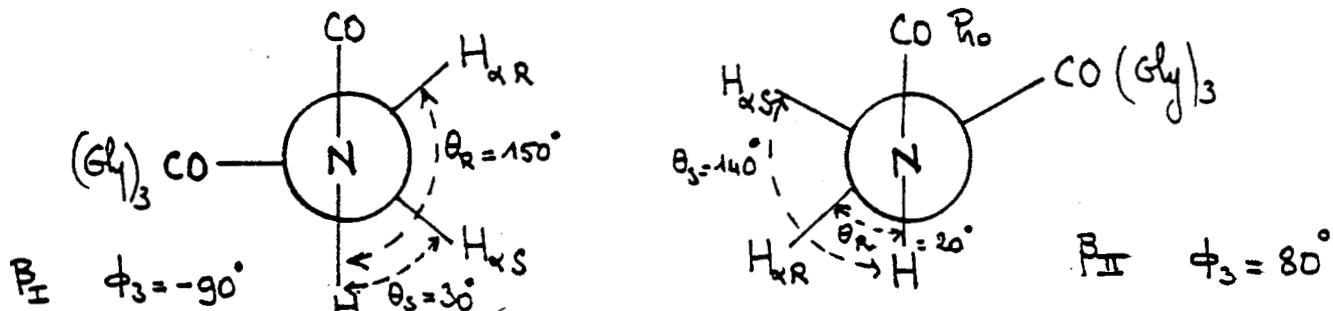


La table III-3 donne les valeurs des constantes de couplage NH-C H (S R):

	Gly3	Gly4
$J^3\text{NH}-\alpha_s$	8,4 Hz	6,5 Hz
$J^3\text{NH}-\alpha_R$	4,5 Hz	1,5 Hz

Table III-3

Les valeurs expérimentales des J NH-CH pour chacun des résidus mènent alors aux propositions suivantes:



L'utilisation de la relation de CUNG et AL (7): $\theta = |\phi - 60^\circ|$ donne pour les deux types de coude les plus fréquemment rencontrés:

$$B \ I \quad \begin{cases} \theta_R = 150^\circ & J^3\text{NH}-\text{CH}_{\alpha R} (\text{Gly3}) \sim 9 \text{ Hz} \\ \theta_S = 30^\circ & J^3\text{NH}-\text{CH}_{\alpha S} (\text{Gly3}) \sim 4,5 \text{ Hz} \end{cases}$$

$$B \ II \quad \begin{cases} \theta_R = 20^\circ & J^3\text{NH}-\text{CH}_{\alpha R} (\text{Gly3}) \sim 4,8 \text{ Hz} \\ \theta_S = 140^\circ & J^3\text{NH}-\text{CH}_{\alpha S} (\text{GLY3}) \sim 8,4 \text{ Hz} \end{cases}$$

Or l'observation nous donne:

$$\begin{aligned} J^3 \text{ NH-CH}_{\alpha S}^{\text{GLY3}} &= 8,4+0,1 \text{ Hz} \\ J^3 \text{ NH-CH}_{\alpha R} &= 4,5+0,1 \text{ Hz} \end{aligned}$$

$$\text{et } \phi_3 = +80^\circ$$

Ainsi on voit que seul le type de repliement en **COUDE BII** est compatible avec les données expérimentales.

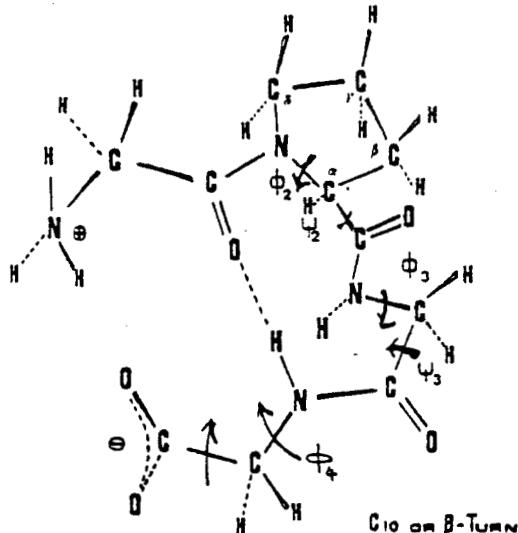
B-5) Détermination de l'angle dièdre ψ_3 :

L'examen des constantes de couplages géminales et en utilisant le diagramme de BARFIELD (8) reliant $J_{\alpha \alpha}^2 \text{ Gly}$ à ψ gly on obtient $J_{\alpha \alpha}^2 \text{ Gly3} = 17,2 \text{ Hz}$

Avec $\phi_3 = +80^\circ$, on a deux valeurs possibles:

$$\begin{aligned} \psi_3 &= 0 \pm 20^\circ \\ \psi_3 &= 180 \pm 20^\circ \end{aligned}$$

Dans les turns théoriques BI et BII la valeur de $\psi = 0^\circ$ (-30° pour BIII). Ceci confirme la présence de la conformation de GPGG en coude BII.



B-6) Détermination de l'angle dièdre ϕ_4 :

La valeur observée de $J_{\alpha \text{NH-CH}}^3$ (Gly4) correspond à $\phi_4 = -165^\circ$. En utilisant un modèle moléculaire on voit très bien que cette valeur permet l'établissement d'une liaison Hydrogène entre NH (Gly4) et CO(Gly1).

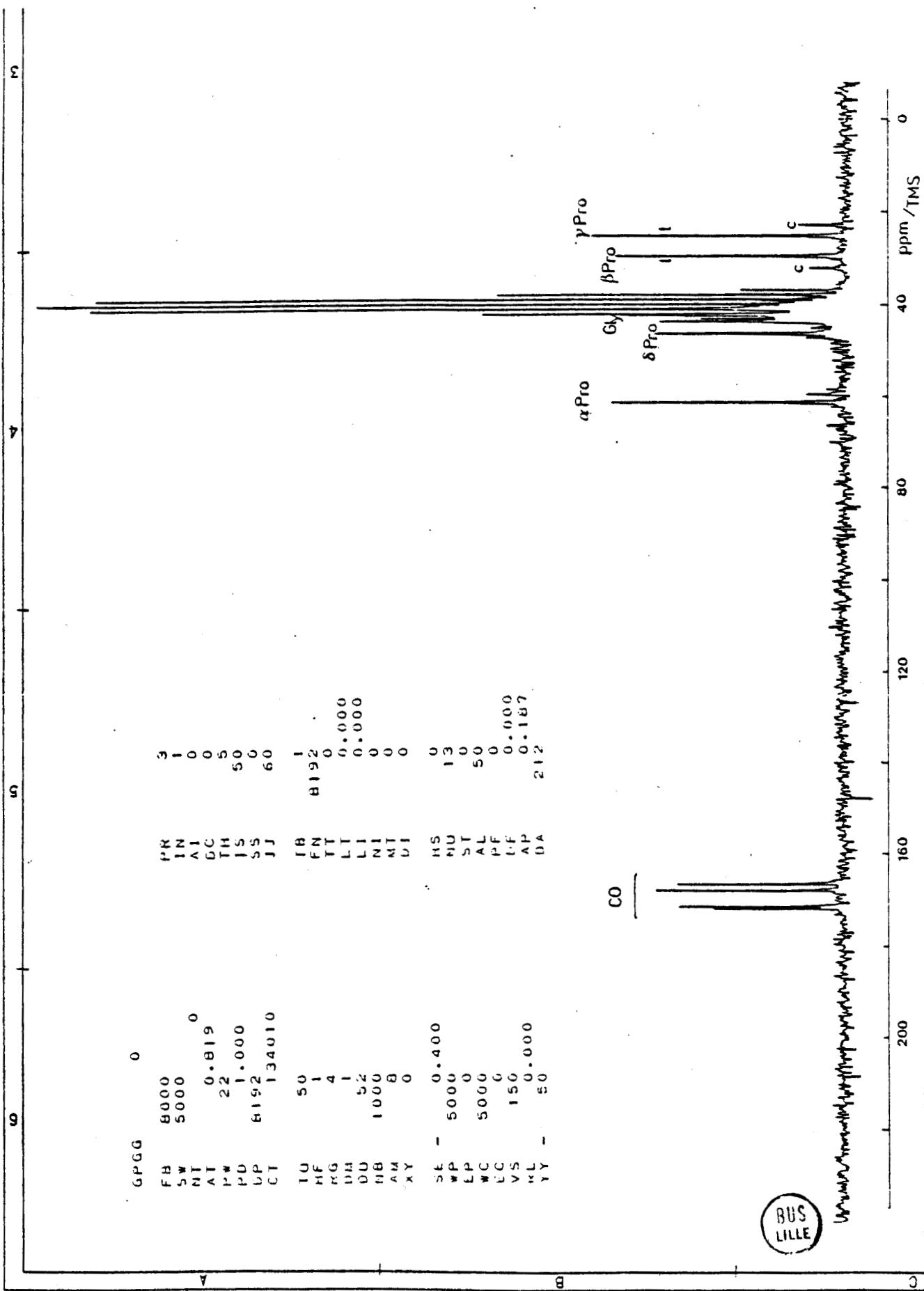
Remarque:

L'interaction électrostatique entre groupements NH_3^+ et CO_2^- terminaux est très forte et contribue principalement à la stabilisation de la structure en coude BII.

Comme nous le verrons lors de l'étude du tétrapeptide ZGPGG dans le DMSO-d6 que ce peptide n'adopte aucune conformation privilégiée, ce qui démontre l'importance de la stabilisation de la structure par les interactions électrostatiques.

D'autres exemples de stabilisation de coude par ce type d'interaction électrostatique sont connus:

Boc-Arg-Ala-Gly-Glu-NH₂ étudié par MAYER et LANCELOT (9), H-Gly-Pro-Leu-Gly-OH et H-Gly-Pro-Asn-Gly-OH par TOMA et AL (BI Turn).



B-7) Conformation du cycle Proline:

Les valeurs des constantes de couplage $J^3H_\alpha H_{\beta_1} = 5,1$ Hz et $J^3H_\alpha H_{\beta_2} = 8,5$ Hz obtenues à $T^\circ = 17^\circ$ montrent qu'il existe une **interconversion rapide entre les formes EXO et ENDO**.

MADISON (8) signale un tel résultat pour des valeurs de δ Pro $\sim -60^\circ$ (β Turns). Ce phénomène est lié également à l'existence d'une faible proportion de forme Cis comme c'est le cas pour GPGG à 17° .

B-8) Structure globale du peptide; Mesure de relaxation en ^{13}C :

Les spectres de GPGG sous forme de Zwitterion dans le DMSO-d6 à $300^\circ K$ (70 mg/ml) ont été enregistrés sur l'appareil WH 90. Les temps de relaxation longitudinaux NT1 des groupes méthylènes de Pro sont donnés dans la table III-4.

	H_α	H_β	H_γ	H_δ
NT1	0,111	0,242	0,24	0,156
$\Delta NT1$	8° /	5° /	10° /	2° /
NT1				

Table III-4

Ces temps de relaxation sont typiques du mouvement interne autour de la liaison C-C.

L'analyse du temps de corrélation global (ref. C Pro) donne:

$$1/\omega_c = 7 \cdot 10^{-9} \text{ Sec}$$

$$\text{pour } \tau_c \sim 5 \cdot 10^{-10} \text{ S} \quad \omega_c^2 \tau_c^2 = 5 \cdot 10^{-3} \ll 1$$

$$\frac{\tau_c^{-1}}{T_1} c_\alpha = \eta^2 Y_c^2 Y_H^2 r_{CH}^{-6} \tau_c \text{ et } r_{CH} = 1,09 \cdot 10^{-10} \text{ unité SI}$$

$$\eta^2 Y_c^2 Y_H^2 = 3,6 \cdot 10^{-38} (\text{unités CGS}) = 3,6 \cdot 10^{-50} (\text{unités SI})$$

$$\text{or } T = 0,111 \text{ nous donne } T_1^{-1} = 9 \text{ Sec et } \tau_c = 4,2 \cdot 10^{-10} \text{ S}$$

Le rayon de la sphère équivalente de la molécule est obtenu par $\tau_c = 1/6D_2 = 4\pi r^3 n/3$ où $D_2 = V_m n/kT$, n coefficient de viscosité, r (mètres), $k=1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J } \text{K}^{-1} (\text{SI})$, $T(\text{K})$, $\eta \text{ kg m S}^{-1} (\text{SI})$

$$\text{à } 300^\circ K \quad n=1,85 \cdot 10^{-2} \text{ poise}$$

$$\text{on a } r_{\text{eff}} = 6 \text{ \AA}$$

remarque: L'analyse des coordonnées cartésiennes lors de nos calculs des vibrations normales (centre de gravité) donne un rayon maximal $r_{\text{max}} = 5,7-5,8 \text{ \AA}$. Ceci est en bon accord avec les valeurs obtenues par relaxation.

CONCLUSION

Le peptide GPGG (zwitterion) adopte la conformation en coude B II.

RMN ^{13}C de GPGG zwitterion 20 mg/1 ml DMSO-d6 T°c=35

d /TMS/DMSO-d6 TMS=DMSO-39,5

RAIE δ ppm/DMSO δ ppm/TMS

CO 1	132,29	171,79
CO 2	131,76	171,26
CO 3	128,51	167,81
CO 4	126,96	166,46
Pro 0	21,32	60,82
Pro 0	6,39	45,89
Cis B Pro	-7,98	31,52
Trans B Pro	-10,59	28,91
Trans Pro	-15,08	24,42
Cis Pro	-17,40	22,10

Rapport Cis

----- = 13 % pour B Pro

Cis+Trans 14 % pour Pro

C) ETUDES CONFORMATIONNELLES DE NCBZ-GPGG-OMe:

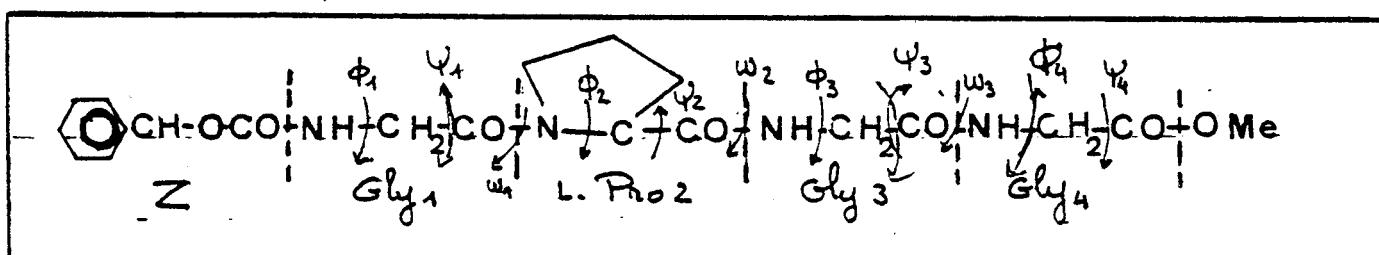
C-1) Méthodes expérimentales:

Les spectres ont été enregistrés à l'aide du spectromètre H RMN à transformée de FOURIER CAMECA à $20^{\circ} + 1^{\circ}$ en prenant comme référence interne le TMS dans CDCl_3 et DMSO-d_6 .

L'étude du tripeptide protégé Z-G1P2G3G4-OMe (Z= N- Carbobenzoxy et OMe = Méthyl-ester) a été menée conjointement avec l'étude des peptides C-deutérés ZGPGGOMe ,ZGPGGOMe , et ZGPGGOMe , ceci afin de lever les ambiguïtés sur les attributions des groupes Gly3 et Gly4 . La synthèse peptidique de ces dérivés a été déjà été décrite (1).

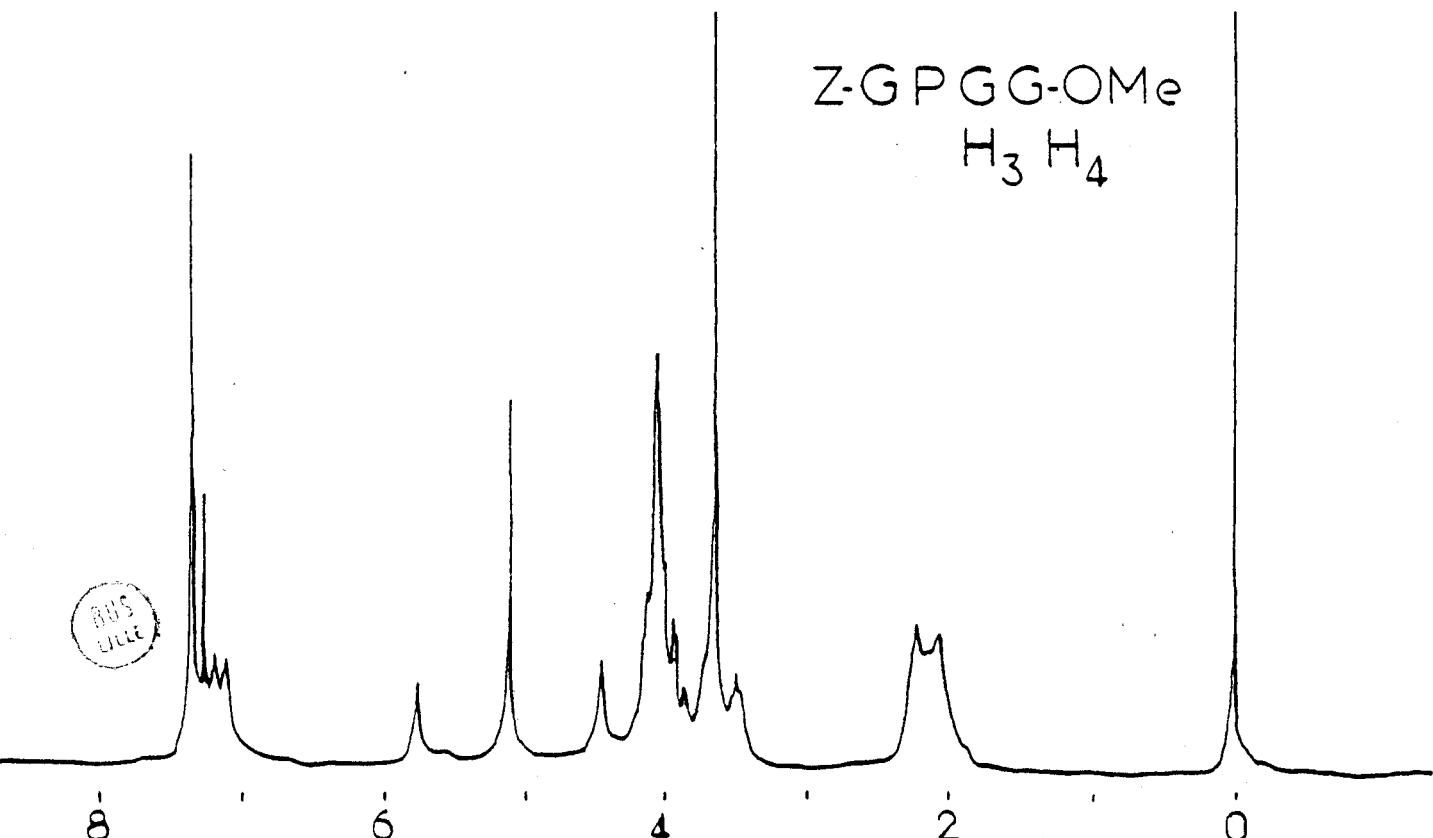
C-2) Identification des groupes Gly3 et Gly4:

Le térapeptide NCBz-GPGG-OMe est caractérisé par les angles diédraux Ψ et Φ , ω de chacun des résidus aminoacides.



La figure 2 donne l'allure du spectre de ZGPGGOMe dans CDCl_3 (4mg/ml à 23°) et l'attribution des différentes bandes. (CDCl_3 est un solvant non polaire où les protons NH ne sont pas solvatés).

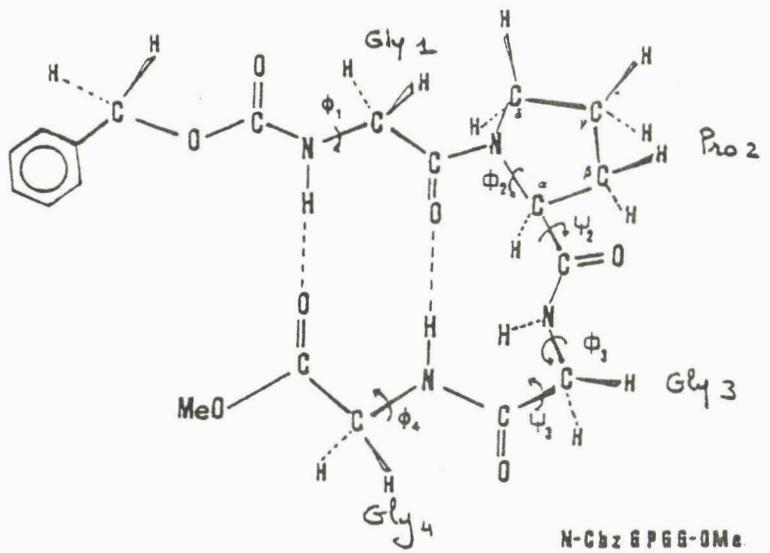
TMS



T°C	$\delta_{\text{NH G3 (Hz)}}$	$\delta_{\text{NH G4 (Hz)}}$	$\delta_{\text{NH G1 (Hz)}}$
23	2088	2025	
34	2076	2015	1817
44	2065	2007	1802
54	2050	1996	1784
64	2038	1986	1770
74	2025	1975	1750
pente (ppm/°C)	-5 10	-3.9 10	-6.6 10

Dépendance des déplacements chimiques des protons N-H de NCBz-GPGG-OMe dans le DMSO-d6. Concentration 13 mg/ml. (250 MHz ^1H NMR). Référence interne: TMS . Les pentes ont été calculées par la méthode des moindres carrés.

Table C1



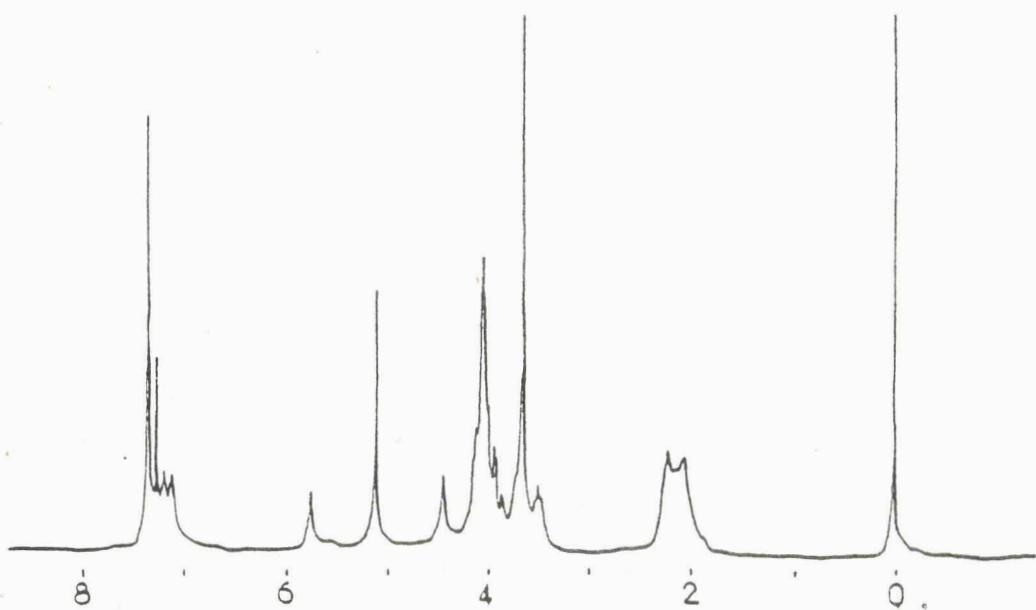
N-Cbz-GPGG-OMe.

(B_2 TURN)

Z-GPGG-OMe
H₃ H₄

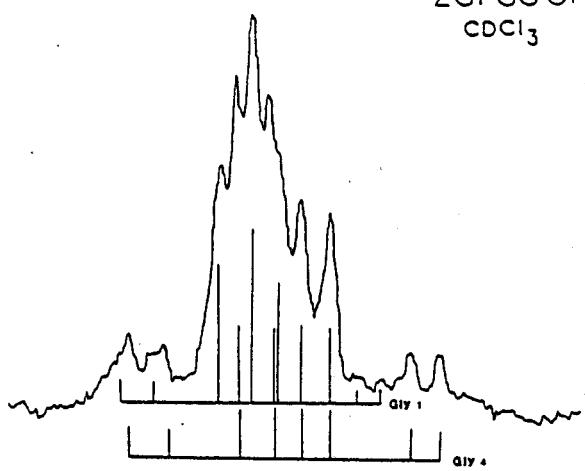
TMS

BUS
LILLE



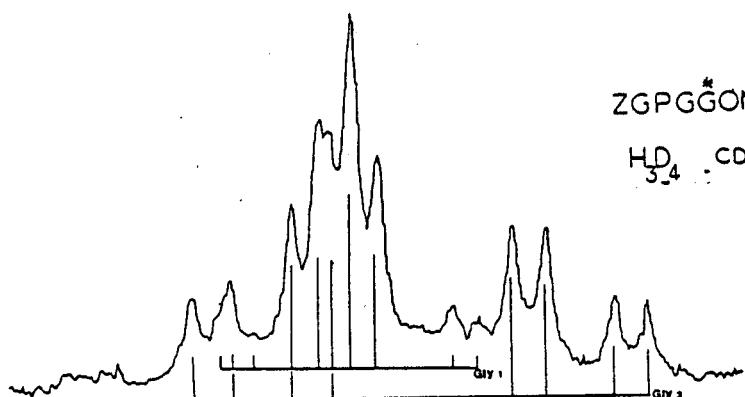
D_3H_4

Z.GPGGOMe
 $CDCl_3$



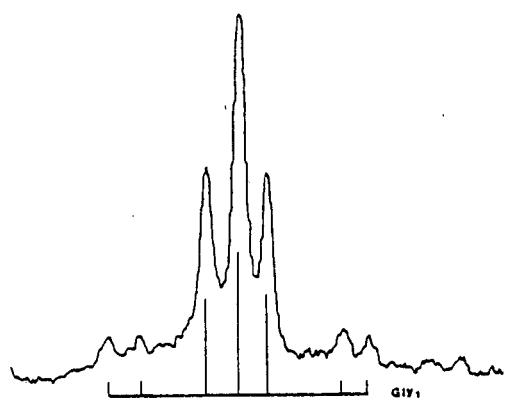
Z.GPGGOMe

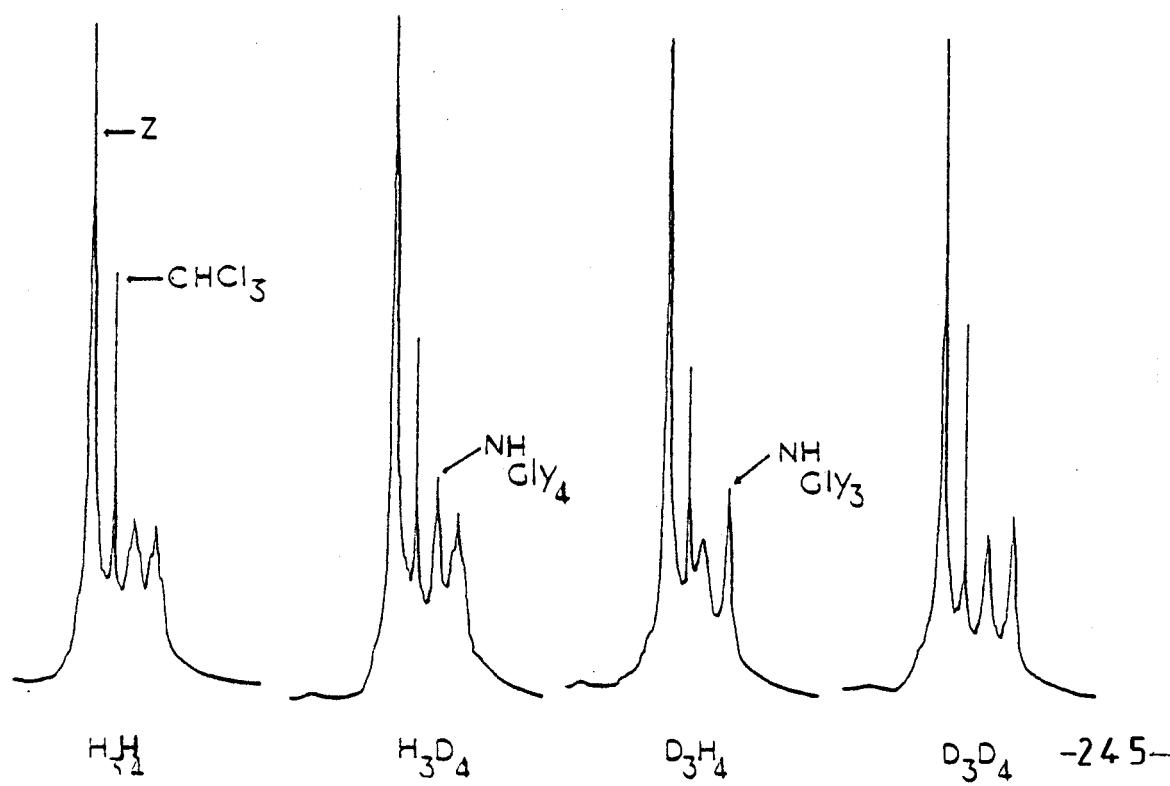
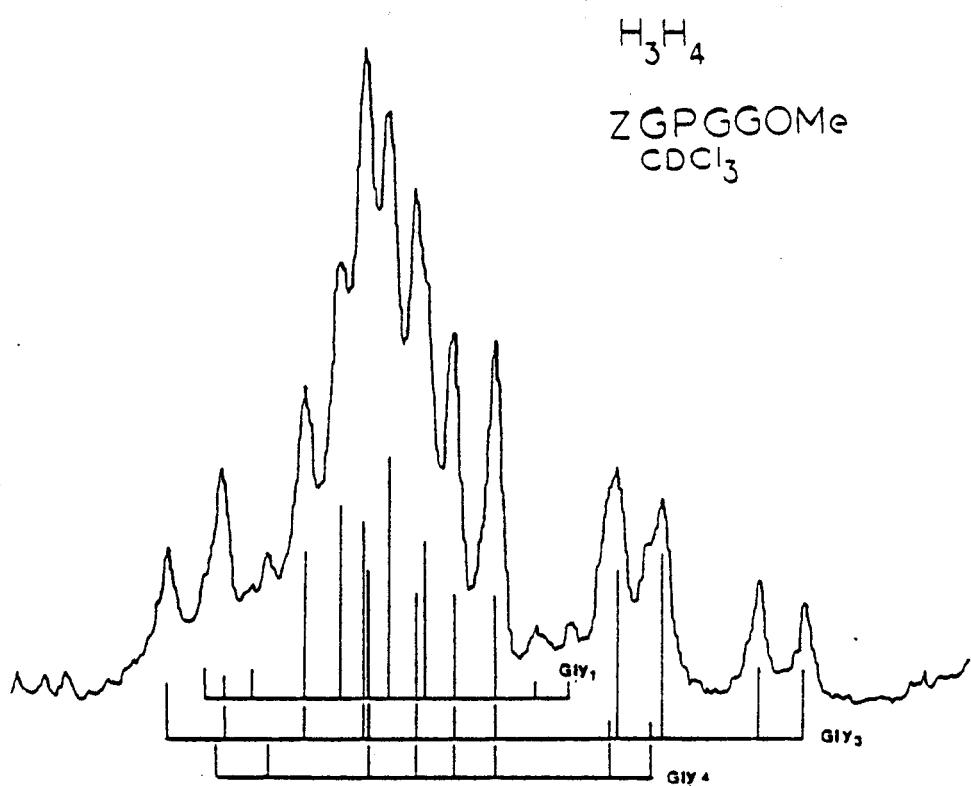
$HD_{3,4}$ $CDCl_3$



Z.GPGGOMe

D_3D_4 ($CDCl_3$)





*Le proton amide voisin du groupe uréthane (NH Gly1) résonne à champ plus fort que les autres protons amide.

*Les signaux de résonance des protons amide des groupes Gly3 et Gly4 ont été attribués sans équivoque à l'aide des dérivés C-d2 deutérés ZPGGGOMe (D3H4), ZPGGGOMe(H3D4) et ZPGGGOMe (D3D4). (Fig3)

Le proton amide adjacent au carbone deutéré apparaissant alors sous la forme d'un singulette au lieu d'un multiplet lorsque le carbone n'est pas substitué.

La table C-1 résume les différents déplacements chimiques.

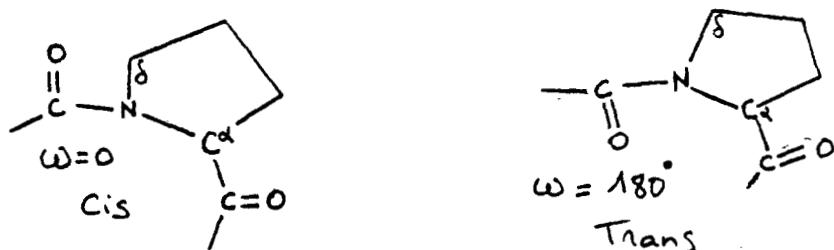
La mesure des constantes de couplage $J_{\text{NH}-\text{CH}}$ n'a pas été possible à partir des résonances NH, ceci étant du à l'élargissement des raies provenant de la relaxation quadripolaire de N.

*La résolution de la région CH (3,8 à 4,2 ppm) a été effectuée à l'aide des dérivés C deutérés et des découpages sélectifs homonucléaires. (Fig 4,5,6,7)

*Les valeurs $J^3_{\text{NH}-\text{CH}}$ ont été obtenues après simulation des spectres par le programme ITRCAL (table C-1).

C-3) Etude de l'isomérie Cis-Trans de ZPGGGOMe dans CDCl₃:

L'analyse des spectres de résonance H ne laisse apparaître **aucune isomérie Cis-Trans autour de la liaison Gly-Pro**



Seul l'isomère Trans (qui correspond alors à une conformation stable) est présent en solution dans CDCl₃.

C-4) Dépendance des déplacements chimiques NH en fonction de la concentration:

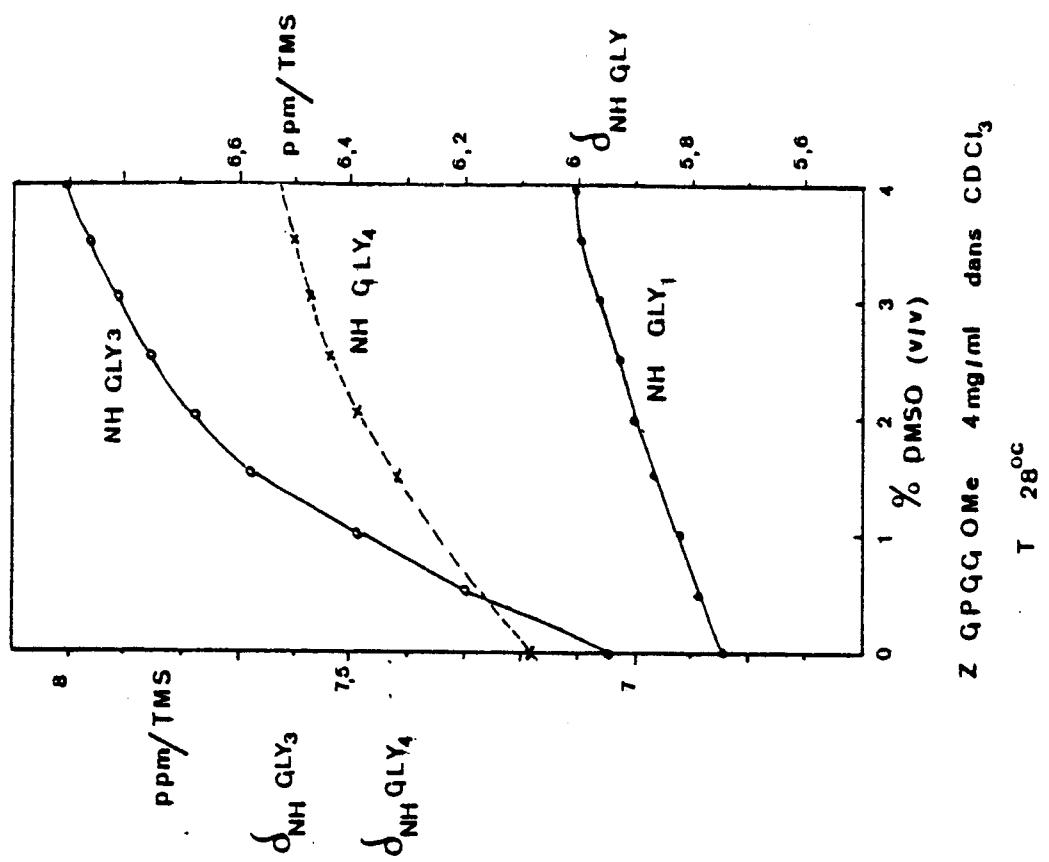
Lors de l'augmentation de la concentration, des interactions intermoléculaires s'établissent (liaison Hydrogène carbonyl C=O--HN amide). La densité électronique diminue au niveau du proton amide (déblindage) et on aura un glissement des signaux de résonance NH vers les champs faibles. A l'inverse, les protons NH engagés dans une liaison intramoléculaire ou protégés du solvant ne sont que peu affectés par les effets de concentration.

Un tel effet a été étudié principalement sur le signal singulette du proton NH(Gly3) du tétrapeptide spécifiquement deutéré ZPGGGOMe (D3H4).

La figure C4 schématisse la variation des protons amide de D3H4 dans CDCl₃.

NH(Gly3) montre une variation importante (6,95 à 7,6 ppm) du déplacement chimique en fonction de la concentration alors que les protons amide NH(Gly1) et NH (Gly4) sont peu perturbés. Ceci suggère que **NH(Gly3) est exposé au solvant**.

FIG C5



$$\frac{\Delta \delta}{\Delta \% \text{ DMSO}}$$

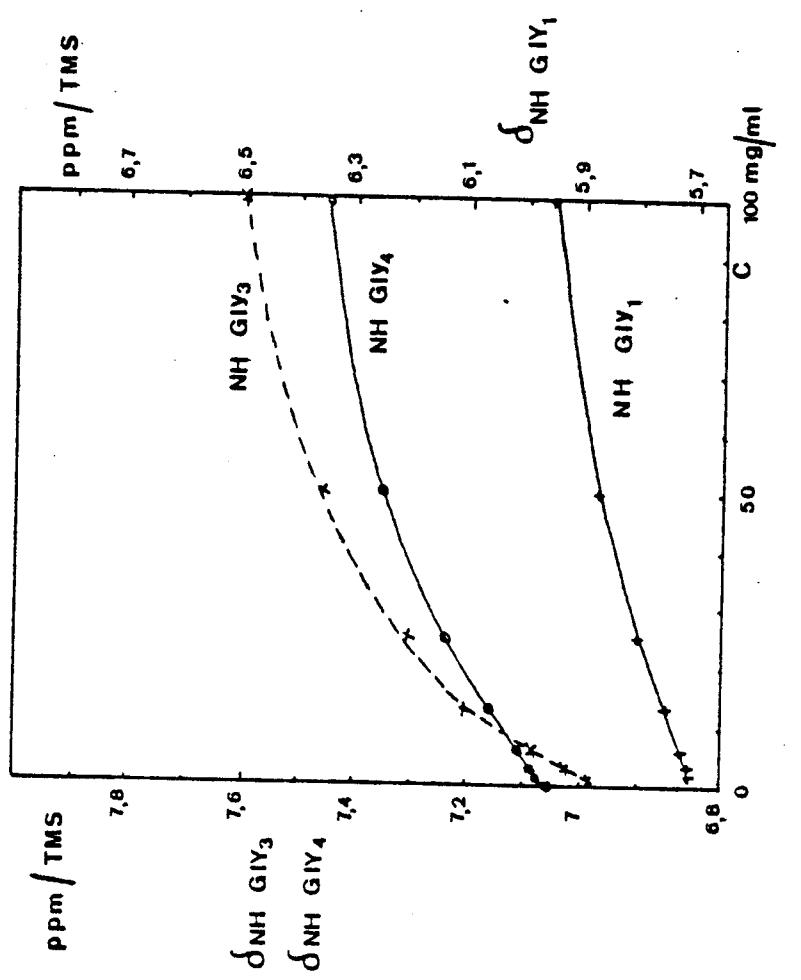
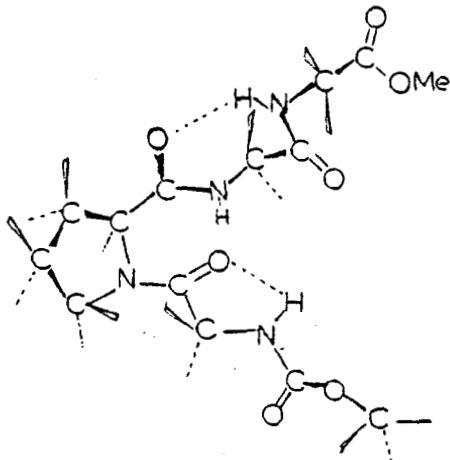


FIG C4

BUS
CILLES



TYPE COUDE V

STRUCTURE B

Cependant, une telle structure devrait posséder une "libre rotation" autour de Ψ_2 pour empêcher l'établissement d'une liaison Hydrogène entre NH(Gly3) et CO (Gly1)(cycle C7), encore que cette rotation soit perturbée par des interactions importantes entre Gly3, Gly4 et le cycle Proline.

Afin de lever l'incertitude, il convient de déterminer les angles ϕ_2, ψ_2 (Pro) et ϕ_3, ψ_3 (Gly3) à partir des constantes de couplage $J^3\text{NH}-\text{CH}_\alpha$.

C-6) Dépendance conformationnelle des constantes de couplage:

Parmi les relations de type KARPLUS⁽¹⁰⁾, la relation de CUNG et AL⁽⁷⁾ a été choisie. Cette dernière est particulièrement bien adaptée à l'étude des peptides:

$J^3\text{NH}-\text{CH}_\alpha = 4,45 \cos 2\theta - 3 \cos \theta + 4,45$
principalement pour les résidus Glycyl(fig C-5b).

L'analyse des constantes de couplage de la table C-1 permet de calculer les angles diédraux ϕ avec $\theta = |60 - \phi|$ dont les valeurs sont indiquées ci-dessous. Deux types de repliements sont caractérisés par une valeur $\phi_3 = 80^\circ$:

	ϕ_2	ψ_2	ϕ_3	ψ_3
B turn II	-60°	120°	80°	0
B TURN V	-80°	80°	80°	-80°

La valeur ϕ_3 expérimentale $\phi_3 = 75^\circ + 5^\circ$ s'accorde bien avec chacun de ces deux types de coude.

Cependant, la présence d'un résidu Prolyl en deuxième position d'un coude est fréquemment rencontrée lors de l'analyse des conformations (obtenues en RX) de protéines globulaires.

Nous choisirons pour celà la conformation en coude BII pour ZPGGGOMe.

C-7) Analyse conformationnelle de ZPGGGOMe dans le DMSO-d6:

Isomérie Cis-Trans:

Les spectres montrent l'existence d'une isomérie Cis-Trans autour de la liaison X-Pro dans le DMSO. Environ 80% du tétrapeptide adopte une conformation Trans autour de Gly1-Pro2.

C-5) Effets de solvant:

CDCl_3 solvate faiblement les protons amide alors que le DMSO les solvate très facilement. L'addition de faibles quantités de DMSO entraîne un déblindage des protons amide accessibles au solvant alors que les protons amide protégés subiront très faiblement cet effet.

La figure C-5 schématise l'effet de solvant (addition de DMSO-d_6) sur les NH de ZGPGGOMe (D_3H_4) dans CDCl_3 ($4\text{mg/ml } 28^\circ$). On voit que NH(Gly3) est très sensible à l'effet de solvant alors que NH(Gly1) et NH(Gly4) sont protégés du solvant.

Ceci implique que NH(GLY3) n'est pas impliqué dans une liaison Hydrogène intra ou intermoléculaire.

Cela élimine la possibilité pour le tétrapeptide d'adopter une structure en coude γ (Fig C-5a) caractérisée par une liaison Hydrogène entre CO(Gly1) et NH(Gly3).

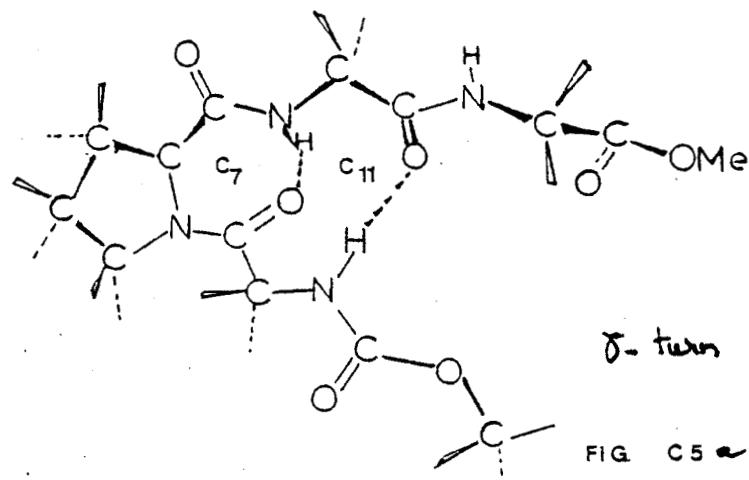
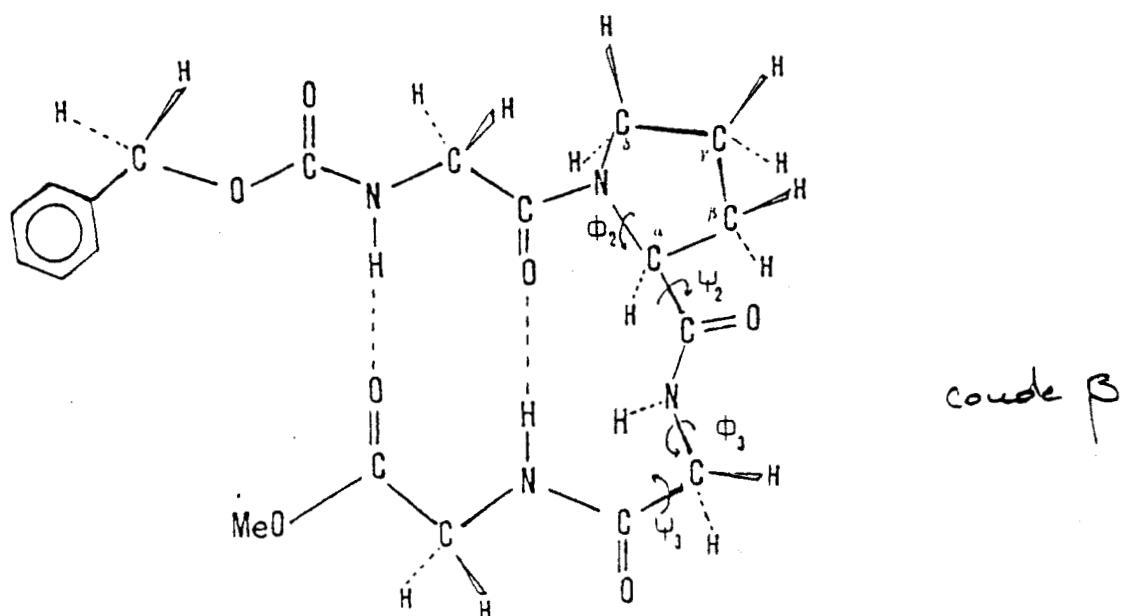


FIG. C5

Comme NH(Gly4) est protégé du solvant ainsi que NH(Gly1) on en déduit la structure possible suivante en coude β pour NCBz-GPGG-OMe dans CDCl_3 :



Une autre structure serait à priori possible également:

Dépendance des déplacements chimiques NH en fonction de la température:

L'effet de température sur les protons amide provient du déplacement de l'équilibre entre formes NH(solvaté)--NH(libre) + solvant. En augmentant la température, le complexe HSolvant se dissocie et on observe une augmentation du blindage du proton NH (déplacement de δ vers les champs forts).

Si le proton amide est peu accessible au solvant (liaison H ou inclus dans un "cluster"), l'effet de température est faible.

La table C-7 donne les valeurs des déplacements chimiques (en Hz) des trois protons amide de ZPGGGOMe dans le DMSO-d6 (13 mg/ml) et les pentes relatives à ces déplacements en fonction de la température (ref:TMS).

Les travaux de URRY et LONG (11) ont montré que les pentes d/T correspondant à des protons relativement inaccessibles au solvant variaient dans le domaine 0 à -3,4 10 ppm/°C. Dans le cas présent, tous les protons amide apparaissent exposés au solvant.

Ceci entraîne que **ZPGGGOMe n'adopte pas de conformation organisée dans le diméthylsulfoxyde (DMSO)**.

D) CONFIRMATION DE LA STRUCTURE EN COUDE B II DE ZPGGGOMe DANS CDCl₃:

D-1) Coefficient de température:

La table D-1 donne les déplacements chimiques (en Hz) (RMN H 250 MHz) des protons amide de ZPGGGOMe dans CHCl₃ (4mg/ml) et leurs pentes respectives:

Table D-1

T °C	δ NH(Gly3)	δ NH(Gly4)	δ NH(Gly1)
26	7,1	7,1	5,77
37	7,08	7,02	5,74
42	7,07	6,98	5,73
48	7,06	6,95	5,71
58	7,04	6,91	5,69
Δd/ΔT (ppm /°C)	-1,75 10 ⁻³	-5,2 10 ⁻³	-2,6 10 ⁻³

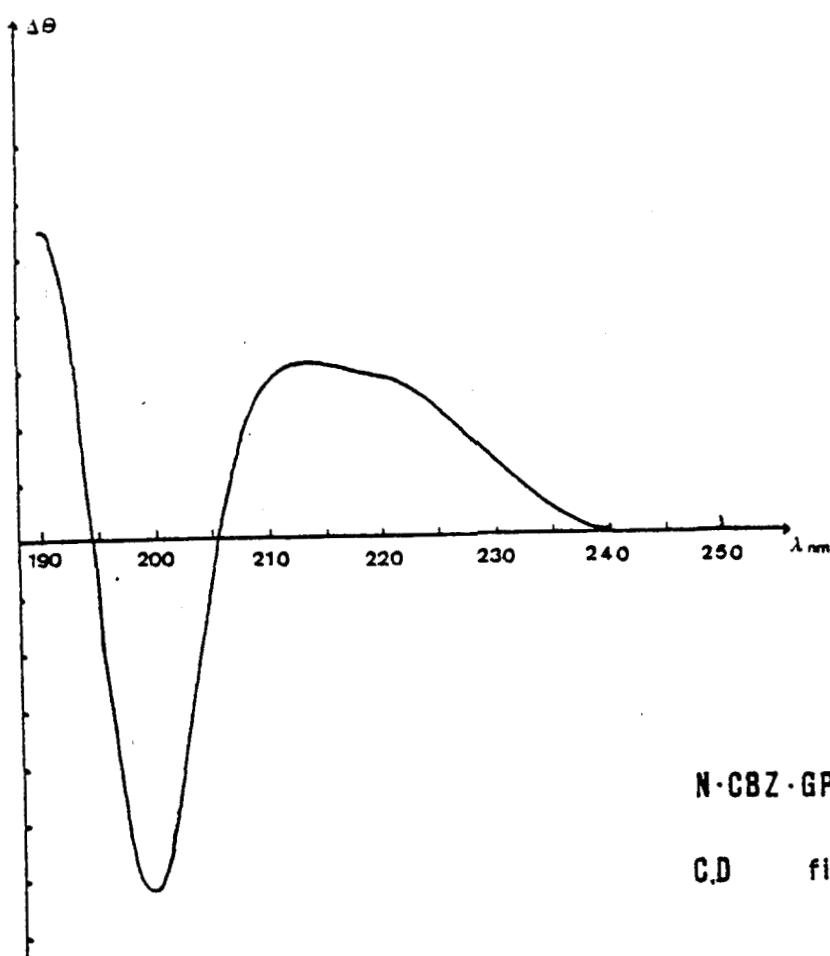
Si l'on considère un coefficient Δd/ΔT < 2 10⁻³ ppm /°C pour un proton amide et 0 < Δd/ΔT < -2 10⁻³ pour un proton solvaté, on confirme les résultats antérieurs, à savoir NH(Gly1) et NH(Gly4) engagés dans une liaison H et NH(Gly3) libre ou solvaté faiblement par CDCl₃.

D-2) Etudes en dichroïsme circulaire:

Le spectre dichroïque de NCBzGPGGOMe a été enregistré après obtention d'un film obtenu par évaporation du solvant chloroforme (Fig D-2).

Ce spectre dichroïque est tout à fait caractéristique d'une

structure en coude B.



N-Cbz-GPGG-OMe

C.D film (CHCl_3)

La comparaison de ce spectre avec ceux, théoriques, de R.WOODY (fig D-2a et Fig chI) ou ceux, expérimentaux de BRAHMS et BRAHMS (11)(Fig D-2b), obtenus à partir des spectres de protéines et peptides, montre l'analogie évidente (bandes <0 vers 197 nm et >0 vers 210-220 nm). On remarquera néanmoins la différence entre l'allure des courbes vers 210-220 nm.

A la lumière de ce résultat expérimental, l'hypothèse de la structure B (type B turn V) pour ne conserver que l'hypothèse de la structure du B TURN II pour ZGPGGOME avec deux liaisons Hydrogènes NH(uréthane)---CO(CO Me) et NH(Gly1)---CO(Gly4).

BUS
LILLE

CONCLUSION GENERALE

Il est intéressant de constater que dans le DMSO-d₆ le peptide ZGPGGOMe est déstabilisé alors que GPGG(zwitterion) conserve une structure en coude BII , ceci étant du principalement aux effets des interactions électrostatiques entre extrémités NH₃⁺ et CO₂- terminales qui permettent au peptide GPGG de conserver sa structure coudée et l'établissement d'une liaison Hydrogène CO(Gly₁)---NH(Gly₃) .

TOMA et AL (2) ont signalé une structure en coude BI pour NH₃⁺ GPLG CO₂- et ceci confirme l'hypothèse de **M.BATAILLE** (12) à savoir qu'un résidu Glycyl après un résidu Pro en position i+1 favorise l'établissement d'un β TURN de type β II alors qu'un autre résidu (Tyr, Ala) ou Leu(2) favorise l'établissement d'un coude de type β I.

Très récemment d'autres auteurs sont arrivés aux mêmes conclusions, telles les études faites par **BRAHMACHARI** et AL(13) sur des tripeptides contenant la séquence Pro-Gly .

Cependant d'autres études semblent montrer que cette règle n'est pas générale comme dans le cas de la conformation en coude B II du peptide Pivaloyl-L-Prolyl- -Aminoisobutyryl -N- Methylamide (Aib=N-CMe₂-Co):**B.V.VEEKATARAM PRASAD** et AL(14) .

References de l'annexe technique III

- 1) B. PERLY, N. HELRECCUE, A. PORCHIONI, J.H LOICHEUX-L'EPERVIER
Biopolymers in Press
- 2) F. TOME, H. LAM-THANG, E. PIRIOU, M.C. HEINDL, V. LINTNER, S.
FERMANDJIAN Biopolymers (1980) 19 781-804
- 3) Y.K LAI, P.P.S SALHJA, P. KERARLE J.Am.Chem.Soc.(1980) 102 7429-7433
- 4) I.Z SIEGMON, T. WIELAND, K.H POOK Ang.Chem (1975) 14 702-703
Org.Mag.Res(1976) 8 432-435
- 5) M. KAINOSHIO, K. AJISAKA, M. KAMISAKA, A. MURAI BBRC (1975) 64 425-432
- 6) G. BOUSSARD, M. MARRAUD, A. AURRY Biopolymers (1979) 18 1297-1331
- 7) M.T CUNG, M. MARRAUD, J. NEEL Macromolecules (1974) 7 603-613
- 8) M. BARFIELD, V.J HRUDY, J.P HERALDI J.Am.Chem.Soc. (1976) 98 1308-
1313
- 9) R. MAYER, G. LANCELOT (1981) J.Am.Chem.Soc. 103 4738-4742
- 10) KARPLUS

- 11) S. BRAHMS, J. BRAHMS J.Mol.Biol (1980) 138 149-178
- 12) M. BATAILLE Th^ese d'Etat es Sciences Physiques LILLE fev.1981
- 13) S.K BRAHMACHARI, R.S BHATNAGAR BBRC (1979) 96 (3) 605-612 ,
- 14) B.V VENKATARAM, PRASAD.

ANNEXE TECHNIQUE 4

Projection cartésienne des nôdes

Le mouvement du $i^{\text{ème}}$ atome pendant la vibration normale est représenté par les équations suivantes pour chacune des composantes cartésiennes:

$$x_i^a = x_i^0 + d(L_x)_{xi}^a \sin(2\pi c \bar{v}_a t)$$

$$y_i^a = y_i^0 + d(L_x)_{yi}^a \sin(2\pi c \bar{v}_a t)$$

$$z_i^a = z_i^0 + d(L_x)_{zi}^a \sin(2\pi c \bar{v}_a t)$$

où x_i^0, y_i^0, z_i^0 sont les coordonnées du $i^{\text{ème}}$ atome au repos

\bar{v}_a est le nombre d'onde de la vibration

$(L_x)_{xi}^a, (L_x)_{yi}^a, (L_x)_{zi}^a$ sont les éléments de la matrice L_x
et $d=6,34 \text{ vt/v}$ coefficient d'homogénéisation des grandeurs $T^{\circ}\text{K}$,
Longueurs en Å, masses en UHA

Les mouvements vibrationnels seront alors représentés à l'aide de la résolution de l'équation matricielle:

$$X = L_x^0$$

Pour définir L_x il faut que les matrices de passage:

R des coordonnées cartésiennes aux coordonnées internes:

$$R = BX$$

L des coordonnées normales aux coordonnées internes:

$$R = LQ$$

qui ne sont pas des matrices carrées, puissent avoir une transformation inverse. Ceci nécessite l'introduction d'une matrice A telle que:

$$R = BX$$

$$X = AR \quad \text{et} \quad BA = E(\text{matrice identité})$$

or on sait que $B\tilde{I}\tilde{I}^{-1}B = G$ et $BA = E$

$$B\tilde{I}\tilde{I}^{-1}BG^{-1} \underset{\sim}{=} E = BA$$

$$A = \tilde{I}\tilde{I}^{-1}\tilde{G}G^{-1}$$

d'où

$$R = LQ$$

$$X = L_x Q = ALQ = (\tilde{I}\tilde{I}^{-1}\tilde{G}G^{-1}L)Q$$

et

$$L_x = \tilde{I}\tilde{I}^{-1}\tilde{G}G^{-1}L = \tilde{I}\tilde{I}^{-1}\tilde{G}FLA^{-1}$$



Résumé

Les spectrométries vibrationnelles de diffusion Raman et d'absorption Infrarouge ont été utilisées pour mettre en évidence la présence de conformations repliées (coudes ou turns) dans des peptides modèles. Les principales vibrations étudiées font intervenir les mouvements des groupes amide qui sont dépendants de la conformation dans laquelle le peptide est engagé.

Un traitement des coordonnées normales a été effectué à partir des données expérimentales en utilisant un champ de force de type UREY-BRADLEY modifié. En utilisant le concept de symétrie locale, les paramètres (constantes de force) obtenus ont été utilisés pour la prédiction des fréquences vibrationnelles des groupes amide engagés dans des conformations proches du premier modèle peptidique.

Une comparaison entre fréquences prédictives et fréquences expérimentales obtenues à partir des travaux d'autres auteurs a été effectuée. La propriété de transférabilité a été poussée à l'étude de conformations s'éloignant du modèle primitif et appliquée à la détermination de la conformation d'une hormone peptidique: l'Angiotensine II humaine.

Mots clés: Peptides. Conformations. Spectroscopie de vibration. Calculs de fréquences.

