

N° d'ordre : 637

50376
1990
335

50376
1990
335

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE Flandres-Artois

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Organique et Macromoléculaire

par

Jean-François GALEY



**SYNTHESE DE PEPTIDES MODELES COMPORTANT DEUX OU TROIS
RESIDUS D'ACIDE ASPARTIQUE.
ETUDE DE LEUR COMPLEXATION AVEC DES CATIONS METALLIQUES**

Soutenue le 18 décembre 1990 devant la Commission d'Examen

Membres du Jury :

Président

A. LABLACHE-COMBIER

Rapporteurs

J.P. HENICHART

H. KOZLOWSKI

Examineurs

C. LOUCHEUX

L.D. PETTIT



02 11 90

A mes Parents,

En hommage affectueux et reconnaissant
pour leurs sacrifices et leur confiance.

A Pascale,

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

A tous ceux qui me sont chers.

A la mémoire de Brigitte Decock

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Macromoléculaire de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois où Monsieur le Professeur Claude LOUCHEUX, Directeur du Laboratoire, a bien voulu m'accueillir. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

Monsieur A. LABLACHE-COMBIER, Professeur à L'Université des Sciences et Techniques de Lille, m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il veuille bien accepter mes remerciements respectueux.

Monsieur H. KOZLOWSKI, Professeur à l'Université de Wroclaw (Pologne) a bien voulu m'accueillir dans son Laboratoire à plusieurs reprises, a porté un grand intérêt à ce travail et m'a fait l'honneur de bien vouloir le juger. Qu'il veuille accepter mes remerciements respectueux.

Monsieur J.P. HENICHART Directeur de Recherche à l'I.N.S.E.R.M. (Lille) a bien voulu être rapporteur et participer au jury. Je lui exprime ma profonde gratitude pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Monsieur L.D. PETTIT, Professeur à l'Université de LEEDS (Grande-Bretagne) a bien voulu m'accueillir dans son Laboratoire. L'intérêt et la persévérance qu'il a manifesté ont contribué à l'élaboration et la réalisation de ce mémoire. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

Je remercie également les camarades de laboratoire qui m'ont apporté leur soutien et plus particulièrement S. DJEMIL et K. CHERIFI.

Enfin je remercie Madame A.M. CAZE pour la réalisation soignée des schémas, Mesdames L. SAINLEGER et N. MOLLET pour l'impression de ce mémoire.

Base et sommet, pour peu que les hommes remuent et divergent,
rapidement s'effritent. Mais il y a la tension de la recherche, la répugnance
du sablier, l'itinéraire nonpareil, jusqu'à la folle faveur, une exigence de la
conscience enfin à laquelle nous ne pouvons nous soustraire, avant de
tomber au gouffre.

René CHAR.

Extrait de "Recherche de la base et du sommet"

**SYNTHESE DE PEPTIDES MODELES COMPORTANT
DEUX OU TROIS RESIDUS D'ACIDE ASPARTIQUE.
ETUDE DE LEUR COMPLEXATION AVEC DES
CATIONS METALLIQUES.**

Table des matières

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
Méthodes expérimentales	
I Principes généraux de la synthèse peptidique	17
1 La réaction de couplage	19
2 Protection de l'extrémité C-terminale et de la chaîne latérale	20
3 Protection de la fonction amine terminale	22
4 Préparation du tBocAsp-O-cyclohexyl	23
II Les différents types de synthèses	24
1 La phase liquide	24
2 La phase gel	25
3 Synthèse de Asp-Asp-Asp en phase liquide	27
4 Synthèse de tétrapeptides en phase gel	30
5 Synthèse du fibrinopeptide A en phase gel	37
III Spectroscopie et potentiométrie	42
1 Spectroscopie d'absorption, dichroïsme circulaire, R.M.N. et R.P.E.	42
2 Potentiométrie	43
Bibliographie Chapitre I	47

CHAPITRE II

Complexation avec le Cu(II)

1 Etude bibliographique	48
2 Etude de la complexation du Fibrinopeptide A avec le Cuivre(II)	56
3 Etude de la complexation avec le Cu(II) de tétrapeptides comprenant deux motifs d'acide aspartique	64
3.1 Asp-Ala-Ala-Asp / Cu(II)	64
3.2 Ala-Asp-Ala-Asp / Cu(II)	71

3.3 Ala-Asp-Asp-Ala / Cu(II)	79
3.4 Ala-Ala-Asp-Asp / Cu(II)	87
4 Etude de complexation de Asp-Asp-Asp avec le Cuivre(II)	95
5 Conclusion	104
Bibliographie Chapitre II	105

CHAPITRE III

Complexation avec le Zinc(II)

1 Introduction	108
2 Etude de la complexation de peptides à motifs aspartiques avec le zinc(II)	109
2.1 Asp-Ala-Ala-Asp / Zn(II)	109
2.2 Asp-Asp-Asp / Zn(II)	111
2.3 Ala-Ala-Asp-Asp, Ala-Asp-Ala-Asp, Ala-Asp-Asp-Ala / Zn(II)	111
3 Conclusion	113
Bibliographie Chapitre III	127

ANNEXE THEORIQUE

1 Spectroscopie U.V.-Visible	128
2 Dichroïsme circulaire	129
3 Etude par résonance magnétique nucléaire	132
4 Etude par résonance paramagnétique électronique	134
Bibliographie Annexe Théorique	140

CONCLUSION	141
------------	-----

1. INTRODUCTION

Les acides aminés et les oligopeptides sont des ligands efficaces et parfois très spécifiques de la plupart des ions métalliques, que ces derniers soient indispensables au bon fonctionnement des processus vitaux ou au contraire toxiques.

Les interactions de ces ions métalliques avec des peptides naturels ou bien leurs analogues constituent un important sujet de recherche. En effet, lorsque des ions métalliques interagissent avec des peptides, il y a bien souvent une modification de l'activité biologique et de la structure peptidique. Parfois la présence du métal peut faciliter l'interaction du peptide avec des structures de type récepteur, soit par modification de structure ou encore en jouant un rôle activateur dans l'interaction ligand-récepteur.

Dans les séquences peptidiques, quelques acides aminés particuliers interagissent spécifiquement avec certains ions métalliques (1-6,13).

Par exemple, dans les protéines et les oligopeptides, des acides aminés à chaîne latérale tels que la cystéine ou l'histidine se révèlent être des sites de complexation très importants vis à vis des ions métalliques.

Il peut y avoir compétition en ce qui concerne la complexation, entre les chaînes latérales des acides aminés et le reste de la chaîne peptidique, à savoir la fonction amine terminale, carboxylique terminale et la fonction amide de la liaison peptidique. La tyrosine, par exemple, qui est présente dans de nombreux peptides tels que les enképhalines, du fait du caractère donneur de l'hydroxyle de sa chaîne latérale, chélate très spécifiquement le cuivre (II) (7-10). D'autre part, la fonction carboxylique de la chaîne latérale de l'acide aspartique a une influence considérable sur la complexation avec des cations métalliques, de peptides naturels tels que le fibrinopeptide A (11) et l'angiotensine II (12).

Les études chimiques et biochimiques de l'influence des ions métalliques sur la bioréactivité des peptides, montrent que dans les systèmes naturels les métaux jouent un rôle essentiel sur l'activité des peptides (14, 15).

2. AMINOACIDES SANS CHAÎNE LATÉRALE.

Les peptides contenant des aminoacides sans chaîne latérale possèdent trois types de centres donneurs capables de chélater les ions métalliques. Il s'agit de la fonction amine terminale, carboxylique terminale et enfin de la liaison amide encore appelée liaison peptidique. Les ions métalliques tels que le cuivre sont capables de déprotoner la liaison amide et de se complexer avec l'azote de celle-ci.

La complexation du cuivre (II) commence avant pH 5 par l'amine N terminale et l'oxygène du carbonyle de la liaison peptidique; on est alors en présence de l'espèce 1N. Cette liaison Cu-Oxygène est relativement faible et le complexe formé est peu stable. Au dessus de pH 5, le cuivre (II) induit la déprotonation de la liaison amide pour aboutir à la formation d'une liaison forte Cu-N, et par la suite d'un complexe à 5 chaînons. Les complexes suivants sont formés par liaison avec les autres atomes d'azote des liaisons peptidiques (6,13) pour aboutir finalement au type de complexes formés par tétragly où les trois azotes des liaisons amides et l'azote de la fonction NH₂ terminale sont impliqués pour former un complexe 4N. Avec des peptides plus petits type digly ou trigly la fonction carboxylique C terminale peut aussi être impliquée dans le complexe formé (figure 1).

3. PEPTIDES CONTENANT UN RESIDU DE PROLINE.

La proline ne contient pas de groupement NH, mais l'amine secondaire =NH. Quand un résidu de proline est inséré dans une séquence peptidique, il n'y a pas d'hydrogène déprotonable si bien que l'azote de la fonction amide ne peut se lier à un ion métallique. Lorsqu'il y a une proline présente en deuxième ou troisième position dans un oligopeptide, celle-ci constitue ce que l'on appelle un " point de rupture " (break point). Elle divise le ligand en deux fragments capables de se lier au métal de façon indépendante (7-10, 14,16-18). D'autre part la proline influence la conformation de la chaîne peptidique, particulièrement quand elle occupe la seconde position dans le ligand (20, 21). Ces structures sont connues pour être particulièrement importantes dans la conformation biologiquement active des peptides. De plus le résidu de proline conduit à un rapprochement des deux extrémités (C terminale et N terminale) du peptide de façon à former des complexes avec le cuivre (II). Des études récentes sur les complexes formés par le Cu(II) et des tétrapeptides ou des octapeptides contenant un résidu de proline montrent cette possibilité.

Si l'on considère par exemple le peptide Gly-Pro-Gly-Gly, il a été montré que lorsque le pH croît, la complexation se fait suivant le modèle représenté figure 2. L'ionisation de la première liaison amide qui se fait avec tétragly autour de pH 5,4 n'apparaît avec Gly-Pro-(Gly)₂ qu'à pH 7,4, ceci provenant de l'impossibilité de former un complexe stable impliquant peu de chaînons dans le chélate (l'espèce b, figure 2 est l'espèce dominante à pH 8) (18). La proline est très souvent retrouvée en deuxième ou troisième position dans les peptides biologiquement actifs tels que la substance P, la casomorphine et le TRH (22). D'autre part le cuivre est un métal essentiel et présent dans tout le corps humain, plus spécialement au niveau de la vésicule biliaire et dans certaines zones du cerveau. Le cuivre est généralement présent dans l'organisme sous forme de complexes avec des acides aminés ou des peptides. Le métal peut avoir une influence considérable sur la bioactivité de peptides tels que les neurohormones, les neurotransmetteurs ou sur d'autres peptides naturels comme ceux possédant dans leur séquence des "points de rupture" (15).

4. PEPTIDES INCLUANT DANS LEUR SEQUENCE DES ACIDES AMINES A CHAINE LATÉRALE.

4.1. PEPTIDES A MOTIF HISTIDINE.

Un des acides aminés importants, l'histidine voit son noyau imidazole se comporter comme une chaîne latérale. L'histidine est un résidu présent dans de nombreux petits peptides naturels ayant des propriétés chélatantes importantes.

Le tripeptide Gly-His-Lys, par exemple, qui a été identifié dans le plasma sanguin humain est un facteur de croissance dont l'activité *in vivo* est dépendante de la présence d'ions Cu(II) (23).

L'histidine a été identifiée aussi dans un dipeptide naturel, la carnosine de séquence β Ala-His dont le rôle exact n'est pas connu mais dont les propriétés chélatantes sont très particulières (13,24). Deux hormones biologiquement très importantes, le TRF (Thyrotropin Releasing Factor) de séquence LpyroGlu-LHis-LProlinamide et LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Glyamide, possèdent une séquence N terminale similaire en ce qui concerne les deux premiers résidus, qui se trouve être l'unité critique pour les propriétés chélatantes (25-27).

Les études potentiométriques et spectroscopiques des interactions du Cu(II) et du Ni(II) avec le TRF et quelques uns de ces analogues à 2 ou 3 acides aminés montrent le rôle essentiel joué par l'histidine dans la complexation. Le TRF et le dipeptide pGlu-His se comportent de la même façon vis à vis des ions métalliques. A bas pH, les métaux forment un complexe avec l'azote de l'imidazole et permettent la déprotonation des fonctions amides de la liaison peptidique et de l'acide pyroglutamique avec la même facilité. Il en résulte la formation d'un complexe à 3 azotes aussi bien avec le Cu(II) qu'avec le Ni(II).

Ici le résidu proline en position C terminale n'a pas de rôle significatif en ce qui concerne la formation des complexes.

D'autre part lorsqu'on remplace l'acide pyroglutamique par l'acide picolinique, dans la séquence peptidique, la géométrie des complexes devient totalement différente : le dipeptide Pic-His forme avec le Cu(II) des complexes de type dimères, ce qui n'est pas observé avec le dipeptide original. A pH physiologique, le TRF forme avec le Cu(II) une espèce à 3 azotes alors qu'avec le nickel il y a formation d'un complexe à 1 azote par l'intermédiaire de l'azote de l'imidazole. Le complexe plan carré à 3 azotes n'est formé avec le nickel qu'à partir de pH 8,5 (26).

Ces différents modes de complexation sont responsables du comportement différent des deux types de complexes lors d'essais biologiques réalisés sur de jeunes poulets (28). Il a été montré, *in vivo*, que l'activité du TRF est considérablement accrue lorsqu'on utilise des complexes de Ni(II) alors qu'avec les complexes de Cu(II), elle est encore plus faible qu'avec le TRF non complexé. Les complexes TRF-Pd(II) sont eux complètement inactifs. Dans ce dernier cas, le mode de complexation est le même que pour le Cu(II). Le cuivre et le palladium, en formant à pH physiologique, des espèces à 3 azotes, empêchent l'interaction des deux résidus N terminaux avec la molécule cible.

Dans le cas des complexes du Ni(II), il n'y a que la chaîne latérale de l'histidine impliquée dans la complexation à ce pH (7,4). le complexe octaédrique peut alors utiliser de nombreux sites pour se lier au récepteur. Les différences de comportement entre les complexes cuivriques et les complexes du palladium, bien que leur géométrie soit la même, provient du fait que la cinétique de formation des complexes avec le Pd(II) est très lente.

Il est donc clair que le type d'espèce formé, la géométrie de ces espèces ainsi que la cinétique de formation des complexes peuvent influencer considérablement les interactions de type ligand-récepteur. L'hormone LHRH "Gonadotrophin Releasing Hormone" est le médiateur principal de la neurorégulation des gonadotrophines, de la LH (Luteinizing hormone) et de la FSH (Follicule Stimulating Hormone). L'implication du Cu(II) dans la bioactivité de l'hormone semble très probable. Déjà des études dues à TSOU et Coll. avaient démontré qu'il y avait augmentation du taux de LHRH au niveau de l'hypophyse chez le lapin après administration

de sels cuivriques (29). De plus BARNEA et Coll. ont aussi montré que la présence de Cu(II) et plus particulièrement du complexe Cu-His avait un impact considérable sur la biochimie de LHRH.

Entre autre, il a été constaté que le Cu(II) stimule la libération de LHRH des granules hypothalamiques. Sur la base de ces observations (30-38), les auteurs ont proposé que :

- la forme active est le Cu(II) sous forme de complexe et non pas le cuivre libre sous forme hydratée.

- Le complexe actif est de type acide aminé-Cu, les complexes avec les peptides étant inactifs.

- Lorsque l'acide aminé impliqué dans le complexe est l'histidine, le taux de libération de LHRH est maximum (2,5 fois supérieur à celui obtenu avec Cu-Cys).

Le mécanisme exact de la stimulation de libération de LHRH n'est pas encore connu. Cependant, il semblerait que les ions métalliques, ou tout au moins, leurs complexes correspondants peuvent interagir avec LHRH en formant des complexes binaires ou ternaires.

Les études potentiométriques et spectroscopiques ont montré que LHRH est un agent chélatant très efficace des ions métalliques tels que le Cu(II) ou le Ni(II), l'histidine présente dans la séquence de cette hormone étant le lieu privilégié de la complexation (27).

La grande stabilité des complexes et leur cinétique de formation suggèrent que l'une des formes actives de LHRH in vivo, est probablement une forme complexée.

Une autre hormone importante, l'angiotensine, est un octapeptide linéaire (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) présentant une grande diversité d'actions biologiques. Il a été montré que grand nombre d'activités biologiques de l'angiotensine sont accrues en présence de certains cations métalliques comme Li(II), Na(I), Ca(II), Mg(II) et Mn(II) (39-42).

Des études antérieures prétendaient que la complexation de l'angiotensine avec des ions métalliques induisait des changements de conformation de l'octapeptide rendant celui-ci biologiquement actif. En fait une étude plus récente (43) montre qu'il n'en est rien et que la complexation du peptide avec des cations métalliques n'affecte pas de façon significative la conformation de la molécule.

L'angiotensine présente dans sa structure deux centres donneurs potentiels pouvant initier la complexation : la fonction amine terminale et l'azote de l'imidazole de l'histidine.

Avec Mn(II), La complexation se fait au niveau de la chaîne latérale de l'histidine (44).

De la même façon, avec le cuivre, la complexation débute au niveau de l'atome d'azote de l'histidine (12). Entre pH 6 et 8, il y a formation d'une espèce CuL à trois azotes .

Lorsque le pH atteint 8, il y a changement dans le mode de complexation et l'on retrouve une coordination initiée par la fonction amine terminale et faisant intervenir les liaisons amides comme dans les peptides simples de type tétragly (figure 3).

4.2. PEPTIDES A MOTIF CYSTEINE.

La fonction SH de la cystéine constitue dans une séquence peptidique un autre centre donneur potentiel, intervenant dans la complexation avec les métaux de transition. Parmi les peptides à motif cystéine, le glutathion se révèle être particulièrement intéressant tant sur le plan chimique que biochimique. Ce peptide a été identifié dans de nombreuses cellules et a une importance drastique dans de nombreux processus biologiques. De nombreux rôles ont été attribués au glutathion y compris une capacité de détoxification. Des motifs de type GSH ont été identifiés dans les phytochélatines et les cadystines (45-46). Ces oligopeptides capables de complexer les métaux lourds contiennent deux ou trois résidus de cystéine qui sont les sites de chélation des ions métalliques. Des études récentes montrent que le Ni(II) (47) est très fortement chélaté par des ligands contenant des motifs cystéines (figure 4). Ceci est d'autant plus

intéressant que le Ni(II) se révèle être un métal à la fois très toxique et présent dans l'environnement.

Les ponts disulfures (6,48) peuvent eux aussi jouer un rôle important dans la complexation des ions métalliques tels que Ag(I) et Hg(II).

4.3. PEPTIDES A MOTIF TYROSINE

La tyrosine, aussi, paraît être un acide aminé intéressant très fréquemment rencontré dans les neuropeptides tels que les enképhalines. L'oxygène de la fonction phénol de la chaîne latérale de la tyrosine peut être impliqué dans la formation de complexes avec des ions métalliques tels que le Cu(II), mais pour des raisons stériques, il ne peut être engagé dans la formation d'un complexe avec un métal déjà complexé par les atomes donneurs de la tyrosine. Quand cet aminoacide est présent dans une séquence peptidique, l'oxygène de la fonction phénol de la chaîne latérale peut être impliqué de 2 façons différentes, soit par la formation de dimères ou enfin par la formation de larges chélates (7-10).

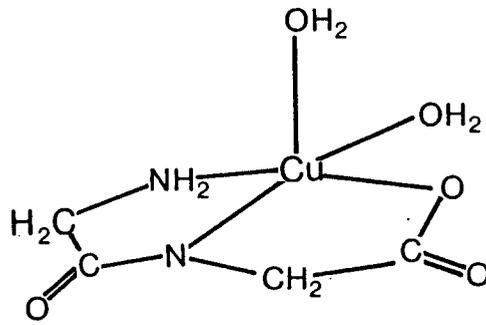
4.4. PEPTIDES A MOTIF ASPARTIQUE

Le fibrinopeptide A est un hexadécapeptide (Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg) ne présentant pas, à priori, dans sa séquence d'acides spécifiques de la complexation avec le Cu(II).

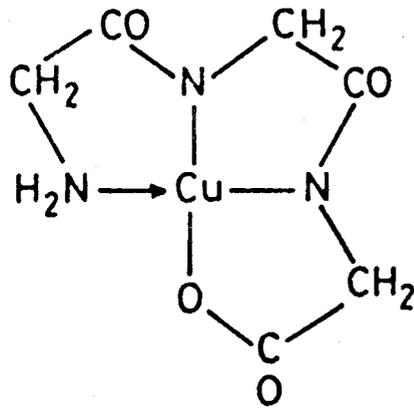
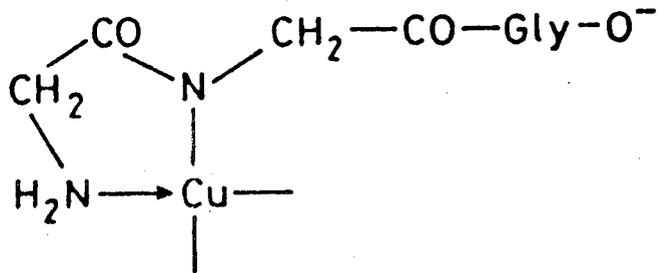
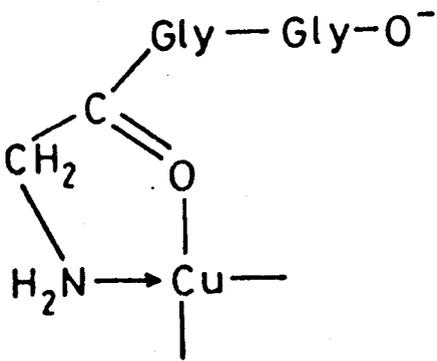
Les études thermodynamiques et spectroscopiques réalisées sur le fragment N-terminal ont montré que l'acide aspartique peut être impliqué par l'intermédiaire de la fonction β carboxylate de sa chaîne latérale dans la formation de complexes très stables avec le Cu(II) (11). De plus de récents travaux réalisés au laboratoire ont confirmé l'importance de la chaîne latérale de l'Asp dans la formation de complexes avec le Cu(II) et le Ni(II) (49, 50).

Dans le but d'étendre l'étude de l'interaction des ions métalliques avec les chaînes latérales carboxyliques, nous avons dans un premier temps étudié la complexation du fibrinopeptide A avec le Cu(II) et évalué le poids de la chaîne peptidique complète sur la stabilité des complexes formés. Dans un deuxième temps, et pour étudier le rôle exact de la

fonction β -carboxylique, nous avons synthétisé des oligopeptides comprenant dans leur séquence 2 ou 3 résidus d'acide aspartique et étudié les complexes formés avec le Cu(II) et le Zn(II).

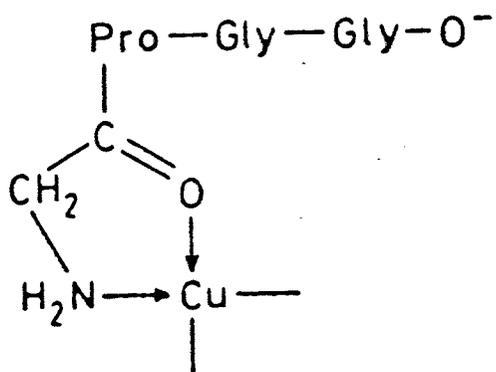


Espèce 2N de Gly-Gly

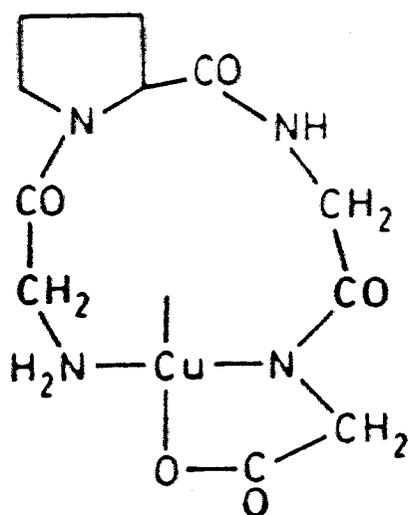


Espèces 1N, 2N et 3N de Gly-Gly-Gly

Figure 1



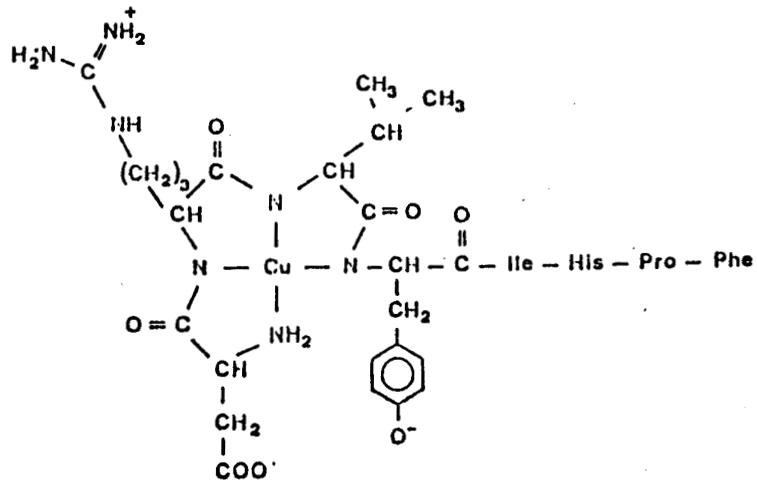
(a)



(b)

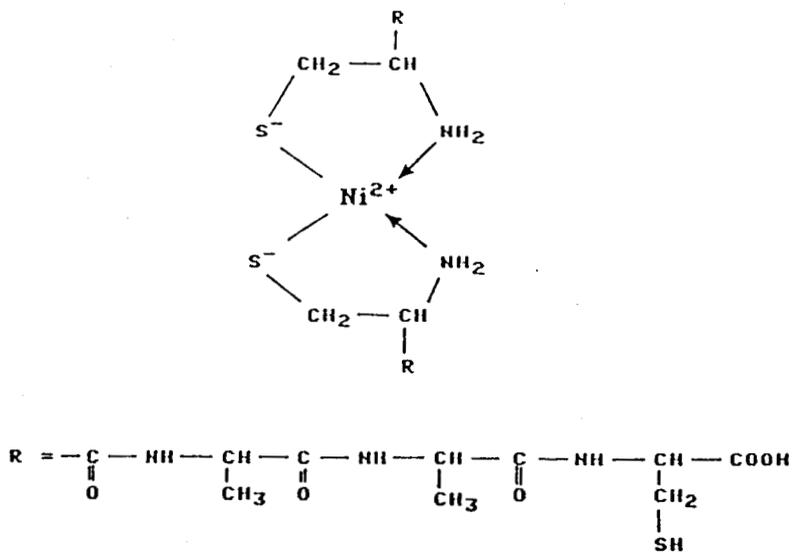
Espèces 1N (a) et 2N (b) de Gly-Pro-Gly-Gly

Figure 2



Espèce 4N de l'angiotensine avec le Cu(II)

Figure 3



Exemple de complexe faisant intervenir la cystéine

Figure 4

- 1 Martin R.B. in *Metal Ions in Biological Systems*, Ed. H. Sigel, Vol. 9 p. 1 - 39, New-York, Dekker, (1979)
- 2 Sundberg R.J. and Martin R.B., *Chem. Rev.*, 74, 471 - 517, (1974)
- 3 McAullife C.A. and Murray S.G., *Inorg. Chim. Acta Rev.*, 6, 103 - 121,(1972)
- 4 Gergely A. and Sovago I., in *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 9,p. 77 - 102, New-York, Dekker, (1979)
- 5 Kozlowski H., Decock-Le-Reverend, Ficheux D., Loucheux C. and Sovago I., *J. Inorg. Biochem.*, 29, 187 - 197, (1987)
- 6 Laurie S.H., in *Comprehensive Coordination Chemistry*, Eds. G. Wilkinson, R.D. Gillard and J.A. McCleverty, p. 739 - 776 and 959 - 988, Oxford, Pergamon Press, (1987)
- 7 Formicka-Kozlowska G., Pettit L.D., Steel I., Hartrodt B., Neubert K., Rekowski P. and Kupryszewski G., *J. Inorg. Biochem.*, 22, 155 - 163, (1987)
- 8 Pettit D., Steel I., Kowalik T., Kozlowski H. and Bataille M., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1201 - 1205, (1985)
- 9 Kozlowski H., Bezer M., Pettit L.D., Bataille M. and Hequet B., *J. Inorg. Biochem.*, 18, 231 - 240, (1983)
- 10 Livera C.E., Pettit L.D., Bataille M., Krembel J., Bal W. and Kozlowski H., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1357 - 1360, (1988)
- 11 Decock- Le -Reverend B., Andrianarijaona L., Livera C.E., Pettit L.D., Steel I., and Kozlowski H., *J. Chem. Soc Dalton Trans.*, 2221- 2226, (1986)
- 12 Decock-Le-Reverend B., Limam F., Livera C.E., Pettit L.D., Pyburn S. and Kozlowski H., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 887 - 894, (1988)
- 13 Sigel H. and Martin R.B., *Chem. Rev.*, 82, 385-426, (1982)

- 14 Kozłowski H., Formicka-Kozłowska G., Pettit D. and Steel I., in *Frontiers in Bioinorganic Chemistry*, Ed., A.V. Xavier, p. 668-675, VCH, Weinheim, (1986)
- 15 Pettit L.D. and Formicka-Kozłowska G., *Neuroscience Letters*, 50, 53-56, (1984)
- 16 Kozłowski H., In *Proceed. IX Conf. Coord. Chem., Smolenice (1983)* p. 201-205
- 17 Bataille M., Kozłowski H., Formicka-Kozłowska G., Steel I. and Pettit L.D., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 231-232, (1984)
- 18 Pettit L.D., Steel I., Formicka-Kozłowska G., Tartarowski T. and Bataille M., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 535-539, (1985)
- 19 Bataille M., Pettit L.D., Steel I., Kozłowski H. and Tartarowski T., *J. Inorg. Biochem.*, 24, 211-221, (1985)
- 20 Chou P.Y. and Fasman G.D., *J. Biol.*, 115, 135-175 (1985)
- 21 Lisowski M., Siemon I.Z. and Sobczyk K., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 21, 301-306, (1983)
- 22 Iversen L.L., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23, 1-27, (1983)
- 23 Pickart L., in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Ed. B. Weinstein, Vol 6, 75-104, New-York, Dekker, (1982)
- 24 Sovago I., Farkas E. and Gergely A., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2159-2163, (1982)
- 25 Formicka-Kozłowska G., Kozłowski H. and Kupryszewski G., *Inorg. Chim. Acta*, 46, 29-34, (1980)
- 26 Formicka-Kozłowska G., Bezer M. and Pettit L.D., *Inorg. Biochem.*, 18, 335-347, (1983)

- 27 Gerega K., Kozlowski H., Masiukiewicz E., Pettit L.D., Pyburn S. and Rzeszotarsaka B., *J. Inorg. Biochem.*, 33, 11-18, (1988)
- 28 Tnoue T., Minagawa s., Kato N. and Okhi K., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 10, 201-204 (1979)
- 29 Tsou R.C., Dalley R.A., McLanaham C.S., Parent A.D., Tindal G.T. and Neil J.D., *Endocrinology*, 101, 534-539 (1977)
- 30 Burrows G.H. and Barnea A., *Endocrinology*, 110, 1456-58, (1982)
- 31 Ryce G.E. and Barnea A., *J. Neurochem.*, 41, 1672-79, (1983)
- 32 Barnea A. and Cho G., *Endocrinology*, 115, 936-43, (1984)
- 33 Barnea A. and Colombani-Vidal M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7656-60, (1984)
- 34 Barnea A. and Cho G., *Neuroendocrinology*, 41, 149-155, (1985)
- 35 Colombani-Vidal M. and Barnea A., *Neuroendocrinology*, 43, 664-669, (1986)
- 36 Barnea A. and Cho G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 580-584, (1987)
- 37 Colombani-Vidal M. and Barnea A., *Neuroendocrinology*, 44, 276-282, (1986)
- 38 Colombani-Vidal M. and Barnea A., *Neuroendocrinology*, 44, 283-291, (1986)
- 39 Schaechtelin G., Walter R., Salomon H., Jelinek J., Karen P. and Cort J.H., *Mol. Pharmacol.*, 10, 57-67, (1974)
- 40 Schaechtelin G., Surovec D. and Walter R., *Experimentia*, 31, 346-348, (1975)
- 41 Blanc E., Sraer J.D., Baud L. and Ardailhou, *Biochem. Pharmacol.*, 27, 517-524, (1978)

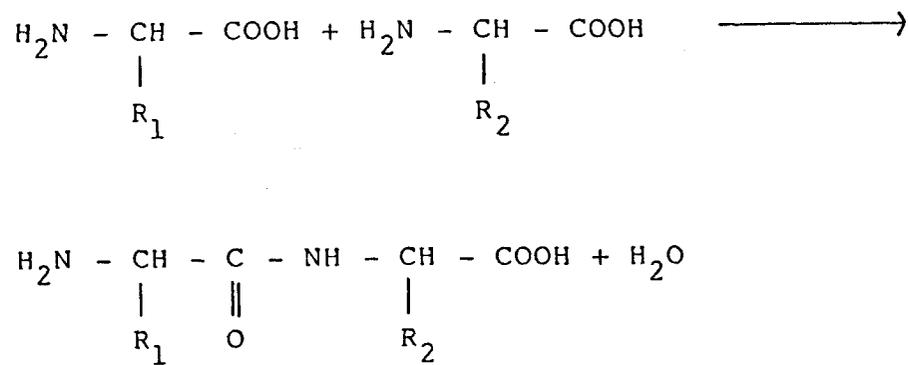
- 42 Gunter S., Gimbrone M.A. and Alexander M.W., *Circ. Res.*, 47, 265-273, (1980)
- 43 Lenkinski R.E. and Stephens R.L., *J. Inorg. Biochem.*, 15, 95-111, (1981)
- 44 Basosi R., Gaggelli E. and Valensin G., *J. Inorg. Biochem.*, 20, 263-268, (1984)
- 45 Murasugi A., Wada Nakagawa C. and Hayashi Y., *J. Biochem.*, 96, 1375-1379, (1984)
- 46 Grill E., Winnacker E.L. and Zenk M.H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 439-443 (1984)
- 47 Cherifi K., Thèse de Doctorat USTL LILLE (1990)
- 48 Varnagy K., Sovago I. and Kozlowski H., *Inorg. Chim. Acta*, 151, 117-123, (1988).
- 49 Decock-Le-Reverend B., Lebkiti A., Livera C. and Pettit L.D., *Inorg. Chim. Acta*, 124, L19-L22, (1986)
- 50 Lebkiti A., Thèse de Doctorat USTL LILLE (1987)

CHAPITRE I

Méthodes expérimentales

I PRINCIPES GENERAUX DE LA SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.

La synthèse peptidique consiste à former une liaison amide (dite aussi liaison peptidique) entre deux molécules d'acides aminés selon le schéma réactionnel suivant:



Pour ce faire trois étapes sont donc nécessaires:

- Protection
- Couplage
- Purification

Etant donné le caractère au moins bifonctionnel des acides aminés, il est nécessaire de neutraliser la réactivité des fonctions ne devant pas intervenir dans le processus de couplage. Ceci est obtenu par introduction sur ces fonctions de groupes protecteurs. Le choix d'un groupe protecteur dépend de plusieurs facteurs:

- La facilité avec laquelle il est mis en place.
- La sélectivité de son élimination.
- Sa stabilité chimique vis à vis des agents de couplage.

COUPLAGE

La réaction de couplage de deux acides aminés n'étant pas spontanée, il est nécessaire d'activer l'une ou l'autre des fonctions. Pour cela, des méthodes rendant plus réactives les fonctions N et C terminales ont été mises au point.

PURIFICATION

Le grand nombre de processus chimiques mis en jeu au cours d'une synthèse peptidique, implique l'apparition de produits secondaires essentiellement de nature peptidique. Il était donc nécessaire de mettre en oeuvre une méthode de purification. Nous avons utilisé la chromatographie sur gel perméable en association avec la chromatographie liquide à haute performance.

La dicyclohexylurée est insoluble dans les solvants généralement utilisés en synthèse peptidique. Elle est éliminée par filtration. WEINSTEIN (2) a montré que cette méthode peut conduire à des produits partiellement racémisés. Pour éviter cet inconvénient KONIG (3) a proposé d'utiliser l'hydroxybenzotriazole.

2. PROTECTION DE L'EXTREMITÉ C TERMINALE ET DE LA CHAÎNE

LATERALE

2.1. LE DIESTER BENZYLIQUE DE L'ACIDE ASPARTIQUE

Il est obtenu par réaction de l'alcool benzylique sur l'acide aspartique. L'eau d'estérification est éliminée par distillation azeotropique en milieu benzénique.

Dans un ballon de 250 cc, on place 0,1 mole d'acide aspartique (13,3 g). On ajoute 50 cc de benzène, 0,1 mole d'acide paratoluène sulfonique qui sert de catalyseur et 100 cc d'alcool benzylique.

On distille sous agitation, en contrôlant le volume d'eau obtenu. Après quelques heures, la solution est refroidie et l'ester est obtenu par précipitation dans l'éther éthylique sec. Il est lavé abondamment par l'éther.

Le paratoluène sulfonate d'acide aminé ainsi obtenu est séché, puis recristallisé dans le mélange méthanol / éther sec. Le rendement est de 85%.

Les paratoluènes sulfonates d'acides aminés ne peuvent être utilisés tels quels pour les couplages, ils sont transformés en leurs chlorhydrates.

- Passage aux chlorhydrates:

On dissout dans le minimum d'eau, $5 \cdot 10^{-2}$ mole de paratoluène sulfonate d'ester d'acide aminé, on neutralise par du carbonate de potassium. La solution est extraite par 30 cc d'éther, puis par 3 fois 30 cc d'acétate d'éthyle, après avoir saturé la phase aqueuse par NaCl. Les phases organiques sont rassemblées, lavées à l'eau puis séchées sur $MgSO_4$ et filtrées. Elles sont ensuite évaporées. Le résidu huileux obtenu est repris par de l'éther sec, il est filtré, lavé puis séché.

Le rendement par rapport au paratoluène sulfonate, après recristallisation dans le système de solvants méthanol / éther est de 60%.

2.2. PREPARATION DU MONOESTER BENZYLIQUE DE L'ACIDE ASPARTIQUE (β ASPARTATE DE BENZYLE)

Dans un ballon de 1 l, on dissout 0,5 mole d'acide aspartique et 600 ml d'alcool benzylique. La solution est chauffée à 100°C sous agitation. Un courant d'HCl gazeux barbote dans la solution jusqu'à dissolution complète. L'ester est précipité par addition de 2 l de triéthylamine. Il est filtré, séché et recristallisé dans l'eau. Le rendement est de 45%.

La pureté de tous les esters est vérifiée par chromatographie sur papier Wathman N°1 dans le système de solvants quaternaire: butanol (30), pyridine (20), acide acétique (6), eau (24). La révélation est faite par pulvérisation à la ninhydrine et chauffage à 100°C pendant 5 minutes.

2.3. RESULTATS EXPERIMENTAUX

	PF (°C)	Rf
HCl, AspdiBzl	158	0,95
AspβBzl	130	0,48

3. PROTECTION DE LA FONCTION AMINE TERMINALE

3.1 PREPARATION DE tBOC AMINOACIDES (méthode au ditertbutyldicarbonate)

On ajoute à une suspension de 0.01 mole d'acide aminé dans 10 ml d'eau, 20 ml de dioxanne, 10 ml de soude 1N et 0,011 mole de ditertbutyldicarbonate. La réaction, sous agitation, est démarrée dans un bain de glace puis se déroule pendant une heure à température ambiante. Le dioxanne est ensuite évaporé et la solution aqueuse est acidifiée à pH 2-3 par l'hydrogénosulfate de potassium. Le tBoc acide aminé est extrait deux fois par l'acétate d'éthyle, lavé plusieurs fois à l'eau et séché sur sulfate de sodium. La solution est filtrée puis évaporée sous pression réduite. La poudre obtenue après évaporation est dissoute dans un peu de dichlorométhane avant d'être précipitée dans l'hexane.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

	PF (°C)	Rf
tBocAspβBzl	105	0,71
tBocAla	75	0,65

4. PREPARATION DU tBocAsp-O-Cyclohexyl (4)

On dissout dans du dichlorométhane 1 équivalent de tBocAsp-O-Bzl et de 1 éthy-3-(3-diméthylaminopropyl 1)-carbodiimide hypochloride pour 3 équivalents de cyclohexanol. Pour accélérer la réaction, on introduit dans le milieu de la 4 diméthylaminopyridine. La réaction dure 1 heure à 0°C.

Dans un deuxième temps, le tBocAsp-(O-Cyclohexyl)-OBzl obtenu est traité par hydrogénation sur Pd / BaSO₄ dans l'éthanol distillé pendant 17 heures. le palladium est filtré et lavé, puis l'éthanol est évaporé sous pression réduite. Le précipité blanc est alors repris plusieurs fois dans le méthanol.

Le rendement global de la réaction est de 70%.

II LES DIFFERENTS TYPES DE SYNTHESSES

Deux types de synthèses ont été utilisés:

- La synthèse en phase liquide ou homogène.
- La synthèse en phase solide ou gel.

I LA PHASE LIQUIDE

Ce type de synthèse est le plus simple à mettre en oeuvre car il ne demande aucun matériel particulier.

La réaction de couplage en phase liquide consiste à faire réagir deux acides aminés protégés convenablement dans un milieu homogène. La réaction se fait dans un solvant organique (chloroforme, diméthylformamide etc...) à basse température, sous agitation. L'évolution du couplage est suivi en chromatographie sur couche mince. Dès que la réaction est terminée, les peptides sont extraits par un solvant organique. Les produits n'ayant pas réagi sont éliminés par des lavages acidobasiques.

La purification finale du peptide se fait par cristallisation et par chromatographie sur gel perméable.

Les avantages de la phase liquide peuvent être résumés ainsi:

- Préparation de quantités importantes de produit sans investissement onéreux.
- Facilité de mise en oeuvre.

- Synthèse par couplage de fragments comportant quelques résidus.

Néanmoins, les étapes de lavage et de cristallisation rendent cette technique fastidieuse.

2. LA PHASE GEL

Vers 1960 MERRIFIELD (5) propose une nouvelle technique de synthèse peptidique: la synthèse en phase gel.

La méthode est basée sur le fait qu'une chaîne peptidique peut être synthétisée pas à pas alors que son extrémité C terminale est fixée sur une résine gonflée dans des solvants organiques. Ce support est réticulé par du divinylbenzène (1 à 2 %) et partiellement chlorométhylé.

La synthèse de MERRIFIELD passe par la répétition d'un cycle d'opérations résumé figure 1

La synthèse en phase gel possède certains avantages:

- Les réactifs non couplés sont éliminés par filtration
- La rapidité d'obtention des produits (60 à 90 mn par couplage).

Néanmoins, elle présente quelques inconvénients:

- La quantité de réactifs à introduire dans le réacteur doit être 2 à 3 fois la quantité stoechiométrique de la synthèse des peptides.
- La microporosité du support limite parfois l'accroissement de la chaîne peptidique.
- De nombreux problèmes se posent lors la libération finale du peptide.

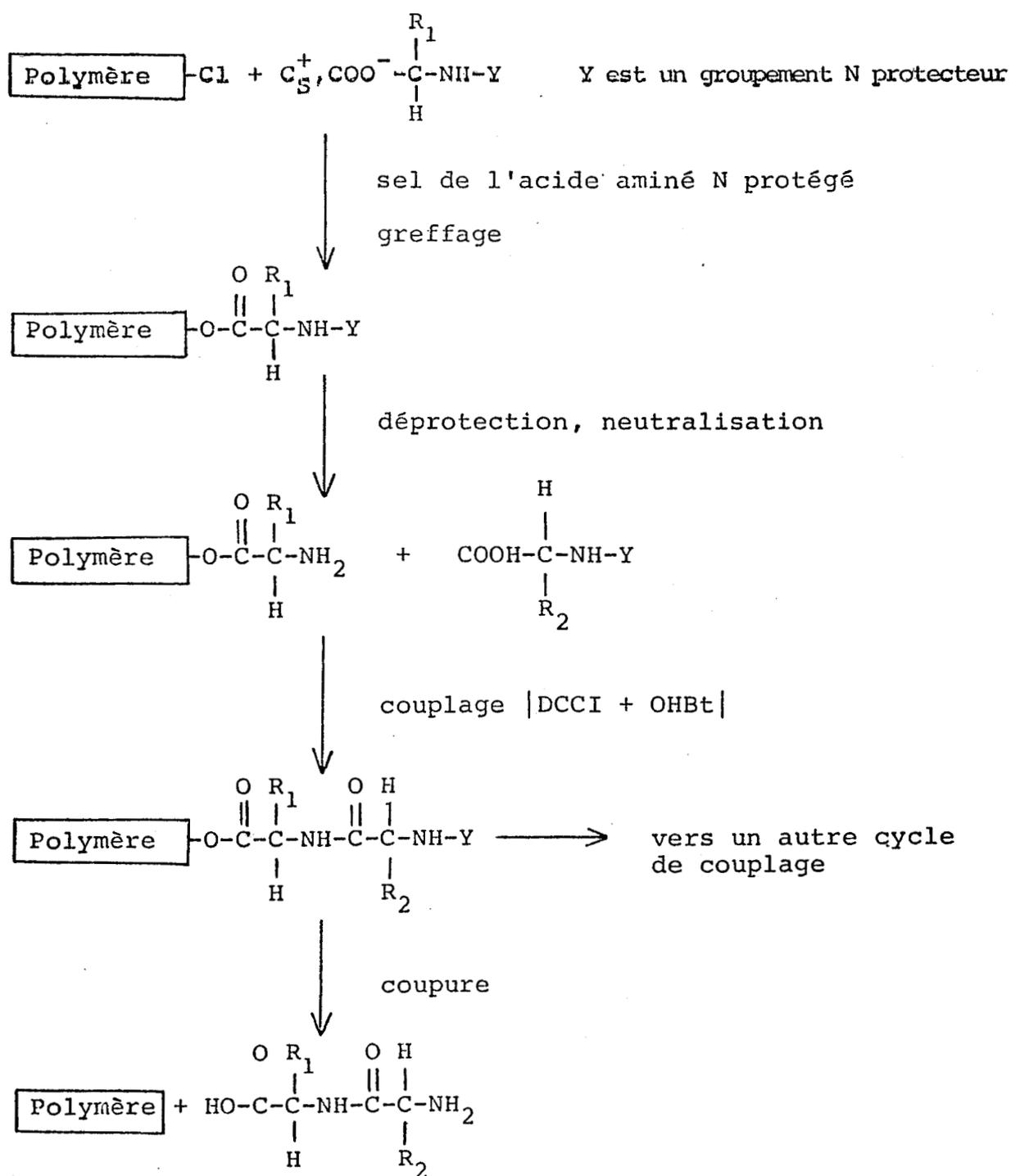


Figure 1

3. SYNTHÈSE DE ASP-ASP-ASP EN PHASE LIQUIDE

Nous avons utilisé des quantités non stoechiométriques d'acides aminés. En effet, nous avons remarqué que, si les esters d'acides aminés s'extraitent bien par lavage, il en va différemment pour les tBoc acides aminés. Il est donc nécessaire de mettre ces derniers en léger défaut pour faciliter la purification. En général, la coupure du tBoc est effectuée dans une solution de HCl 4 N dans le dioxane. Les réactions de couplage et de déprotection sont suivies par chromatographie sur couche mince dans le solvant ternaire (CHCl_3 85 %, AcOH 5 %, MeOH 10 %).

Le solvant du milieu est le chloroforme refroidi à 0°C par un bain de glace et une agitation est maintenue dans le milieu réactionnel.

Le protocole de couplage peut être résumé comme suit:

- 1 mole d'ester d'acide aminé sous forme de chlorhydrate
- 1 mole de base faible pour neutraliser le chlorhydrate (la N-méthyl morpholine sera préférée à la triéthylamine car il semble qu'elle évite tout problème de racémisation)
- 0,9 mole de tBoc acide aminé
- 1500 CC de CHCl_3 refroidi à 0°C
- 1 mole d'HOBT
- 1,1 mole de DCCI

Le tout est laissé une nuit à la température de 0°C; on vérifie que la réaction est terminée par chromatographie sur couche mince.

3.1. EXTRACTION ET PURIFICATION

Le couplage terminé, on ajoute quelques gouttes d'acide acétique au milieu réactionnel afin de transformer la DCCI qui n'a pas réagi en

dicyclohexylurée (DCU). La DCU est filtrée, puis lavée 2 fois par 50 CC d'une solution de bicarbonate de sodium à 4 % afin d'éliminer les traces de tBoc n'ayant pas réagi et l'hydroxybenzotriazole. Cette opération est suivie d'un lavage par 50 CC d'une solution de HCl à 1 % afin d'éliminer le chlorhydrate de l'ester de l'acide aminé en excès. Un dernier lavage par une solution saturée de NaCl est effectué. Les phases organiques rassemblées sont séchées sur du sulfate de magnésium. Après filtration, le chloroforme est évaporé. L'huile alors obtenue est reprise par 30 CC d'acétate d'éthyle afin de précipiter le chlorhydrate de N-méthyl morpholine qui est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé, l'huile obtenue est reprise par le dichlorométhane et précipité dans l'hexane. Le peptide est alors sous forme de tBoc-peptide-ester. Afin de poursuivre les synthèses, il est indispensable de déprotéger une des deux fonctions.

3.2. LA COUPURE DU GROUPE tBoc

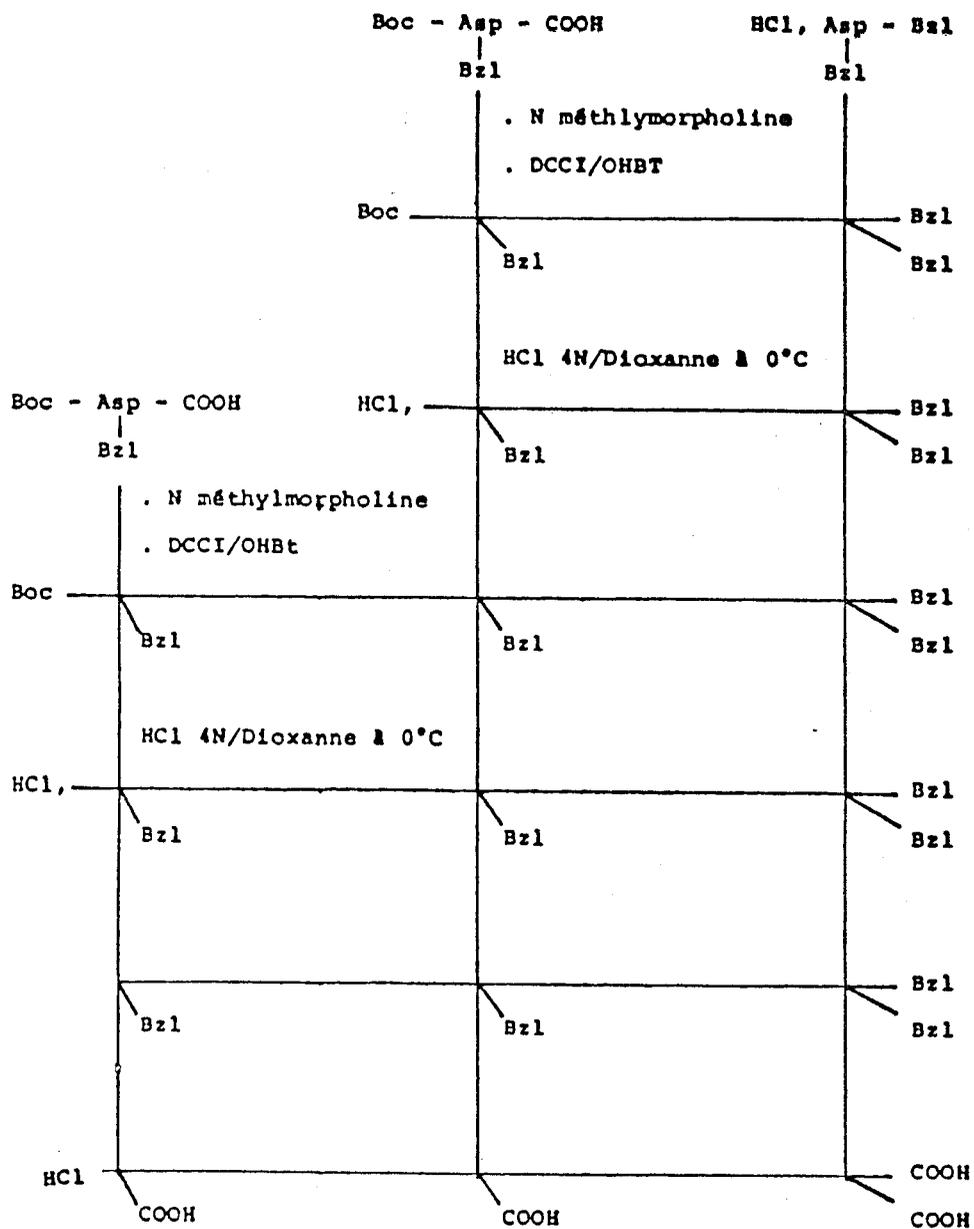
On place le peptide protégé dans une solution de HCl 4 N / Dioxanne. La réaction est menée dans la glace sous forte agitation. Un dégagement de CO₂ et un précipité blanchâtre de chlorhydrate du peptide apparaissent. Lorsque les analyses par chromatographie sur gel de silice montrent que tout est coupé, le solvant est évaporé sous vide. Le précipité blanc obtenu est repris par un peu de méthanol et précipité dans l'éther sec. Le chlorhydrate est rapidement filtré, lavé par l'éther sec, séché et pesé.

3.3. DEPROTECTION DES GROUPES BENZYLTIQUES

Nous avons pratiqué l'hydrogénolyse en milieu dioxanne en présence de palladium à 10% sur charbon. La réaction là aussi est suivie par chromatographie sur couche mince. Dès qu'elle est terminée, le catalyseur est filtré.

La synthèse du tripeptide Asp-Asp-Asp est résumée figure 2

Figure 2



4. SYNTHÈSE DE TETRAPEPTIDES EN PHASE GEL

Les résidus C terminaux de la séquence des peptides doivent être introduits les premiers. Il s'agit du tBocAla pour Ala-Asp-Asp-Ala, et du tBoc-O-cyclohexyl pour Asp-Ala-Ala-Asp, Ala-Asp-Ala-Asp et Ala-Ala-Asp-Asp. Ils sont fixés sur la résine par la méthode de GISIN (6) par leur sel de césium.

4.1. FLOTTATION DE LA RÉSINE

La résine utilisée est un polystyrène copolymérisé avec 2 % de divinylbenzène, chlorométhylé (comportant 0.8 mmole de Cl^- par gramme de résine).

Avant la fixation du premier acide aminé, il est nécessaire d'éliminer les fines particules de la résine afin de ne pas boucher les pores du verre fritté du réacteur.

La résine est mise en suspension dans un litre de méthanol. Après agitation, on laisse décanter la résine, puis on élimine les plus fines particules qui remontent à la surface. On réitère cette opération 3 fois. Ensuite on transvase la résine dans une ampoule à décanter et on lave par du dichlorométhane. La résine monte en surface, seules les petites particules restent en suspension et sont éliminées avec le dichlorométhane. Cette opération est répétée plusieurs fois, puis la résine est filtrée, séchée et peut alors être utilisée pour greffer le premier acide aminé.

4.2. PREPARATION DES SELS DE CESIUM DES tBoc ACIDES AMINES

On dissout 2 g de tBoc acide aminé dans une solution de 12 ml d'éthanol et de 5 ml d'eau. On ajuste le pH à 7 au moyen d'une solution de carbonate de césium à 20 %. Un peu de toluène est ajouté à la solution qui est évaporée rapidement. Le sel de césium de l'acide aminé est obtenu sous forme d'une poudre blanche qui est ensuite séchée 5 heures sur P_2O_5 . Il est obtenu avec un rendement de 85 %.

4.3. FIXATION DU PREMIER ACIDE AMINE SUR LA RESINE

Pour fixer le premier acide aminé sur la résine on procède généralement de la manière suivante. Dans un ballon, on place:

- 1,5 mmole de sel de césium de tBoc acide aminé.
- 1 équivalent de résine chlorométhylée (0,8 mmole de Cl^- soit 1 g de résine)
- 6 à 8 ml de DMF purifié par gramme de résine.

Le ballon est mis sous agitation à 50°C pendant 24 heures. La résine est ensuite filtrée et lavée par du DMF (3 fois), DMF / eau (3 fois), DMF / EtOH (1 fois), EtOH (3 fois), MeOH (2 fois). Les 7 premiers lavages sont récupérés et concentrés. On reprend le résidu dans 50 ml d'eau. La détermination de la charge de la résine se fait par un dosage des chlorures libérés, par la méthode de CHARPENTIER-VOLHARD (précipitation des chlorures par un excès de nitrate d'argent, cet excès étant dosé en retour par du thiocyanate de potassium).

La résine est ensuite séchée et peut être utilisée pour les couplages.

4.4. UTILISATION DU SYNTHETISEUR AUTOMATIQUE

La synthèse sera menée à son terme par l'exécution d'une suite d'opérations ordonnées selon un programme établi à l'avance. Ce programme est transmis à l'automate par l'intermédiaire d'une interface pilotée par un microordinateur de type Apple //. Cet automate a été conçu au laboratoire de chimie macromoléculaire en collaboration avec l'ENSAM (7)

4.5. DESCRIPTION DU PROGRAMME DE SYNTHÈSE

L'ensemble résine-tBoc-acide aminé est introduit dans le réacteur puis mis à gonfler dans le dichlorométhane. Après élimination de ce solvant, la résine est prélavée par le réactif de déprotection de la fonction aminée pendant 1'30". Le groupement protecteur est totalement éliminé par réaction pendant 30' par le réactif acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane (50 / 50).

La résine-aminoacide-fluorhydrate est neutralisée par la N-éthyl-diisopropylamine dans le dichlorométhane. Elle peut être alors utilisée pour faire le premier couplage.

4.6. DESCRIPTION DÉTAILLÉE DES OPÉRATIONS

Tous les lavages, étapes de neutralisation ou couplages, mettent en jeu les opérations suivantes:

- Transfert de solvants dans les réservoirs jaugés, autorisé par l'ouverture de vanne de type S
- Arrêt du transfert de solvant lorsque le niveau désiré est atteint (cas de l'ouverture d'une vanne S)
- Passage du solvant du réservoir jauge vers le réacteur, autorisé par la vanne V7
- Fermeture de la vanne V7 après temporisation
- Mise en route du moteur, puis arrêt

- Ouverture de la vanne de vidange V8 et de la vanne de poussée d'azote V10 du réacteur pour aider la vidange
- Fermeture de ces deux vannes

Les étapes de déprotection se font de la même manière à la différence que la cellule jauge (spécifique au réactif acide) et les vannes mises en jeu ne sont pas les mêmes (figure 3).

4.7. COUPLAGE EN PHASE SOLIDE

4.7.1. ESTER ACTIF D'HOBt

L'acide aminé protégé (tBoc-AA) est dissous dans du dichlorométhane et mis à incuber avec de l'HOBt à 0°C pendant 10 minutes. Cette suspension est ensuite ajoutée à la DCCI dissoute dans le dichlorométhane à 0°C. La solution obtenue est alors mise à incuber 10 minutes à 0°C sous agitation. Le précipité de dicyclohexylurée obtenu est filtré sur ouate. Le filtrat est alors introduit dans le réacteur, un nouveau couplage peut alors commencer.

4.7.2 ANHYDRIDE SYMETRIQUE

Cette méthode d'activation est utilisée pour tout couplage difficile. Il est alors nécessaire de peser 2 équivalents d'acide aminé pour un équivalent de DCCI, de les dissoudre dans du dichlorométhane et de les incuber séparément à 0°C. Les deux solutions sont ensuite mélangées et mises à incuber 10' à 0°C. Après filtration sur ouate, le filtrat est évaporé à la trompe à eau; le résidu est alors repris avec du DMF et peut alors être introduit dans le réacteur. Dans ce cas la durée du couplage ne doit pas excéder une demi-heure.

4.7.3 CONTROLE DU COUPLAGE. TEST DE KAISER (8)

Un échantillon de résine est placé dans un tube à hémolyse, on ajoute de la ninhydrine. Le tube est placé dans une enceinte chauffée à 100°C pendant 5 minutes. Si la résine reste blanche et la solution jaune, le test est négatif. Ceci veut dire que la réaction de couplage a été complète.

Figure 3

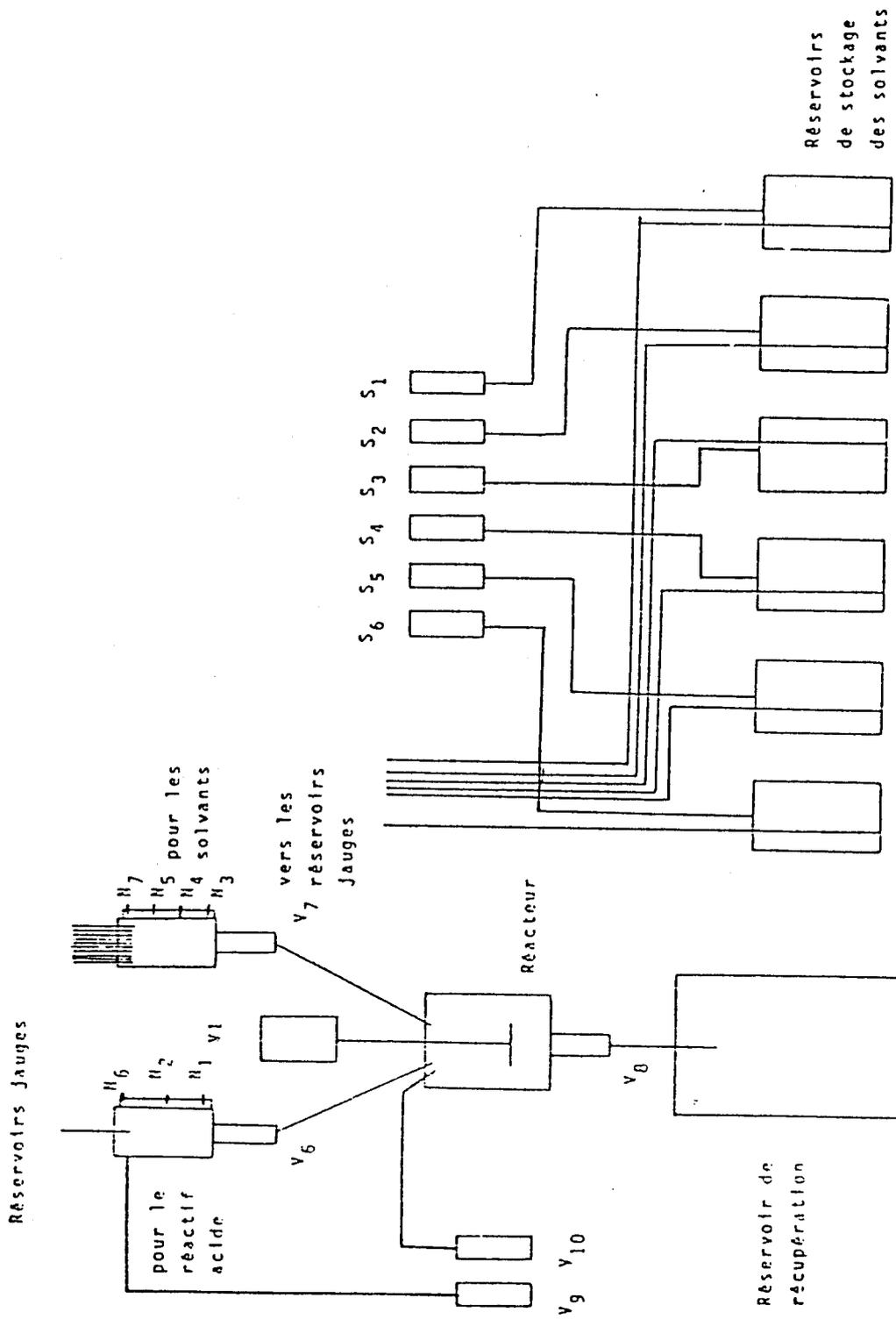


Schéma d'organisation des vannes

Le même type de réaction peut être fait à l'issue de l'étape de déprotection. Si la résine et la solution prennent une teinte bleue soutenue, le test est alors positif. Ceci signifie que la réaction de déprotection est totale.

Dès que la synthèse de la séquence est terminée, l'ensemble résine-peptide est lavé puis filtré et séché.

4.8. *DEPROTECTION PAR HF (High HF)*

L'appareil utilisé est construit entièrement en polymères fluorés (téflon). Il est composé de deux réacteurs en Kelf notés R1 et R2, d'une bouteille réservoir d'HF, d'un piège de sortie R3 et d'une trompe à eau P. Les réacteurs sont isolés par des vannes notées V1 et V2 (figure 4). Le premier réacteur R1 sert à mesurer le volume d'HF qui est condensé par de l'azote liquide. Le HF condensé est desséché sur trifluorure de cobalt. En effet, toutes les opérations doivent être menées en milieu rigoureusement anhydre afin d'éviter le risque d'hydrolyse des liaisons peptidiques.

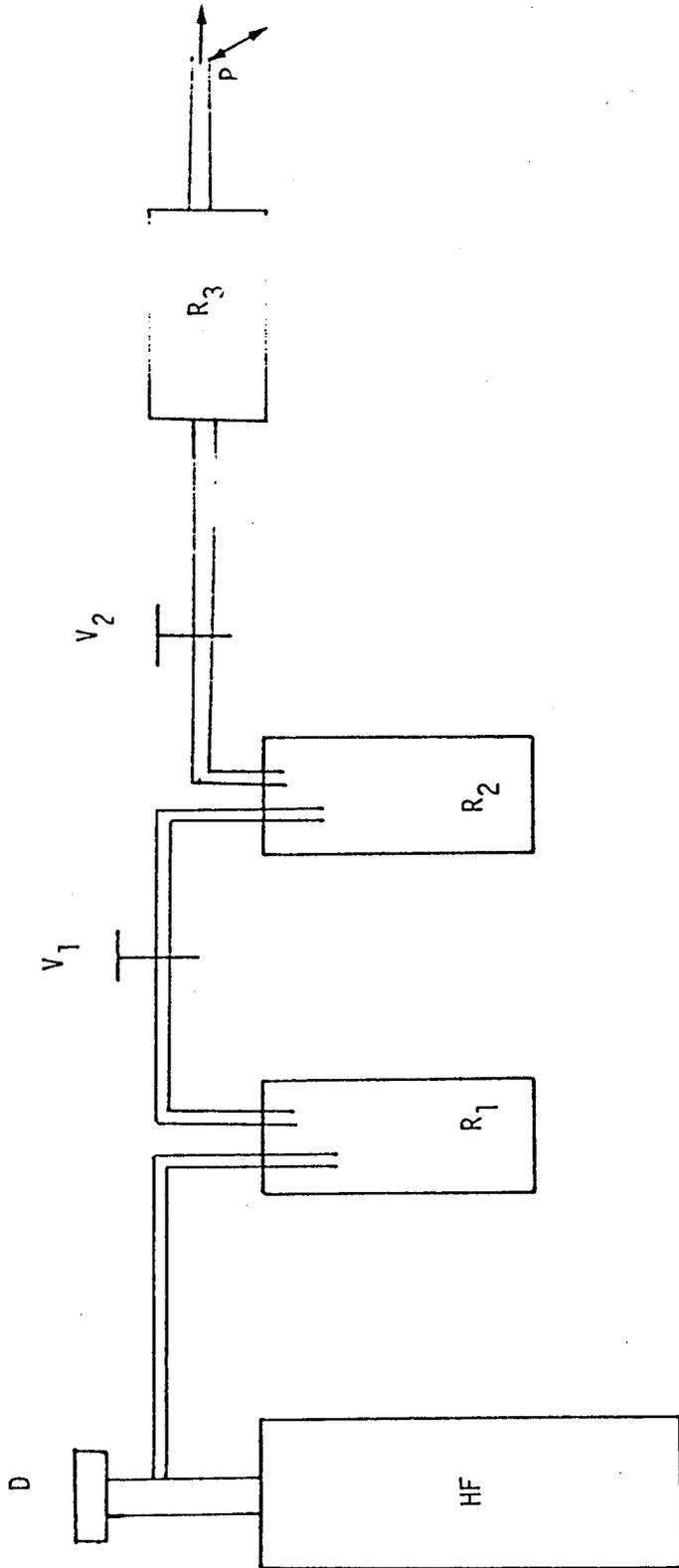
Le second réacteur R2 reçoit l'ensemble peptide-résine. On ajoute du paracrésol pour protéger les acides aminés sensibles.

Il est nécessaire de mener la coupure sous une hotte fortement ventilée et en prenant des précautions particulières.

On procède comme suit pour réaliser le clivage peptide-résine:

- Avant tout, on fait le vide dans la chaîne HF au moyen d'une trompe à eau. Ensuite, on ferme la vanne V1, le réacteur R1 est alors isolé et refroidi par de l'azote liquide. Le robinet D de la bouteille est alors ouvert doucement. Le HF est alors condensé dans R1 jusqu'à obtention du volume désiré (10 ml de HF par gramme de résine). Une fois le volume désiré atteint, le robinet D est fermé. Le HF condensé est alors séché sur trifluorure de cobalt.

- Après quelques minutes, le HF est transféré de R1 au réacteur R2 contenant l'ensemble peptide-résine et le paracrésol. Pour ce faire on procède de la façon suivante:



Schema de la chaîne à HF

Figure 4

- On fait le vide dans R2 qui est refroidi par l'azote liquide, ensuite on ferme V2. Le HF est alors réchauffé lentement à température ambiante. Il est donc transféré par distillation en ouvrant doucement la vanne V1. Une fois la distillation terminée, le réacteur R2 est isolé en fermant V1. Une agitation est maintenue pendant une heure à 0°C.

- Le temps de coupure étant passé, le HF est éliminé par distillation. Pour cela, on laisse revenir à température ambiante le réacteur R2. On ouvre la vanne V2, le HF distille lentement et est neutralisé dans le piège de sortie contenant de la chaux.

- Les résidus peptide et résine sont mis en suspension dans de l'éther sec pour éliminer les dernières traces de paracrésol. L'éther est éliminé par filtration et le peptide est extrait par lavage à l'acide acétique 5 %. Ensuite la phase aqueuse est lyophilisée et le peptide est purifié.

4.9. PURIFICATION

Nous avons utilisé la chromatographie de gel filtration sur sephadex G 15. Le principe repose sur la séparation des produits en fonction de leur différence de volume hydrodynamique. L'éluant choisi est l'eau pour les tétrapeptides et l'acide acétique à 5 % dans l'eau pour le tripeptide Asp-Asp-Asp. Le matériel utilisé comporte une cellule de détection à 2 longueurs d'onde (206 et 280 nm), une pompe péristaltique LKB, un collecteur de fraction (LKB 2111) et un enregistreur multicanaux LKB 2089 uvicond III (Les Rf et les résultats d'analyse en acide aminé sont donnés tableau 1).

5. SYNTHÈSE DU FIBRINOPEPTIDE A EN PHASE GEL

La synthèse du fibrinopeptide A de séquence Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg a été réalisée selon la technique en phase gel décrite précédemment.

Nous avons utilisé le matériel de synthèse suivant:

- Résine : polystyrène chlorométhylé réticulé par 1 % de divinylbenzène, chargé à 1-2 meq par gramme, 100-200 Mesh.
- Acides aminés protégés commerciaux: tBoc-Arg-Tos et tBoc-Gly (Peptide Institut), tBoc-Val, tBoc-Glu-OBzl et tBoc-Ala (Propeptide), tBoc-Leu hydrate, tBoc-Phe, tBoc-Asp-O-Bzl et tBoc-Asp-O-cyclohexyl (Bachem), tBoc-Glu-O-cyclohexyl et tBoc-Ser-O-Bzl (Novabiochem).
- Matériel de purification: gel filtration (gel TSK, éluant TFA 1 / 1000 dans l'eau).

Plaques de chromatographie sur couche mince de silice Kieselgel 60, 0,2mm (Merck)

HPLC phase inverse analytique (Gilson). Mélangeur modèle 302 C. Pompe modèle 302. Détecteur U.V 116. Système pilote par Apple 2. Colonne 35 cm, 4,6 mm de diamètre. Phase nucléosil C18, 5 μ m, 100 Å* de porosité.

HPLC phase inverse préparative Waters. Pompe 6000 A. Colonne 50cm, 9 mm de diamètre. Phase Nucléosil C18, 5 μ m, 100 Å* de porosité.

Analyseur d'acide amine Beckman 7300.

5.1. RESULTATS DE L'ANALYSE EN ACIDES AMINES

Asp: 1,91. Ser: 0,81. Glu: 2,06. Gly: 5,01. Ala: 2,01. Val: 0,90. Leu: 1,07. Phe: 1,02. Arg: 0,98.

6. PROBLEME PARTICULIER POSE PAR L'ACIDE ASPARTIQUE EN PHASE GEL

La protection de la fonction β carboxylique est absolument nécessaire avant l'activation de la fonction en alpha, sinon l'un ou l'autre des deux

groupes pourrait être active et conduire à la formation d'un mélange d'alpha et de β aspartyl peptide.

Cette formation de β aspartyl peptide peut être aussi due à la formation d'un intermédiaire succinimide qui évolue par réouverture de cycle en alpha ou β aspartyl peptide (figure 5). Ce phénomène est observé principalement et à plus fort degré quand l'acide aminé qui suit l'acide aspartique est une glycine, une sérine ou une alanine (5).

La nature du groupe protecteur intervient aussi quant à la formation de succinimide. Souvent on utilise l'ester benzylique, mais dans les conditions fortement acides nécessaires pour le clivage de cet ester, la perte d'alcool benzylique conduit à la formation d'une succinimide (figure 6). C'est pour cela que nous avons utilisé l'acide aminé protégé sous forme d'ester de cyclonexyle lorsque celui-ci suivait dans le sens de la synthèse une alanine

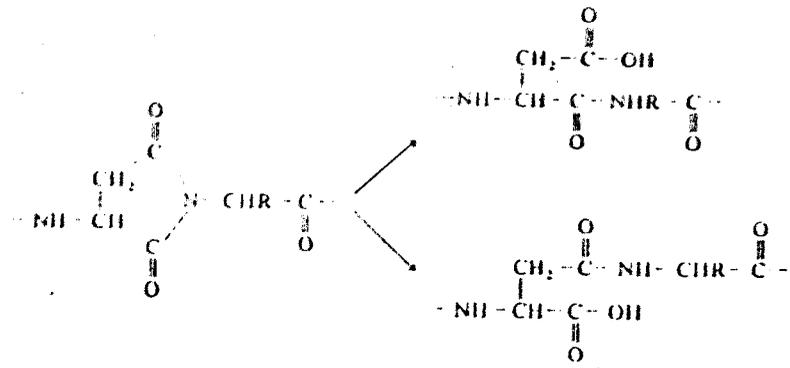


Figure 5

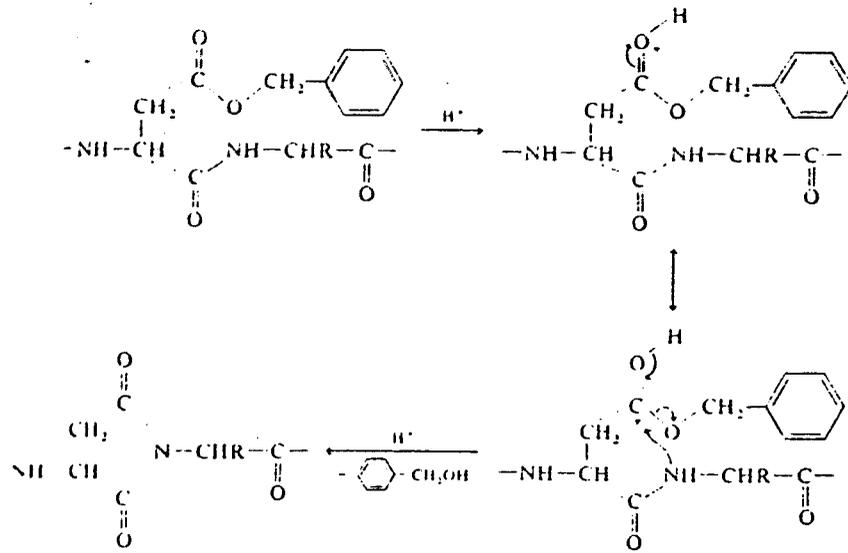


Figure 6

Tableau 1: Tableau récapitulatif des résultats. Analyse en acides aminés et Rf

Peptide	Analyse en acides aminés			Rf
Asp-Ala-Ala-Asp	2.05 Asp	1.95	Ala	0.20
Ala-Asp-Ala-Asp	1.98 Asp	2.02	Ala	0.19
Ala-Asp-Asp-Ala	1.97 Asp	2.03	Ala	0.21
Ala-Ala-Asp-Asp	2.04 Asp	1.96	Ala	0.20
Asp-Asp-Asp	2.98 Asp	-		0.17

III SPECTROSCOPIE ET POTENTIOMETRIE

1. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION - DICHROISME CIRCULAIRE - RMN - RPE

Pour les deux premières techniques, toutes les solutions ont été préparées à partir d'eau distillée. En ce qui concerne la RPE, on a ajouté quelques gouttes d'éthylène glycol dans les solutions pour mieux visualiser les spectres. La concentration des peptides varie entre 10^{-3} et $2 \cdot 10^{-3}$ mole par litre et le rapport ligand métal est de 1.

Les spectres d'absorption ont été tracés sur un spectrophotomètre UVIKON 810. Les cellules utilisées de 1 cm de longueur sont en quartz.

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées sur un dichrographe JOBIN et YVON MARK III équipé d'un système d'acquisition des données couplé avec un ordinateur APPLE //. Les mesures ont été faites avec des cellules en quartz de trajet optique 1 et 0,1 cm. Les résultats sont donnés en $\Delta\epsilon$.

Les spectres de résonance paramagnétique électronique ont été obtenus avec un spectromètre VARIAN 9 à la température de 77 K avec une modulation de 100 KHz (bande X, 9,3 GHz).

En ce qui concerne les études de RMN, les solutions ont été préparées dans D_2O et les pH ajustés avec DCI et NaOD. Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre BRÜKER AM 400. Les spectres ABX ont été traités sur un ordinateur HP 9826 avec les programmes LAOCN et ROTAMER adaptés au calculateur par J. TARTAROWSKI et Z. SIATECKI.

2. POTENTIOMETRIE

Les titrations potentiométriques sont effectuées dans une cellule en téflon de capacité maximum 3 ml. L'agitation est réalisée manuellement à l'aide d'un petit agitateur en polypropylène. La soude est ajoutée à l'aide d'une burette de 100 μ l (seringue HAMILTON délivrant 2 μ l à la fois par un bouton poussoir mécanique), par un tube en téflon de 0,3 mm de diamètre. La titration est suivie en millivolt en utilisant une microélectrode combinée verre - calomel (RUSSEL CRAWL).

Les titrations sont effectuées dans une pièce thermostatée à 25°C. Les solutions à doser sont pesées directement dans la cellule.

De l'argon pressaturé, par passage à travers une solution de KNO_3 0,1 M, est passé sur la surface du tampon et des solutions à doser lors des calibrations d'électrode et des titrations pour maintenir une atmosphère inerte.

2.1. PURIFICATION DE L'EAU

Toutes les solutions sont préparées en utilisant de l'eau désionisée bidistillée et seule l'eau ayant une résistivité supérieure à 4 M Ohm / cm est jugée utilisable.

2.2. SOLUTIONS D'IONS METALLIQUES

Le nitrate de Cuivre (II) et le nitrate de Zinc (II) (réactifs BDH pour analyses) sont utilisés pour préparer des solutions aqueuses de concentration approximative 0,01 M par addition de nitrate de potassium sec solide.

2.3. SOLUTIONS DE LIGANDS

Généralement, 5 ml de solution de ligand de concentration $2 \cdot 10^{-3}$ mole par litre sont préparés par dissolution d'une quantité pesée de ligand dans une solution 0,1 M de KNO_3 . Cependant les peptides sont rarement purs à 100 %. Les sources d'impuretés peuvent être diverses, mais la

principale étant dans notre cas la présence d'ions acétates (l'acide acétique étant utilisé lors de la purification en gel filtration).

En conséquence, la concentration précise ne peut être déterminée par simple pesée. Elle est obtenue par titration potentiométrique en utilisant la méthode de GRAN (9-11).

La figure 7 montre le diagramme de GRAN obtenu pour un dipeptide basique tel que Gly-Gly. La constante de protonation de l'ion acétate ($\log K = 4,5$) étant très peu différente du $\log K$ obtenu pour la fonction carboxylique de petits peptides ($\log K = 3,5$), la présence d'ions acétates peut affecter la forme du diagramme de GRAN. La figure 7 montre un diagramme de GRAN traduisant l'effet des ions acétates au niveau du premier point d'équivalence correspondant à une fonction carboxylique.

Dès lors, on peut distinguer deux points d'équivalence mais la résolution entre ces deux points n'est pas très bonne.

La concentration du ligand est calculée d'après le diagramme de GRAN au moyen de ΔEP qui est proportionnel à la concentration. Par conséquent si le premier point d'équivalence (EP1) subit une distorsion trop grande due à la présence d'acétate, il devient impossible de calculer la concentration en ligand. SUPERQUAD (12) permet de faire face à ce problème en utilisant ce que l'on appelle un "paramètre dangereux" qui tient compte des ions acétates en tant que second ligand. Dans ce cas un affinement mathématique permet d'obtenir la concentration précise de ligand.

2.4. CALIBRATION DE L'ELECTRODE

L'électrode de verre est connectée via un amplificateur à un multimètre THURLBY 109 S. La lecture est donc obtenue en mv. Pour obtenir la conversion en pH, il est nécessaire de connaître deux caractéristiques de l'électrode.

- Sa pente

Les potentiels des tampons KHP (phtalate acide de potassium) et borax sont déterminés, de valeur de pH connue:

$$E_{KHP} = E_0 + b_{pH}KHP$$

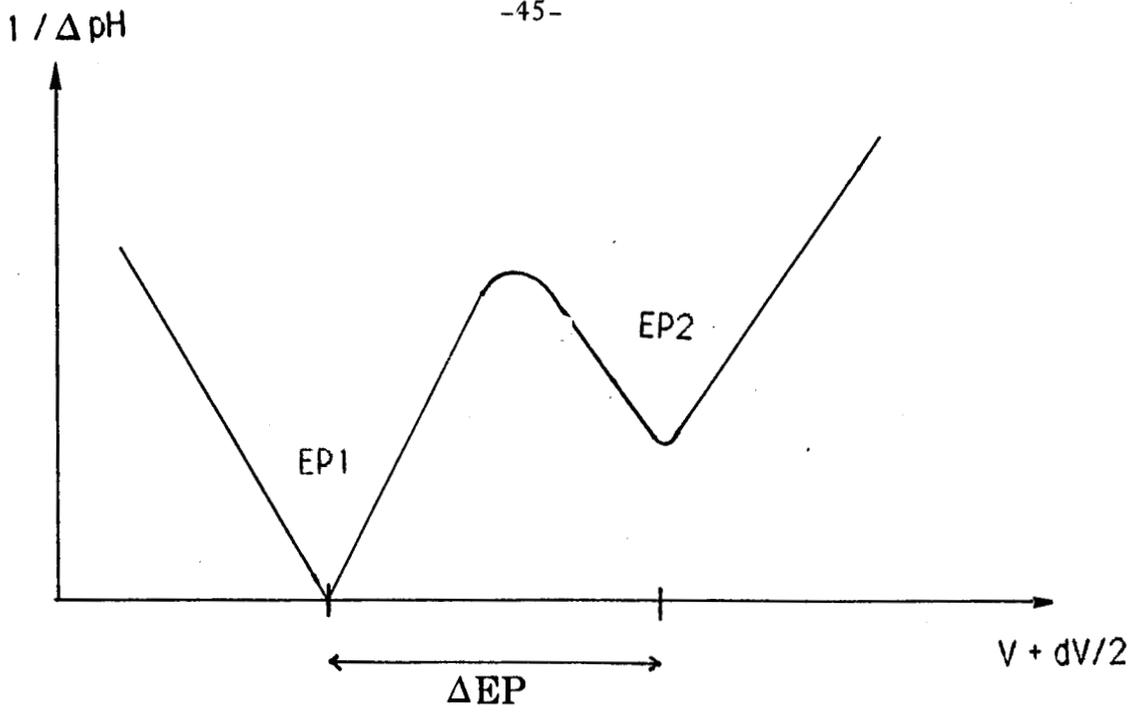
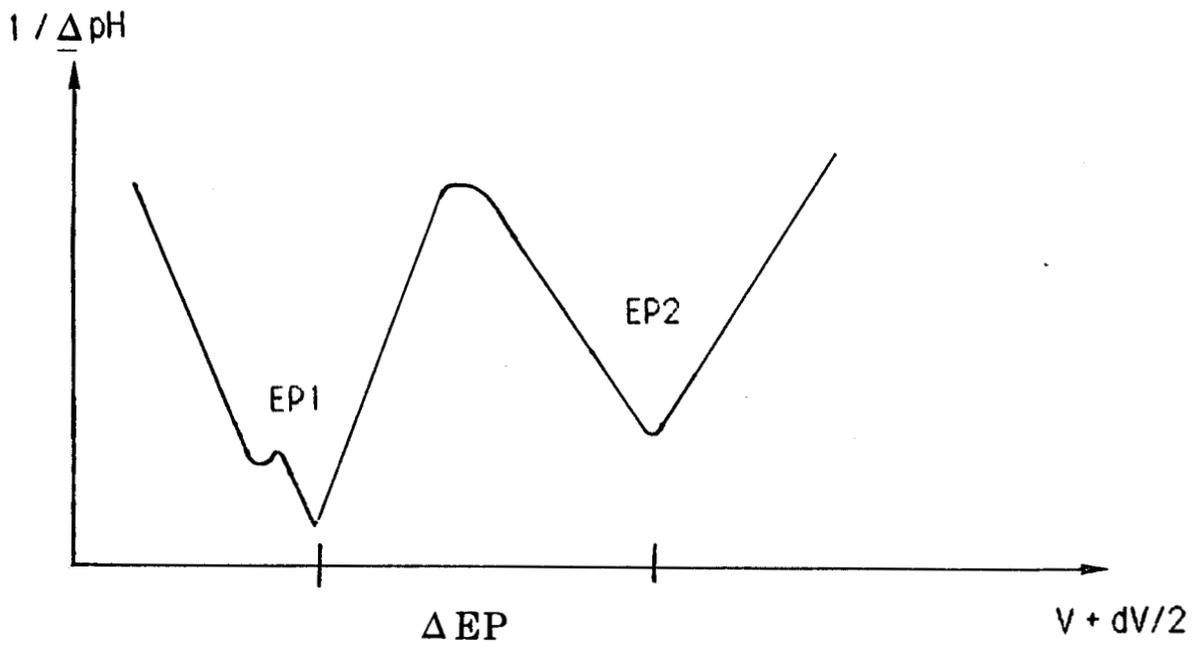


Diagramme de Gran pour un peptide simple dibasique



Effet des ions acétates sur le diagramme de Gran

Figure 7

$$E_{\text{borax}} = E_0 + b\text{pH}_{\text{borax}} \quad \text{d'où } b = (E_{\text{KHP}} - E_{\text{borax}}) / (\text{pH}_{\text{KHP}} - \text{pH}_{\text{borax}})$$

- Le potentiel E_0

Chaque fois, on effectue une titration d'acide fort par la base standardisée. Ces données sont introduites dans SUPERQUAD. La valeur de E_0 est alors trouvée par itération. La validité de cette valeur est vérifiée en faisant "flotter" la valeur de pK_w . Cette valeur doit rester proche de 13,8. Les valeurs de la pente et de E_0 sont alors utilisées pour les titrations de la journée.

- 1 Sheeman & Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1067-1068, (1955)
- 2 Weinstein & Pritchard, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1015, (1972)
- 3 König & Geiger, *Chem. Ber.*, 103, 788, (1970)
- 4 Tam, Wong, Riemen, Tjoeng & Merrifield, *Tetrahedron Letter*, 42, 4033-4036, (1979)
- 5 Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149, (1963)
- 6 Gisin, *Helv. Chimica Acta*, 56, fasc. 5 n° 142-143, 1476-1482, (1973)
- 7 Bernard, Thèse de 3ème Cycle, USTL Lille, (1981)
- 8 Kaiser, Clolescott, Bossinger & Cook, *Anal. Biochem.*, 34, 595, (1970)
- 9 Gran G., *Acta Chem. Scand.*, 4, 559, (1950)
- 10 Gran G., *Analyst*, 77, 661, (1952)
- 11 Rossotti F. J. C. & Rossotti H., *J. Chem. Educ.*, 47 (7), 357, (1965)
- 12 Gans P., Sabatini A. & Vacca A., *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1196, (1985)

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

En examinant les spectres d'absorption et les spectres dichroïques des peptides complexés, trois régions particulières peuvent être mises en évidence:

- Région des transitions électroniques relatives aux orbitales d du métal, transition d-d ($\lambda > 400 \text{ nm}$)
- Région des transitions électroniques par transfert de charge (TC) $230 \text{ \AA} < \lambda < 350 \text{ nm}$
- Région des transitions intraligands de type amide ou acide, $\lambda < 250 \text{ nm}$

Les transitions intraligands des fonctions amides ou acides présentent un spectre trop compliqué pour pouvoir être exploité aisément. De nombreuses bandes se superposent dans cette région spectrale et il est difficile d'extraire les transitions.

Par contre, les deux autres régions correspondant aux transitions TC et d-d fournissent de nombreux renseignements concernant les complexes formés.

1.1. LA TRANSITION d-d

Les différentes transitions électroniques pouvant intervenir sur les couches d du métal complexé, provoquées par le champ des ligands, ont une valeur très importante car elle donne des renseignements sur la structure des complexes formés. Il est donc nécessaire de mettre en évidence certains facteurs influençant l'énergie (λ), l'intensité (ϵ , $\Delta\epsilon$) et le signe de l'effet Cotton de ces transitions.

Le spectre d'absorption dans cette région spectrale, d'une solution qui contient des ions Cu (II), non complexés montre un maximum vers $\lambda = 800 \text{ nm}$ avec $\epsilon = 10 \text{ à } 20 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ caractéristique de l'espèce $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{++}$ (1,2).

La substitution des molécules d'eau en position équatoriale par d'autres atomes donneurs comme l'oxygène (-COOH, C=O) ou l'azote (-NH₂, -NHCO-) provoque un déplacement du λ max vers les plus petites longueurs d'onde (3-5). Cet effet est plus marqué quand le substituant est un atome d'azote. Ceci implique que la substitution d'un atome d'azote provoque une diminution de la longueur d'onde maximale (6,3,7-9).

La longueur d'onde maximale pour les transitions d-d peut être exprimée par la somme des contributions individuelles des quatre atomes donneurs formant avec le Cu (II) un plan carré. Une équation empirique, pour estimer la longueur d'onde maximale des spectres d'absorption des complexes du Cu (II) a été proposée (10).

$$\lambda \text{ max} = 10^3 / 0,301 n_a + 0,342 n_b + 0,453 n_c + 0,485 n_d$$

où n_a , n_b , n_c et n_d sont respectivement les nombres d'atomes donneurs de type O (peptide, H₂O, -OH), O (carboxylate), N (amino), N (peptide). Il faut remarquer que cette relation n'est pas valable dans le cas d'interactions apicales. Dans le tableau suivant sont rassemblées quelques valeurs de λ max calculées pour différents complexes.

Groupes complexants	λ max calculés (nm)
4 H ₂ O	830
2 COO ⁻ , 1 COO ⁻ , 1 NH ₂	715
2 COO ⁻ , 2 NH ₂	628
2 H ₂ O, 1 COO ⁻ , 1 amide déprotonée	694
2 H ₂ O, 2 amides déprotonées	636
4 amides déprotonées	515
1 NH ₂ , 3 amides déprotonées	524

Cette équation appliquée sur plusieurs systèmes cuivriques avec une bonne concordance, reste cependant empirique et donc suspectée d'une certaine erreur.

D'un point de vue structural, les complexes avec le Cu (II) présentent une distorsion octaédrique: quatre ligands (liaisons courtes) sont dans le plan de coordination et deux ligands (liaisons longues) en position axiale (9,11-14).

Pour les complexes cuivriques, l'activité optique des transitions d-d est due essentiellement à un effet de conformation du chélate et / ou aux interactions vicinales entre le métal et les centres asymétriques du ligand (16).

LARSEN et OLSEN (17) ont proposé que l'effet Cotton dans les transitions d-d du métal n'est mesurable que si le ligand asymétrique forme un chélate avec le métal. Cette hypothèse n'est pas toujours vérifiée car certains systèmes de ligands monodentés présentent néanmoins une activité optique (18,19).

D'autre part, l'activité optique résultante est plus importante lorsqu'un centre asymétrique appartient lui-même aux chaînons du chélate. En effet, les peptides (formés d'acides aminés sans chaîne latérale) forment avec les ions cuivriques des chélates à 5 chaînons qui sont plus ou moins plans (21).

Le ligand chélaté peut prendre suivant la position axiale ou équatoriale du groupement R, deux conformations extrêmes qui sont en équilibre. Dans le cas où ces deux conformations sont en quantités égales, il y a absence d'activité optique. Au contraire quand une des deux conformations est favorisée, elle entraîne l'apparition d'activité optique (22-24).

1.2. TRANSITIONS PAR TRANSFERT DE CHARGE (TC)

Les bandes de transfert de charge sont souvent observées comme des épaulements dans les spectres d'absorption en raison de la présence des transitions électroniques intraligands dans ce domaine.

- Transfert amide ----> Cu (II)

Dans les complexes cuivriques où la fonction amide participe à la complexation sous forme déprotonée, une bande de transfert de charge apparaît vers 290 - 330 nm (5, 7, 25-27).

- Transfert acide ----> Cu(II)

Les complexes du Cu (II) avec les aminoacides (22, 28-33) présentent dans leurs spectres une bande d'absorption vers 240 - 270 nm, mais celle-ci est parfois difficile à observer avec les peptides.

Des études récentes faites dans notre laboratoire (34) ont montré l'importance et la spécificité de la fonction β -carboxylate portée par la chaîne latérale de l'acide aspartique et son rôle dans la formation de chélates avec les métaux de transition tel que le Cu (II).

L'influence de la position de l'acide aspartique dans les oligopeptides sur la formation de tels complexes a aussi été étudiée sur les tétrapeptides suivants :

Asp-Ala-Ala-Ala

Ala-*Asp*-Ala-Ala

Ala-Ala-*Asp*-Ala

Ala-Ala-Ala-*Asp*

D'autre part pour préciser le rôle spécifique de la fonction β carboxylate portée par la chaîne latérale des acides aminés, les résidus incluant un résidu d'acide glutamique à la place de l'acide aspartique ont été étudiés.

Si l'on considère le tétrapeptide *Asp*-Ala-Ala-Ala, la chaîne latérale portant la fonction β carboxylate se trouve en première position dans la chaîne peptidique. Si l'on se réfère au système tétraalanine, les résultats potentiométriques montrent un accroissement de stabilité de l'espèce CuL (I N). La formation de ce complexe est aussi détectée spectroscopiquement. Par contre on observe aucune modification en ce qui

concerne les espèces 2 N, 3 N et 4 N. Ceci montre, d'une part, que la fonction β carboxylate portée par la chaîne latérale de l'acide aspartique est impliquée dans la formation de l'espèce à un azote et d'autre part que la fonction β carboxylate portée par la chaîne latérale ne peut en aucun cas être impliquée de façon simultanée dans la formation d'un complexe avec un azote d'une liaison peptidique voisine (figure a).

Comme il a déjà été montré avec le fragment N terminal du fibrinopeptide A (35), quand l'acide aspartique est placé en seconde position dans la chaîne peptidique, on observe un accroissement considérable de la stabilité de l'espèce CuH-1L à deux azotes qui se trouve être l'espèce majoritaire dans le domaine de pH 5 - 9. L'implication de la fonction β carboxylate dans ce complexe rend la déprotonation de la seconde fonction amide impossible avant pH 8,5 soit deux unités de pH de plus qu'avec le système tétraalanine (figure b).

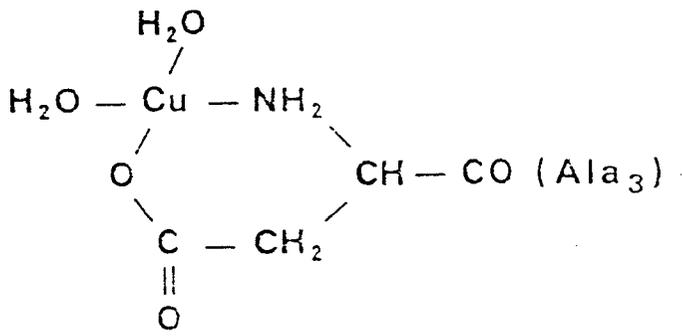
Lorsque l'acide aspartique occupe la 3^{ème} position dans le térapeptide, c'est cette fois l'espèce à trois azotes CuH-2L qui est fortement stabilisée (36). Cette espèce est prépondérante dans le domaine de pH 5-10 et le complexe est beaucoup plus stable qu'avec le système tétraalanine (figure c).

Enfin, avec Ala-Ala-Ala-Asp en potentiométrie, la distribution des espèces est sensiblement la même qu'avec le système tétraalanine. On constate cependant que la stabilité du complexe à un azote se trouve légèrement augmentée par rapport au tétraalanine sans toutefois que ceci puisse être expliqué par la participation de la chaîne latérale COOH de l'acide aspartique en 4^{ème} position dans la séquence.

En ce qui concerne les térapeptides contenant l'acide glutamique en 1^{ère}, 2^{ème} ou 3^{ème} position, on constate de façon générale que les complexes formés ne diffèrent pas de façon significative de ceux formés avec tétraalanine. La stabilisation, par l'intermédiaire de la fonction γ -carboxylate, des complexes, bien moins marquée qu'avec l'acide aspartique était attendue. En effet, dans le cas de l'acide glutamique, l'implication de la fonction carboxylate nécessite la formation de chélates à 7 chaînons, beaucoup moins stables que les chélates à 6 chaînons observés avec l'acide aspartique.

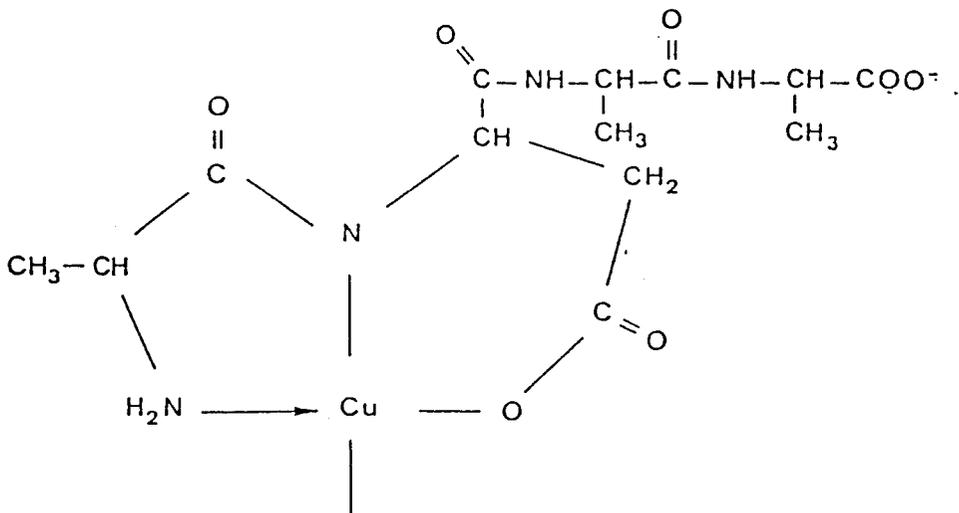
Connaissant la capacité et la spécificité de stabilisation, des complexes formés avec le Cu (II), de la chaîne latérale de l'acide aspartique, nous avons dans un premier temps choisi d'étudier la complexation de l'hexadécapeptide fibrinopeptide A et de comparer les résultats avec ceux obtenus précédemment avec le fragment N terminal de ce même peptide.

Dans un deuxième temps, il était alors intéressant d'étudier la complexation de tétrapeptides et tripeptide comprenant respectivement 2 ou 3 résidus d'acide aspartique dans leur séquence. Nous avons réalisé cette étude avec les tétrapeptides *Asp-Ala-Ala-Asp*, *Ala-Asp-Ala-Asp*, *Ala-Ala-Asp-Asp*, *Ala-Asp-Asp-Ala* et enfin le tripeptide *Asp-Asp-Asp*.



Cu L

Figure a
Espèce 1N de Asp.A.A.A:Cu(II)



Cu H₋₁ L

Figure b
Espèce 2N de A.Asp.A.A:Cu(II)

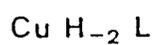
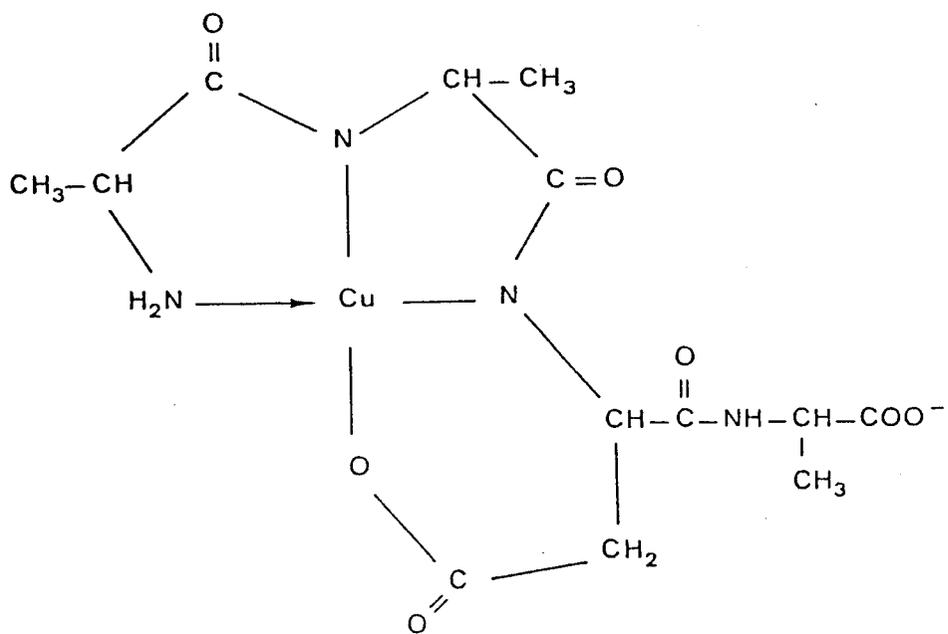


Figure C

Espèce 3N de A.A.AsP.A:Cu(II)

2. ETUDE DE LA COMPLEXATION DU FIBRINOPEPTIDE A AVEC LE CUIVRE(II)

Lors de l'attaque du fibrinogène par la thrombine, dans le processus de coagulation du sang qui intervient lorsqu'un vaisseau sanguin est endommagé, il y a libération simultanée de fibrine et des deux fibrinopeptides A et B. Lors de la formation du caillot, à l'emplacement de la blessure, la concentration locale des fibrinopeptides est élevée et il peut y avoir alors compétition avec les molécules de sérum albumine dans l'interaction avec des ions métalliques, en particulier avec le cuivre (II). Dans cette optique, il était intéressant d'étudier le pouvoir de complexation du fibrinopeptide A qui est l'hexadécapeptide:

Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg

Des travaux récents (35) réalisés au laboratoire montrent que des ions métalliques tels que le Cu (II) et le Ni (II) peuvent former des complexes avec le fragment N terminal du fibrinopeptide A et que la complexation débute par l'extrémité NH₂ terminale du tétrapeptide. La présence d'un résidu d'acide aspartique en deuxième position dans la séquence peptidique cause la formation d'un complexe à deux azotes très stable. Cette grande stabilité de l'espèce CuH-₁L résulte de l'implication de la chaîne latérale carboxylate portée par ²Asp, de façon très spécifique avec le Cu (II). Le fragment N terminal du fibrinopeptide A étudié précédemment pouvait modéliser la complexation avec l'extrémité N terminale, mais ceci supposait que l'on admette d'une part, que le peptide original ne possède pas de structure organisée en solution capable d'empêcher la complexation, et d'autre part, qu'il n'existe pas dans la molécule de sites pouvant entrer en compétition avec les quatre premiers acides aminés.

Ces suppositions semblaient raisonnables, mais il était intéressant d'étudier la complexation de l'hexadécapeptide.

Les résultats obtenus montrent que les petits peptides peuvent être utilisés comme modèles de structures peptidiques plus complexes.

2.1. RESULTATS POTENTIOMETRIQUES

Les constantes de protonation pour le fibrinopeptide A sont données dans le tableau 1.

La première constante se rapporte à la constante de protonation (KHL) de l'azote du groupe NH₂ terminal alors que les autres constantes se rapportent à la protonation des fonctions carboxylates. Le fibrinopeptide A comporte dans sa séquence 5 fonctions de ce type (2 Asp, 2 Glu et la fonction carboxylique terminale) par conséquent les équilibres de protonation de ces groupes se recouvrent considérablement.

Les constantes de stabilité des complexes avec le Cu (II) ainsi que la distribution des espèces sont données respectivement dans le tableau 1 et la figure 1

On note la présence de 4 espèces, successivement CuL, CuH-₁L, CuH-₂L et CuH-₃L. Les deux espèces CuL et CuH-₂L bien que présentes en solution, sont très minoritaires. Comme avec le fragment N terminal du fibrinopeptide A, on note une très forte stabilisation de l'espèce CuH-₁L dans le rang de pH 5 - 9. Le même type d'observation a déjà été fait avec le tétrapeptide Ala-Asp-Ala-Asp

2.2. ETUDES SPECTROSCOPIQUES

Les valeurs des paramètres spectroscopiques indiquent la formation de deux types de complexes avec le Cu (II) (tableau 2). Les espèces CuH-₁L et CuH-₃L apparaissent comme majoritaires en solution. Ces deux complexes sont les mêmes que ceux observés avec le tétrapeptide modèle Ala-Asp-Ser-Gly.

Les spectres de dichroïsme circulaire (figure 3 et 4) à pH 6 montrent une bande négative à 638 nm correspondant à une transition d-d. Dans la région U.V, on note une première bande négative à 300 nm et une deuxième bande positive à 252 nm. Ces deux bandes dichroïques correspondent respectivement à un transfert de charge N⁻ (amide) ----> Cu (II) et à un transfert de charge NH₂ (amine) ----> Cu (II). A ce même pH les

paramètres calculés d'après le spectre R.P.E montrent que l'on est en présence d'un complexe faisant intervenir 2 azotes.

A pH 9, le spectre dichroïque dans la région visible montre une bande d-d à 530 nm mais on remarque aussi la présence d'un épaulement à 630 nm, ceci traduit la présence de deux espèces. La même chose est constatée en spectroscopie d'absorption et sur les spectres R.P.E (figure 2).

Lorsque le pH a atteint 10,5, on note sur les spectres de dichroïsme circulaire un inversement des effets Cotton des bandes de transfert de charge (par rapport à pH 6) dans la région U.V, traduisant un changement dans la nature du complexe formé. Les paramètres déduits des spectres d'absorption et de R.P.E suggèrent la formation d'une espèce à 4 azotes.

2.3. CONCLUSION

Les résultats obtenus avec l'hexadécapeptide se révèlent être identiques à ceux obtenus avec le tétrapeptide modèle. Ceci montre que, même si le fibrinopeptide A possède de par sa taille une structure organisée en solution, celle-ci ne gêne pas la complexation.

Dans les deux cas, la complexation débute toujours par l'extrémité N terminale, l'hexadécapeptide ne possédant pas dans sa séquence d'acides aminés comme la cystéine ou l'histidine dont la chaîne latérale puisse servir de point d'ancrage pour la complexation.

De la même façon, on remarque que c'est la présence du résidu d'acide aspartique en deuxième position qui stabilise le complexe à deux azotes par l'intermédiaire de sa fonction β carboxylate.

L'acide aspartique se trouve donc être un résidu spécifique en ce qui concerne la complexation avec le cuivre (II).

Cette conclusion inspire l'étude de systèmes plus complexes mettant en jeu 2 ou 3 résidus d'acide aspartique.

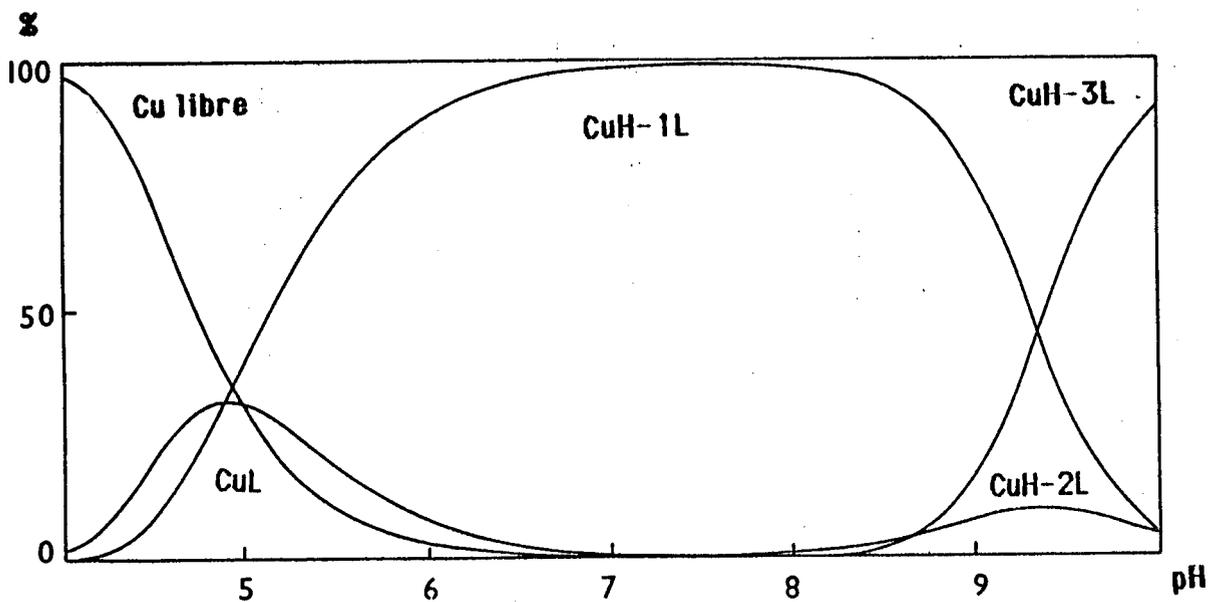
CHAPITRE II

Complexation avec le cuivre (II)

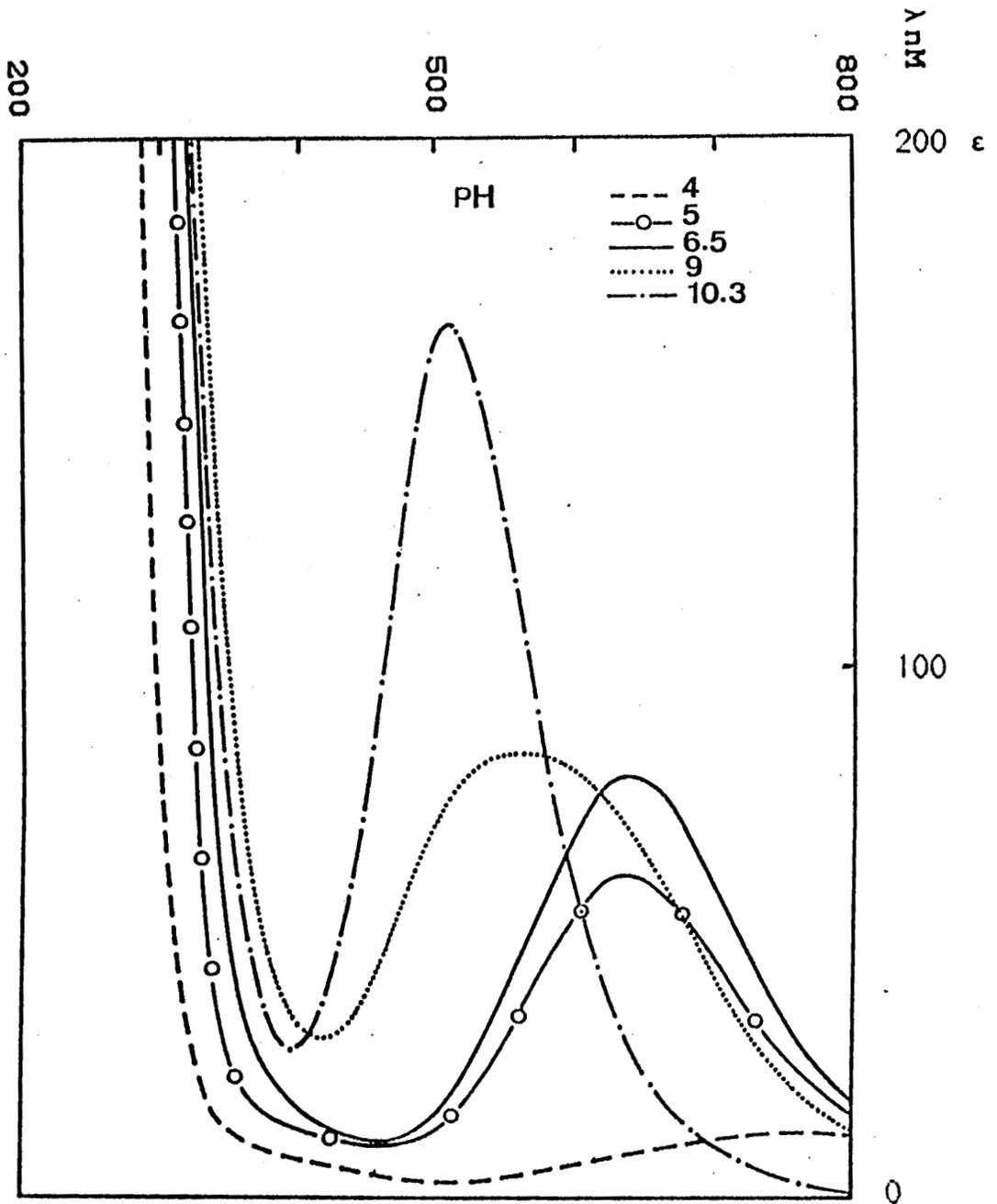
Tableau 1: Constantes de protonation du fibrinopeptide A et constantes de stabilité des complexes du Cu(II) (exprimées en terme de Log β)

Ligand	LH	LH ₂	LH ₃	LH ₄	LH ₅
Fibrinopeptide A	8.4	13.43	17.74	21.36	24.86

Ligand	CuL	CuH-1L	CuH-2L	CuH-3L
Fibrinopeptide A	7.31	2.4	-7.60	-16.3
Ala-Asp-Ser-Gly	6.63	2.16	-7.41	-16.77



Courbes de répartition des espèces
Fibrinopeptide A / Cu(II)
rapport 1
figure 1



Spectre d'absorption du fibrinopeptide A : Cu(II) rapport 1/1

Figure 2

Tableau 2

Données spectroscopiques pour le système fibrinopeptide A / Cu(II)

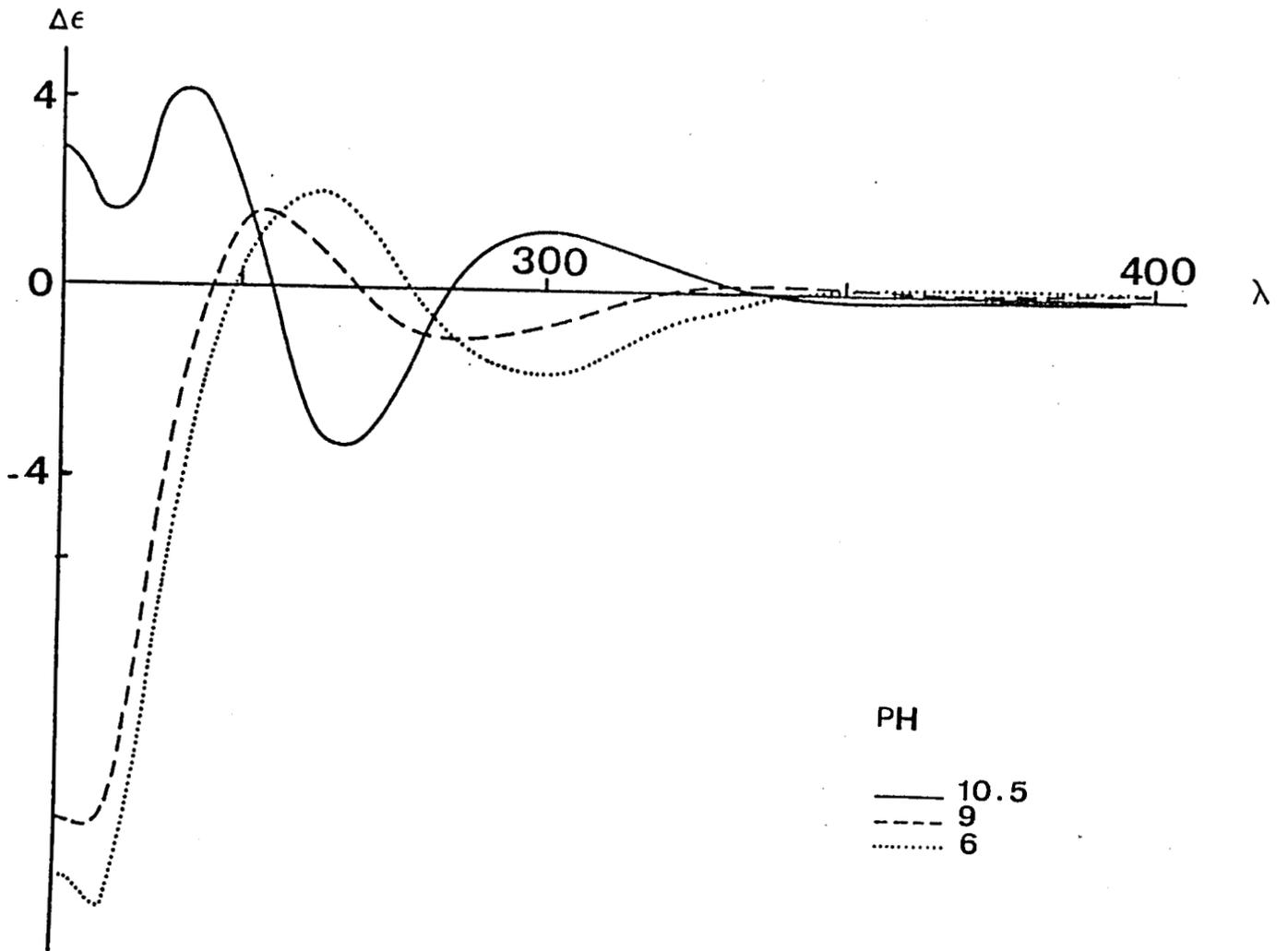
Ligand	Espèces	λ_{Visible} nm ^a	D.C nm $\Delta\epsilon$	R.P.E g//	A//
Ala-Asp-Ser-Gly	(CuH ₁ L)	630 (83)	615 (+0.07) ^b 300 (-0.75) ^c 262 (+0.60) ^d	2.26	185
	(CuH ₃ L)	506 (150)	522 (-0.90) ^b 298 (+0.75) ^c 270 (-0.50) ^d	2.18	210
Ala-Asp-OBut-Ser-Gly	(CuH ₁ L)	648 (52)	642 (-0.19) ^b 310 (+0.08) ^c 268 (-0.23) ^d	2.23	175
	(CuH ₂ L)	580 (104)	566 (-0.44) ^b 310 (+0.47) ^c 274 (-0.34) ^d	2.19	195
	(CuH ₃ L)	510 (147)	522 (-0.85) ^b 302 (+0.39) ^c 268 (-1.88) ^d	2.16	210
Fibrinopeptide A	(CuH ₁ L)	638 (80)	640 (-0.49) ^b 300 (-2.00) ^c 252 (+2.45) ^d	2.245	178
	(CuH ₃ L)	508 (164)	523 (-3.50) ^b 298 (+1.50) ^c 267 (-3.80) ^d	2.170	210

a : coefficient d'extinction molaire

b : B+E d-d transition

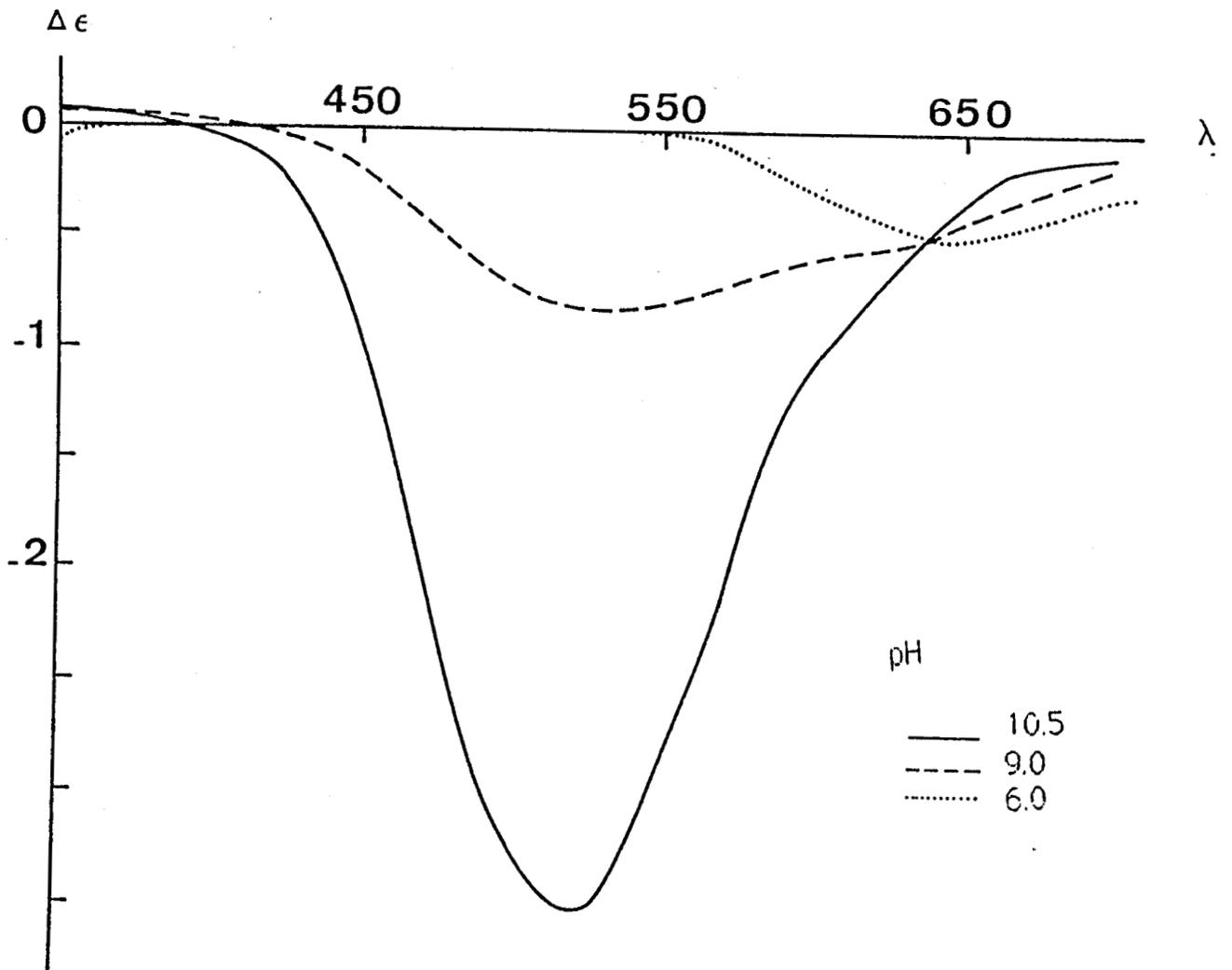
c : transfert de charge N⁻ ----> Cu(II)

d : transfert de charge NH₂ ----> Cu(II)



Specre dichroïque U.V. du fibrinopeptide A : Cu(II) rapport 1/1

Figure 3



Spectre dichroïque visible du fibrinopeptide A : Cu(II) rapport 1/1

Figure 4

3. ETUDE DE LA COMPLEXATION AVEC LE CU (II) DE TETRAPEPTIDES COMPRENANT DEUX MOTIFS ASPARTIQUES

3.1. *Asp-Ala-Ala-Asp* / Cu (II)

Les études potentiométriques montrent l'existence de quatre espèces: CuL, CuH-1L, CuH-2L et CuH-3L (figure 5).

A bas pH, le premier complexe formé est l'espèce CuL. Si l'on considère la constante de formation de ce complexe (tableau 3), on remarque qu'elle est similaire à celle trouvée pour Asp-Ala-Ala-Ala, tout en étant très supérieure à la constante de formation de CuL relative au système tétraalanine. L'espèce CuL se trouve donc stabilisée.

Les données spectroscopiques (dichroïsme circulaire) ne montrent pas de bande de transfert de charge à 300 nm, donc la participation de l'azote d'une liaison amide dans le complexe est à exclure. Par contre, on remarque un léger épaulement à 238 nm suggérant un transfert de charge $\text{COO}^- \rightarrow \text{Cu (II)}$ et une autre bande négative due à un transfert de charge $\text{NH}_2 \rightarrow \text{Cu (II)}$ (figure 6 et 7).

Par ailleurs, les autres données spectroscopiques (absorption et résonance paramagnétique électronique) indiquent la formation d'un complexe à 1 azote (tableaux 5 et 6).

Toutes les données montrent que l'espèce CuL (indétectable spectroscopiquement dans le système tétraalanine), résulte de la formation d'un complexe impliquant d'une part, la fonction amine terminale et d'autre part la fonction β carboxylate du premier acide aspartique. L'accroissement de stabilité de l'espèce à 1 N est due à la présence de la fonction β carboxylate.

Dans les domaines de pH supérieurs, la potentiométrie et la spectroscopie montrent l'apparition successive des 3 espèces CuH-1L, CuH-2L et CuH-3L.

Les constantes de formation de ces espèces sont très proches de celles trouvées tant avec Asp-Ala-Ala-Asp qu'avec le système tétraalanine.

D'autre part en spectroscopie, on constate la disparition de la bande de transfert de charge correspondant à la transition $\text{COO}^- \rightarrow \text{Cu (II)}$ dès pH 6,6, mais on note l'apparition d'une bande de transfert de charge vers 305 nm due à la transition $\text{N}^- \rightarrow \text{Cu (II)}$.

Toutes les données spectroscopiques (tableaux 4, 5 et 6) montrent que les espèces CuH-1L , CuH-2L et CuH-3L sont respectivement des espèces à 2, 3 et 4 azotes.

Enfin en ce qui concerne l'espèce CuH-3L , la constante formation relative à ce complexe est identique à celle observée pour tétraalanine. La présence d'une fonction β carboxylate en quatrième position dans la chaîne peptidique ne paraît donc pas avoir d'influence sur la stabilité de l'espèce formée.

CONCLUSION

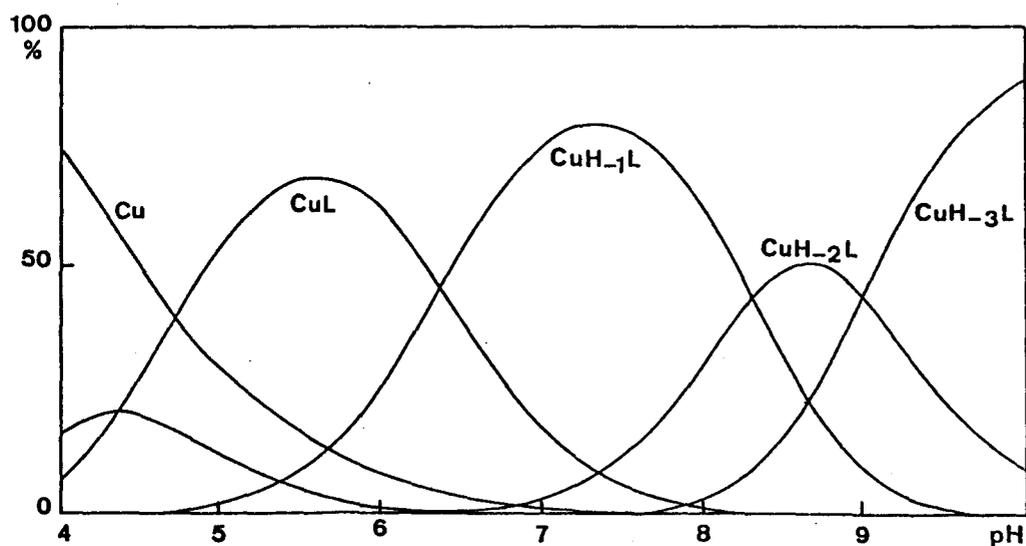
L'apparition d'une espèce à 1 azote détectable spectroscopiquement met en évidence la participation de la fonction β carboxylate dans la stabilisation du complexe.

La fonction β carboxylate du résidu d'acide aspartique en quatrième position dans la séquence peptidique n'engendre pas de stabilisation accrue de l'espèce à 4 azotes, cette fonction ne doit donc pas être impliquée dans la formation de cette espèce.

Tableau 3 : Constantes de formation des complexes de Asp-Ala-Ala-Asp avec le Cu(II) comparées à celles d'autres tétrapeptides.

Log β des valeurs

Ligand	(CuHL)	(CuL)	(CuH ₋₁ L)	(CuH ₋₂ L)	(CuH ₋₃ L)
Asp-Ala-Ala-Asp	11.18(5)	6.83(2)	0.44(5)	-7.89(6)	-16.89(6)
Asp-Ala-Ala-Ala	-	6.04(2)	-0.34(2)	-7.82(2)	-16.88(3)
Ala-Ala-Ala-Asp	-	5.46(3)	-0.41(2)	-7.95(3)	-17.29(4)
Ala-Ala-Ala-Ala	-	4.77	-0.45	-8.09	-17.53



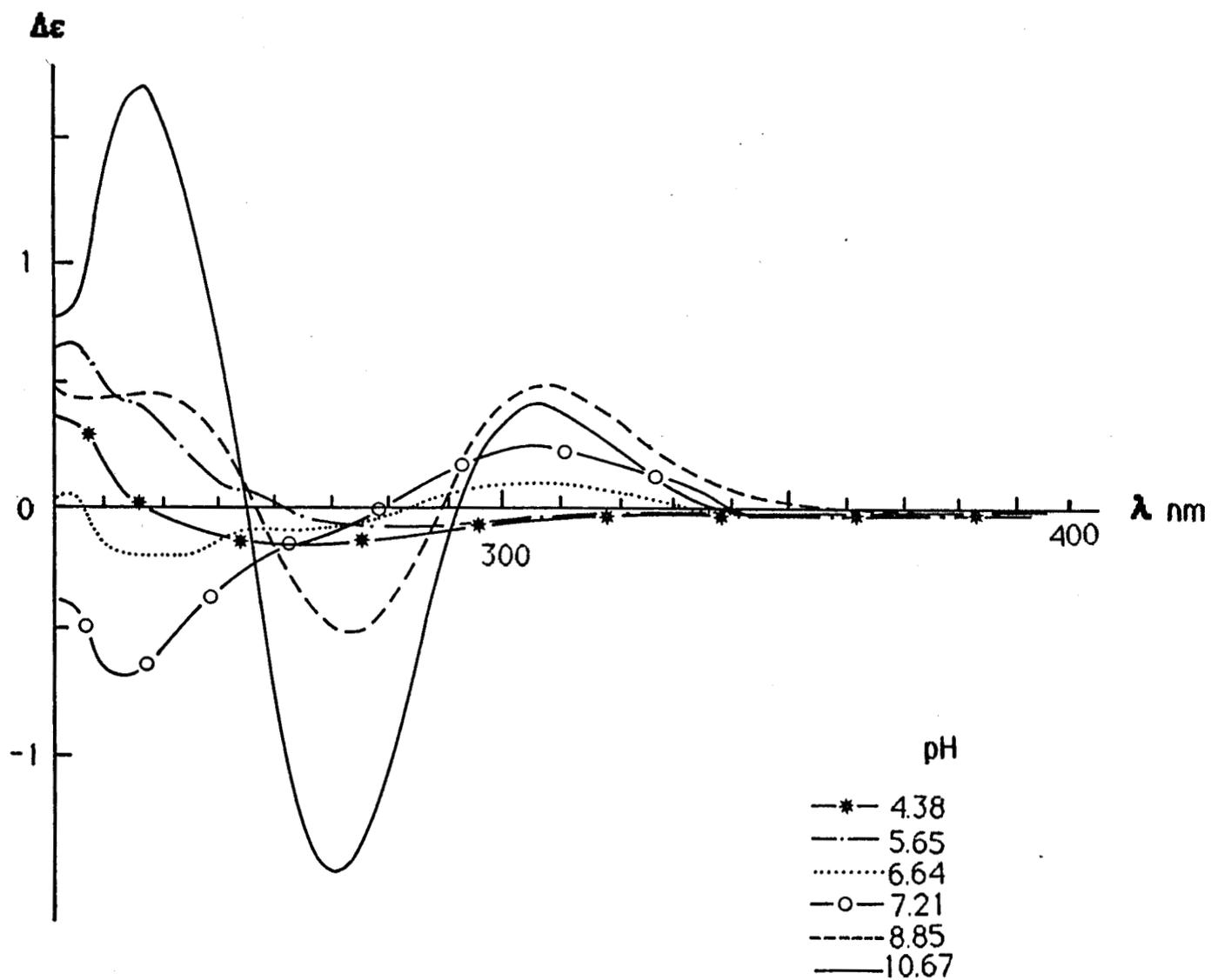
Courbe de distribution des espèces
Asp-Ala-Ala-Asp / Cu(II) rapport 1
figure 5

TABLEAU 4 : Valeurs des maxima en dichroïsme circulaire pour le système Asp-Ala-Ala-Asp / Cu(II). $c = 2.10^{-3}$ M/l

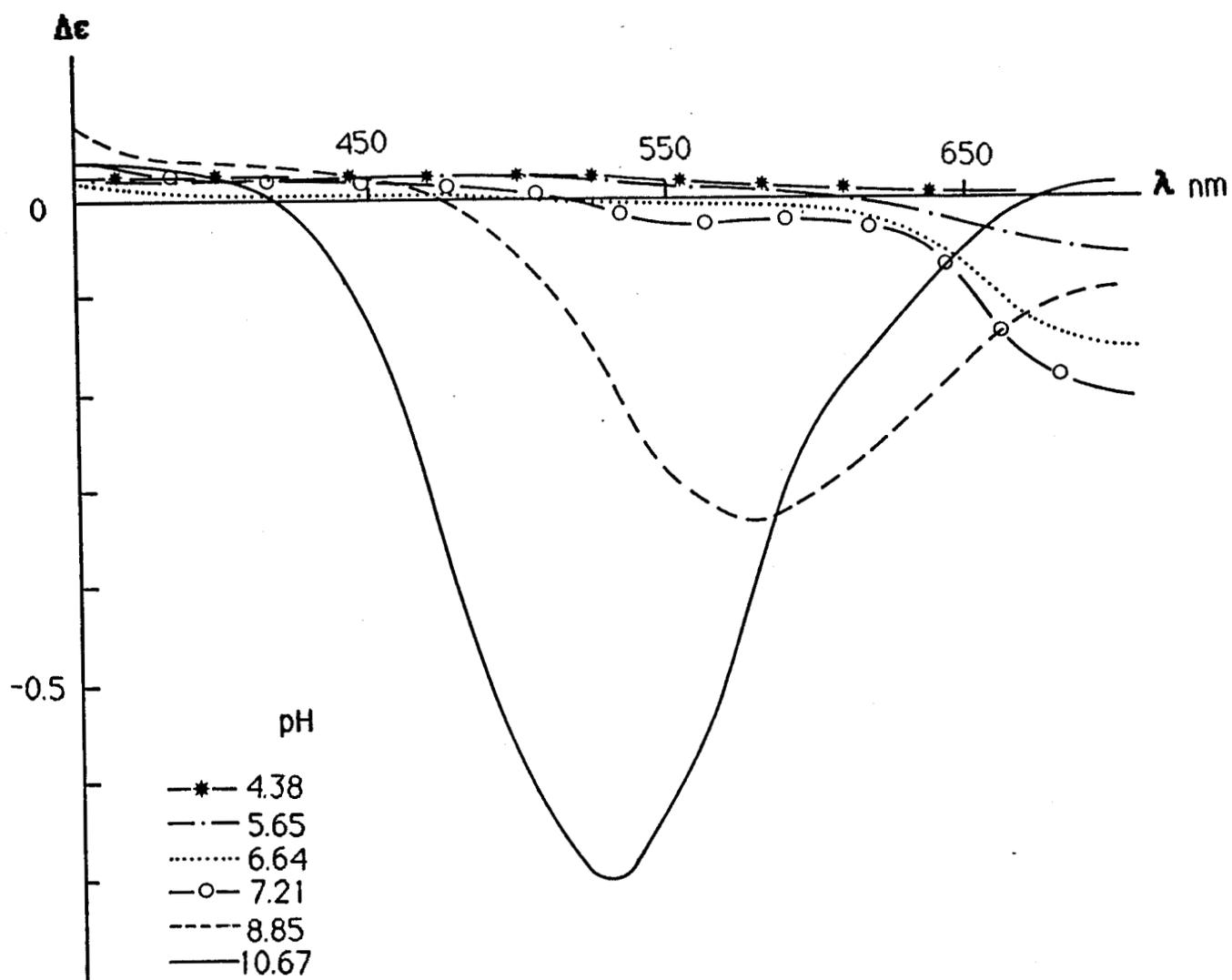
pH	λ_{\max} (nm)	$\Delta\epsilon$	Attribution	Espèce
5.65	700	-0.1	Transitions B et E	
	280	-0.1	TC NH ₂ ----> Cu(II)	1N
	240	+0.48	TC COO ⁻ ----> Cu(II)	
7.21	700	-0.25	B	
	555	-0.05	E	
	305	+0.15	TC N ⁻ ----> Cu(II)	2N
	270	-0.2	TC NH ₂ ----> Cu(II)	
8.85	570	-0.35	Transitions B et E	
	310	+0.50	TC N ⁻ ----> Cu(II)	
	275	-0.45	TC NH ₂ ----> Cu(II)	3N
	240	+0.50	Intralligand	
10.67	530	-0.70	Transitions B et E	
	305	+0.45	TC N ⁻ ----> Cu(II)	4N
	270	-1.50	TC NH ₂ ----> Cu(II)	

TABLEAU 6 : Valeurs des paramètres λ_{\max} et ϵ calculées à partir des spectres d'absorption

pH	λ_{\max}	ϵ	Espèce
5.50	705	35	1N
7.40	650	82	2N
8.80	567	131	3N
11.0	518	164	4N



Spectre dichroïque U.V de Asp-Ala-Ala-Asp / Cu(II) rapport 1
figure 6



Spectre dichroïque visible de Asp-Ala-Ala-Asp / Cu(II) rapport 1
figure 7

TABLEAU 5 : Valeurs des paramètres A// et g// calculées à partir des spectres de R.P.E

pH	A//	g//	Espèce
5.50	150	2.310	1N
7.400	170	2.240	2N
8.85	187	2.200	3N
11.04	207	2.172	4N

3.2. *Ala-Asp-Ala-Asp / Cu (II)*

Là encore, les études potentiométriques montrent l'existence de 4 espèces, bien que les stabilités des espèces formées diffèrent de façon significative (tableau 7 et figure 9).

A bas pH, le premier complexe formé correspond à l'espèce CuL . Celle-ci de stabilité faible ne peut être détectée spectroscopiquement, tout comme dans le système tétraalanine. On constate cependant que la constante de stabilité de l'espèce CuL est relativement plus élevée que celle observée avec tétraalanine, ceci pouvant provenir de la conformation adoptée par le peptide en solution.

Lorsque le pH augmente, on note la formation de l'espèce $CuH-1L$, très stable dans le domaine de pH 6 - 9. Si l'on considère la constante de formation de cette espèce (tableau 7), on remarque qu'elle est similaire à celles trouvées pour les peptides *Ala-Asp-Ala-Ala*, le fragment N terminal du fibrinopeptide A et le fibrinopeptide A lui-même. Par rapport au système tétraalanine, la stabilité de l'espèce $CuH-1L$ se trouve considérablement accrue. Ceci implique donc, comme pour les peptides cités précédemment, une participation de la fonction β carboxylate dans la formation du complexe.

Quand le pH augmente, il y a apparition successive des espèces $CuH-2L$ (par ailleurs indétectable spectroscopiquement) et $CuH-3L$. On peut noter que les constantes de stabilité de ces deux espèces sont très proches de celles trouvées pour *Ala-Asp-Ala-Ala* et *Ala-Asp-Ser-Gly*. Il n'y a par conséquent pas d'accroissement de stabilité de ces deux espèces et donc le résidu d'acide aspartique en quatrième position dans la séquence peptidique ne participe pas à la stabilisation de ces deux complexes.

En spectroscopie d'absorption (tableau 8 et figure 10), entre pH 6,13 et 8,7, le maximum d'absorption de la transition d-d se situe à 630 nm soit à une valeur très légèrement inférieure à celle normalement attendue pour un complexe à 2 azotes (39).

Lorsque le pH augmente le maximum d'absorption de la transition d-d atteint la valeur de 525 nm caractéristique du complexe à 4 azotes.

Les spectres de dichroïsme circulaire à pH 7, montrent dans la région visible une bande négative à 610 nm et une bande positive à 580 nm correspondant aux transitions d-d du métal (tableau 9, figures 11 et 12).

Les bandes de transfert de charge à 300 et 260 nm correspondent respectivement à un transfert de charge $N^- \rightarrow Cu(II)$ et à un transfert de charge $NH_2 \rightarrow Cu(II)$.

les spectres RPE à pH 7 sont caractéristiques de l'espèce à 2 azotes tandis qu' à pH 10 ils correspondent à l'espèce à 4 azotes (tableau 10).

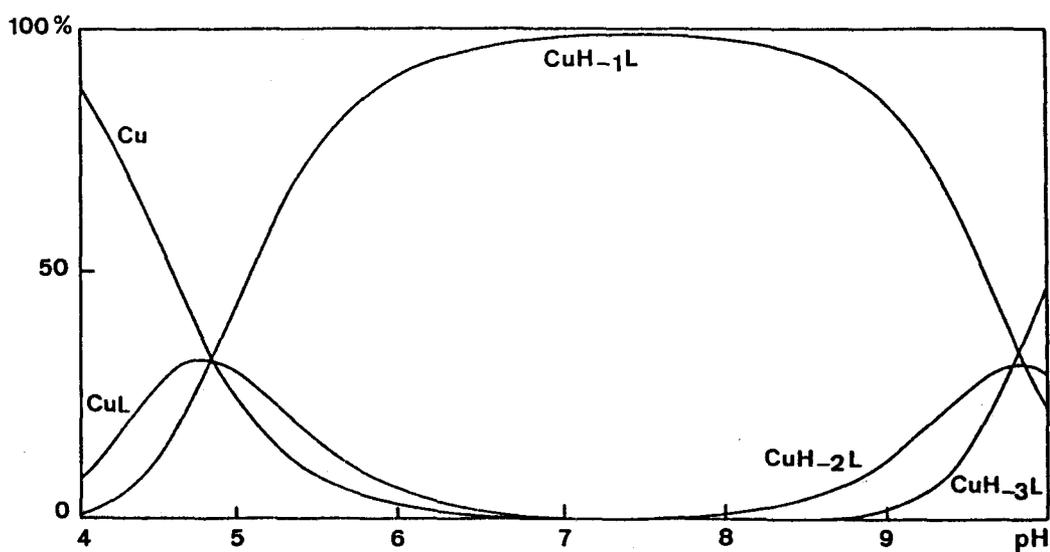
CONCLUSION

L'ensemble des données potentiométriques et spectroscopiques montrent clairement que l'espèce $CuH-1L$, complexe à 2 azotes, est comme pour $Ala-Asp-Ala-Ala$, fortement stabilisée, ceci résultant de la participation de la fonction β carboxylate à la structure du complexe.

De plus les résultats montrent clairement qu'il n'y a pas de différence de stabilité, en ce qui concerne les complexes à 3 et 4 azotes, par rapport au tétraalanine; il est donc clair que la fonction β carboxylate du résidu d'acide aspartique en 4 ème position dans la séquence peptidique, n'est pas impliquée dans la complexation.

TABLEAU 7 : Constantes de formation des complexes de Ala-Asp-Ala-Asp comparées à celles d'autres térapeptides.

Ligand	(CuHL)	(CuL)	(CuH ₁ L)	(CuH ₂ L)	(CuH ₃ L)
Ala-Asp-Ala-Asp	10.67(5)	7.11(1)	2.27(1)	-7.58(1)	-17.37(1)
Ala-Asp-Ala-Ala	-	6.27(5)	1.97(1)	-7.77(3)	-17.65(2)
Ala-Ala-Ala-Asp	-	5.46(3)	-0.41(2)	-7.95(3)	-17.29(4)
Ala-Asp-Ser-Gly	-	6.63(2)	2.16(1)	-7.41(2)	-16.77(1)
Ala-Ala-Ala-Ala	-	4.77	-0.45	-8.09	-17.33



Courbes de distribution des espèces
Ala-Asp-Ala-Asp / Cu(II) rapport 1

figure 9

TABLEAU 8 : Valeurs des paramètres λ_{\max} et ϵ calculées à partir des spectres d'absorption

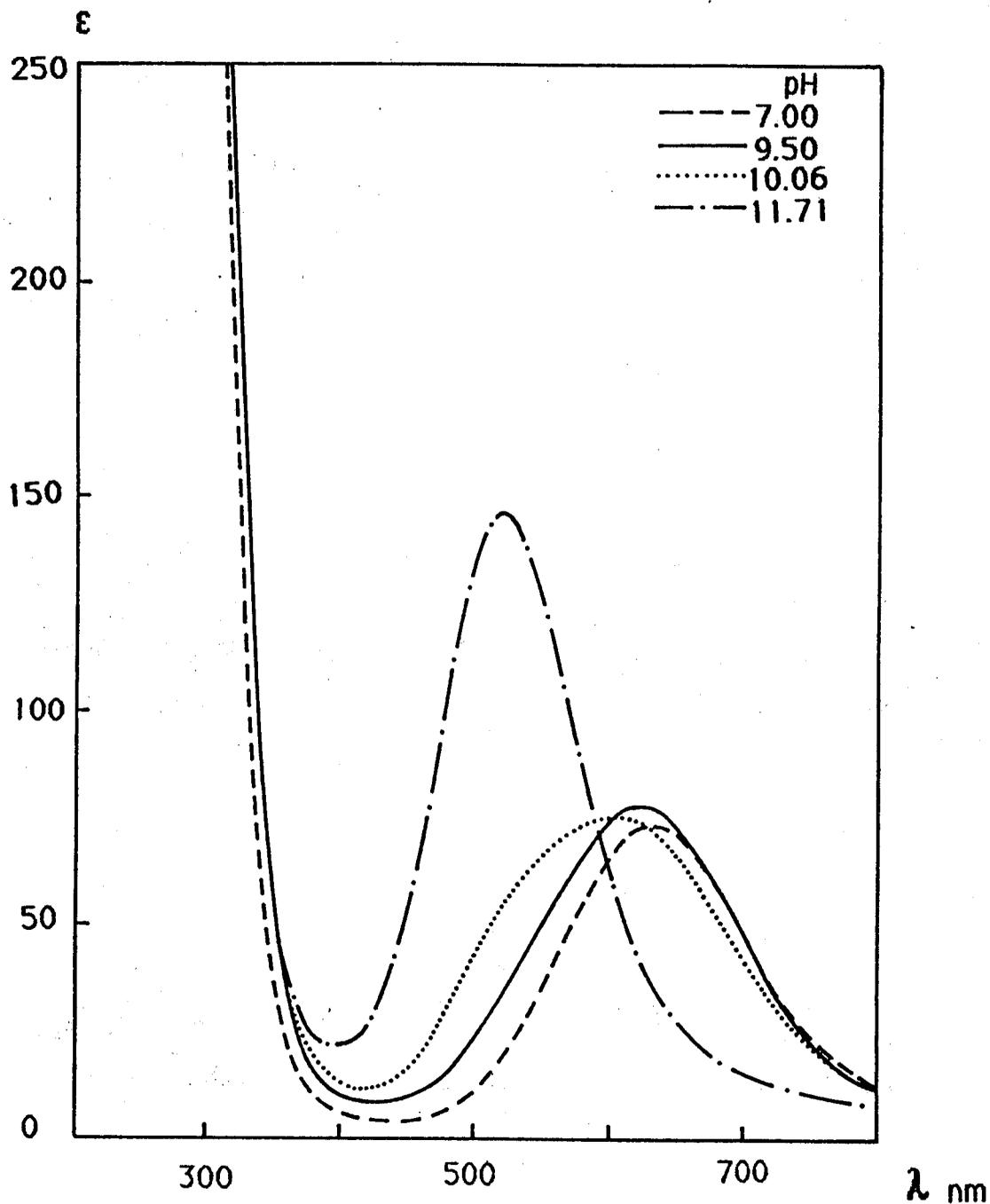
pH	λ_{\max}	ϵ	Espèce
7.10	631	73	2N
10.90	523	121	4N

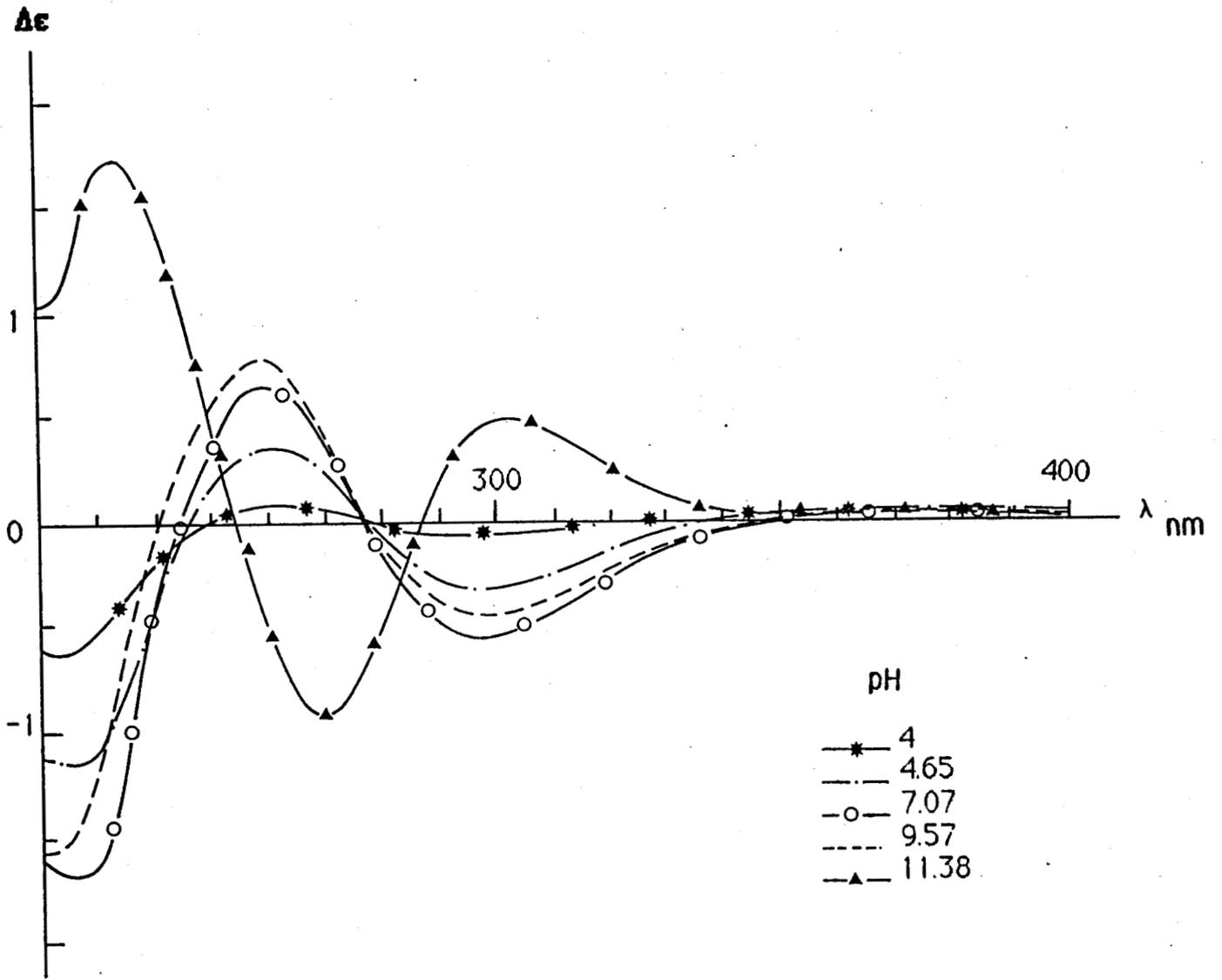
TABLEAU 9 : Valeurs des maxima en dichroïsme circulaire pour le système Ala-Asp-Ala-Asp / Cu(II). $c = 2.10^{-3}$ M/l

pH	λ_{\max} (nm)	$\Delta\epsilon$	Attribution	Espèce
7.07	610	-0.02	B	2N
	580	+0.02	E	
	300	-0.60	TC N^- ----> Cu(II)	
	260	+0.70	TC NH_2 ----> Cu(II)	
11.38	530	-0.70	Transition B et E	4N
	303	+0.50	TC N^- ----> Cu(II)	
	270	-1.00	TC NH_2 ----> Cu(II)	
	230	+1.8	Intraligand	

Spectre d'absorption de Ala-Asp-Ala-Asp / Cu(II)
rapport 1

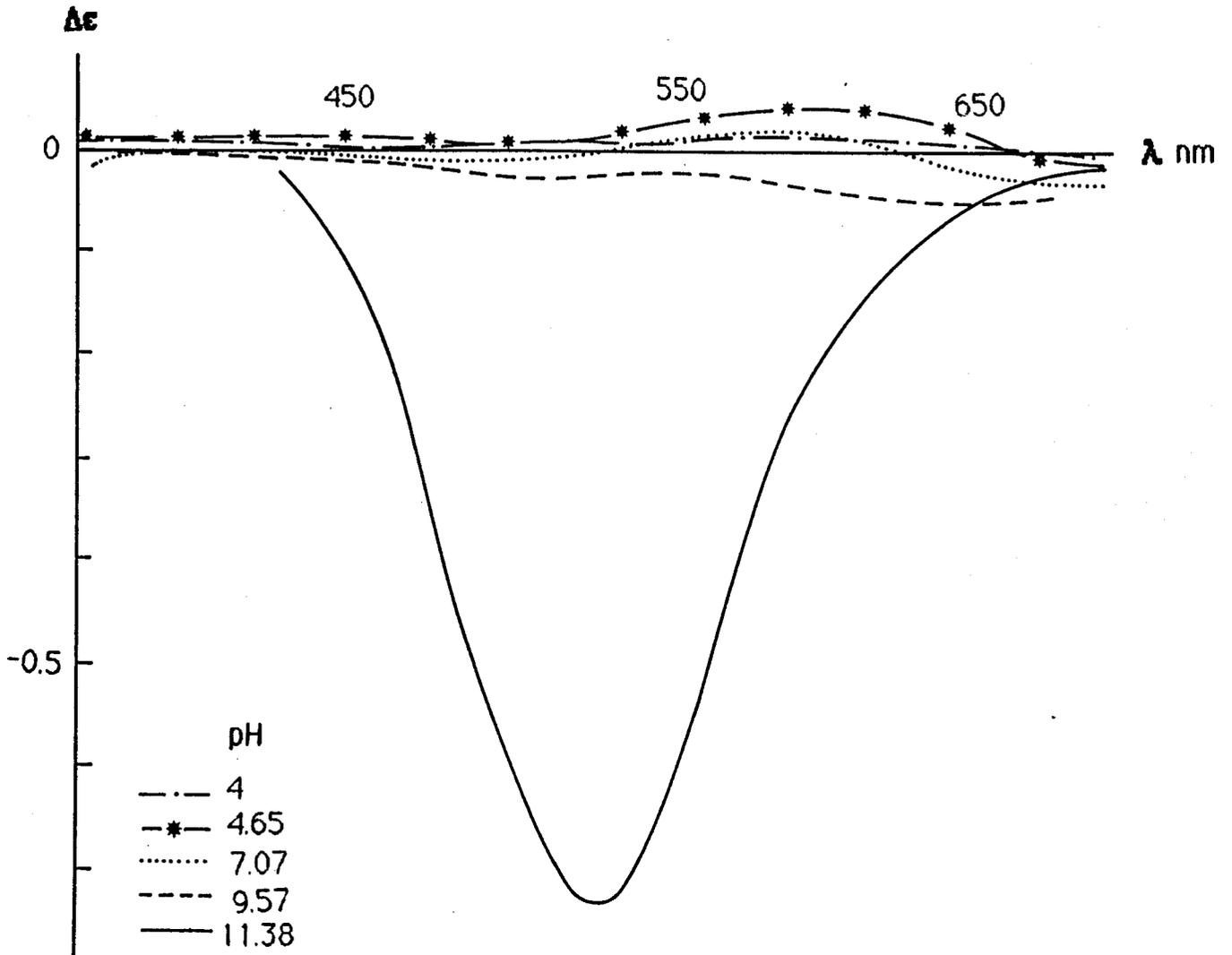
figure 10





Spectre dichroïque U.V. de Ala-Asp-Ala-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 11



Spectre dichroïque visible de Ala-Asp-Ala-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 12

TABLEAU 10 : Valeurs des paramètres A// et g// calculées à partir des spectres de R.P.E .

pH	A//	g//	Espèce
7.13	182	2.240	2N
10.90	212	2.170	4N

3.3. *Ala-Asp-Asp-Ala / Cu (II)*

Les constantes de stabilité des complexes sont données dans le tableau 11.

Lorsque l'on considère la distribution des espèces (figure 13), on note la formation de trois complexes entre pH 4 et 10: CuL , $CuH-1L$, $CuH-2L$.

Cependant deux espèces sont majoritaires, il s'agit de $CuH-1L$ et $CuH-2L$. Les constantes de stabilité de ces deux complexes sont respectivement similaires à celle obtenues pour *Ala-Asp-Ala-Ala* et *Ala-Ala-Asp-Ala* (tableau 11) et leurs valeurs suggèrent la participation de la fonction β carboxylate dans la formation des complexes.

Les résultats potentiométriques montrent que l'on est dans le cas où deux résidus d'acide aspartique peuvent être impliqués successivement dans la formation de complexes avec le $Cu(II)$.

En dichroïsme circulaire, à pH 6,0 dans la région visible, on note une bande pour la transition d-d négative (figure 14), alors que dans la région U.V (figure 15) apparaissent deux bandes de transfert de charge à 295 nm et à 260 nm correspondant respectivement à un transfert de charge $N^- \rightarrow Cu(II)$ et $NH_2 \rightarrow Cu(II)$.

Enfin en RPE, les valeurs des paramètres $A//$ et $g//$ (tableau 14), en accord avec les autres données spectroscopiques (tableau 12,13) indiquent que l'espèce $CuH-1L$ est un complexe à 2 azotes.

Lorsque le pH atteint 9, on constate dans la région U.V des spectres dichroïques, un changement de signe de l'effet Cotton des deux bandes observées précédemment (pH 6) traduisant un changement dans la structure du complexe formé. De plus apparaît à 240 nm une bande de transfert de charge montrant clairement l'interaction $COO^- \rightarrow Cu(II)$.

L'ensemble des données spectroscopiques montrent que l'espèce $CuH-2L$ est une espèce à 3 azotes (figures 14,15,16).

Lorsque le pH augmente pour atteindre 10,9 on remarque qu'il n'y a pas de changement dans les paramètres spectroscopiques. L'espèce à 3 azotes dans ce domaine de pH est la dernière formée.

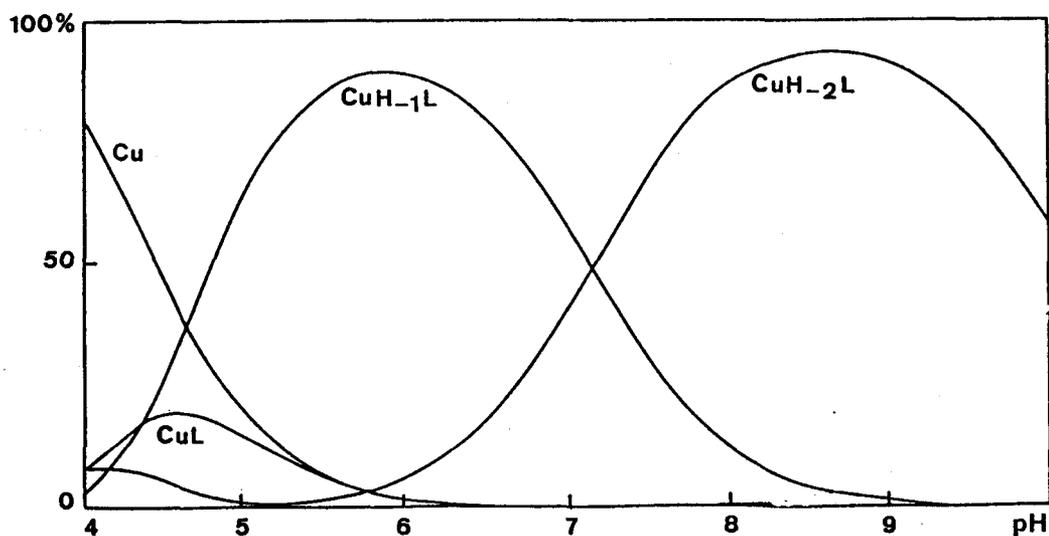
CONCLUSION

La stabilité des complexes CuH-1L et CuH-2L, formés successivement, montre l'importance des résidus d'acide aspartique en 2ème et 3ème positions dans la séquence peptidique.

La grande stabilité de l'espèce CuH-2L, complexe impliquant 3 azotes, dans lequel la fonction β carboxylate de l'Asp en troisième position se trouve engagée, empêcherait la déprotonation de la troisième fonction amide et par conséquent la formation de l'espèce à 4 azotes.

TABLEAU 11 Constantes de formation des complexes de Ala-Asp-Asp-Ala comparées à celles d'autres tétrapeptides.

Ligand	(CuHL)	(CuL)	(CuH ₁ L)	(CuH ₂ L)	(CuH ₃ L)
Ala-Asp-Asp-Ala	10.97(8)	6.98(2)	2.61(1)	-4.57(3)	-
Ala-Asp-Ala-Ala	-	6.27(5)	1.97(1)	-7.77(3)	-17.65(2)
Ala-Ala-Asp-Ala	-	5.36	0.57	-4.73	-
Ala-Ala-Ala-Ala	-	4.77	-0.45	-8.09	-17.33



Courbes de distribution des espèces
Ala-Asp-Asp-Ala / Cu(II) rapport 1

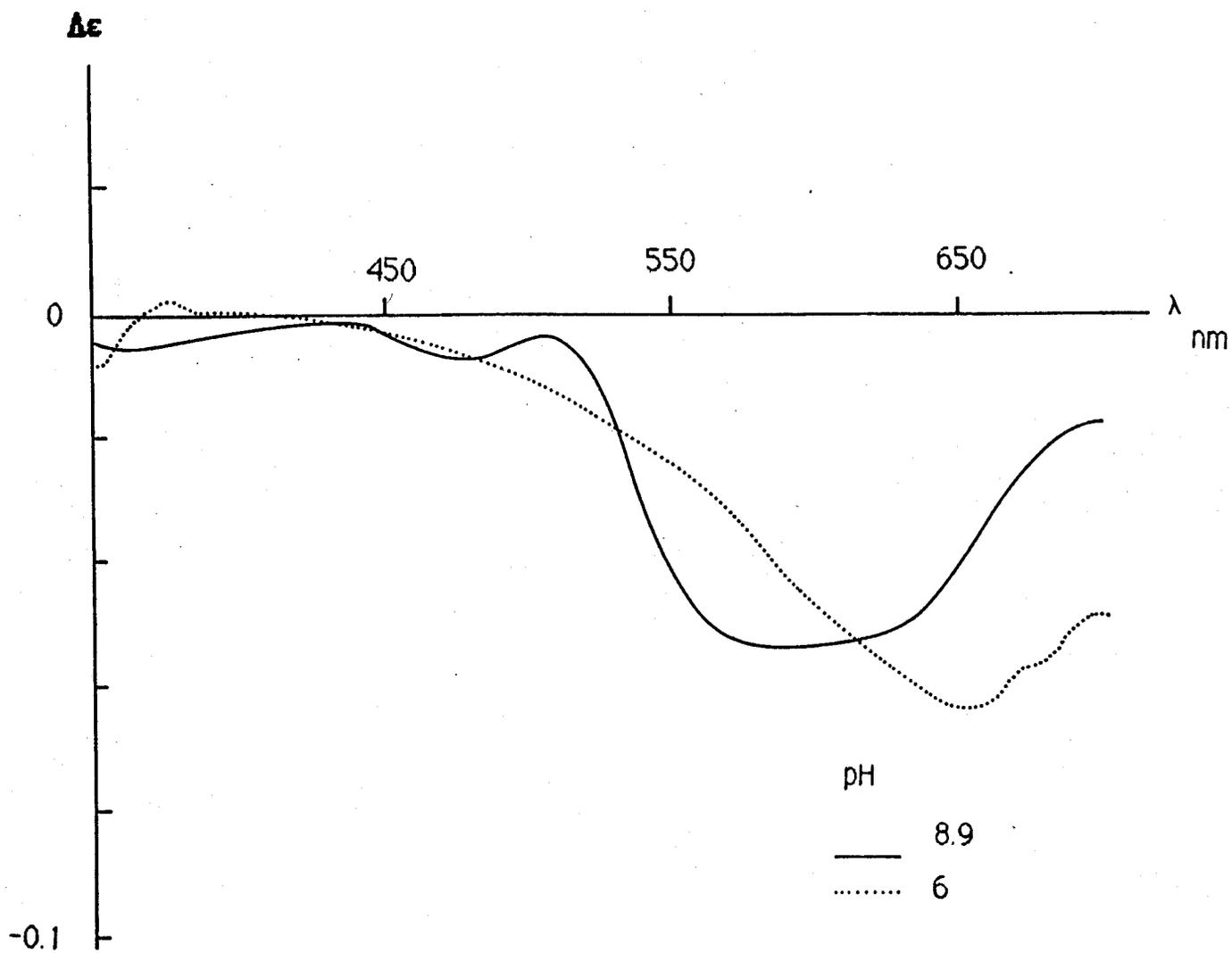
figure 13

TABLEAU 12 : Valeurs des maxima en dichroïsme circulaire pour le système Ala-Asp-Asp-Ala / Cu(II). $c = 2.10^{-3}$ M/l

pH	λ_{\max} (nm)	$\Delta \epsilon$	Attribution	Espèce
6.00	650	-0.06	Transitions B et E	2N
	295	-0.30	TC N ⁻ ----> Cu(II)	
	260	+0.15	TC NH ₂ ----> Cu(II)	
8.90	610	-0.06	B	3N
	580	-0.06	E	
	480	-0.01	E	
	305	+0.35	TC N ⁻ ----> Cu(II)	
	270	-0.40	TC NH ₂ ----> Cu(II)	
	240	+0.65	TC COO ⁻ ----> Cu(II)	

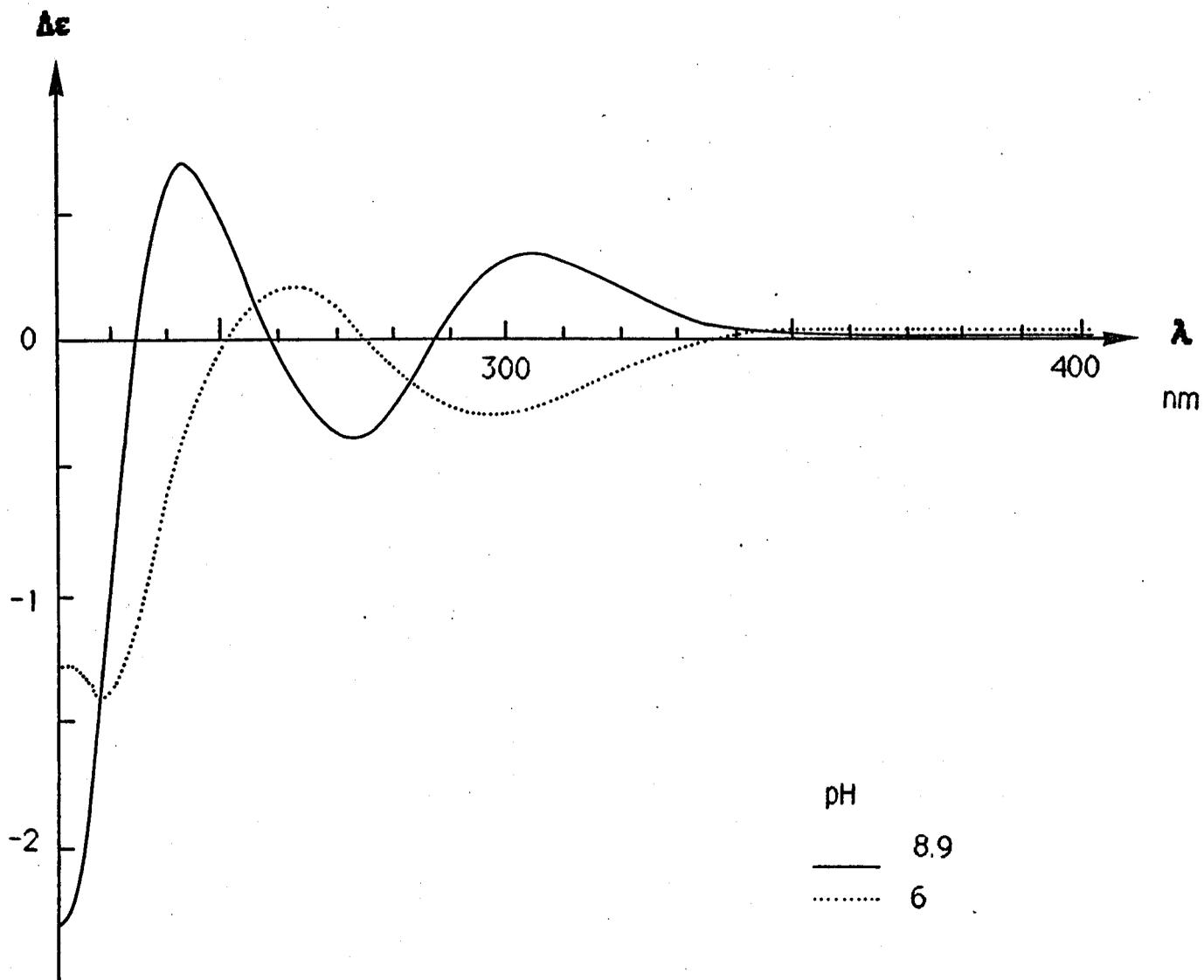
TABLEAU 13 : Valeurs des paramètres λ_{\max} et ϵ calculées à partir des spectres d'absorption

pH	λ_{\max}	ϵ	Espèce
6.06	630	85	2N
8.85	555	106	3N



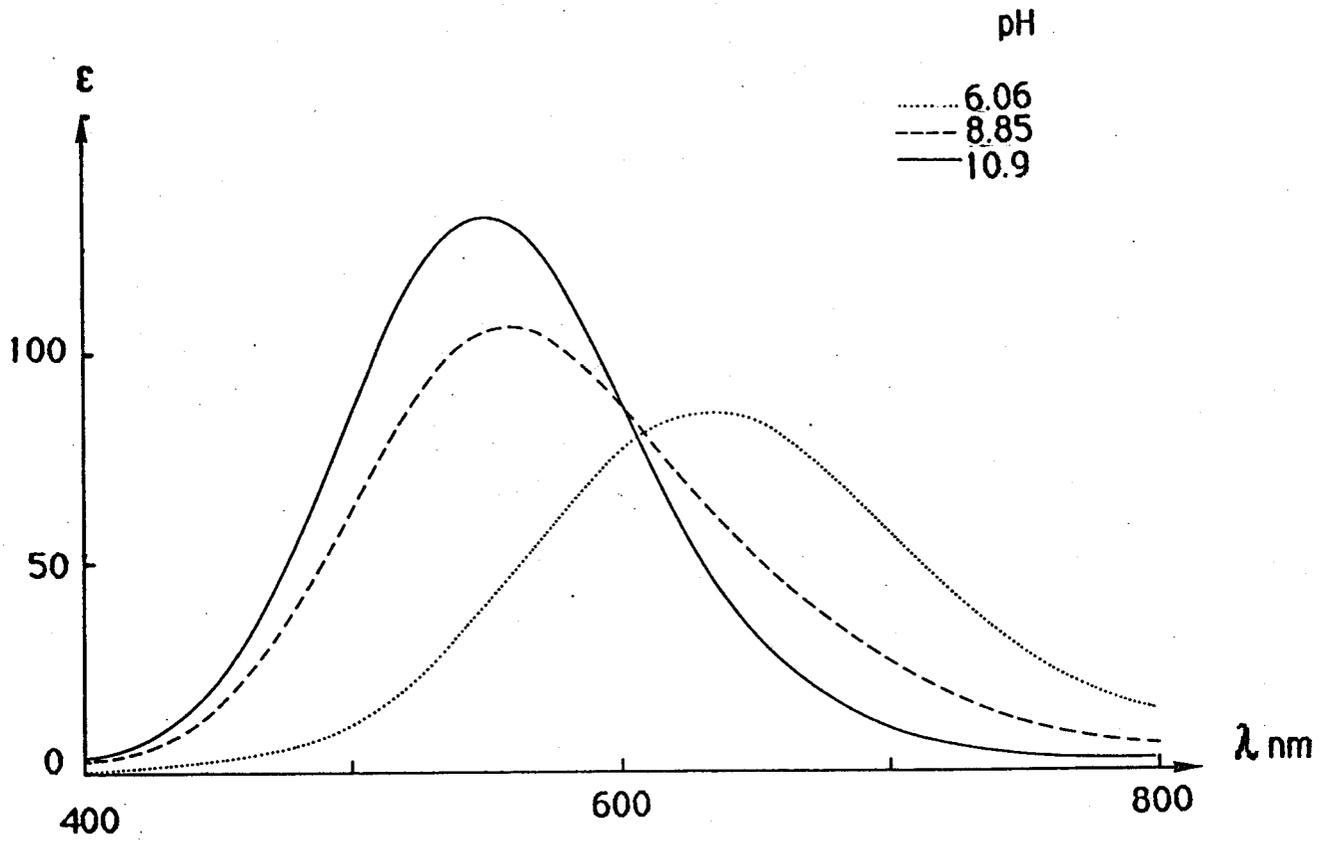
Spectre dichroïque visible de Ala-Asp-Asp-Ala / Cu(II)
rapport 1

figure 14



Spectre dichroïque U.V. de Ala-Asp-Asp-Ala / Cu(II)
rapport 1

figure 15



Spectre d'absorption de Ala-Asp-Asp-Ala / Cu(II)
rapport 1

figure 16

TABLEAU 14 : Valeurs des paramètres A// et g// calculées à partir des spectres de R.P.E

pH	A//	g//	Espèce
6.06	182	2.242	2N
8.87	203	2.204	3N

3.4. *Ala-Ala-Asp-Asp* / *Cu(II)*

Les données potentiométriques figure 17 et tableau 15 montrent la présence de 3 espèces respectivement $CuHL$, CuL et $CuH-2L$. On note une grande similitude des constantes de stabilité avec *Ala-Ala-Asp-Ala*.

Le tableau 17 et la figure 20 présentent les valeurs de λ_{max} et ϵ_{max} en fonction du pH.

De même, les spectres dichroïques à pH 7.43 (tableau 16) donnent les bandes caractéristiques des transitions d-d et des interactions $N^- \rightarrow Cu(II)$, $NH_2 \rightarrow Cu(II)$. En effet, dans la région visible (figure 18), les spectres présentent deux bandes :

- une bande négative vers 590 nm, d'intensité $\Delta\epsilon = -0.2$, attribuée à la transition B
- une bande positive à 490 nm, d'intensité $\Delta\epsilon = +0.1$ attribuée à la transition E

Dans la région U.V., toujours au même pH le spectre dichroïque présente 2 bandes (figure 19) :

- la première à 300 nm d'intensité relativement importante correspond à un transfert de charge N^- (amide) $\rightarrow Cu(II)$
- la deuxième à 270 nm, négative et très intense, est attribuée à un transfert de charge NH_2 (amine) $\rightarrow Cu(II)$

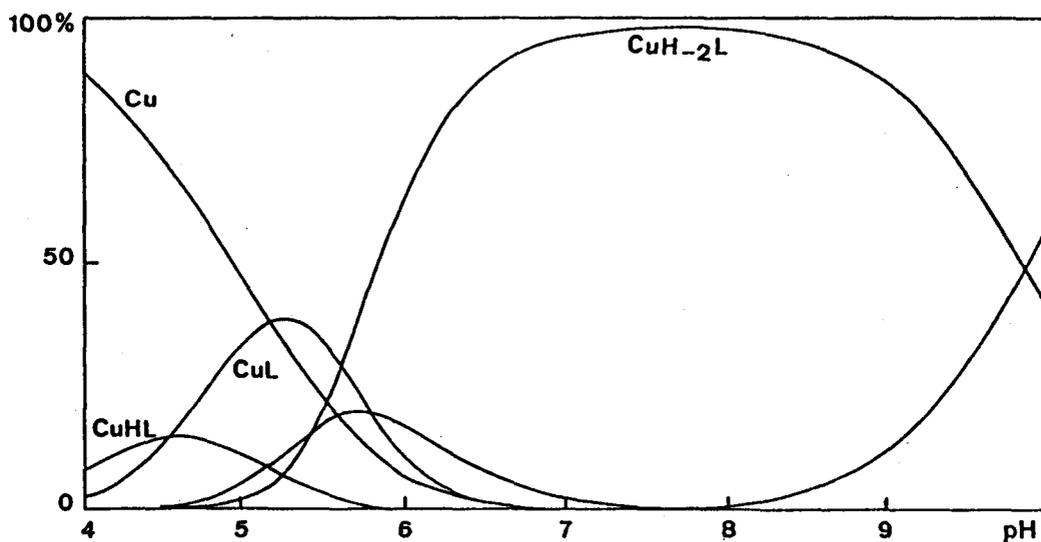
Les données RPE (tableau 18) et de spectroscopie d'absorption corroborent les résultats obtenus en dichroïsme circulaire et montrent que l'espèce considérée est un complexe impliquant 3 azotes.

Conclusion :

L'absence du complexe à 4 azotes doit être due à la stabilité exceptionnelle du complexe à 3 azotes qui est formé à partir de l'amine N terminale, des deux azotes de la première et seconde liaison peptidique et de la fonction β -carboxylate. Cette extra-stabilité défavorise la déprotonation de la troisième liaison amide et empêche la formation du complexe à 4 azotes.

TABLEAU 15 Constantes de formation des complexes de Ala-Ala-Asp-Asp comparées à celles d'autres térapeptides.

Ligand	(CuHL)	(CuL)	(CuH ₁ L)	(CuH ₂ L)	(CuH ₃ L)
Ala-Ala-Asp-Asp	11.20(2)	6.67(1)	0.86(2)	-4.58(1)	-
Ala-Ala-Asp-Ala	-	5.36	0.57	-4.73	-
Ala-Ala-Ala-Ala	-	4.77	-0.45	-8.09	-17.33



Courbes de distribution des espèces
Ala-Ala-Asp-Asp / Cu(II) rapport 1

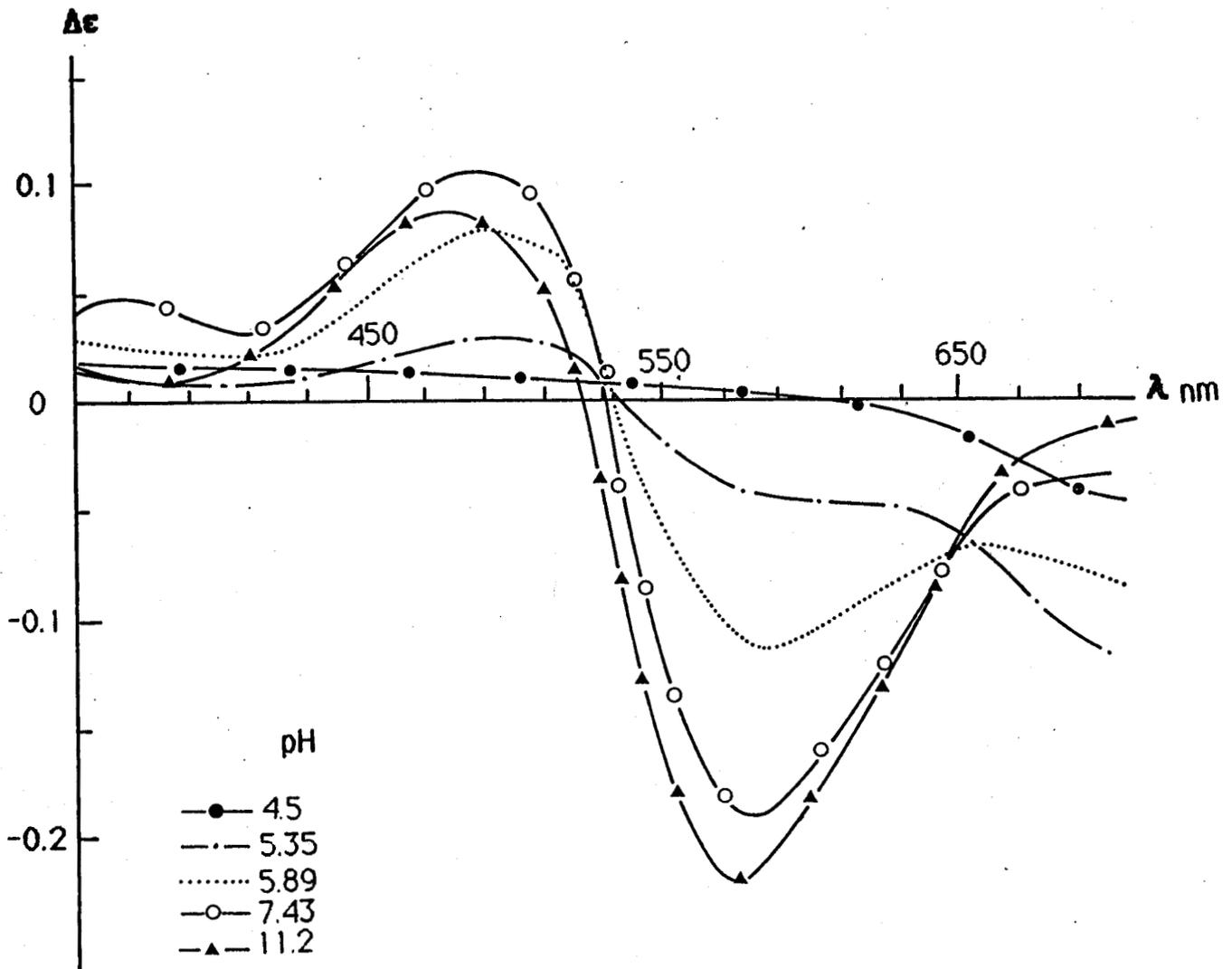
figure 15

TABLEAU 16 : Valeurs des maxima en dichroïsme circulaire pour le système Ala-Ala-Asp-Asp Cu(II). $c = 2.10^{-3}$ M/l

pH	λ_{max} (nm)	$\Delta\epsilon$	Attribution	Espèce
5.35	680	-0.05	Transitions B et E	
	255	+0.5	TC NH ₂ ----> Cu(II)	1N
7.43	590	-0.20	Transition B	
	490	+0.10	Transition E	
	300	+0.50	TC N ⁻ ----> Cu(II)	
	270	-1.30	TC NH ₂ ----> Cu(II)	3N

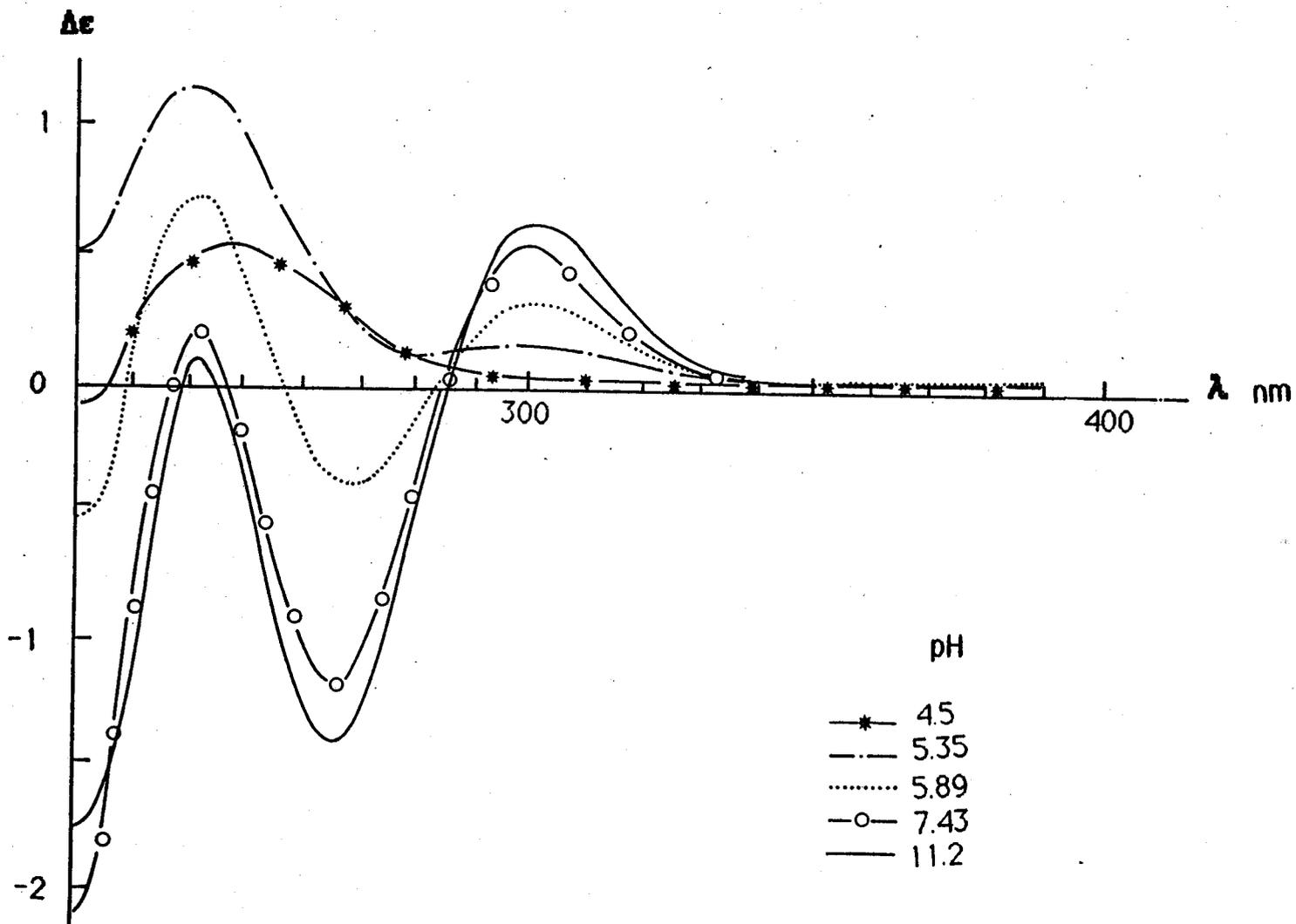
TABLEAU 17 : Valeurs des paramètres λ_{max} et ϵ calculées à partir des spectres d'absorption

pH	λ_{max}	ϵ	Espèce
5.35	710	35	1N
7.52	547	123	3N



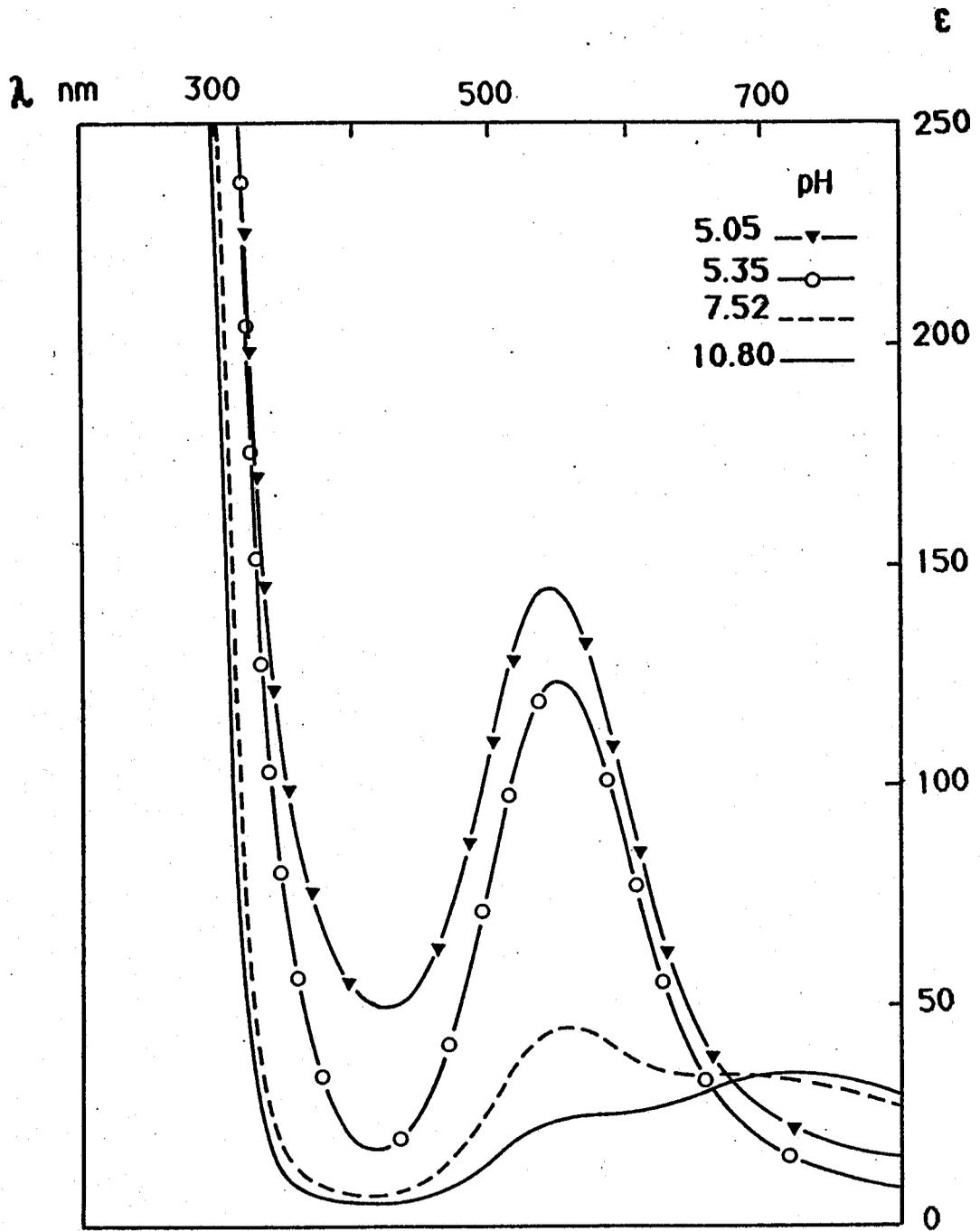
Spectre dichroïque visible de Ala-Ala-Asp-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 18



Spectre dichroïque U.V. de Ala-Ala-Asp-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 19



Spectre d'absorption de Ala-Ala-Asp-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 20

TABLEAU 18 : Valeurs des paramètres A// et g// calculées à partir des spectres de R.P.E

pH	A//	g//	Espèce
5.20	125	2.396	1N
7.29	200	2.196	3N

4. ETUDE DE COMPLEXATION DE Asp-Asp-Asp AVEC LE Cu (II)

Les études ci-dessus montrent que l'insertion d'un résidu d'acide aspartique en première, deuxième ou troisième position dans une séquence peptidique (en partant de l'extrémité N terminale) à une importance considérable sur la stabilité des complexes formés.

L'insertion d'un résidu d'acide aspartique en quatrième position dans la séquence semble par contre n'avoir aucun impact.

Pour confirmer ceci de façon plus précise, nous avons choisi d'étudier le système Asp-Asp-Asp.

Comme le montre la distribution des espèces (figure 21), on observe la formation de 3 espèces CuL , $CuH-1L$ et $CuH-2L$.

Si l'on se réfère au système triglycine (tableau 19), on constate que l'espèce CuL est très fortement stabilisée ($\Delta \log\beta = 2,75$) et qu'à pH 4,5, seulement 25 % du Cu (II) reste non complexé alors que plus de 50 % forme un complexe avec l'espèce CuL (figure 21).

Lorsque le pH est légèrement supérieur à 5, on note l'apparition de l'espèce $CuH-1L$, très stable jusqu'à pH 7,5. Les spectres de dichroïsme circulaire montrent dans la région U.V deux bandes de transfert de charge, la première à 305 nm, la deuxième à 260 nm, correspondant respectivement à un transfert de charge $N^- \rightarrow Cu(II)$ et $NH_2 \rightarrow Cu(II)$ (figures 22,23 et tableau 20).

Comme il a déjà été constaté précédemment, la bande de transfert de charge correspondant au TC $COO^- \rightarrow Cu(II)$, n'est pas observable, cependant l'accroissement de stabilité du complexe par rapport au système trigly ($\Delta \log\beta = 3,06$) suggère l'implication de la fonction β carboxylate dans la formation de l'espèce $CuH-1L$.

Les données RPE (tableau 21) et les spectres d'absorption (figures 24, 24 bis et tableau 22) sont caractéristiques d'une espèce faisant intervenir deux azotes.

D'autre part, ce complexe à deux azotes étant très fortement stabilisé par la fonction carboxylate, on remarque que déjà à pH 5 il n'y a plus de cuivre libre en solution, alors que pour le système tétraalanine le cuivre II est présent en solution jusqu'à pH 7.

Dès pH 8,2 on assiste à la formation de l'espèce CuH-2L qui se révèle, d'après les paramètres spectroscopiques, être une espèce à 3 azotes.

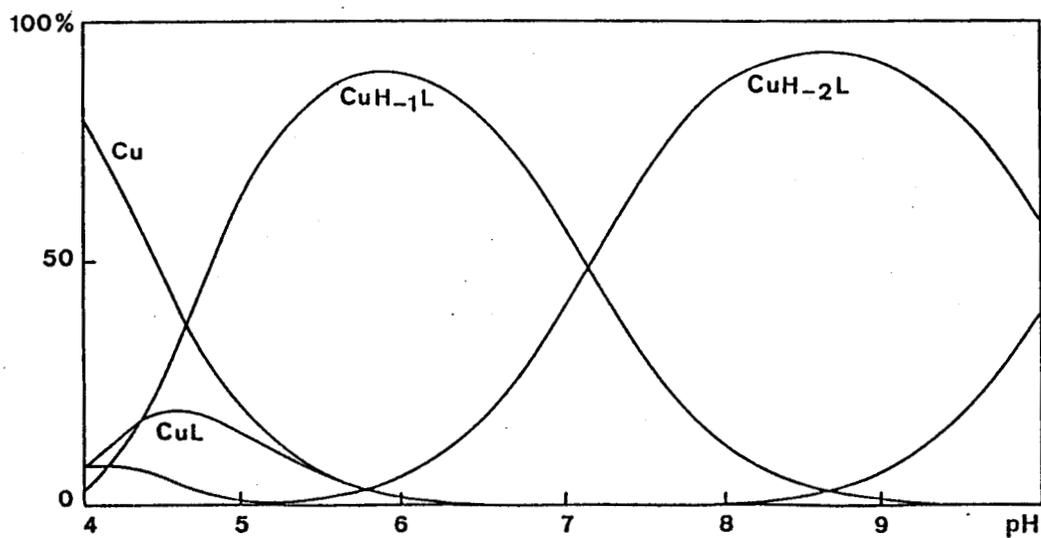
De la même façon, en potentiométrie, on constate une stabilité accrue de cette espèce par rapport à la même espèce dans le système trigly. Ceci, là encore, résulte de la présence de la fonction β carboxylate du résidu d'acide aspartique en troisième position dans la séquence peptidique qui intervient dans la formation et la stabilisation du complexe.

CONCLUSION

Cette étude corrobore toutes les observations faites précédemment et montre clairement que les trois premiers résidus d'acide aspartique dans une séquence peptidique sont impliqués successivement et stabilisent fortement les complexes formés avec le Cu (II).

TABLEAU 19 : Constantes de formation des complexes de Asp-Asp-Asp comparées à celles du système Gly-Gly-Gly.

Ligand	(CuHL)	(CuL)	(CuH ₋₁ L)	(CuH ₋₂ L)	(CuH ₋₃ L)
Asp-Asp-Asp	12.00(4)	7.83(2)	3.03(2)	-5.34(3)	-
Gly-Gly-Gly	-	5.08	-0.03	-6.75	-



Courbes de distribution des espèces
Asp-Asp-Asp / Cu(II) rapport 1

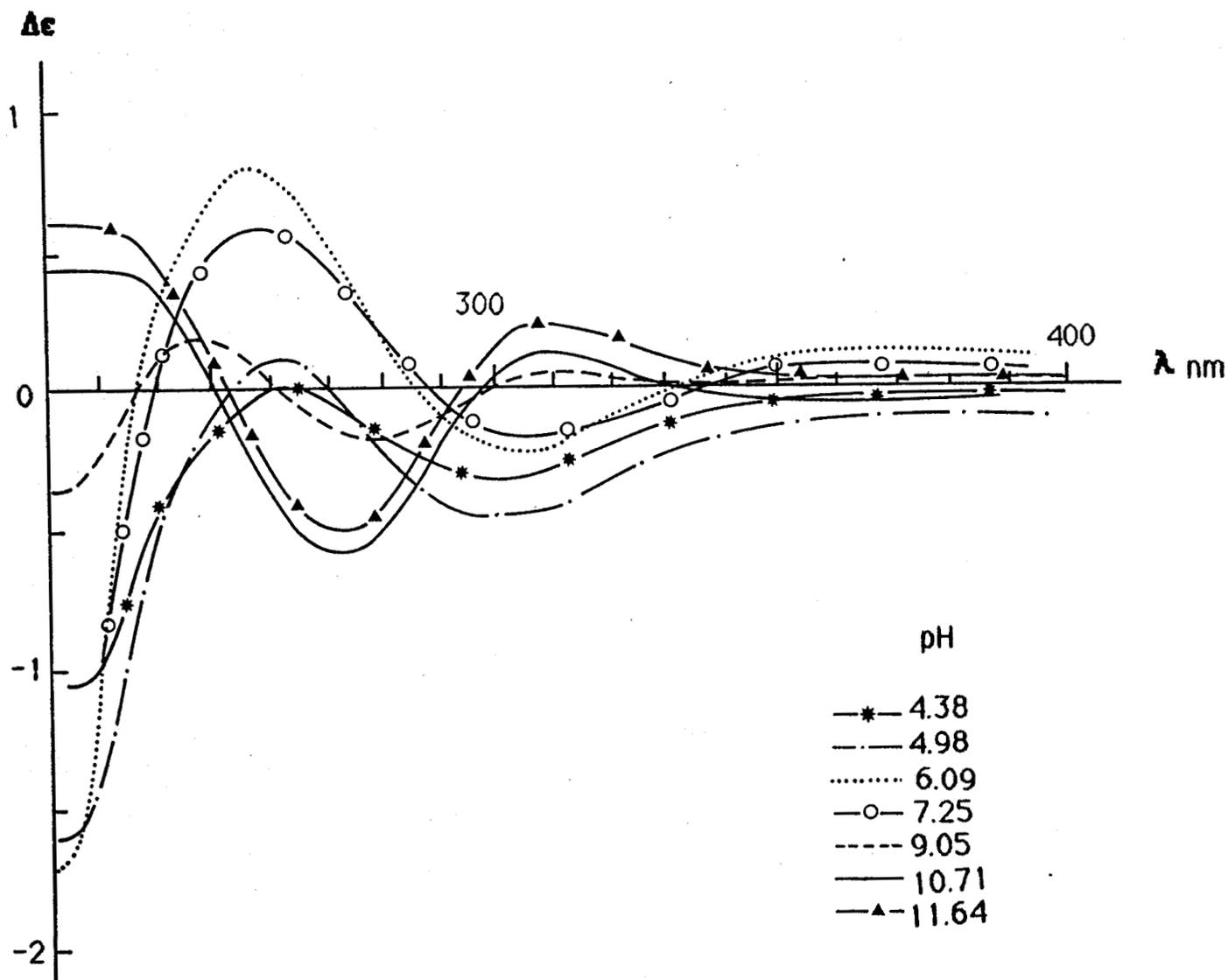
figure 21

TABLEAU 20: Valeurs des maxima en dichroïsme circulaire pour le système Asp-Asp-Asp / Cu(II). $c = 2.10^{-3}$ M/l

pH	λ_{\max} (nm)	$\Delta \epsilon$	Attribution	Espèce
7.25	625	+0.08	Transition B et E	2N
	305	-0.25	TC N^- ----> Cu(II)	
	260	+0.60	TC NH_2 ----> Cu(II)	
9.05	580	-0.15	E	3N
	310	+0.10	TC N^- ----> Cu(II)	
	280	-0.25	TC NH_2 ----> Cu(II)	

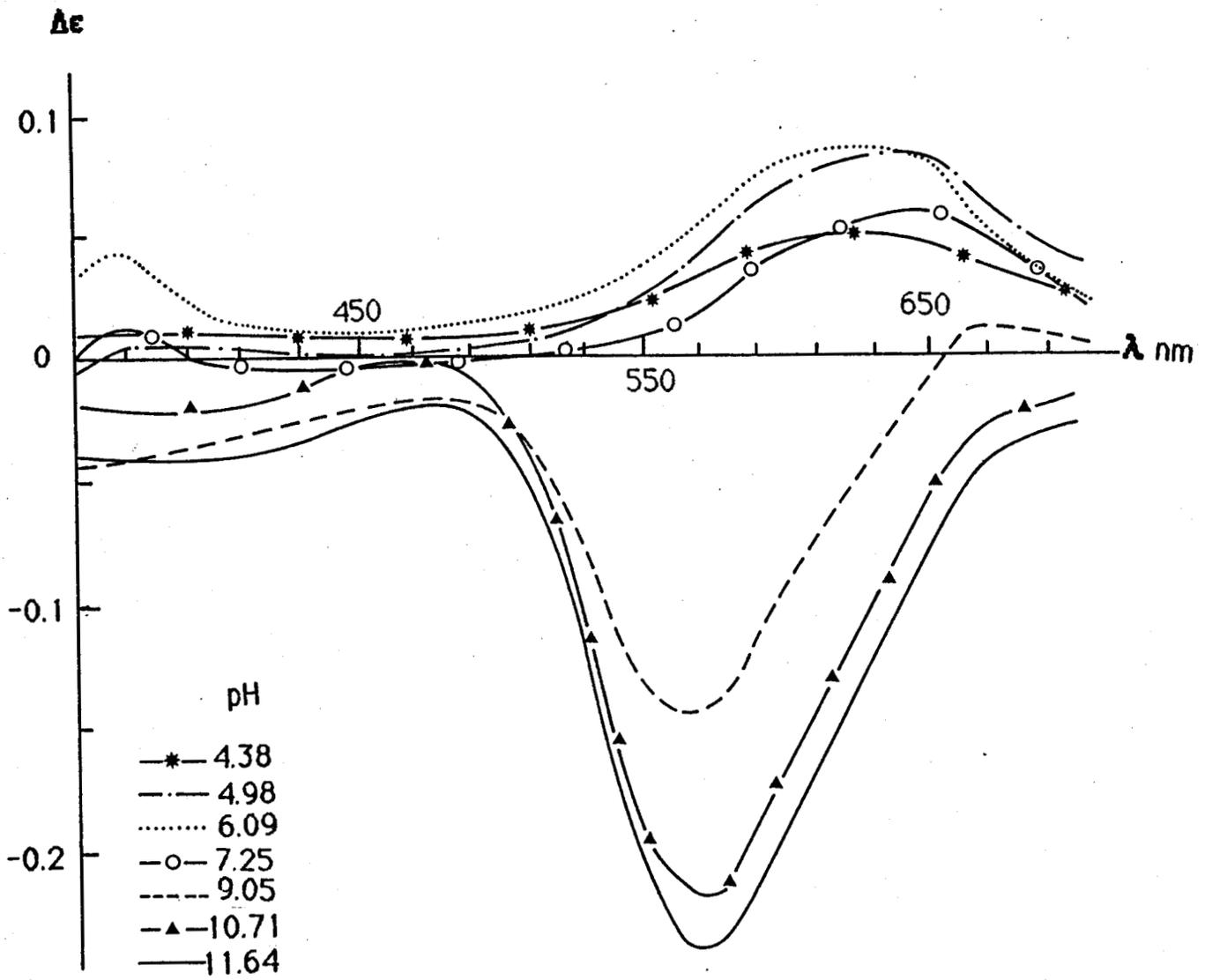
TABLEAU 22 : Valeurs des paramètres λ_{\max} et ϵ calculées à partir des spectres d'absorption

pH	λ_{\max}	ϵ	Espèce
6.63	644	58	2N
9.04	549	118	3N



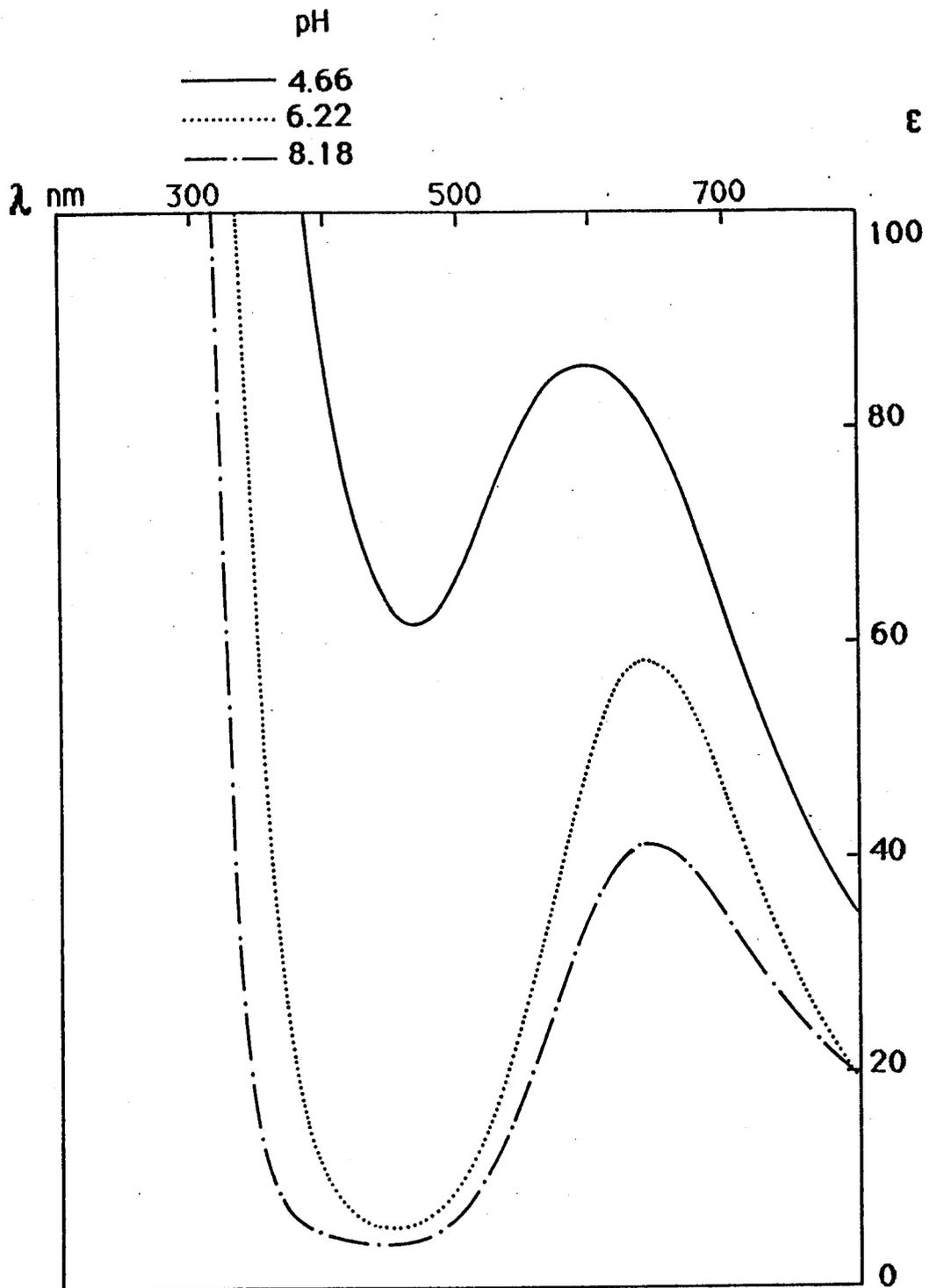
Spectre dichroïque U.V. de Asp-Asp-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 22



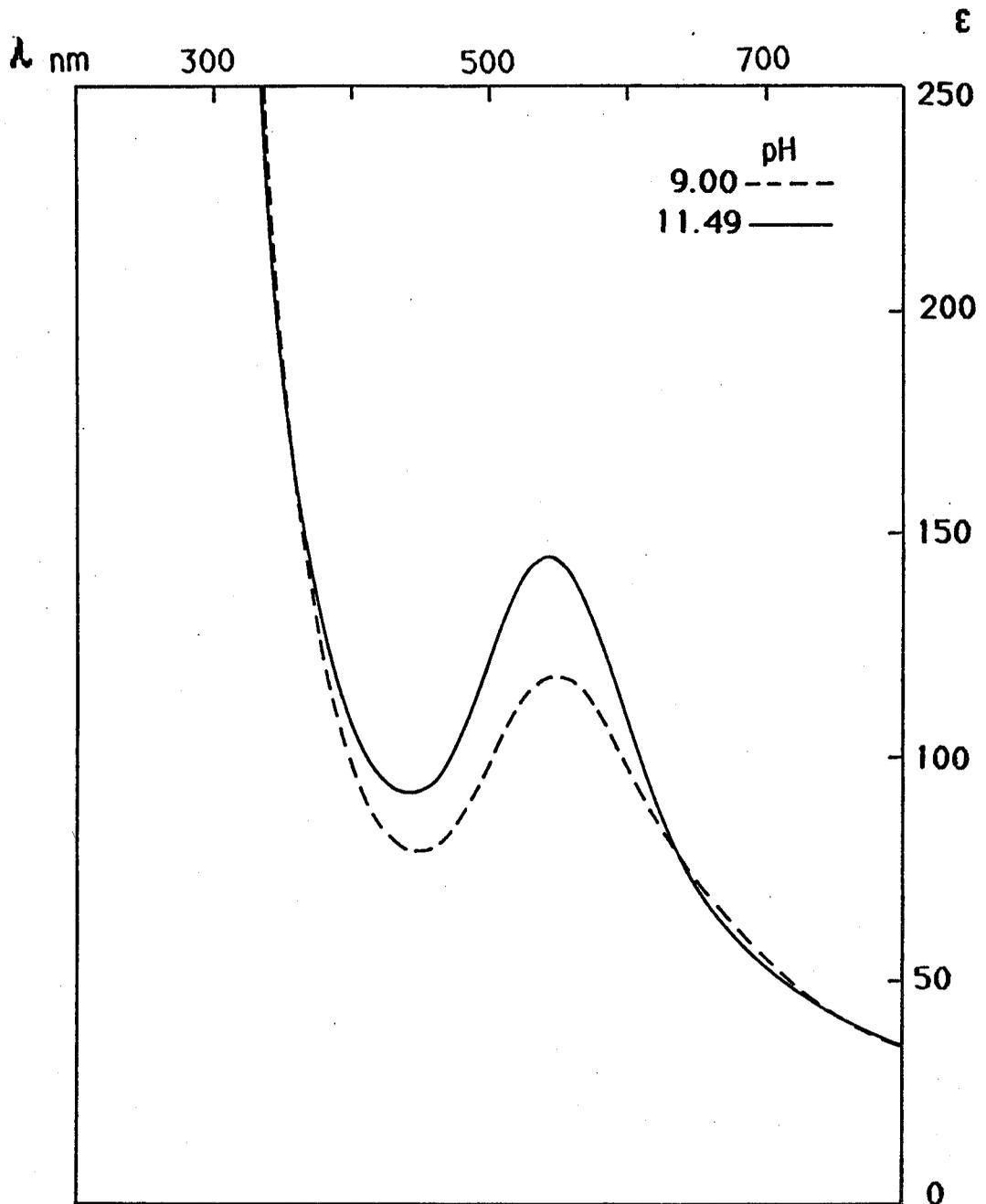
Spectre dichroïque visible de Asp-Asp-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 23



Spctre d'absorption de Asp-Asp-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 24



Spectre d'absorption de Asp-Asp-Asp / Cu(II)
rapport 1

figure 24 bis

TABLEAU 21 : Valeurs des paramètres A// et g// calculées à partir des spectres de R.P.E

pH	A//	g//	Espèce
6.63	185	2.240	2N
9.04	210	2.198	3N

5. CONCLUSION GENERALE

Si comme il a été dit précédemment, les trois premiers résidus d'acide aspartique dans une séquence peptidique peuvent être impliqués successivement dans la formation de complexes avec le Cu (II) et les stabiliser, la fonction β carboxylate de l'acide aspartique en quatrième position se révèle être inefficace et n'a pas d'influence significative sur la stabilisation des complexes formés.

Ceci semble du au fait que lorsque l'espèce 4 N se forme, tous les sites de liaisons sont déjà occupés dans le plan équatorial par les atomes donneurs potentiels.

Par conséquent, la stabilisation des complexes par l'intermédiaire de la fonction β carboxylate ne peut avoir lieu que lorsqu'il existe une possibilité de coordination avec le Cu (II) dans le plan équatorial.

- 1 Phan C.V., Tosi L., Garnier A., *Bioinorg. Chem.*, 8, 21, (1978)
- 2 Huet J., Jouini J., Abello L. and Lapluye G., *J. Chim. Phys.*, 81, 505 (1981)
- 3 Formicka-Kozłowska G., Kozłowski H., Bezer M., Pettit L.D., Kuprszewski G. and Przybylski J., *Inorg. Chim. Acta*, 56, 79, (1981)
- 4 Bair M.L. and Larsen E.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 1140, (1971)
- 5 Sigel H. and Martin R.B., *Chem. Rev.*, 82, 385, (1982)
- 6 Tsangaris J.M. and Martin R.B., *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 4255, (1970)
- 7 Formicka-koźłowska G., Kozłowski H., Jezowska-Trzebiatowska B., Kupryszewski G. and Przybylski J., *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, 15, 387, (1979)
- 8 Martell A.E., Kim M.K. and Kaneda A., *J. Coord. Chem.*, 4, 159, (1975)
- 9 Camp H., Sigel H. and Zuberbuhler A.D., *Inorg. Chem.*, 21, 1190, (1982)
- 10 Billo E.J., *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, 10, 613, (1974)
- 11 Yokoi H., Sai M., Isobe T. and Ohsawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 45, 2189, (1972)
- 12 Ono T; and Sasada Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 54, 90, (1981)
- 13 Havere W.V. and Lenstra A.T., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 87, 419, (1978)
- 14 Akruck P. and Sarkar B., *Can J. Chem.*, 21, 3563, (1973)
- 15 Freeman A.C., *Adv. Protein. Chem.*, 22, 257, (1967)
- 16 Hawkins G.J. and Wong C.L., *Aust. J. Chem.*, 23, 2237, (1970)
- 17 Larsen E. and Olsen J., *Acta Chem. Scand.*, 18, 1025, (1964)

- 18 Martin R.B., in "Optical properties of transition metal ion in complexes of amino acids and peptides" in *Metal Ion in Biological Systems*, Vol. 1, 129, Dekker, Inc., (1974)
- 19 Tsangaris J.M. and Martin R.B., *Monats. Chem.*, 113, 1393, (1982)
- 20 Espersen W.C. and Martin R.B., *J. Am. Chem Soc.*, 98, 40, (1976)
- 21 Hawkins G.J., in "Circular dichroism" in *Absolute Configuration of metal Complexes*, J. Wiley Interscience, (1971)
- 22 Gil L., Moraga E., Bobadilla H., Bunel S. and Bunton C.A., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 37, 2509, (1975)
- 23 Phan C.V., Tosi L. and Garnier A., *J. Inorg Nucl. Chem.*, 37, 2385, (1975)
- 24 Wellman K.L., Mecca T.G., Nungall W. and Hare C.R., *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 3647, (1976)
- 25 Garnier A. and Tosi L., *Bioinorg. Chem.*, 8, 493, (1978)
- 26 salardi S., Tosi L., Garnier A., Toniolo C., Bonora G.M. and Marchiori F., *Biopolymers*, 21, 1229, (1982)
- 27 Garnier A. and Tosi L., *Biopolymers*, 14, 2247, (1975)
- 28 Wilson G.W. and Martin R.B., *Inorg. Chem.*, 10, 1197, (1971)
- 29 Ibarra C., Soto R., Adoin L., Recenti A. and Bunel S., *Inorg. Chim. Acta*, 6, 601, (1972)
- 30 Bunel S., Gil L. and Bobadilla H., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 39, 365, (1977)
- 31 Bunel S., Ibarra C., Urbana A. and Bonton C.A., *Inorg. Nucl. Chem. Lett.*, 13, 259, (1977)
- 32 Bunel S., Ibarra C., Rodriguez M., Urbana A. and Bonton C.A., *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 43, 971, (1981)

- 33 Garnier A., Albertini J.P., Collet A., Faury L., Pastor J.M. and Tosi L.,
J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2544, (1981)
- 34 Lebkiří A., Thèse de Doctorat, USTL Lille, (1987)
- 35 Decock-Le-Reverend B., Andrianarijanoa L., Livera C.E., Pettit L.D.,
Pyburn S. and Kozłowski H., J. Chem. Soc. Dalton Trans., 2221-2226,
(1986)
- 36 Decock-Le-Reverend B., Lebkiří A., Livera C. and Pettit L.D., Inorg.
Chim. Acta, 124, L19-22, (1986)

1. INTRODUCTION

De nombreuses études ont été entreprises concernant les interactions Zn(II) - peptides, plus particulièrement avec des di et tétrapeptides. Les études portant sur des dipeptides comportant dans leur séquence Gly, Ala, Leu et Pro montrent que contrairement à ce qui a été observé pour le cuivre, le zinc est incapable de déprotoner la fonction amide (1) et dans ce cas les sites majeurs de complexation sont la fonction amine terminale et la fonction carbonyle.

Cependant, des études potentiométriques et spectroscopiques (1H NMR) ont montré que dans des séquences particulières telles que Ala-His et Gly-His, le Zn(II) était capable de déprotoner le groupement amide de l'histidine à haut pH (2). Les déplacements chimiques observés montrent que le zinc, dans ce cas, peut se complexer par l'intermédiaire de l'azote N terminal, de l'azote déprotoné de la liaison amide et enfin de l'azote du cycle imidazole. Les complexes du zinc avec His-Gly et Gly-His ont aussi fait l'objet d'études et dans le cas de Gly-His, l'espèce ZnH-2L a pu être mise en évidence. L'addition de un ou deux résidus de Gly dans la séquence n'empêche pas la complexation du zinc par l'intermédiaire des trois atomes d'azote donneurs. Lorsque l'histidine occupe la première position dans la séquence peptidique (His-Phe, His-Tyr), la déprotonation de la liaison amide ne peut se produire.

Les complexes de zinc avec les dipeptides cycliques tels que cyclo-(Gly-His) et cyclo-(Met-His) ont montré, sur la base des études RMN et potentiométriques, que le zinc formait un complexe tétraédrique avec les quatre atomes d'azote des résidus histidines.

D'autres études ont porté sur la complexation du zinc(II) avec des tripeptides tels que Gly-His-Gly et Gly-His-Lys (3). La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire montre que l'on trouve pour le cycle imidazole au moins trois environnements différents. En particulier la présence du complexe Zn(II)-(His-Gly-His)₂ a pu être détectée tout en se

révélat pH dépendante. A pH physiologique, le Zn(II) forme avec Gly-His-Lys un complexe dans lequel se trouve impliqué l'azote déprotoné de la fonction amine (Gly), l'azote déprotoné de la liaison amide (Gly-His) et l'azote porté par le cycle imidazole de l'histidine, la fonction amine de la lysine restant sous forme protonée (4).

La complexation du zinc(II) ainsi que la cinétique de formation des complexes avec le glutathion γ -Glu-Cys-Gly ont fait l'objet d'études dans le domaine de pH 4,5 - 5 (5). Les différentes études prouvent que c'est essentiellement l'atome de soufre qui est impliqué dans la complexation.

Compte-tenu des données disponibles dans la littérature concernant des peptides incluant dans leur séquence des acides aminés à chaîne latérale (His, Cys), il était intéressant d'évaluer la capacité de complexation de l'acide aspartique, et plus particulièrement le comportement de la fonction β -carboxylate vis à vis du zinc(II).

2. ETUDE DE LA COMPLEXATION DE PEPTIDES A MOTIFS ASPARTIQUES PAR LE ZINC(II)

2.1. *Asp-Ala-Ala-Asp / Zn(II)*

L'analyse des résultats potentiométriques (figure 1 et tableau 1) montre la formation des espèces ZnL , $ZnH-1L$ et $ZnH-2L$.

Le premier complexe formé est ZnL . Cette espèce est largement prédominante dans le domaine de pH 6 - 8. La stabilité relative de ce complexe peut être expliqué par la participation de la fonction β -carboxylate dans la formation du complexe.

Dans le but de confirmer les sites de coordination de Zn(II), les spectres ^1H RMN du peptide libre et du peptide complexé ont été analysés à pD 7,5.

L'attribution des pics de résonance du peptide libre a été menée par pH titration (figure 2).

La complexation du peptide par le Zinc entraîne une modification de l'aspect du spectre de RMN du proton (figure 3).

Les protons β -CH₂ de ^1Asp , qui apparaissent sous forme de multiplet dans le peptide libre, apparaissent sous forme de doublet dans le peptide complexé avec $J_{AC} \approx J_{BC}$ (5 Hz).

Si l'on considère d'une part la fréquence moyenne de ce doublet (1087.4 Hz) et d'autre part les fréquences ν_A et ν_B (respectivement 1052 Hz et 1040 Hz) pour le peptide libre on constate des déplacements respectifs pour ν_A et ν_B de 0,09 ppm et 0,13 ppm.

Les déplacements chimiques sont relativement faibles dans la mesure où le zinc forme des complexes relativement faible avec le ligand.

D'autre part le proton α CH de ^1Asp apparaît sous la forme d'une large bande centrée à 1640,3 Hz dans le peptide complexé soit un déplacement de 0,04 ppm (par rapport au peptide libre). En ce qui concerne le peptide libre, le rotamère I (tableau 2 et figure 4) possède la fraction molaire la plus importante, ce qui est en accord avec la présence d'un encombrement stérique minimum. Par contre, si l'on considère le peptide complexé, il y a accroissement de la population du rotamère III (figure 4) où le zinc peut être complexé par l'intermédiaire des fonctions amine terminale, β -carboxylate et le groupe carbonyle (figure 5).

2.2. Asp-Asp-Asp / Zn(II)

Si l'on considère la courbe de distribution des espèces, on note là aussi la présence d'un complexe très stable correspondant à l'espèce ZnL entre pH 6,5 et pH 8 (figure 6, tableau 3). Sa stabilité est toutefois légèrement inférieure à celle observée pour l'espèce ZnL de Asp-Ala-Ala-Asp.

En $^1\text{H RMN}$, si l'on compare le spectre du peptide libre et le spectre du peptide complexé (figure 7 et 8), la modification majeure est celle qui apparaît pour le proton αCH de ^1Asp . En effet le quartet ($\nu_{\text{C}} = 1731.4$) apparaît dans le peptide complexé sous la forme d'une large bande centrée à 1673 Hz soit un déplacement chimique de 0,15 ppm par rapport au peptide libre.

Les populations de rotamères (tableau 4) calculées pour le peptide libre montrent que le rotamère I est majoritaire, ce qui est conforme au résultat attendu compte-tenu des contraintes stériques.

Par contre pour le peptide complexé, on assiste à un accroissement du pourcentage de rotamère I alors que le rotamère III décroît considérablement (7%).

Les résultats potentiométriques obtenus pour Asp-Ala-Ala-Asp et Asp-Asp-Asp, montrent que le zinc est incapable de déprotoner la liaison amide.

2.3. Ala-Ala-Asp-Asp, Ala-Asp-Ala-Asp, Ala-Asp-Asp-Ala / Zn(II)

Si l'on considère les résultats potentiométriques pour ces peptides, on constate que la stabilité de l'espèce ZnL est moindre et de plus on note que celle-ci diminue considérablement lorsque ^1Ala est suivie dans la

séquence par un résidu d'acide aspartique, avec une stabilité minimale obtenue pour le peptide Ala-Asp-Asp-Ala présentant deux résidus d'acide aspartique qui suivent l'alanine dans l'enchaînement peptidique (figures 9,10,11, tableaux 5,6,7).

En résonance magnétique nucléaire, on note effectivement une modification du spectre concernant l'alanine en première position pour le peptide complexé. Cependant les déplacements chimiques observés sont très faibles étant donné le peu de zinc complexé.

Comme il a été mentionné précédemment dans le cas de Asp-Asp-Asp, la présence de Zinc stabilise considérablement le rotamère I. D'autre part le pourcentage de rotamère III diminue très sensiblement par rapport au peptide libre.

Dans le cas du peptide complexé, pour stabiliser le rotamère I, le zinc doit interagir avec les fonctions amine terminale et β -carboxylate. Ce type de complexation exclut la participation de la fonction carbonyle dans le complexe, alors qu'avec Asp-Ala-Ala-Asp, cette même fonction est impliquée dans le chélate.

Néanmoins dans le cas de Asp-Asp-Asp, l'espèce ZnL est relativement stable comparée à Ala-Asp-Asp-Ala car la fonction β -carboxylate stabilise le complexe.

Dans le cas de Ala-Asp-Asp-Ala, la présence d'un résidu d'acide aspartique en seconde position exclut la coordination par la fonction carbonyle.

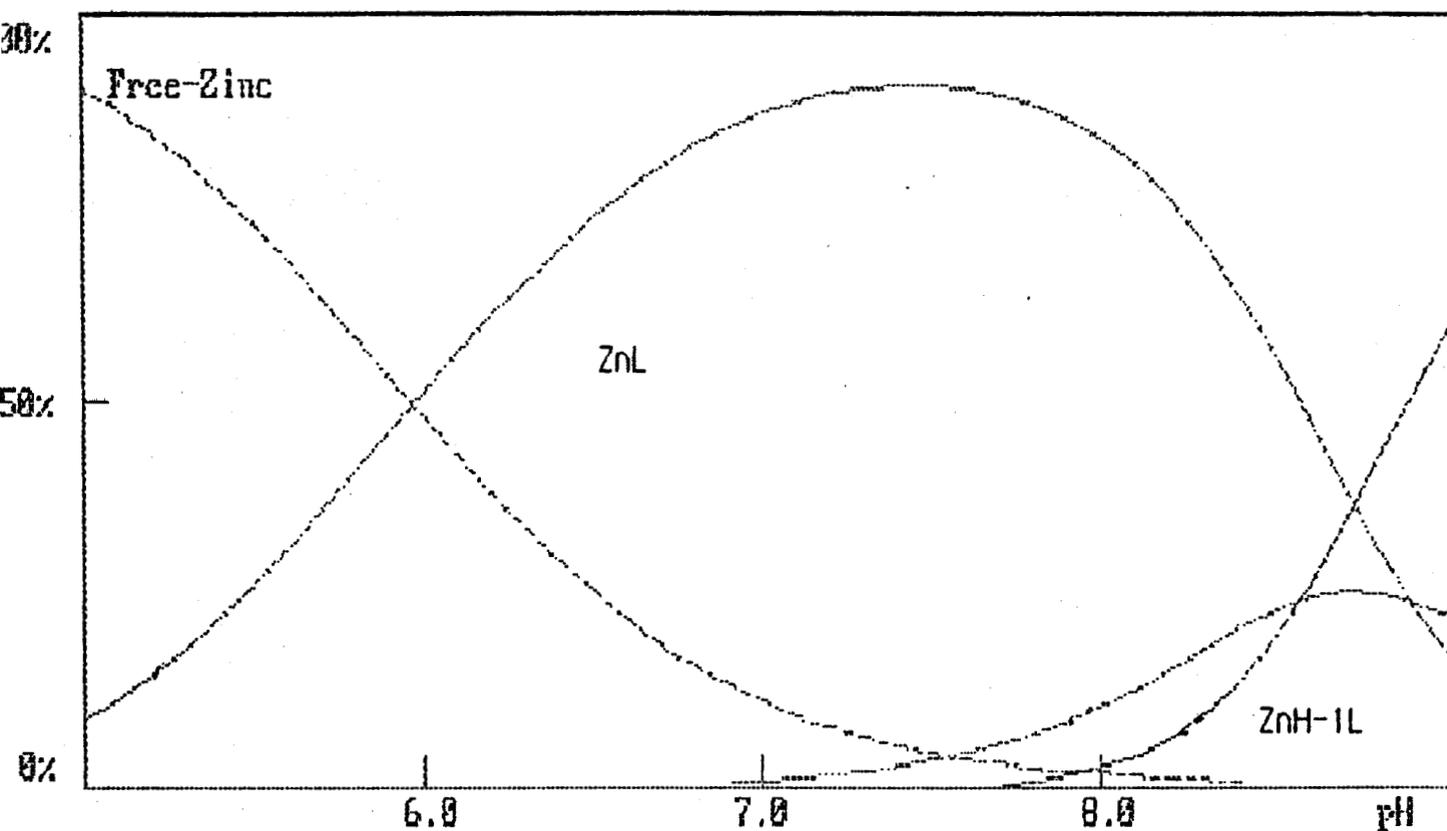
Les études menées avec le fibrinopeptide A montrent une courbe de distribution des espèces très similaire à celle obtenue pour Ala-Asp-Asp-Ala, mais dans ce cas il est difficile de conclure car nous ne disposons pas des données R.M.N. Le fibrinopeptide A comprenant dans sa séquence de nombreux aminoacides à chaîne latérale carboxylique, on peut penser que ce peptide adopte une conformation en solution rapprochant un groupe carboxylique du site de complexation N terminal.

3. CONCLUSION

Plus généralement, on peut dire que l'implication de la fonction carbonyle de la première liaison peptidique dans la formation de complexe avec le zinc est conditionnée par la proximité de résidus d'acide aspartique dans la séquence peptidique.

Lorsque l'acide aspartique est proche de la liaison amide (2Asp), la coordination exclut la participation de C=O, mais lorsque l'acide aspartique est plus éloigné la coordination par l'intermédiaire du groupe carbonyle se trouve beaucoup moins affectée.

Il semble que ce soit l'accumulation de charges négatives (COO⁻), et ceci est particulièrement sensible dans le cas de Ala-Asp-Asp-Ala qui conditionne l'exclusion de la fonction carbonyle dans la géométrie du complexe.



Courbes de distribution des espèces de Asp-Ala-Ala-Asp/ Zn (II)
rapport 2/1

figure 1

Tableau 1: Constantes de stabilité

Log β des valeurs

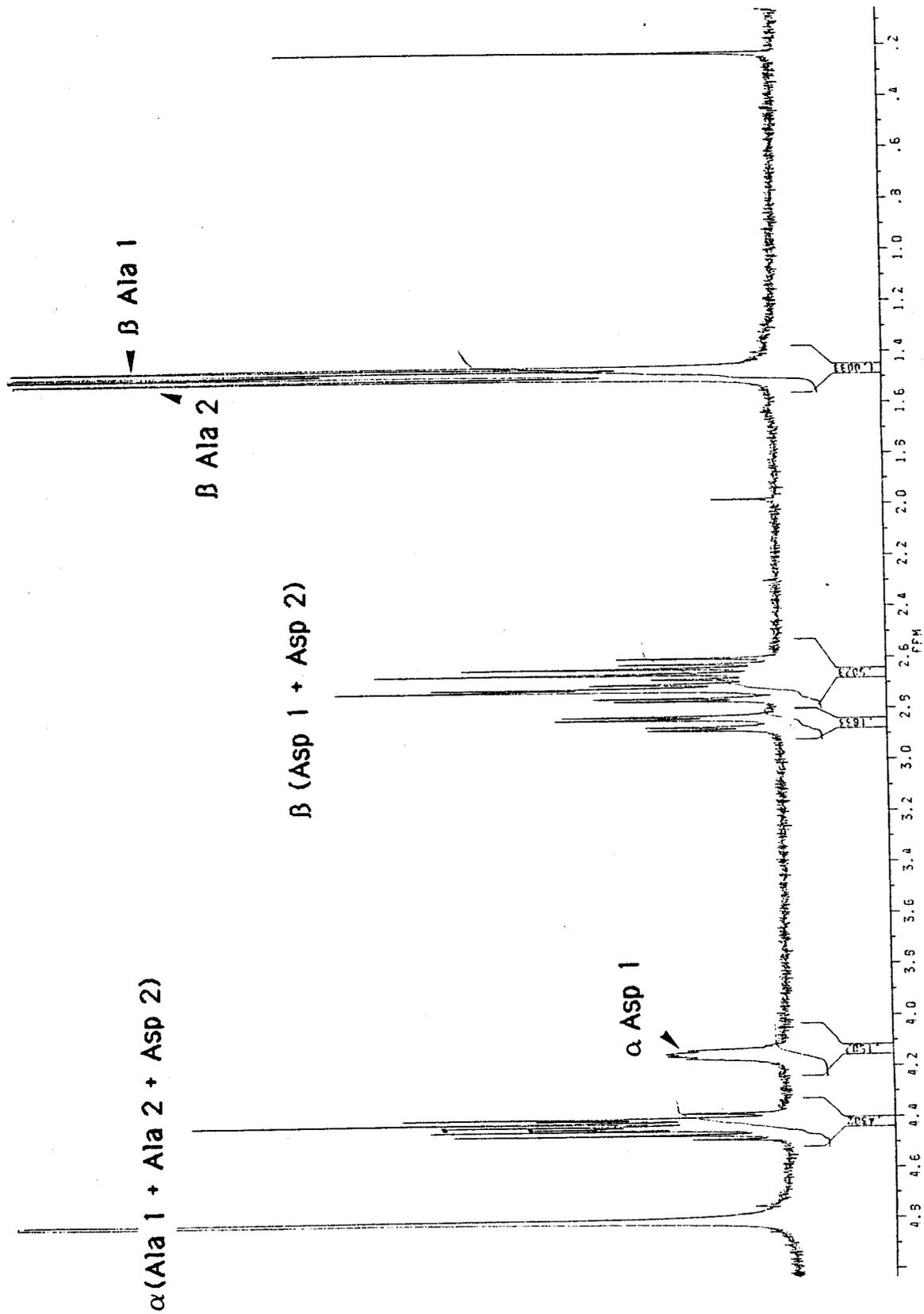
Ligand	ZnL	ZnH-1L	ZnH-2L
Asp-Ala-Ala-Asp	4.88	-4.00	-12.57

CHAPITRE III

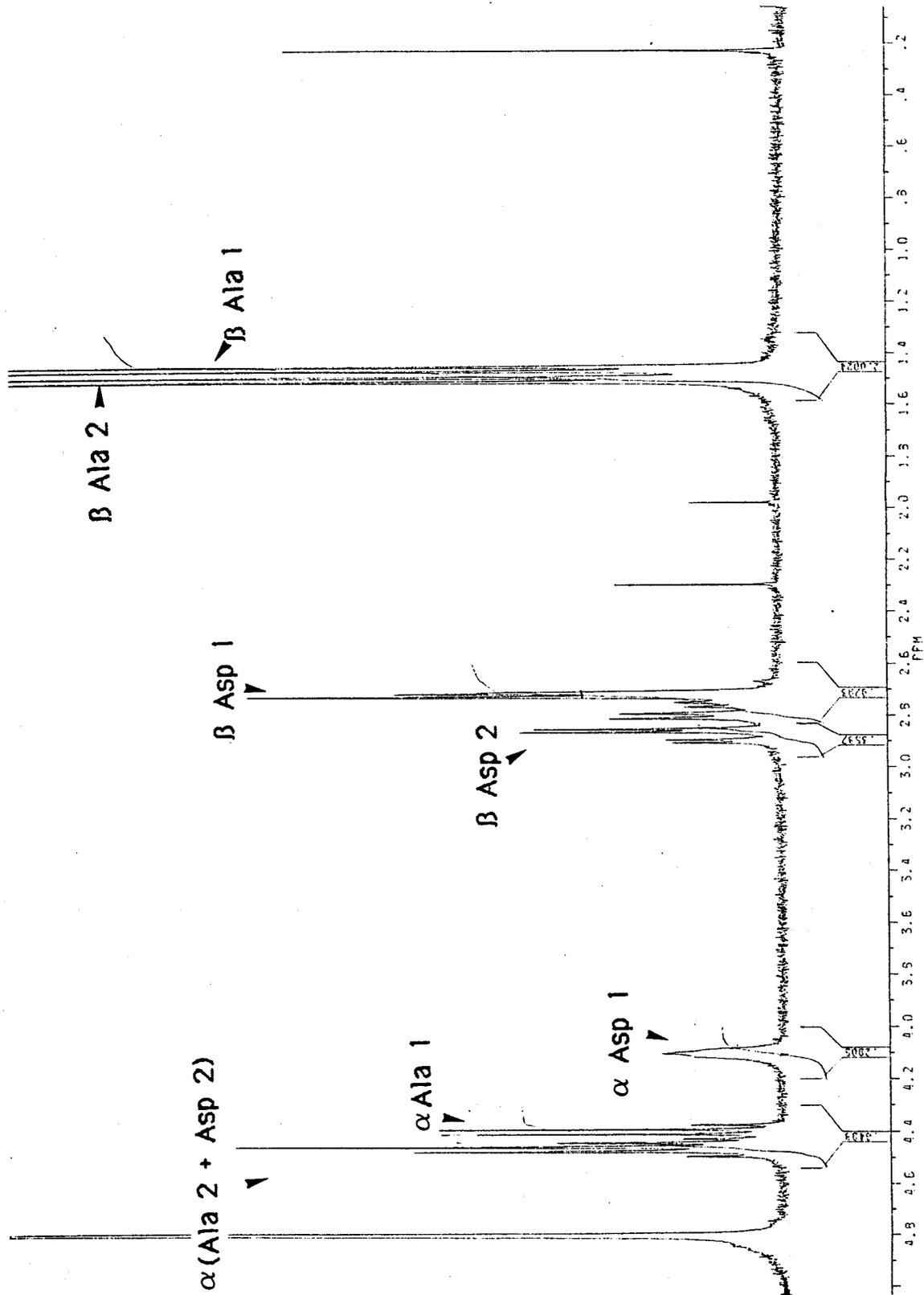
Complexation avec le zinc (II)

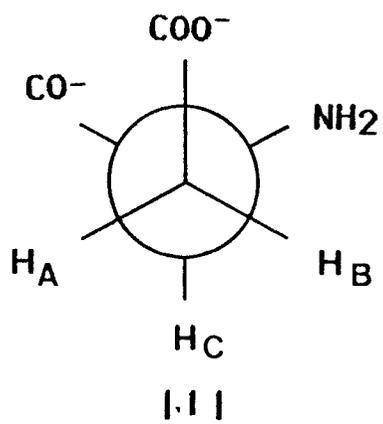
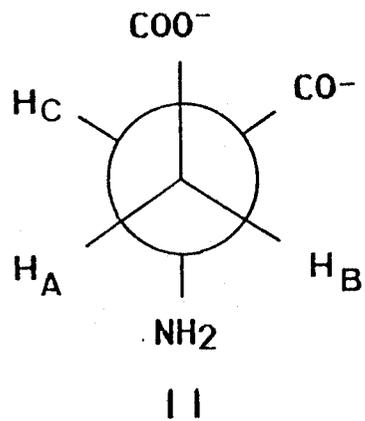
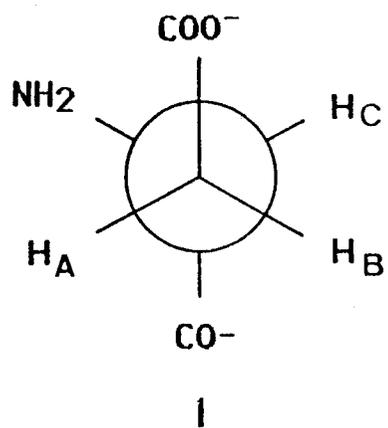
Spectre 1H RMN de Asp-Ala-Ala-Asp libre

figure 2



Spectre ^1H RMN de Asp-Ala-Ala-Asp / Zn(II)
rapport 2/1
figure 3





Population de rotamères

figure 4

Tableau 2

Paramètres 1H RMN de Asp-Ala-Ala-Asp libre à pD 7.5

VA (Hz)	VB (Hz)	VC (Hz)	JAC (Hz)	JBC (Hz)	JAB (Hz)	PI	PII	PIII
1052.35	1140.30	1657.15	9.0	4.7	16.2	.583	.194	.223

Paramètres 1H RMN de Asp-Ala-Ala-Asp complexé à pD 7.5

VA (Hz)	VB (Hz)	VC (Hz)	JAC (Hz)	JBC (Hz)	JAB (Hz)	PI	PII	PIII
1087.4	1640.3	5	5	-	.221	.221	.588	

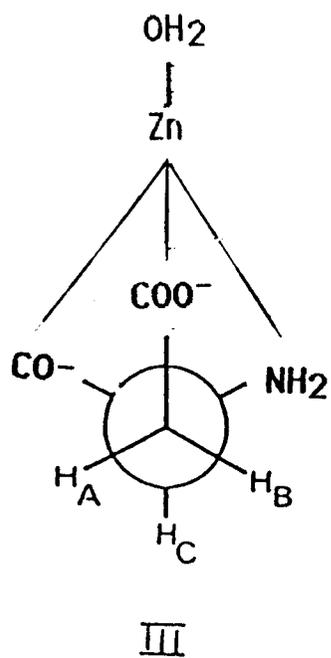
Tableau 4

Paramètres 1H RMN de Asp-Asp-Asp libre à pD 7.5

VA (Hz)	VB (Hz)	VC (Hz)	JAC (Hz)	JBC (Hz)	JAB (Hz)	PI	PII	PIII
1113.2	1172.15	1731.3	9.5	4.4	17.35	.629	.162	.205

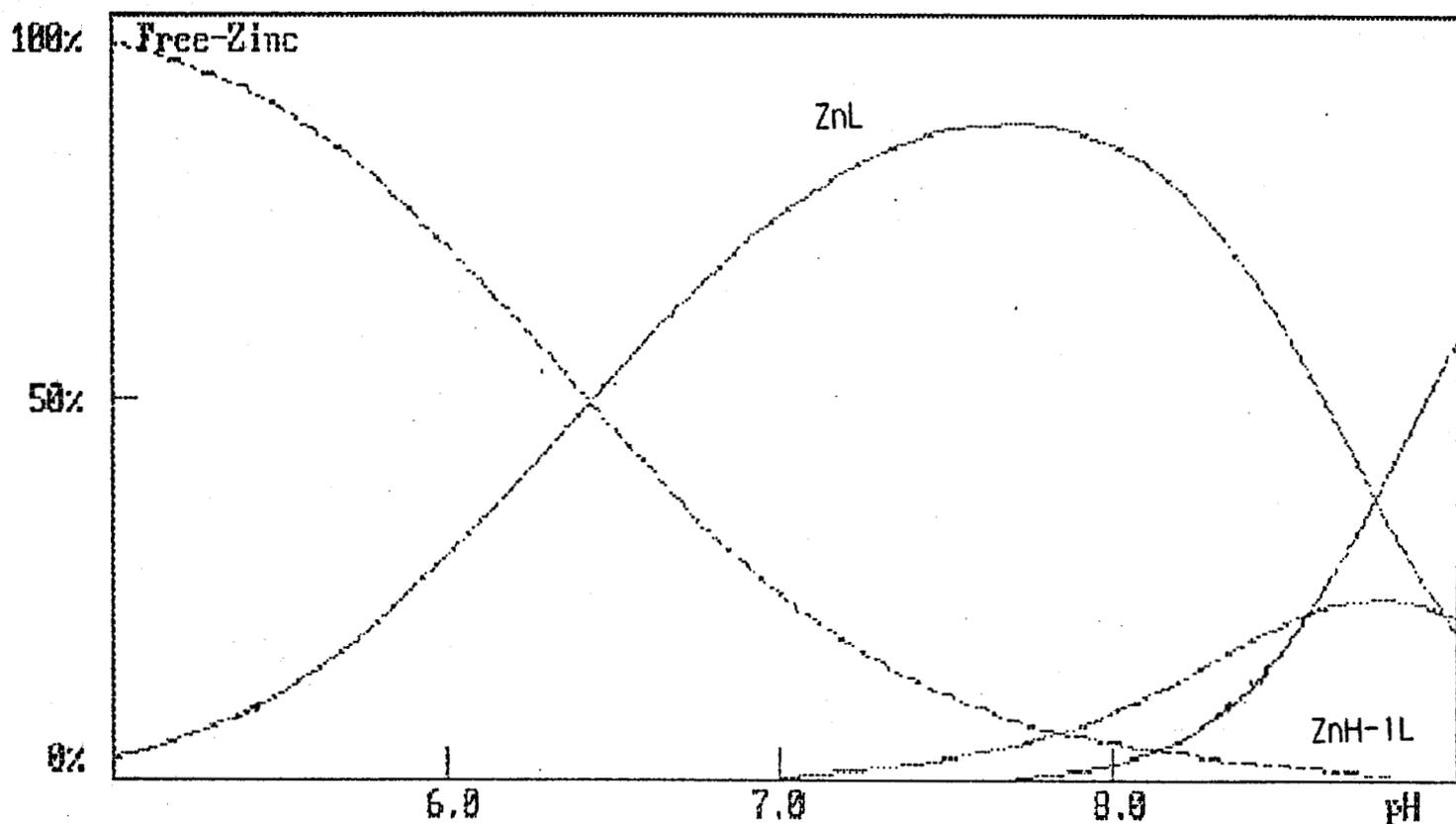
Paramètres 1H RMN de Asp-Asp-Asp complexé à pD 7.5

VA (Hz)	VB (Hz)	VC (Hz)	JAC (Hz)	JBC (Hz)	JAB (Hz)	PI	PII	PIII
1116.6	1172.95	1672.90	10.7	4.7	17.65	.737	.194	.069



Structure du complexe ZnL pour Asp-Ala-Ala-Asp

Figure 5



Courbes de distribution des espèces de Asp-Asp-Asp / Zn (II)
rapport 2/1

figure 6

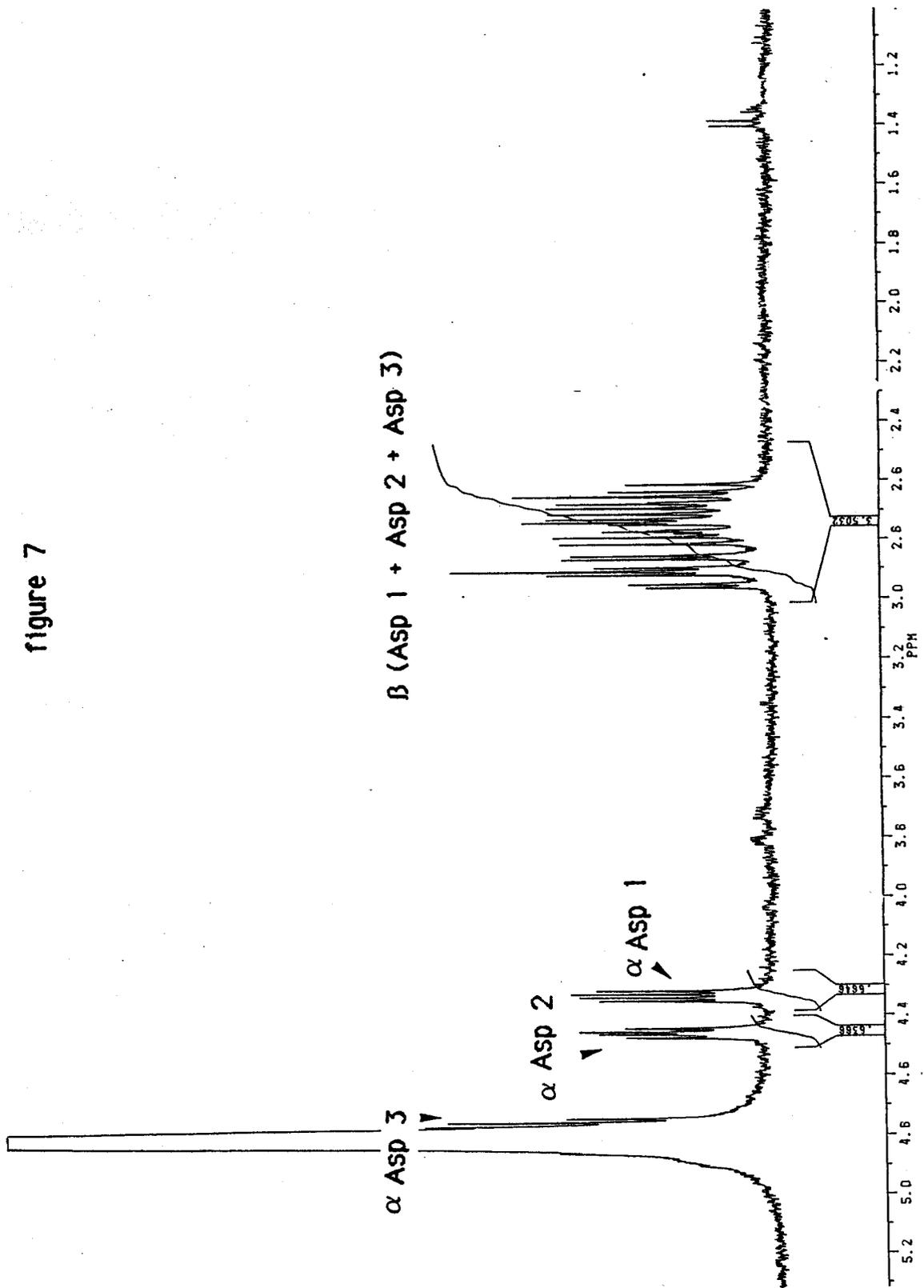
Tableau 3: Constantes de stabilité

Log β des valeurs

Ligand	ZnL	ZnH-1L	ZnH-2L
Asp-Asp-Asp	4.55	-4.40	-12.97

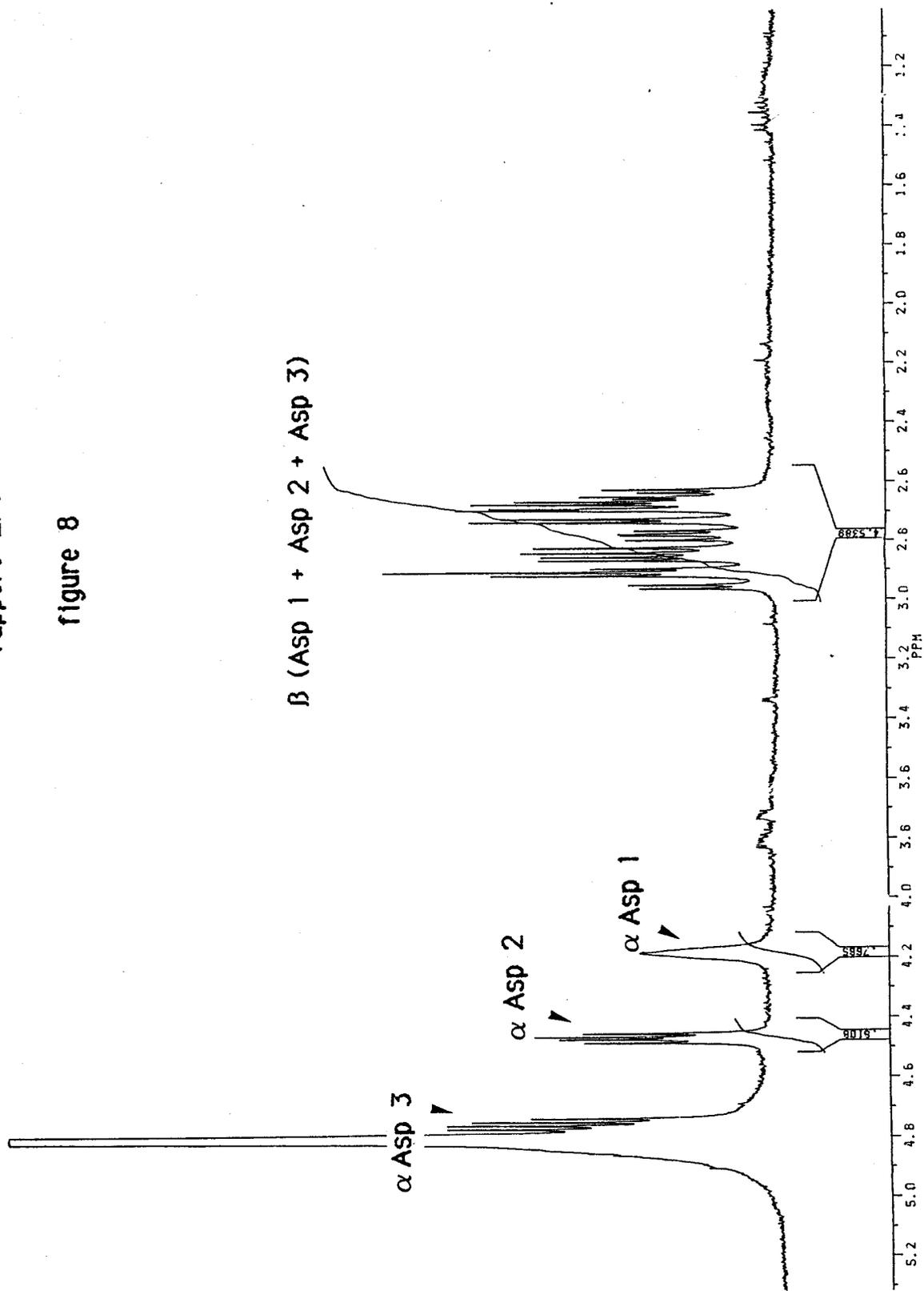
Spectre ^1H RMN de Asp-Asp-Asp libre

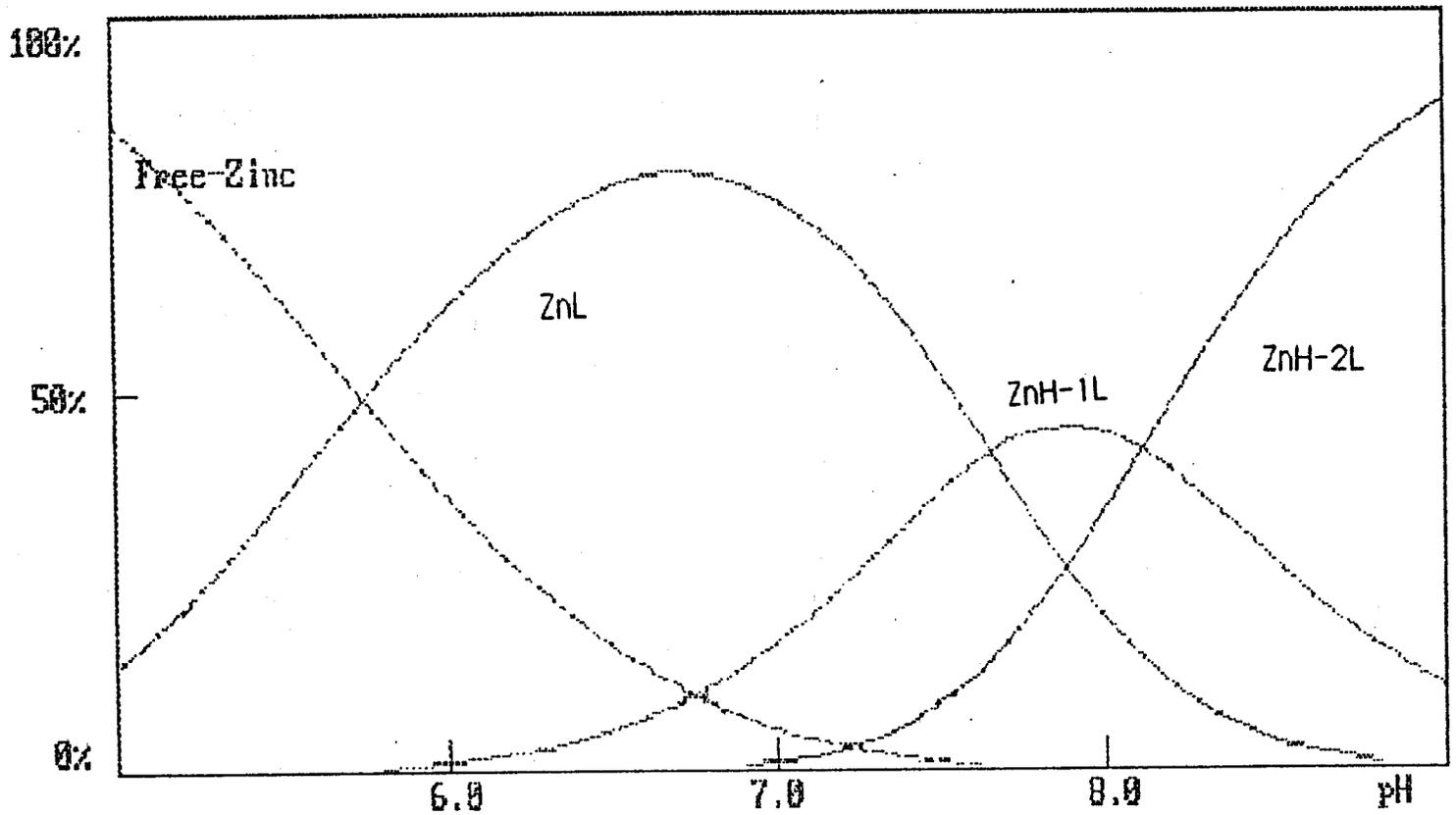
figure 7



Spectre ^1H RMN de Asp-Asp-Asp / $\text{Zn}(\text{II})$
rapport 2/1

figure 8





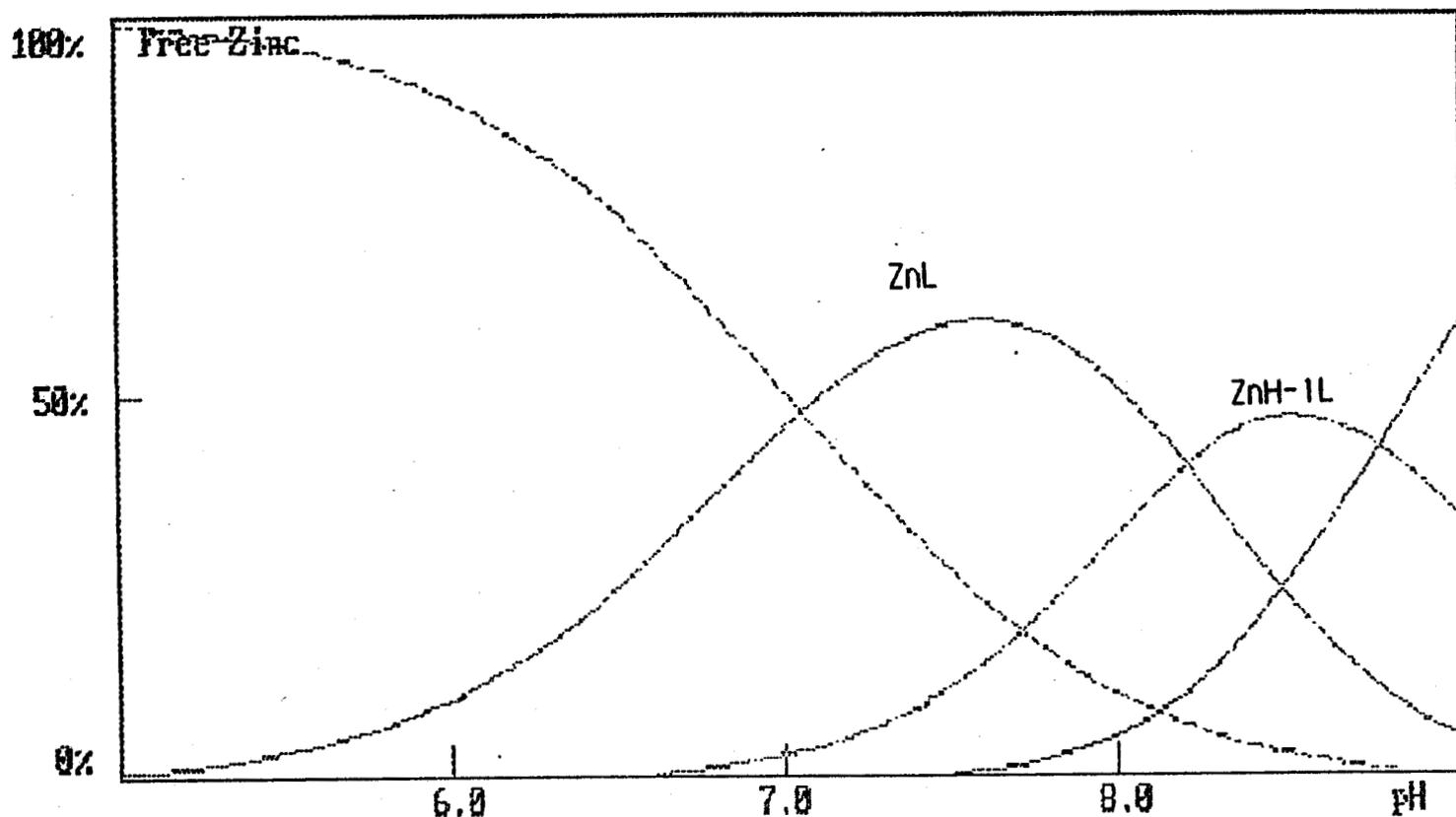
Courbes de distribution des espèces de Ala-Ala-Asp-Asp / Zn (II)
rapport 2/1

figure 9

Tableau 5: Constantes de stabilité

Log β des valeurs

Ligand	ZnL	ZnH-1L	ZnH-2L
Ala-Ala-Asp-Asp	4.55	-4.40	-12.97

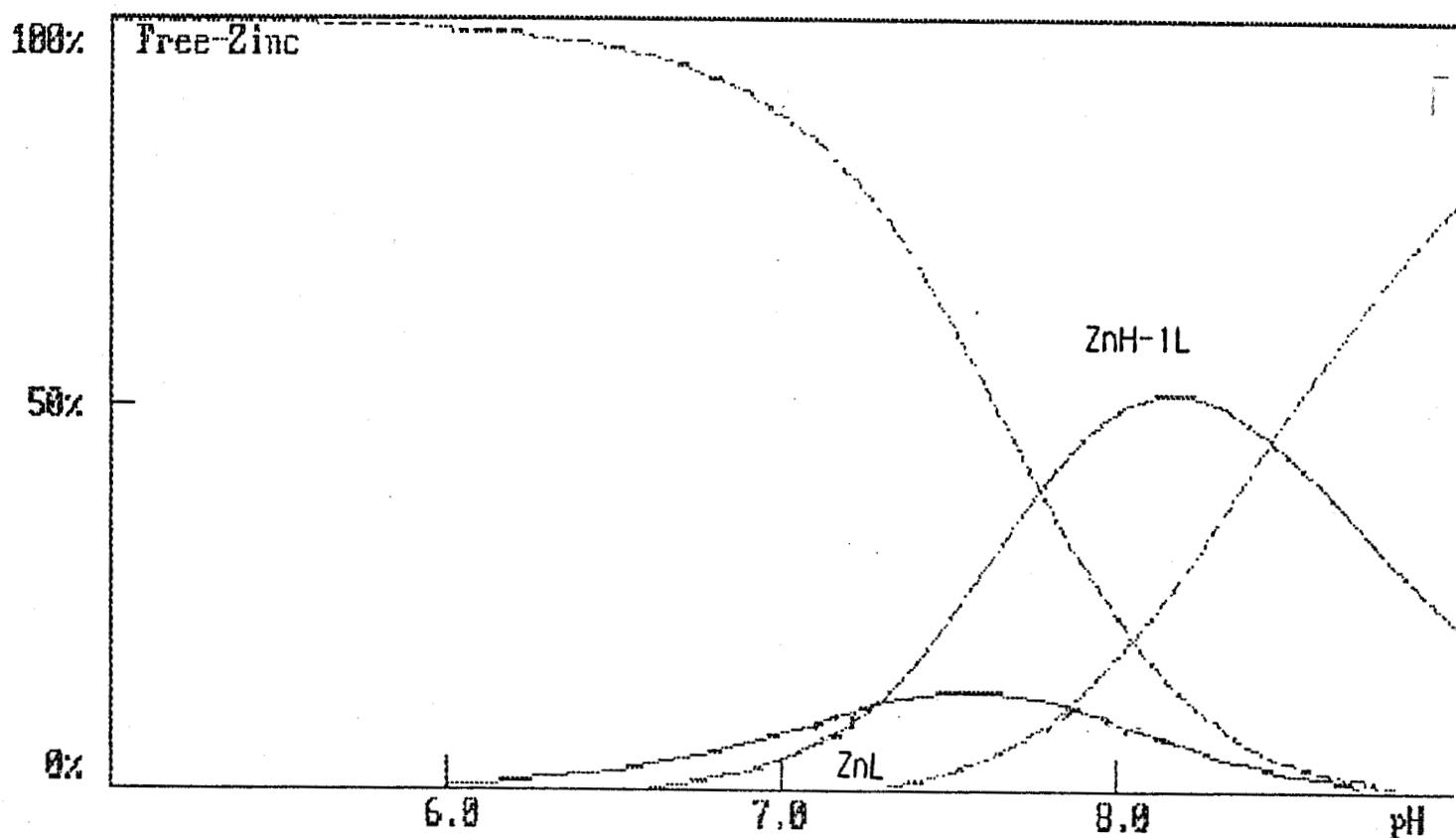


Courbes de distribution des espèces de Ala-Asp-Ala-Asp / Zn (II)
rapport 2/1

figure 10

Tableau 6: Constantes de stabilité

Ligand	Log β des valeurs		
	ZnL	ZnH-1L	ZnH-2L
Ala-Asp-Ala-Asp	4.09	-4.10	-12.86

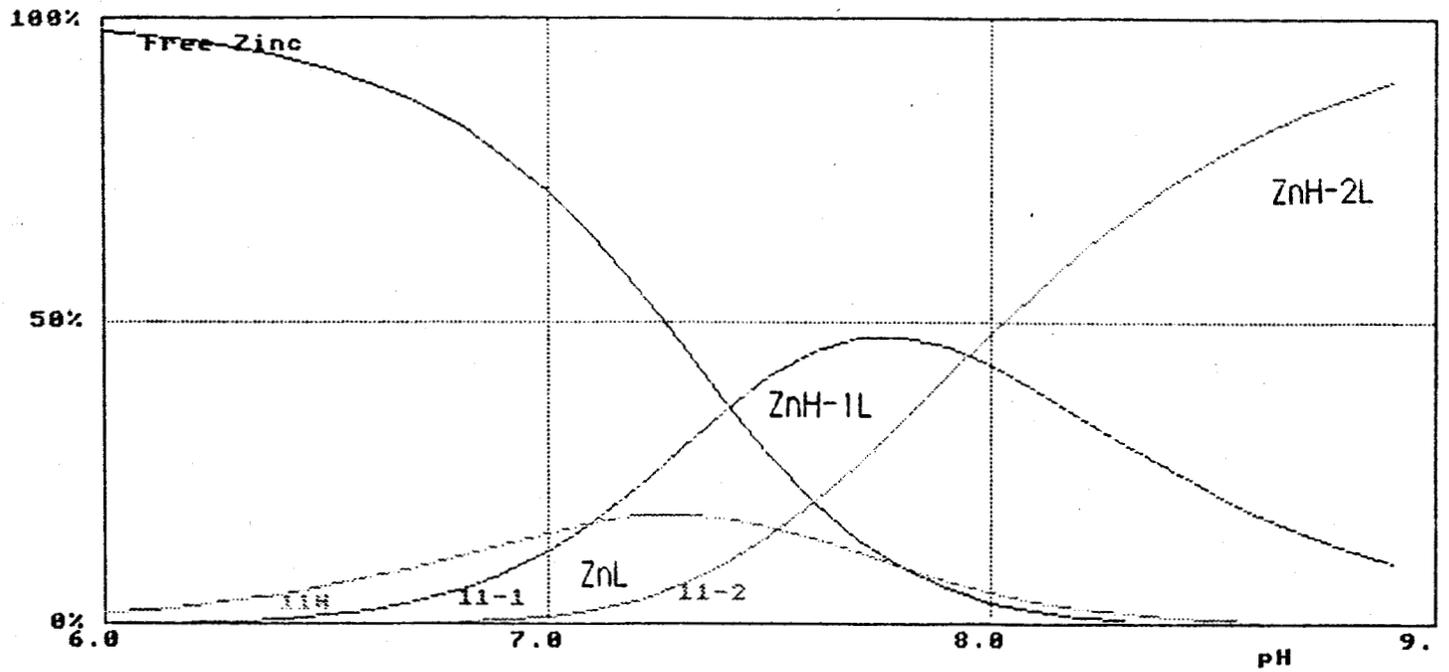


Courbes de distribution des espèces de Ala-Asp-Asp-Ala/ Zn (II)
rapport 2/1

figure 11

Tableau 7: Constantes de stabilité

Ligand	Log β des valeurs		
	ZnL	ZnH-1L	ZnH-2L
Ala-Asp-Asp-Ala	4.88	-4.00	-12.57



Courbes de distribution des espèces du Fibrinopeptide A/ Zn (II)
rapport 5/1

figure 12

Tableau 8: Constantes de stabilité

Log β des valeurs

Ligand	ZnL	ZnH-1L	ZnH-2L
Fibrinopeptide A	3.40	-3.85	-12.02

- 1 W.S. Kittl and B.M Rode, *Inorg. Chim. Acta*, 63 (1982) 47-52
- 2 D.L. Rabenstein, S.A. Daignault, A.A. Isab, A.P. Arnold and M.M. Shoukry, *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 6435-6439
- 3 Y.E. Kwa, B.B. Lin, N.J. Rose, B. Weinstein and L. Pickart, *Pept. Struct. Funct., Proc. 8 th Am. Pept. Symp.* (1983) 805-808
- 4 S.A. Daignault, A.P. Arnold, A.A. Isab and D.L. Rabenstein, *Inorg. Chem.*, 24 (1985) 3984-3988
- 5 L.A. Shimizu and K. Kustin, *J. Inorg. Biochem.*, 18 (1983) 153-160

ANNEXE THEORIQUE

ANNEXE THEORIQUE

I. SPECTROSCOPIE U.V - VISIBLE

Afin d'extraire des renseignements utiles d'un spectre ultraviolet ou visible, la longueur d'onde du maximum d'absorption et son intensité doivent être mesurées avec précision. Le composé doit être dissous dans un solvant convenablement choisi, n'absorbant pas lui-même dans la région à étudier. Pour les peptides l'eau est un solvant idéal pour les études U.V - Visible.

De nombreux spectrophotomètres enregistreurs fournissent directement la courbe de l'intensité de l'absorption en fonction de la longueur d'onde.

L'intensité de l'absorption A ou la densité optique est donnée par la relation:

$$A = \log (I_0 / I)$$

où I_0 est l'intensité de la lumière incidente et I l'intensité de la lumière transmise.

Le coefficient d'extinction moléculaire est donné par:

$$\epsilon = A / cl$$

où c est la concentration moléculaire et l la traversée optique en cm.

La mesure de ϵ n'a de sens que si la loi de BEER LAMBERT est respectée.

2. DICHROISME CIRCULAIRE

Une onde électromagnétique linéairement polarisée peut être considérée comme la résultante de deux composantes droite et gauche circulairement polarisées. Lorsque cette onde traverse un milieu contenant des chromophores optiquement actifs, l'indice de réfraction des deux composants diffère, entraînant une rotation du plan de polarisation d'un angle α . On observe alors le phénomène de dispersion optique rotatoire. Si l'onde se trouve sur une bande d'absorption optiquement active, le coefficient d'extinction de chacune des composantes sera différent. Ainsi le rayon émergent sera elliptiquement polarisé (figure 1) et le milieu présentera le phénomène de dichroïsme circulaire. La combinaison de l'absorption différentielle et la différence de transmission de la lumière polarisée droite ou gauche dans la région spectrale où se manifeste une bande d'absorption optiquement active est appelée "effet Cotton". Il se manifeste en dichroïsme circulaire par une variation de $\Delta\epsilon$ positive ou négative.

L'ellipticité ψ est reliée aux coefficients d'absorption droit ou gauche K_G et K_D :

$$\psi = (K_G - K_D) / \lambda \quad \text{avec } \psi \text{ en radians}$$

$\text{tg } \psi = a / b$, a et b étant respectivement les grands et petits axes de l'ellipse.

Deux grandeurs ont été introduites pour exprimer l'ellipticité d'une solution:

L'ellipticité spécifique:

$$(\psi) = \psi / lc$$

avec ψ en degrés, l en dm et c en g/ml.

- L'ellipticité molaire

$$(\theta) = (\psi)_m / 100$$

M étant la masse molaire du soluté.

Le coefficient d'absorption K est relié au coefficient d'extinction molaire par la relation: $K = 2,303 \lambda c / 4$.

ce qui entraîne que:

$$(\theta) = 3300 \Delta \epsilon \text{ (en degrés. cm}^2 \text{ décimole}^{-1}\text{)}$$

Le dichrographe fournit directement la différence de densité optique:

$$\Delta A = A_G - A_D$$

On obtient donc $\theta = 3300 M \Delta A \cdot s / lc$ avec c en g/l, l en cm, $A_G - A_D$ mesurée sur le spectre en mm et s (sensibilité) en mm^{-1} .

La force rotationnelle R_K permet de mesurer les interactions entre un chromophore et son entourage asymétrique. Les phénomènes d'absorption et de dichroïsme circulaire sont produits par des déplacements de charges induits par une onde électromagnétique en créant des dipôles électriques et magnétiques. Elle correspond à l'aire de la bande en dichroïsme circulaire.

L'équation de R_K , en prenant une transition située entre les états électroniques a et b est:

$$R_K = \text{Im} (a | \mu_e | b) (b | \mu_m | a)$$

c'est à dire la partie imaginaire du produit scalaire des moments de transition dipolaire électrique μ_e et magnétique μ_m .

L'équation devient en prenant comme angle entre les moments magnétiques (μ) et électrique (ρ):

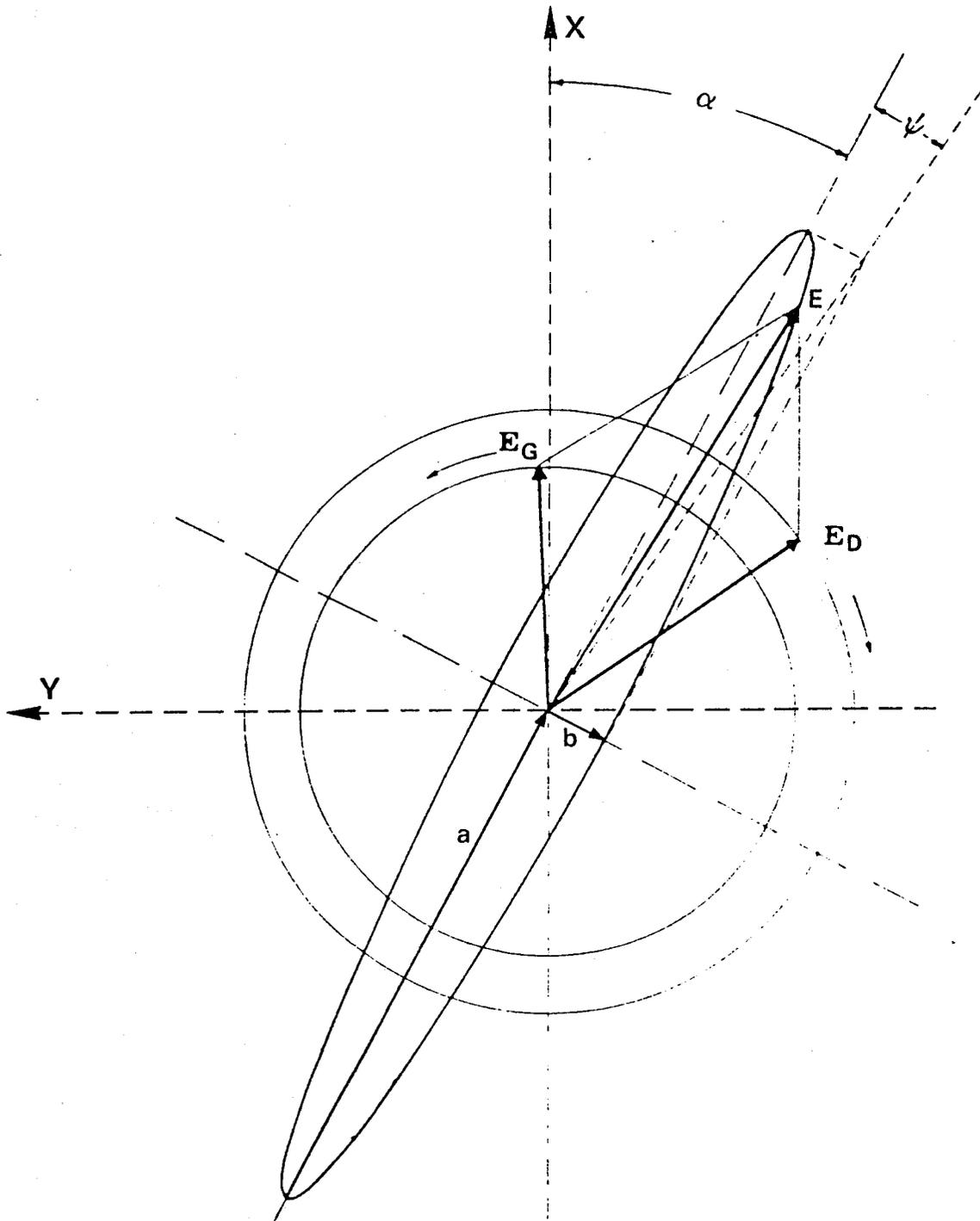


Figure 1

Schéma du phénomène de dichroïsme circulaire

$$R_K = \rho \mu \cos \gamma$$

La transition sera active en dichroïsme circulaire si R_K est non nul.

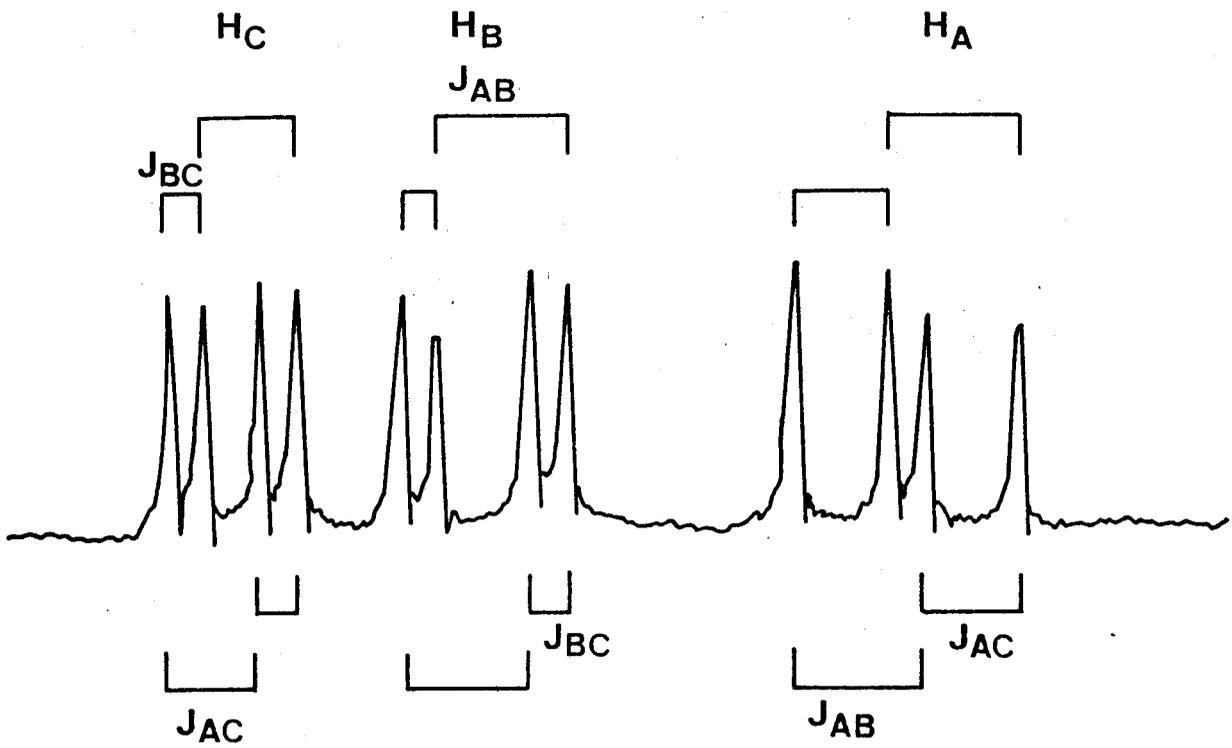
3. ETUDE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (R.M.N.)

La comparaison des spectres RMN des peptides libres et complexés apporte beaucoup de renseignements sur les sites de complexation et la stéréochimie des complexes étudiés. L'étude par RMN, lorsqu'elle est possible permet de confirmer les données potentiométriques. En effet, la déprotonation d'une fonction par un métal tel que le Zinc (II) entraîne le blindage des protons en fonction de leur proximité (1,2,3). Le déplacement chimique de ces protons permet de connaître le ou les centres de déprotonation.

Les acides aminés que nous avons étudiés présentent un spectre de type ABC (figure 2) correspondant à la résonance des unités CH-CH₂ des résidus d'acide aspartique. Ces unités présentant une activité optique sont susceptibles d'introduire le phénomène de non équivalence des protons géminés par une dissymétrie moléculaire.

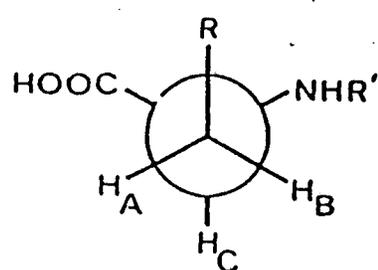
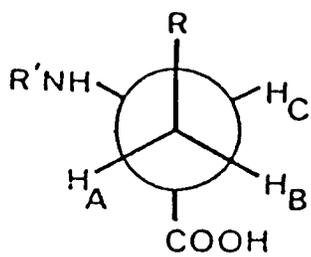
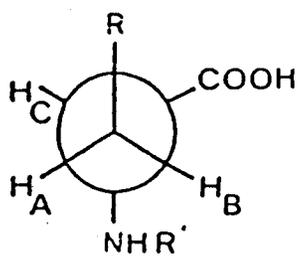
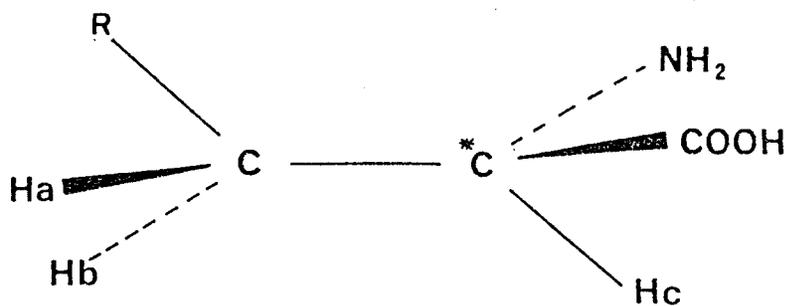
En solution un équilibre rapide s'établit entre les trois rotamères représentés figure 3. La rotation se faisant autour de la liaison C α — C β .

On peut déterminer les constantes de couplage et les déplacements chimiques des protons H_A, H_B et H_C mais seules les constantes J_{AB} et ν_C sont obtenues avec assez de précision. Les autres valeurs étant approximatives, il est nécessaire d'utiliser une méthode de calcul pour les affiner par itération. Dans le cas du mélange des rotamères, les déplacements chimiques et les constantes de couplage représentent la moyenne de ceux-ci pour chaque rotamère (4).



Spectre de type ABC

figure 2



Notation des rotamères autour de la liaison C — C

figure 3

Karplus a proposé une méthode d'approximation des constantes de couplages vicinales en fonction des angles de liaison CH de CH-CH₂ pour les trois rotamères (5).

L'évaluation des constantes de couplage gauche (J_G) et trans (J_T) permet alors de déduire la population des trois rotamères. J_{AB} et J_{BC} peuvent être rapportées aux fractions molaires des trois rotamères et aux paramètres J_G et J_T, dus aux positions du proton H_C relativement à H_A et H_B par l'intermédiaire des équations de Pachler (4).

$$J_{AC} = P_I J_G + P_{II} J_T + P_{III} J_G$$

$$J_{BC} = P_I J_T + P_{II} J_G + P_{III} J_G$$

$$\text{avec } P_I + P_{II} + P_{III} = 1$$

$$\text{donc } J_{BC} - J_{AC} = (P_{II} - P_I) (J_T - J_G)$$

De ces équations, on déduit les populations des différents rotamères:

$$P_I = (J_{BC} - J_G) / (J_T - J_G)$$

$$P_{II} = (J_{AC} - J_G) / (J_T - J_G)$$

$$P_{III} = (J_{BC} - J_{AC}) / (J_T - J_G)$$

Les paramètres les plus utilisés sont ceux proposés par Pachler (4 - 6) :

$$J_G = 2,56 \text{ Hz et } J_T = 13,60 \text{ Hz}$$

4. ETUDE PAR RESONNANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE (RPE) (7)

La RPE est d'un apport non négligeable dans la détermination et l'examen des complexes. L'avantage de cette technique c'est de n'être sensible qu'aux atomes possédant un électron non apparié en donnant des renseignements sur leur localisation, leur environnement et leur état d'oxydation.

Sous l'effet d'un champ électromagnétique dont la fréquence se trouve dans le domaine des microondes, les électrons célibataires non appariés peuvent subir une transition d'état d'énergie.

La différence d'énergie entre les différents états varie de manière linéaire selon le champ appliqué H_0 .

$$\Delta E = h \nu = g \beta H_0$$

E = variation d'énergie

g = facteur spécifique d'un radical donné

β = magnéton de Bohr

H_0 = intensité du champ (Gauss)

ν = fréquence de la résonance

Pour une valeur de champ donné si un électron célibataire reçoit une énergie égale à $h\nu$, il l'absorbera et passera de l'état d'énergie $-1/2$ à l'état $+1/2$: c'est le phénomène de résonance.

L'ion cuivrique ($4s^0, 3d^9$) possède un seul électron célibataire et un spin électronique total de $1/2$. Sous l'action d'un champ magnétique et sans couplage hyperfin, on observerait une seule transition entre les niveaux énergétiques et une seule raie de résonance.

En phase liquide, dans un milieu isotrope où les mouvements sont rapides, on observerait une seule raie d'absorption de forme gaussienne dont la dérivée est simple.

$$h\nu = g \beta H_0$$

En phase solide à 77°K , les ions Cu (II) sont arrangés dans un réseau cristallin ou répartis au hasard dans une matrice amorphe, à ce moment là la forme de la raie n'est plus gaussienne.

4.1. LES PARAMETRES DES SPECTRES RPE

4.1.1. LE FACTEUR g

Le facteur g ou facteur de décomposition spectroscopique permet d'apprécier le degré de localisation des électrons non couplés qui provoquent l'absorption RPE.

Dans le cas des substances cristallines le facteur g est une grandeur tensorielle et dépend de l'orientation du cristal étudié par rapport au champ magnétique. C'est ainsi que le facteur g peut fournir des informations sur la symétrie des champs locaux qui agissent sur l'électron à spin non couplé.

g se décompose en g_x , g_y , g_z selon les trois axes avec :

$$g_x = g_y = g_{\perp}$$

$$g_z = g_{//}$$

On a dans ce cas un tenseur g à symétrie axiale caractérisé par deux valeurs principales :

$g_{//}$ qui correspond à la direction parallèle à H_0

g_{\perp} qui correspond aux directions perpendiculaires à H_0

4.1.2. LE COUPLAGE HYPERFIN

- Couplage isotrope

L'absorption d'énergie correspondrait à une seule raie d'absorption s'il n'y avait pas interaction des moments magnétiques de l'électron célibataire et des noyaux voisins.

Le couplage hyperfin est un couplage de type magnétique entre l'électron à spin non couplé et le noyau de l'atome correspondant. Le moment magnétique d'un noyau caractérisé par un nombre quantique de spin nucléaire I peut occuper dans un champ magnétique statique H_0 , $2I + 1$ positions différentes avec une probabilité égale. A chacune de ces

positions correspond une des $2I + 1$ valeurs possibles du nombre quantique magnétique nucléaire ($m = -I, I + 1, \dots, I - 1, I$). Cela fait qu'au champ magnétique constant H_0 qui lève la dégénérescence de spin du niveau électronique, s'ajoutent $2I + 1$ champs magnétiques locaux (correspondant aux $2I + 1$ orientations du moment magnétique nucléaire) créés par le noyau à l'endroit où se trouve l'électron.

Le spin nucléaire du cuivre (^{63}Cu ou ^{65}Cu) est égal à $I = 3/2$. Le cuivre possède donc 4 états de spin : $\pm 3/2$ et $\pm 1/2$. Cette interaction crée de ce fait pour chaque état de spin de l'électron $2I + 1$ soit quatre niveaux d'énergie possibles.

En fonction des règles de sélection, quatre transitions seront autorisées : on observe 4 raies d'absorption avec une constante de couplage A égale à ΔH .

- Couplage anisotrope

En réalité, la représentation est encore plus simple puisque le couplage hyperfin n'est pas isotrope. Il existe un tenseur de couplage à symétrie axiale caractérisé par :

$$A_{//} = A_z \text{ et } A_{\perp} = A_x = A_y$$

où A_x, A_y, A_z sont les trois valeurs de A selon les trois directions. Dans le cas de l'ion Cu^{2+} : $A_{//} \gg A_{\perp}$

g est situé au milieu des raies 2 et 3, et se calcule à l'aide des deux relations :

$$h\nu = g_{//} \beta H_{//}$$

$$h\nu = g_r \beta H_r$$

H_r est la valeur du champ de référence du diphenylpicorylhydrazyl (DDPH) pour lequel $g_r = 2,0036$:

$$g_{//} = g_r (H_r / H_{//}) = 2,0036 (H_r / H_{//})$$

$A_{//}$ se lit directement sur le spectre.

- Largeur des raies

La largeur et la forme de la raie dépendent de la grandeur et de la nature des interactions qui ont lieu dans la substance étudiée.

Les valeurs de g et de A dépendent de l'orientation relative du champ et de l'ion (ou de l'atome). L'anisotropie peut être modulée par les mouvements moléculaires : l'effet anisotrope est atténué si les réorientations de l'ion (ou de l'atome) sont très rapides, le spectre est alors composé de raies fines (une raie fine correspond à un électron célibataire mobile, un spectre à raies larges est la preuve d'une mobilité restreinte de l'ion).

- 1 B. Decock-le-Reverend, L. Andrianarijaona, C. Livera, L.D. Pettit, I. Steel, H. Kozłowski, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2221 (1986)
- 2 H. Kozłowski, *Inorg. Chim. Acta* 31, 135 (1978)
- 3 G. Formicka-Kozłowska, H. Kozłowski, G. Kupryszewski *Inorg. Chim. Acta* 46, 29 (1980)
- 4 K.G.R. Pachler, *Spectrochimica Acta* 19, 2085 (1963) et 20, 281 (1964)
- 5 N. Karplus, *J.A.C.S.*, 2870 (1963)
- 6 J. Feeney, *J. Magn. Res.* 21, 473 (1976)
- 7 R.S. Alger, *Electron paramagnetic Resonance*, Wiley Interscience, New-York, (1968)

CONCLUSION

L'objectif principal de ce travail résidait dans l'étude de l'interaction de cations métalliques tels que le Cu(II) et le Zn(II) avec le fibrinopeptide A et des oligopeptides comportant dans leur séquence deux ou trois résidus d'acide aspartique (les autres résidus étant des alanines).

La première partie de ce travail a donc consisté en la synthèse de ces peptides soit en phase homogène soit en phase gel.

La synthèse classique en phase homogène nous a permis de préparer le tripeptide Asp-Asp-Asp ainsi que tous les produits de départ nécessaires à la synthèse en phase gel des tétrapeptides.

Nous avons alors dans un deuxième temps étudié la complexation des peptides préparés par des métaux biologiquement importants tels que le Cu(II) et le Zn(II).

Ainsi, à l'aide de la spectroscopie électronique U.V.-Visible, du dichroïsme circulaire, de la R.M.N. du proton, de la résonance paramagnétique électronique et de la potentiométrie, nous avons pu déterminer les différents sites de complexation et la structure des divers complexes formés en solution.

Les résultats obtenus lors des études de la complexation du fibrinopeptide A avec le Cu(II) montrent, comme il avait déjà été observé avec le fragment N terminal, que la chaîne latérale β -carboxylate du second résidu d'acide aspartique joue un rôle très spécifique dans l'interaction métal-peptide et dans la grande stabilité de l'espèce à deux azotes formée à pH physiologique.

D'autre part cette étude montre que de petits peptides peuvent être utilisés comme modèles de structures peptidiques plus complexes.

En ce qui concerne l'étude des oligopeptides comportant 2 ou 3 résidus d'acide aspartique dans leur séquence, les résultats confirment le rôle spécifique de la chaîne latérale β -carboxylate dans la formation et la stabilisation des complexes, mais montrent qu'un résidu d'acide aspartique en position 4 dans la séquence n'a pas d'influence significative sur la stabilité des complexes formés.

Par conséquent, la stabilisation des différentes espèces par la fonction β -carboxylate ne peut avoir lieu que lorsqu'il existe une possibilité de coordination avec le Cu(II) dans le plan équatorial.

Dans le cas du Zn(II), les études réalisées (R.M.N. et potentiométrie) montrent que ce métal se révèle incapable de déprotoneur la liaison amide.

D'autre part les sites de complexation du métal sont séquence dépendants.

En effet lorsque l'acide aspartique occupe la première position dans la séquence peptidique, la complexation fait intervenir trois sites: la fonction amine terminale, la fonction β -carboxylate et la fonction carbonyle (on note par ailleurs que la chaîne latérale β -carboxylate stabilise dans ce cas l'espèce ZnL).

Cependant, lorsque l'acide aspartique se trouve en deuxième position dans la séquence peptidique, la fonction carbonyle est exclue du site de complexation. Ceci est particulièrement sensible pour le peptide Ala-Asp-Asp-Ala où la seule fonction intervenant dans le complexe est la fonction amine terminale.



Résumé

L'objectif principal de ce travail réside dans l'étude de l'interaction de cations métalliques tels que le Cu(II) et le Zn(II) avec le fibrinopeptide A et des oligopeptides comportant dans leurs séquences deux ou trois résidus d'acide aspartique.

La première partie de ce travail a donc consisté en la synthèse de ces peptides soit en phase homogène soit en phase gel.

A l'aide de la spectroscopie électronique U.V.-visible, du dichroïsme circulaire, de la R.M.N. du proton, de la résonance paramagnétique électronique et de la potentiométrie, nous avons pu déterminer les différents sites de complexation et la structure des divers complexes formés en solution.

Les résultats obtenus lors des études de la complexation du fibrinopeptide A avec le Cu(II) montrent, comme il avait déjà été observé avec le fragment N-terminal, que la chaîne latérale β -carboxylate du second résidu d'acide aspartique joue un rôle très spécifique dans l'interaction métal-peptide et dans la grande stabilité de l'espèce à deux azotes formée à pH physiologique.

D'autre part cette étude montre que de petits peptides peuvent être utilisés comme modèles de structures peptidiques plus complexes.

En ce qui concerne l'étude des oligopeptides comportant 2 ou 3 résidus d'acide aspartique dans leur séquence, les résultats confirment le rôle spécifique de la chaîne latérale β -carboxylate dans la formation et la stabilisation des complexes, mais montrent qu'un résidu d'acide aspartique en position 4 dans la séquence n'a pas d'influence significative sur la stabilité des complexes formés.

Dans le cas du Zn(II), les études réalisées (R.M.N. et potentiométrie) montrent que ce métal se révèle incapable de déprotoner la liaison amide. Lorsque l'acide aspartique occupe la première position dans la séquence peptidique, la complexation fait intervenir trois sites : la fonction amine terminale, la fonction β -carboxylate et la fonction carbonyle.

Cependant, lorsque l'acide aspartique se trouve en deuxième position dans la séquence peptidique, la fonction carbonyle est exclue du site de complexation. Ceci est particulièrement sensible pour le peptide Ala-Asp-Asp-Ala où la seule fonction intervenant dans le complexe est la fonction amine terminale.

Mots-Clés

Complexation-Peptide

Cuivre(II)-Zinc(II)

Acide aspartique-Alanine

Fibrinopeptide A

U.V.-visible

Dichroïsme circulaire

R.M.N.

R.P.E.

Potentiométrie