### UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

N° D'ORDRE: 1837



Présentée



Pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

Par

#### Philippe CHAVATTE

#### ANALYSE CONFORMATIONNELLE DES DIASTEREOISOMERES DE LA MOLECULE UCB16101, ANTAGONISTE DES RECEPTEURS DE LA SUBSTANCE P

Soutenue le 13 Mars 1997 devant la Commission d'Examen:

Directeur de Thèse :

Professeur G. VERGOTEN

Rapporteurs:

Professeur G. GRASSY

Professeur J.P. HENICHART

Examinateurs:

Professeur D. LESIEUR

Docteur M. NEUWELS

## **INTRODUCTION**

#### INTRODUCTION

La substance P, neuropeptide de la famille des tachykinines qui se lie aux récepteurs NK1, est impliquée dans la transmission de la douleur, l'initiation de la réponse immunitaire et la réaction inflammatoire. Mais son implication suscitant le plus grand intérêt est celle dans l'asthme par un mécanisme de type inflammation neurogène. Cette observation suggère l'utilisation des antagonistes des récepteurs NK1 pour un nouveau traitement de cette maladie.

Les études préliminaires, basées sur des modifications de la structure de la substance P ont abouti à la découverte d'antagonistes peptidiques (spantide II, GR71251, FR113680,...). Toutefois, ces peptides offrent un intérêt thérapeutique limité du fait de leur instabilité métabolique (dégradation par les enzymes protéolytiques et l'acidité gastrique), leur faible biodisponibilité (passage difficile des barrières), leur sélectivité relative pour les récepteurs (flexibilité conformationnelle). Par conséquent, pour pallier ces inconvénients, des travaux récents ont porté sur la recherche d'antagonistes non peptidiques (CP96345, CP99994,...).

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre d'une démarche rationnelle originale de conception d'antagonistes non-peptidiques des récepteurs de la substance P qui consiste, dans un premier temps, à identifier un "lead" peptidique, puis, dans un second temps, à déterminer la conformation supposée bioactive adoptée au niveau du récepteur par ce petit peptide afin de proposer un pharmacophore. La connaissance des éléments du pharmacophore servira de base à la conception rationnelle d'analogues non peptidiques, médicaments potentiels.

Une recherche croisée de similitudes avec des antagonistes connus dans la base de données de la firme pharmaceutique UCB a révélé ce "lead" peptidique.  $\mathbf{I}\mathbf{I}$ s'agit de 1a molécule UCB16101 diastéréoisomères possibles) qui est un tripeptide, antagoniste de la substance P, qui possède une faible affinité pour le récepteur NK1 (< 10<sup>-6</sup> M). Afin d'émettre des hypothèses pouvant mener à la connaissance de la conformation bioactive, nous avons réalisé une analyse conformationnelle des diastéréoisomères (S,S) et (S,R) de faire, nous 1'UCB16101. Pour ce avons utilisé deux d'investigation complémentaires : d'une part la modélisation moléculaire

dans une approche théorique du problème, et d'autre part les spectroscopies infrarouge (IR), Raman, et de résonance magnétique nucléaire (RMN) dans une approche expérimentale.

Les techniques de modélisation moléculaire permettent l'exploration de l'espace conformationnel des diastéréoisomères (S,S) et (S,R) du tripeptide UCB16101, c'est-à-dire l'étude de toutes les conformations possibles adoptées par ces structures très flexibles et la sélection des plus basses en énergie et des plus différentes du point de vue topologique : on retiendra les chefs de file potentiels.

Les spectrométries vibrationnelles infrarouge (IR) et Raman permettent d'atteindre les niveaux de vibration de groupes fonctionnels présents dans une molécule. Certains de ces groupes présentent une sensibilité à l'environnement intramoléculaire propre à la conformation de la molécule elle-même, aux forces intermoléculaires (dans le cas d'associations en milieu liquide ou solide), mais également aux liaisons hydrogène. Ceci est le cas des groupements amide présents dans les peptides lorsqu'ils sont impliqués dans des structures secondaires (hélices  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ , coudes intramoléculaires,...).

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de déterminer les conformations des peptides en solution à travers l'étude du comportement dans un champ magnétique des protons <sup>1</sup>H. Les spectres de résonance magnétique nucléaire sont caractérisés par un certain nombre de paramètres en relation directe avec l'aspect structural de la molécule étudiée. Les expériences de type COSY (COrrelates SpectroscopY) apportent des informations sur la connectivité moléculaire tandis que les expériences de type NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) fournissent des informations sur les distances entre les protons et donc sur la conformation en solution.

Les résultats issus de l'étude théorique seront confrontés à ceux de l'étude expérimentale.

# I. LES ANTAGONISTES DE LA SUBSTANCE P

#### I. LES ANTAGONISTES DE LA SUBSTANCE P

#### I.1 Structure de la substance P

La substance P fut découverte en 1931 par Von Euler et Gaddum qui l'isolèrent à partir du tractus gastro-intestinal et du cerveau de cheval sous forme d'une poudre ("P" comme "Powder" ou comme "Permeability") (Von Euler et Gaddum, 1931). Sa séquence primaire, Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH2, fut déterminée en 1971 par Chang et al. (Chang et al., 1971) et aussitôt confirmée par la synthèse (Tragear et al., 1971). C'est un undécapeptide qui appartient à la famille des tachykinines.

#### I.2 Les tachykinines

Les tachykinines (du grec takhus : rapide) sont ainsi dénommées du fait de leur rapidité d'action sur l'iléon de cobaye (Erspamer, 1971). Elles constituent un groupe de petits peptides biologiquement actifs qui possèdent une séquence pentapeptidique C-terminale commune et une affinité pour les récepteurs des neurokinines. Cette séquence est de type Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH2 où Xaa représente un acide aminé aromatique (Phe, Tyr) ou aliphatique ramifié (Val, Ile). Elle définit l'activité agoniste tandis que la partie N-terminale détermine la sélectivité (Lowe, III et Snider, 1993; Nakanishi et al., 1993). Les tachykinines de mammifères regroupent la substance P (SP), neurokinine A, également connue sous les appellations substance K et neuromédine L (NKA), la neurokinine B ou neuromédine K (NKB) et les deux formes étendues de la partie N-terminale de la neurokinine A, le neuropeptide K (NPK) et le neuropeptide γ (NPγ) (Lowe, III et Snider, 1993). Il existe également d'autres tachykinines naturelles. L'élédoïsine a été extraite de la pieuvre *Eledone moschata* (Erspamer et Anastasi, 1962), tandis que la physalaemine (Erspamer et al., 1964) kassinine (Anastasi et al., 1977) ont pour origines respectives la peau des grenouilles Physalaemus bigilonigerus et Kassina senegalensis. Plus récemment, quatre nouvelles tachykinines, les ranatachykinines A, B, C, D, ont été isolées du cerveau et de l'intestin d'une grenouille Rana catesbeiana (Kangawa et al., 1993). Les séquences primaires des

tachykinines de mammifères et leurs abréviations sont regroupées dans le tableau 1.

Peptide	Abr.	Séquence		
Substance P	SP	Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH2		
Neurokinine A	NKA	His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH2		
Neurokinine B	NKB	Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH2		
Neuropeptide K	NPK	Asp-Ala-Asp-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Gln-Val-Ala-Leu-Leu-Lys-Ala-Leu-Tyr-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr-Asp-Ser- <b>Phe</b> -Val- <b>Gly-Leu-Met-NH2</b>		
Neuropeptide γ	NPγ	Asp-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Ile-Ser-His-Lys-Arg-His-Lys-Thr- Asp-Ser- <b>Phe</b> -Val-G <b>ly-Leu-Met-NH2</b>		

Tableau 1 : Séquences primaires des tachykinines de mammifères.

#### I.3 Biosynthèse et dégradation des tachykinines

La substance P, la neurokinine A et les neuropeptides K et γ sont formés à partir d'un mécanisme post-traductionnel de trois ARN messagers précurseurs distincts. La substance P peut être produite exclusivement à partir de l' $\alpha$ -préprotachykinine ( $\alpha$ -PPT). La  $\beta$ préprotachykinine (β-PPT) est également un précurseur de la substance P, mais produit aussi la neurokinine A et le neuropeptide K. La γpréprotachykinine (γ-PPT) est un précurseur de la substance P, de la neurokinine A et du neuropeptide γ. Ces trois précurseurs sont le résultat de l'épissage différentiel d'un ARN précurseur issu du gène préprotachykinine A ou I (PPT I). Quant à la neurokinine B, elle possède son propre précurseur résultant de l'expression du gène spécifique préprotachykinine B ou II (PPT II) (Jeanjean et al., 1992; Lowe, III et Snider, 1993) (Figure 1). L'inactivation des tachykinines libérées ne semblerait pas due à un processus de recapture, mais principalement à l'action de deux enzymes qui sont l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE, peptidyldipeptidase 15.1, angiotensin converting enzyme) et l'endopeptidase neutre (NEP, E.C. 24.11, neutral endopeptidase) également dénommée enképhalinase (Lowe, III et Snider, 1993; Dietl et Torrens, 1995).

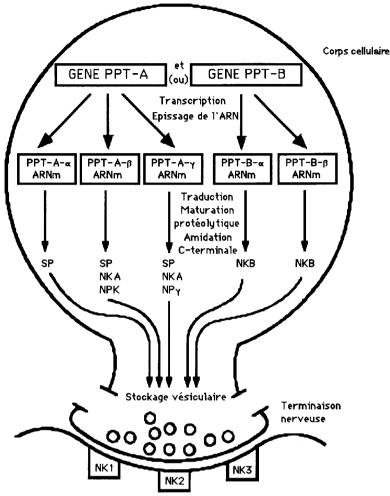


Figure 1 : Biosynthèse des tachykinines (Dietl et Torrens, 1995).

#### I.4 Localisation des tachykinines

Les cinq tachykinines sont présentes dans le système nerveux central. Les plus hautes concentrations sont retrouvées dans les cornes postérieures de la moelle épinière, principalement au niveau des fibres afférentes sensitives primaires. Au niveau cérébral, elles existent essentiellement dans les neurones striato-nigraux, les corps cellulaires du noyau caudé, les terminaisons du pallidum et de la substance noire, et dans l'hypothalamus. En périphérie, la présence de leurs précurseurs dans de nombreux tissus a été rapportée (Jeanjean et al., 1992).

#### I.5 Les récepteurs des tachykinines

Les trois principales tachykinines de mammifères : SP, NKA et NKB, se lient avec des affinités variables à trois sous-types de récepteurs spécifiques appelés NK1, NK2 et NK3. Bien qu'elle puisse interagir avec

les récepteurs NK2 et NK3, la substance P présente une affinité préférentielle pour le récepteur NK1. Quant aux neurokinines A et B, elles ont respectivement des tropismes particuliers pour les récepteurs NK2 et NK3 (Maggi *et al.*, 1993) (Tableau 2).

Type de récepteur	Spécificité du ligand	
NK1	SP > NKA > NKB	
NK2	NKA > NKB > SP	
NK3	NKB > NKA > SP	

Tableau 2 : Spécificités relatives des tachykinines pour leurs récepteurs.

Différents systèmes sont utilisés pour déterminer l'affinité des ligands spécifiques de ces récepteurs.

L'affinité pour les récepteurs NK1 est mise en évidence par la relaxation de l'artère carotide du chien avec son endothélium (Frossard et Advenier, 1991) ou la contraction de la veine cave de lapin (Regoli *et al.*, 1993).

L'activation des récepteurs NK2 induit la contraction de l'artère pulmonaire de lapin dépouillée de son endothélium (Frossard et Advenier, 1991; Regoli et al., 1993). Cependant, l'existence de deux sous-types du récepteur NK2, NK2A et NK2B, a été proposée. Le récepteur NK2A se retrouve dans les bronches de cobaye et dans l'artère pulmonaire de lapin. Le récepteur NK2B est présent dans la trachée artère de hamster (Maggi et al., 1993). Les agonistes du récepteur NK2 ont des effets similaires sur les deux types de préparations tandis que des antagonistes spécifiques de ce récepteur montrent des affinités différentes (Frossard et Advenier, 1991).

L'organe cible pour l'étude des récepteurs NK3 est la veine porte du rat où l'action de la neurokinine B induit une vasoconstriction (Frossard et Advenier, 1991; Regoli *et al.*, 1993) (Tableau 3).

#### I.5.1 Localisation

Les récepteurs des tachykinines sont largement distribués dans l'organisme. Chez l'homme, les sites de liaison NK1 sont présents, non seulement au niveau du système nerveux central, mais aussi des cellules gliales, des lymphocytes, des muscles lisses. Les sites de liaison NK2 sont retrouvés au niveau des muscles lisses bronchiques et vésicaux, et également au niveau des neurones (Jeanjean et al., 1992). Ils n'ont

jamais été mis en évidence dans le système nerveux central d'aucune espèce vertébrée étudiée. Les sites de liaison NK3 sont surtout présents dans le système nerveux central mais leur distribution est complètement différente de celle des récepteurs NK1 (Jeanjean et al., 1992; Dietl et Torrens, 1995).

Récepteurs	Modèles d'étude	Agonistes sélectifs
NK1	Artère carotide du chien (relaxation dépendante de l'endothélium)	[Pro <sup>9</sup> ] SP [Sar <sup>9</sup> ,Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP [Pro <sup>9</sup> ,Met(O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ] SP [ $\beta$ Ala <sup>4</sup> ,Sar <sup>9</sup> ] SP(4-11) GR 73632
NK2 NK2-A NK2-B	Artère pulmonaire de lapin sans endothélium (contraction)  Trachée artère de hamster (contraction)  Bronches humaines (contraction)	[Lys <sup>5</sup> ,MeLeu <sup>9</sup> ,Nle <sup>10</sup> ]NKA(4-10) [Nle <sup>10</sup> ] NKA(4-10) NKA(4-10) [βAla <sup>8</sup> ] NKA(4-10) GR 64349 MDL 28564 (NK2-A)
NK3	Veine porte de rat (contraction)	[MePhe <sup>7</sup> ] NKB senktide

GR 73632 :  $\delta$  -aminovaléryl-[Pro<sup>9</sup>,N-MeLeu<sup>10</sup>] SP(7-11)

GR 64349 :  $[Lys^3,Gly^8-R-\gamma-lactam-Leu^{10}]NKA(3-10)$ 

MDL 28564: H-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leuφ(CH2NH)Leu-NH2

senktide: [sucAsp<sup>6</sup>,MePhe<sup>8</sup>] SP(6-11)

Tableau 3 : Exemples d'agonistes des récepteurs des tachykinines (Frossard et Advenier, 1991 ; Dietl et Torrens, 1995).

#### I.5.2 Structure

Après avoir été proposés sur la base des efficacités relatives des différentes tachykinines, les trois types de récepteurs ont été séquencés et clonés. Le récepteur NK2 fut le premier isolé à partir de l'estomac de boeuf. Sa séquence primaire comporte 384 acides aminés (Masu et al., 1987). Le récepteur NK1 fut, quant à lui, isolé à partir du cerveau et des glandes salivaires de rat. Il est constitué de 407 acides aminés (Yokota et al., 1989). Finalement, le récepteur NK3 issu également du cerveau de rat comprend 452 acides aminés (Shigemoto et al., 1990). De même, les récepteurs d'origine humaine ont été décrits. Les trois types de récepteurs NK1, NK2 et NK3 sont respectivement formés de 407, 398 et 465 acides aminés. Il existe pour les trois récepteurs un haut degré

d'homologie (de l'ordre de 60%) (Tableau 4). Chaque type est codé par un seul gène (Hall et al., 1993).

Espèces	NK1	NK2	NK3
Homme	407 (100%)	398 (100%)	465 (100%)
Rat	407 (94%)	390 (86%)	452 (88%)
Boeuf	n.c.	384 (88%)	n.c.
Cobaye	407 (96%)	n.c.	n.c.
Souris	407 (94%)	384 (85%)	n.c.

Tableau 4 : Nombre d'acides aminés et homologie des séquences des récepteurs aux tachykinines. Toutes les homologies de séquence sont exprimées par rapport aux récepteurs humains clonés (n.c. : non cloné) (Hall et al., 1993).

Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils possèdent sept domaines transmembranaires en qui forment une poche hydrophobe dans la membrane cellulaire. Ces structures sont séparées entre elles par des chaînes hydrophiles extra et intracellulaires de taille variable. L'extrémité Nterminale est extracellulaire tandis que l'extrémité C-terminale est intracellulaire (Hermans et al., 1992). Il existe une forte homologie (54 à 66%) entre les trois types de récepteurs au regard des segments transmembranaires et des boucles cytoplasmiques qui les relient entre eux. Le segment VII est particulièrement bien conservé entre les trois types de récepteur. De plus, il y a également plusieurs acides aminés qui sont retrouvés chez les autres membres de la famille des récepteurs couplés aux protéines G: deux résidus cystéine qui probablement formeraient un pont disulfure entre la première et la seconde boucle extracellulaires, un résidu cystéine qui permettrait l'ancrage de la protéine dans la membrane après palmitoylation (Figure 2).

#### I.5.3 Transduction du signal

Pour les trois types de récepteurs, la transduction du signal s'opère essentiellement par l'intermédiaire de la protéine G (GP) qui active la phospholipase C. Cette enzyme permet l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate en diacylglycérol et en inositol triphosphate. Le transfert d'information peut également se faire par la protéine G (GS) qui stimule la formation d'AMP cyclique en activant l'adénylate cyclase. Toutefois, ce mécanisme est moins usité et requiert des concentrations en ligand dix fois supérieures à celles nécessaires

pour déclencher l'hydrolyse du phosphatidylinositol (Nakanishi et al., 1993) (Figure 3). Des études récentes ont montré, par ailleurs, que les récepteurs des tachykinines étaient probablement couplés à de nombreux systèmes de transduction qui diffèrent selon les récepteurs et les tissus (Dietl et Torrens, 1995).

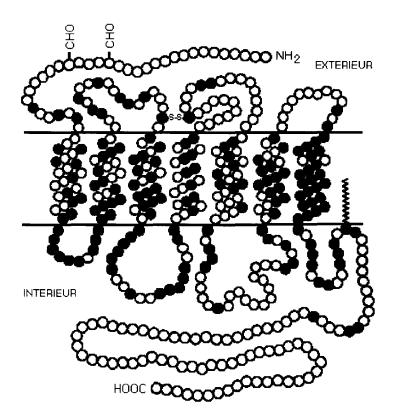


Figure 2 : Modèle transmembranaire de récepteur aux tachykinines. Les cercles noirs représentent les acides aminés communs aux trois récepteurs murins (Nakanishi et al., 1993).

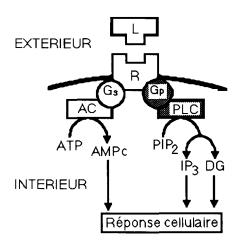


Figure 3: Mécanismes de transduction du signal des récepteurs aux tachykinines (L: ligand (tachykinine); R: récepteur; GS et GP: protéines G; AC: adénylate cyclase; PLC: phospholipase C; PIP2: phosphatidylinositol 4,5-diphosphate; IP3: inositol triphosphate; DG: diacylglycérol) (Nakanishi et al., 1993).

#### I.5.4 Relations structure-fonction

La construction de récepteurs chimères et les modifications entreprises sur les récepteurs naturels ont permis d'aborder les relations structure-fonction de ces récepteurs.

#### I.5.4.1 Fixation des agonistes

L'analyse de multiples récepteurs chimères NK1/NK2, a montré que la région s'étendant du domaine transmembranaire II à la seconde boucle extracellulaire, avec une faible contribution de la région extracellulaire N-terminale, déterminerait la sélectivité du récepteur alors que la partie couvrant les domaines transmembranaires V à VII serait responsable de la reconnaissance spécifique des tachykinines. Sur la base du concept "message-adresse", la partie C-terminale commune à toutes les tachykinines correspondrait à la séquence "message" et serait responsable de l'affinité. Elle interagirait avec la partie du récepteur comprenant les domaines transmembranaires V à VII. Tandis que la N-terminale tachykinines partie différentiant les entre représenterait la séquence "adresse" et induirait la sélectivité par son interaction avec la région N-terminale du récepteur (Nakanishi et al., 1993) (Figure 4).

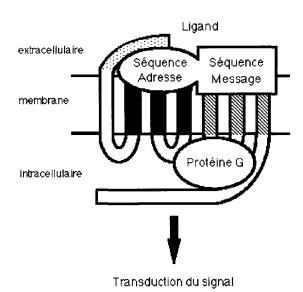


Figure 4: Modèle des sites de liaison des récepteurs aux tachykinines (Nakanishi et al., 1993)

Toutefois, ce modèle "message-adresse" est controversé. En effet, l'analyse de mutations multiples de récepteurs chimères NK1/NK2, NK1/NK3 et de mutations ponctuelles ont mis en évidence la multiplicité domaines extracellulaires interagissant avec les agonistes. Des résidus importants pour la fixation des trois agonistes physiologiques ont été identifiés au niveau de la région N-terminale et la première extracellulaire. De plus, la substitution de extracellulaires d'un récepteur NK1 par ceux d'un récepteur NK3 augmente l'affinité pour la neurokinine B sans pour autant affecter la fixation de la substance P. Ce qui tend à prouver que les sites de fixation des agonistes naturels diffèrent d'un récepteur à l'autre. Cinq résidus (Asn 23, Gln 24, Phe 25, Asn 96 et His 108) sont conservés parmi les trois récepteurs. Ils sont supposés interagir avec la partie commune des tachykinines (Fong et al., 1993). L'analyse d'une série de récepteurs chimères NK1/NK3 a montré que la fixation des tachykinines naturelles, substance P et neurokinine B, est le résultat d'interactions multiples plusieurs épitopes disposés autour des sept transmembranaires. Les épitopes situés à proximité de la partie Nterminale récepteur sont importants pour la reconnaissance spécifique de la substance P. A l'inverse, les épitopes proches du transmembranaire VII reconnaissent spécifiquement neurokinine B. La partie C-terminale caractéristique des tachykinines interagirait à l'intérieur de la poche formée par les sept hélices transmembranaires alors que la partie N-terminale des interagirait avec quelques résidus situés sur la partie N-terminale et les boucles extracellulaires du récepteur (Gether et al., 1993) (Figure 5). Des mutations ponctuelles effectuées sur les domaines transmembranaires II et VII du récepteur NK1 ont permis de déterminer le site de fixation de la substance P. Quatre résidus du domaine transmembranaire II (Asn 85, Asn 89, Tyr 92 et Asn 96) et un résidu transmembranaire VII (Tyr 287) sont particulièrement importants pour la fixation du peptide endogène. Le groupement amide C-terminal de la substance P interagirait avec le résidu Asn 85. D'autre part, deux autres aminés, Glu 78 et Tyr 205, situés respectivement sur les hélices II et V, seraient plus particulièrement impliqués dans l'activation du récepteur. Ces résultats soulignent l'importance des domaines transmembranaires dans la reconnaissance et l'activation des récepteurs (Huang et al., 1994a). L'hypothèse selon laquelle les différentes

tachykinines puissent adopter différentes conformations lors de leur liaison au récepteur NK1, suggère que la compatibilité conformationnelle entre le peptide et son récepteur puisse déterminer la sélectivité différentielle des récepteurs aux tachykinines (Huang et al., 1994b).

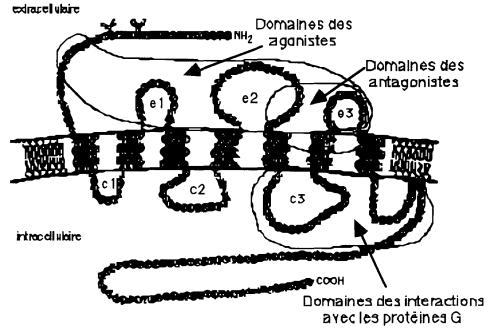


Figure 5 : Modèle schématique du récepteur NK1 humain montrant les différents domaines fonctionnels (Watling et Krause, 1993).

#### I.5.4.2 Fixation des antagonistes

Les épitopes impliqués dans la fixation de l'antagoniste nonpeptidique synthétique CP96345 se situeraient au sommet des domaines transmembranaires V et VI. Le non recouvrement des sites de fixation agoniste (substance P) et antagoniste (CP96345) suggère que cet antagoniste pourrait être considéré comme un "inhibiteur allostérique" perturberait l'interaction intrinsèque les entre domaines transmembranaires V et VI et empêcherait ainsi la formation du site de liaison du ligand naturel (Gether et al., 1993) (Figure 5). Plusieurs antagonistes non-peptidiques des récepteurs NK1 (CP96345 et RP67580) présentent des affinités différentes selon les espèces étudiées, en l'occurrence l'homme et le rat. Des mutations ponctuelles ont permis d'identifier deux résidus (116 et 290) qui sont responsables de l'interconversion entre les récepteurs humains et murins. Toutefois, ces résidus transmembranaires (Val 116 et Ile 290 chez l'homme, Leu 116 et Ser 290 chez le rat) ne sont pas en contact direct avec les

antagonistes. Ils modifieraient la structure des hélices III et VII, ce qui influencerait la fixation des antagonistes (Fong et al., 1993b). Une autre étude a non seulement confirmé le rôle prépondérant du résidu 290 dans les différences d'affinité interespèces, mais a révélé l'importance de résidus de la seconde boucle extracellulaire (Sachais et al., 1993). Les antagonistes CP96345 et RP67580 ne partagent pas le même site de liaison au niveau du récepteur NK1 humain car le remplacement de l'histidine 197 par l'alanine conduit à une perte d'affinité sensible du ligand CP96345 sans pour autant modifier celle du ligand RP67580 (Fong et al., 1993a). Les différences de fixation des ligands antagonistes, constatées d'une espèce à l'autre, peuvent résulter de différences dans la composition de la bicouche lipidique qui entoure le récepteur et qui interagit avec les hélices α. Par conséquent, une modification de l'environnement lipidique pourrait modifier la structure tertiaire des hélices α et, par là même, affecter la fixation du ligand (Appell et al., 1992). Cinq acides aminés (Gln 165, Ser 169, His 197, His 265, Tyr 287) qui constituent le site de fixation des antagonistes non-peptidiques au niveau du récepteur NK1 ont été mis en évidence à l'issue d'expériences de mutagenèse dirigée. Les interactions des différents antagonistes non peptidiques sont spécifiques et dépendent de la conformation qu'ils adoptent au niveau du récepteur (Fong et al., 1994) (Figure 6). Les études des relations structure-activité de composés dérivés du CP96345, couplées à la modélisation moléculaire et à la mutagenèse ont permis la proposition d'un pharmacophore qui confirme l'implication de trois acides aminés (Gln 165, His 197, His 265) (Swain et al., 1995). L'analyse des relations structure-activité a montré trois points importants pour l'interaction du CP96345 avec le récepteur NK1. Il s'agit du site d'interaction par paire d'ions avec l'atome d'azote quinuclidinique, du site d'interaction accessoire avec le groupement benzhydryle, et du site d'interaction spécifique avec l'extrémité de la méthoxybenzylamine (Lowe III et al., 1992). Cet atome d'azote ne semble donc pas être en contact direct avec le récepteur, mais peut servir de point d'ancrage à la molécule. La charge positive apparaissant dans la forme protonée peut former une paire d'ions avec une charge négative de la tête polaire des phospholipides membranaires (Lowe III et al., 1994). Le CP96345 interagit avec un site de fixation, comprenant les résidus Gln 165, His 197 et His 265, qui n'est autre qu'un site allostérique.

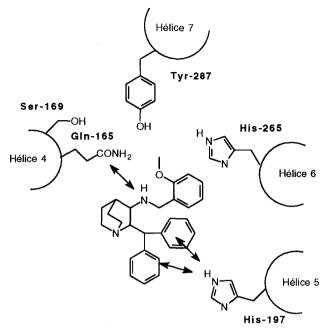


Figure 6: Modèle schématique du site de fixation des antagonistes. Les interactions entre le récepteur NK1 humain et la molécule antagoniste CP96345 sont matérialisées par des flèches (Fong et al., 1994).

Il apparaît que les agonistes peptidiques et les antagonistes non peptidiques ne possèdent pas les mêmes sites de fixation. Leur compétitivité pourrait provenir d'un effet d'exclusion de volume résultant du recouvrement de leurs sites de fixation respectifs (Huang et al., 1994a). Ce modèle d'interaction se base sur des résultats acquis par des études de mutagénèse dirigée. Notre but ici n'est pas de faire toute l'analyse de ces études de mutagénèse mais il en ressort clairement que, d'une part, il existe des différences interespèces liées très probablement à des variations des sites d'action, notamment entre le CP96345 et le RP67580. D'autre part, une mutation ponctuelle peut avoir un impact très différent selon la famille chimique étudiée avec l'exemple de l'histidine 197 dont le rôle n'est pas trouvé constant pour tous les antagonistes. Ce qui nous laisse conclure que tous les antagonistes n'ont pas exactement les mêmes sites d'interaction.

#### I.6 Rôle des tachykinines

Les tachykinines ont principalement un rôle de neurotransmission. La substance P est impliquée dans la transmission de la douleur à différents niveaux. En périphérie, elle est libérée, après stimulation, par les nocicepteurs sur lesquels elle agit indirectement en provoquant la dégranulation des mastocytes. Ceci provoque une libération localisée d'histamine. Au niveau de la corne postérieure de la moelle épinière, elle participe à la transmission du message nociceptif véhiculé par les fibres nerveuses C (non myélinisées) et Aδ (peu myélinisées) aux neurones spinaux qui transmettent l'information vers les centres supérieurs. La substance P semble être un des neuromédiateurs les plus impliqués dans la transmission de la douleur (Giannis et Kolter, 1993). En fait, elle modulerait les effets excitateurs du glutamate, de l'aspartate (Randic et al., 1993), de l'histamine ou inhibiteurs des enképhalines et du GABA (Atsumi et al., 1993). Dans la moelle épinière, des interneurones spécifiques créent des synapses, à un niveau pré-synaptique, avec les fibres afférentes fines. Ils peuvent libérer des enképhalines, ligands endogènes des récepteurs opioïdes, pour bloquer la libération de la substance P (Jessel et Iversen, 1977) (Figure 7).

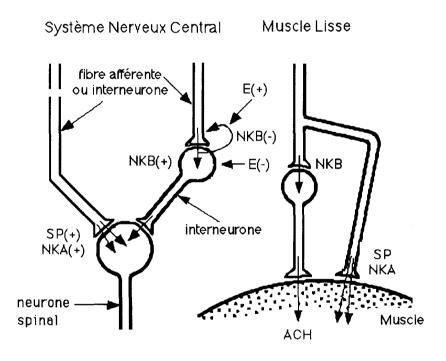


Figure 7: Modèle simple expliquant les effets des tachykinines au niveau du système nerveux central et des muscles lisses (ACH: acétylcholine; E: enképhalines; NKA: neurokinine A; NKB: neurokinine B; SP: substance P) (Hölzemann, 1989).

La substance P et la neurokinine A stimulent la libération de dopamine dans la substance noire et le noyau caudé (Baruch et al., 1988). L'activité de la voie dopaminergique nigrostriatale est régulée par une boucle rétroactive striatonigrale. Le putamen et le noyau caudé projettent des fibres nerveuses contenant du GABA et de la substance P

vers la pars compacta de la substance noire. Les fibres contenant la substance P excitent la substance noire causant ainsi un accroissement du taux de dopamine tandis que les fibres contenant le GABA ont un effet inverse (Brodal, 1992). La dégénérescence du système dopaminergique stimule la libération de substance P et inhibe celle du GABA, ce qui entraîne une augmentation compensatrice de la dopamine nigrostriatale (Groves, 1983; Yurek et Sladek, 1990). Cet effet offre une perspective intéressante dans le traitement de la maladie de Parkinson où il existe un déficit en dopamine.

Par ailleurs, la substance P joue un rôle dans la régénérescence du tissu nerveux et est capable d'arrêter l'effet neurotoxique de la protéine β-amyloïde considérée comme responsable de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Giannis et Kolter, 1993). La maladie d'Alzheimer se traduit par la dégénérescence progressive du cerveau qui se poursuit sans rémission jusqu'à la mort. Au microscope, cette pathologie se caractérise par un enchevêtrement de neurofibrilles et la présence de plaques amyloïdes qui seraient à l'origine de la réponse inflammatoire. Des fragments de la protéine β-amyloïde causeraient ainsi la perte des cellules nerveuses. Or la substance P possède une structure similaire à celle des fragments et protégerait ainsi les cellules nerveuses de cette neurotoxicité. De même, la diminution du nombre de neurones contenant de la substance P dans le cerveau des malades souffrant de la maladie d'Alzheimer contribue à accentuer l'évolution de la dégénérescence neuronale. La substance P apparaît donc comme un important modulateur de l'action physiologique de la protéine β-amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (Khalil, 1995).

Une hypersensibilisation des sites récepteurs de la substance P, consécutive à une lésion neuronale, a été décrite au niveau des cellules gliales (Mantyh et al., 1989).

Les tachykinines provoquent la contraction des muscles lisses des tractus gastrointestinal, urogénital et respiratoire (Figure 7), ce qui a pour effet une augmentation du péristaltisme intestinal et une bronchoconstriction. La substance P a un puissant effet diurétique car elle augmente le débit sanguin rénal, le volume urinaire, la natriurèse et la kaliurèse. De plus, elle stimule les sécrétions salivaires, pancréatiques et biliaires. C'est aussi un puissant vasodilatateur qui induit une intense hypotension. La dilatation des vaisseaux capillaires et l'augmentation de la perméabilité vasculaire sont les symptômes caractéristiques de

l'inflammation (Giannis et Kolter, 1993). La libération de substance P à partir des fibres afférentes sensitives C peut provoquer la production de médiateurs de l'inflammation tels que l'interleukine-1 et le tumor factor, en se liant aux récepteurs NK1 à la surface des macrophages (Lotz et al., 1988). Elle est impliquée dans l'arthrite rhumatoïde en provoquant la libération de prostaglandine E2 et de collagénase contenues dans les synoviocytes rhumatoïdes (Lotz et al., 1987). Elle joue un rôle dans les pathologies inflammatoires intestinales car de nombreux récepteurs NK1 ont été trouvés dans le gros intestin de patients souffrant de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse (Mantyh et al., 1988). La libération de substance P lors de la stimulation électrique du ganglion trijumeau chez l'homme, suggère son intervention dans la migraine (Goadsby et al., 1988). Mais son implication suscitant le plus grand intérêt est celle dans l'asthme par un mécanisme de type neurogène. La stimulation des afférences inflammation sensitives bronchiques, les fibres C, par des substances endogènes (eicosanoïdes, bradykinine, histamine) ou exogènes (irritants, polluants, antigènes) pourrait entraîner la libération locale de substance P et de neurokinine A par un mécanisme de réflexe d'axone (Snider et al., 1991; Lowe, III et Snider, 1993). Ces tachykinines, par le biais d'une stimulation des récepteurs NK1 et NK2, provoqueraient de nombreuses réponses : bronchospasme, augmentation de la perméabilité vasculaire, stimulation de la sécrétion de mucus, recrutement et activation de cellules inflammatoires (Lowe, III et Snider, 1993). Des études in vitro, chez l'homme, ont par ailleurs montré la stimulation de la sécrétion de mucus bronchique par les tachykinines (Rogers et al., 1989). De même, le pouvoir bronchoconstricteur des tachykinines a été très étudié et il s'avère que la neurokinine A est beaucoup plus efficace que la substance P (Frossard et Advenier, 1991) (Figure 8).

#### I.7 Antagonistes des tachykinines

La découverte d'antagonistes des tachykinines est le résultat de différentes stratégies de recherche dont nous présentons les principaux exemples. L'obtention d'antagonistes sélectifs et métaboliquement stables a permis de connaître précisément le rôle physiologique des tachykinines. Compte tenu de l'implication des tachykinines dans de nombreuses pathologies, elle ouvre également des champs d'application

thérapeutique intéressants dans de nombreux domaines tels que l'inflammation, la douleur, l'asthme.

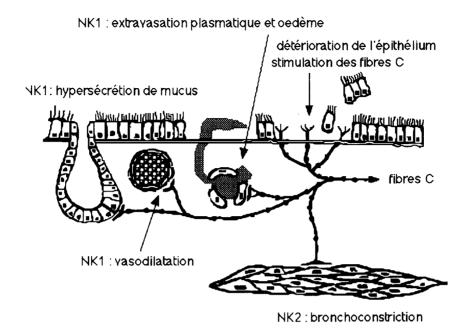


Figure 8 : Rôle des tachykinines dans la pathologie asthmatique (Lowe III et Snider, 1993).

#### I.7.1 Antagonistes peptidiques

Les premiers antagonistes disponibles furent des peptides dérivés de la substance P par substitution de un ou plusieurs acides aminés. Les premiers travaux dans cette démarche "linéaire" aboutirent à la découverte du spantide (IC50 = 80 nM) dans lequel les résidus L-Arg 1, L-Trp 7 et L-Trp 9, sont remplacés par leurs énantiomères (Folkers et al., 1984) (Figure 9). Cependant, le manque de spécificité de cette nouvelle molécule, plus particulièrement sa liaison au récepteur de la bombésine, ainsi que sa neurotoxicité chez le rat ont conduit à la proposition du spantide II (IC50 = 20 nM) (Folkers et al., 1990) dans lequel pratiquement tous les acides aminés de la séquence originale de la substance P sont modifiés (Figure 9). Ces modifications sont particulièrement importantes dans la partie N-terminale où les résidus basiques Lys et Arg seraient en partie responsables de la neurotoxicité du spantide (Lowe III et Snider, 1992).

Figure 9: Spantide (1) et spantide II (2).

L'incorporation de deux résidus Pro en position 9 et 10 du peptide dérivé de la substance P : [Arg<sup>5</sup>,D-Trp<sup>7,9</sup>,Nle<sup>11</sup>] SP(5-11), et l'addition d'un substituant N-terminal lipophile conduit à un antagoniste sélectif du récepteur NK2 : le GR83074. L'optimisation de ces acides aminés Nterminaux amène le GR94800 (PhCO-Ala-Ala-D-Trp-Phe-D-Pro-Pro-Nle-NH<sub>2</sub> (McElroy et al., 1992). Dans le but de réduire la nature peptidique et le poids moléculaire de cette molécule tout en maintenant son activité antagoniste, une stratégie de suppression d'acides aminés suivie d'une réoptimisation fut développée. Elle a abouti dans un premier temps au tétrapeptide GR92392 qui est le résultat du remplacement de la partie C-terminale (D)Pro-Pro-Nle-NH2 par un groupement diméthylamide. l'optimisation du groupement acyle N-terminal Ensuite remplacement de l'alanine par la glycine amena le GR100679 qui a le même potentiel que l'heptapeptide initial (Hagan et al., 1993) (Figure 10).

Figure 10: GR100679.

Des modifications du squelette peuvent être entreprises, non seulement, en modifiant la séquence primaire, mais également en à la place des liaisons amides. des groupements aminométhylène (liaison amide réduite ψ(CH2NH). Cette démarche s'est avérée efficace puisqu'elle a permis la synthèse de plusieurs peptides antagonistes du récepteur NK2, analogues de la partie C-terminale de la neurokinine A :  $[\psi(CH_2NH)^9, Leu^{10}]NKA(4-10)$  (IC50 = 115 nM) et  $[\beta Ala 8, \psi (CH_2N(CH_2)_2CH_3)^9, Phe^{10}]NKA(4-10)$  (IC50 = 1 nM) (Harbeson et al., 1992).

adopte Un ligand agoniste au niveau du récepteur conformation spécifique qui induit la réponse cellulaire : la conformation bioactive. Le caractère agoniste de ce ligand peut être commué en caractère antagoniste par l'imposition de contraintes conformationnelles qui rendent inaccessibles la conformation bioactive. C'est sur ce principe que fut proposé le GR71251 (IC50 = 20 nM) où le résidu très flexible Gly 9 de la substance P est remplacé par un noyau spirolactame de configuration S (Ward et al., 1990) (Figure 11). Cette structure stabilisée adopte une conformation de type β-turn II' et suggère qu'une courbure du squelette serait nécessaire pour obtenir des propriétés antagonistes. Sur ce principe, plusieurs peptides cycliques, dont la structure est basée sur la séquence C-terminale de la substance P, ont été préparés. Les deux cyclopeptides, cyclo(Gln-Trp-Phe-Gly-Leu-Met) et cyclo(Gln-Trp-Phe-(R)Gly[ANC-2]Leu-Met), présentent une activité antagoniste pour les récepteurs NK2 (Williams et al., 1993). Le rôle déterminant de la liaison pseudopeptidique aminométhylène a été mis en évidence par synthèse du cyclopeptide MDL29913, cyclo(LeuΨ[CH2NCH3]Leu-Gln-Trp-Phe-Gly), antagoniste du récepteur NK2 (Quartara et al., 1994).

$$\begin{array}{c} \mathsf{NH}_2 \\ \mathsf{H}_2 \mathsf{N} \\ \mathsf{H}_2 \mathsf{N} \\ \mathsf{O} \\ \mathsf{O} \\ \mathsf{O} \\ \mathsf{NH}_2 \\ \mathsf{O} \\ \mathsf{O$$

Figure 11: GR71251.

Une troisième méthode consiste à ne conserver d'un ligand que la partie essentielle pour sa fixation sur le récepteur. La fragmentation d'un octapeptide [D-Pro<sup>4</sup>,D-Trp<sup>7,9,10</sup>,Phe<sup>11</sup>]SP(4-11), antagoniste connu de la substance P, en tripeptides a permis de sélectionner le FR106506 (Boc-Gln-D-Trp(CHO)-Phe-OBzl) (IC50 = 4700 nM) (Hagiwara et al., 1992a). Le remplacement de la partie N-terminale Boc-Gln par la séquence Ac-Thr, le remplacement du groupement, bloquant la partie Cterminale, benzylester par le groupement N-méthylbenzylamide qui confère à la molécule une meilleure stabilité métabolique a conduit à la découverte du FR113680 (Ac-Thr-D-Trp(CHO)-Phe-NMeBzl) (IC50 = 5,8 nM) (Hagiwara et al., 1992b). L'analyse des relations structure-activité de cette structure a montré que la partie D-Trp(CHO)-Phe-NMeBzl était en fait importante pour la reconnaissance du récepteur et que les composés capables de mimer l'orientation spatiale prise par ce dipeptide auraient probablement des propriétés antagonistes (Hagiwara et al., 1993a). Ces considérations ont amené la conception du FK888 (IC50 = 6,9 nM) (Hagiwara et al., 1993b, 1994) (Figure 12).

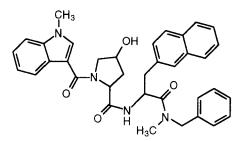


Figure 12: FK888.

Le FK224 est un cyclopeptide obtenu par l'hydrogénation catalytique d'une substance naturelle, produit de la fermentation du *Streptomyces violaceusniger*, le WS9326A (Hashimoto *et al.*, 1992) (Figure 13). Il exerce un antagonisme compétitif à la fois sur les récepteurs NK1 et NK2. Lors de son évaluation clinique, le FK224 a montré ses capacités à inhiber la bronchoconstriction induite par l'inhalation de bradykinine chez des patients asthmatiques (Ichinose *et al.*, 1992).

Le WIN66306 est un heptapeptide cyclique isolé d'une culture d'Aspergillus flavipes. Son dérivé méthylé est un antagoniste compétitif de la substance P pour le récepteur NK1 humain (Figure 14) (Barrow et al., 1994).

Figure 13: FK224.

Figure 14: Dérivé méthylé du WIN66306.

Cependant, les peptides offrent un intérêt thérapeutique limité du fait de leur instabilité métabolique car ils sont rapidement dégradés par les enzymes du tractus gastrointestinal et du plasma. Ils ont également une faible biodisponibilité due à leur haut poids moléculaire et au manque de moyens de transport spécifiques, qui empêchent le franchissement des barrières biologiques, plus particulièrement, au niveau du tube digestif et du système nerveux central. De plus, ils sont rapidement éliminés de l'organisme par le foie et les reins. Leur grande flexibilité conformationnelle leur permet d'interagir avec de nombreux récepteurs et, de ce fait, engendre des effets indésirables (Giannis et Kolter, 1993).

#### I.7.2 Antagonistes non-peptidiques

Le premier antagoniste non-peptidique, le CP96345 ((2S,3S)-cis-2-(diphénylméthyl)-N-[(2-méthoxyphényl)méthyl]-1-azabicyclo octane-3-amine), est le résultat du criblage systématique d'une base de données de composés chimiques en testant le déplacement de la substance P tritiée d'une préparation de récepteurs NK1 d'origine bovine = 2,2 nM) (Figure 15). Il appartient à la famille des benzoquinuclidines. Seul l'énantiomère (2S,3S) présente cette activité antagoniste puissante et sélective des récepteurs NK1, l'énantiomère (2R,3R) présente une très faible affinité (IC50 = 81000 nM). Le CP96345 révèle des différences d'espèces en termes d'affinité pour le récepteur NK1. Les affinités enregistrées chez la souris et le rat sont 10 à 100 fois inférieures à celles observées chez les autres espèces y compris l'homme. Son activité d'antagoniste compétitif des récepteurs NK1 a été démontrée sur l'artère carotide de chien préalablement contractée par la noradrénaline où la substance P exerce un effet relaxant. Cette observation in vitro a pu être confirmée in vivo. Le CP96345 est capable d'inhiber la salivation du rat induite par la substance P. Par contre, tant le CP96345 que son énantiomère interagissent avec les canaux calciques et montrent une affinité cinq fois inférieure à celle du vérapamil (Lowe L'alkylation de l'atome d'azote quinuclidinique ne modifie en rien les propriétés de la molécule (Lowe III et al., 1994) et l'introduction d'un carbone supplémentaire au niveau du noyau quinuclidine du CP96345 diminue fortement l'affinité pour le récepteur NK1 (Lowe III et al., 1993). L'analyse des relations structure-activité du CP96345 a CP99994 ((+)-(2S,3S)-3-(2la découverte du méthoxybenzylamino)-2-phénylpipéridine) (Figure 15). Le substituant phényle en position 2 est capable d'occuper le même espace que l'un des noyaux aromatiques du groupement benzhydryle du CP96345 (Desai et al., 1992). L'affinité pour le récepteur de la substance P dépend de l'orientation prise par les deux noyaux aromatiques (Desai et al., 1994). Le CP99994 (IC50 = 0,48 nM) est un antagoniste des récepteurs NK1 humains (cellules IM-9) aussi puissant et sélectif que le CP96345 (IC50) = 0,58 nM). Par contre, son affinité pour les canaux calciques de type L, sensibles au vérapamil, est réduite (IC50 = 3400 nM) par rapport à celle du CP96345 (IC50 = 41 nM) (McLean et al., 1993). Le remplacement du groupement NH de la chaîne benzylamine du CP99994 par un atome

d'oxygène bioisostère, a amené le L733060 (Harrison et al., 1994) (Figure 15). Le L741671 est le résultat de La fixation sur l'atome d'azote du noyau pipéridine d'un groupement méthyltriazolone. Il montre une bonne stabilité in vitro au contact de microsomes hépatiques de rat puisque 84% du produit sont retrouvés après 24 heures. In vivo, il est 40 fois plus actif que le CP99994 lorsqu'il est administré par voie orale au cobaye qui présente une extravasation plasmatique induite par la substance P (Ladduwahetty et al., 1996) (Figure 15). L'hétérocycle séparé de l'atome d'azote par un pont méthylène contribue à l'activité par voie orale. Puis le noyau pipéridine de ce composé a été remplacé par un novau morpholine. La substitution de l'atome d'azote diminue sa basicité. Ceci se traduit par une nette diminution de l'affinité pour les canaux calciques de type L (IC50 = 11000 nM) tout en maintenant celle pour les récepteurs NK1 humains (cellules CHO) (IC50 = 0,09 nM). Le L742694 regroupe toutes ces modifications structurales (Hale et al., 1996) (Figure 15).

$$H_3$$
CO
 $H_3$ 

Figure 15: CP96345 (1), CP99994 (2), L733060 (3), L741671 (4) et L742694 (5).

Comme le CP96345, le RP67580, appartenant à la famille des perhydroisoindolones, est un antagoniste puissant et sélectif des récepteurs NK1, issu du criblage systématique d'une base de données de composés chimiques en testant le déplacement de la substance P tritiée des récepteurs NK1 de cerveau de rat (Ki = 4,16 nM) (Figure 16). In vitro, il inhibe de manière compétitive l'action contractile de la substance P sur l'iléon de cobaye isolé. In vivo, chez le rat, il inhibe l'extravasation plasmatique induite par la substance P. Il manifeste chez la souris des propriétés analgésiques puissantes à l'égard des effets nociceptifs de la phénylbenzoquinone ou du formol (Garret et al., 1993). Le RP67580 présente également des différences d'espèces en termes d'affinité pour le récepteur NK1 (Fardin et al., 1993). Mais, à l'inverse du CP96345, les affinités enregistrées chez la souris (IC50 = 11,4 nM) et le rat (IC50 = 7 nM) (homogénat de cerveau) sont plus élevées que celle observée chez l'homme (cellules U373MG) (IC50 = 38,9 nM) (Watling, 1992). Ces observations suggèrent que les sites de fixation du CP96345 et du RP67580 sur le récepteur NK1, même s'ils ne sont pas identiques 1993). Des probablement se recouvrir (Fardin et al., doivent modifications entreprises sur le groupement carbonyle du RP67580 ont amené le RPR100893 (Tabart et Peyronel, 1994) (Figure 16).

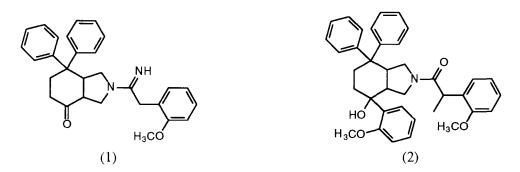


Figure 16: RP67580 (1) et RPR100893 (2).

Le SR140333 est un antagoniste des récepteurs NK1 qui ne présente pas de différences d'espèces contrairement au CP96345 et au RP67580 (Edmonds-Alt *et al.*, 1993b) (Figure 17).

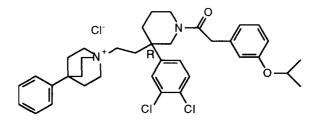


Figure 17: SR140333.

Le criblage systématique d'une base de données a également révélé la faible activité antagoniste des récepteurs NK1 humains, de l'ester benzylique du N-éthyl-L-tryptophane (IC50 = 3800 nM). Le développement de cette nouvelle série, a amené le L732138 (ester 3,5bis(trifluorométhyl)benzylique du N-acétyl-L-tryptophane) (IC50 = 1,6 nM) qui est capable de bloquer in vivo l'extravasation plasmatique induite par la substance P chez le cobaye (McLeod et al., 1994) (Figure 18). Dans le but d'augmenter la stabilité in vivo du L732618, des contraintes conformationnelles ont été imposées à sa fonction ester très flexible en la remplaçant par un groupement hétérocyclique bioisostère. Cette démarche s'est soldée par une diminution de l'affinité car ce type de rigidification entraîne la molécule hors des limites de la tolérance stérique du récepteur (Lewis et al., 1995). La transformation de la fonction ester en une fonction cétone conduit à des dérivés équivalents en termes d'affinité pour les récepteurs NK1. Dans cette série, le L737488 possède une bonne activité in vivo sur un modèle animal d'étude de l'inflammation lorsqu'il est administré par voie orale (McLeod et al., 1995) (Figure 18).

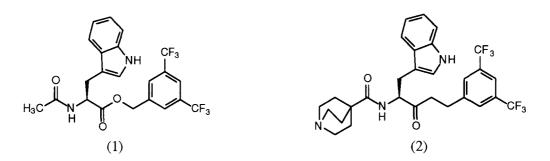


Figure 18: L732138 (1) et L737488 (2).

L'évolution de ces dérivés du L-tryptophane s'est poursuivie par le remplacement de la fonction carbonyle par une chaîne 3-aryl-1,2-diacétamidopropane. Les énantiomères (R) sont plus actifs que les énantiomères (S). Le LY303870 s'est particulièrement distingué *in vitro* 

par son activité antagoniste des récepteur NK1 humains (cellules IM-9) (IC50 = 0,23 nM) et par sa durée d'action *in vivo* sur un modèle animal de l'inflammation neurogène durale (Hipskind *et al.*, 1996) (Figure 19).

Figure 19: LY303870.

Les propriétés pharmacologiques de la substance P sont liées aux résidus Phe 7 et Phe 8 qui permettent sa fixation sur le récepteur ("hypothèse Phe-Phe"). Le criblage systématique d'une base de données de petits peptides a, dans un premier temps, révélé le faible caractère antagoniste des récepteurs NK1 d'un dérivé de la phénylalanine : Z-Phe-OBn. Dans un second temps, l'arrangement tridimensionnel de cette structure a conduit au CGP47899 qui est un antagoniste des récepteurs NK1 de la rétine de bovin (IC50 = 30 nM) (Schilling et al., 1993) (Figure 20). Par ailleurs, l'arrangement spatial d'analogues contraints du dipeptide Phe-Phe a été étudié (Josien et al., 1994).

Figure 20: CGP47899.

Le dipeptide, Z-Trp-Phe-NH2 est un ligand antagoniste des récepteurs NK1 de cerveau de cobaye avec une affinité de l'ordre du micromolaire (Ki = 4200 nM). La simplification de sa structure chimique fut suivie de l'imposition de contraintes conformationnelles par l'incorporation de groupements méthyles au squelette peptidique. Cette démarche rationnelle a abouti à la découverte du PD154075 qui se fixe au récepteurs NK1 des cellules IM-9 humaines (Ki = 0,35 nM) (Boyle et al., 1994) (Figure 21). La même démarche fut suivie pour obtenir le PD161182 qui est un antagoniste sélectif et compétitif des récepteurs

NK3 humains (cellules CHO) (IC50 = 7 nM) (Boden et al., 1996) (Figure 21).

Figure 21: PD154075 (1) et PD161182 (2).

SR48968 ((S)-N-méthyl-N[4-(4-acétylamino-4-phényl pipéridino)-2-(3,4-dichlorophényl)butyl]benzamide) est le antagoniste non-peptidique des récepteurs NK2. Cette molécule présente affinité pour les récepteurs NK2 de duodénum de rat forte provoquant un antagonisme compétitif de la neurokinine A (Ki = 0,51 nM). Son énantiomère (R) est beaucoup moins actif (Ki = 945 nM) (Edmonds-Alt et al., 1992) (Figure 22). In vitro, il inhibe la contraction induite des muscles lisses de différentes espèces. In vivo, quelle que soit la voie utilisée, intraveineuse, intrapéritonéale, intraduodénale, souscutanée ou orale, il reste très actif. Il passe la barrière hématoméningée. Il inhibe les effets périphériques (contraction des muscles lisses des tractus respiratoires et gastrointestinaux) et centraux (changement de comportement) induits par la neurokinine A. Il inhibe effets centraux dépendants de la neurokinine A également les (sensibilité à la chaleur) (Edmonds-Alt et al., 1993a).

Figure 22: SR48968.

# II. STRATEGIE DE RECHERCHE D'ANTAGONISTES DE LA SUBSTANCE P

## II. STRATEGIE DE RECHERCHE D'ANTAGONISTES DE LA SUBSTANCE P

La recherche d'antagonistes des récepteurs de la substance P peut se faire selon deux démarches distinctes.

La première correspond au criblage systématique d'une base de données de composés chimiques. Elle a abouti à la découverte relativement aléatoire du CP96345 et du RP97580.

La seconde suit une méthode rationnelle qui a mené entre autre à la découverte du FK888, du GR71251 et du PD154075.

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre d'une démarche rationnelle originale de conception d'antagonistes non-peptidiques des récepteurs de la substance P qui peut se rapprocher de celle suivie par Schilling *et al.* en 1993 ou Boyle *et al.* en 1994, aller du peptide vers le non-peptide.

de passage structures peptidiques vers des structures peptidiques essentiel car les peptides offrent est thérapeutique limité du fait de leur instabilité métabolique, leur faible biodisponibilité et leur manque de sélectivité pour les récepteurs. Etant donné que tous les antagonistes n'ont pas les mêmes sites d'interaction au niveau de la cavité réceptrice, il est risqué de les utiliser comme référence absolue. Par conséquent, nous proposons un autre type de stratégie.

#### II.1 Stratégie générale

La stratégie adoptée dans notre travail consiste, dans un premier temps, à identifier un "lead" peptidique, c'est-à-dire une petite structure peptidique relativement simple présentant des propriétés antagonistes de la substance P. Seuls quelques acides aminés sont nécessaires pour la reconnaissance du récepteur.

Dans un second temps, intervient l'identification des groupements fonctionnels essentiels à cette reconnaissance qui interviennent non seulement par leur type mais aussi par leur orientation spatiale spécifique. Or la grande flexibilité du squelette des peptides rend généralement difficile cette étape qui détermine la conformation bioactive, c'est-à-dire la conformation interagissant avec le site actif du récepteur. C'est pourquoi nous mènerons une analyse conformationnelle

afin de retenir des conformations caractéristiques du peptide parmi lesquelles se trouve probablement la conformation bioactive. Ces conformations caractéristiques retenues serviront à l'élaboration de nouvelles molécules rigides qui seront alors synthétisées puis testées pour connaître la conformation bioactive. Notre travail se focalisera sur conformationnelle tant du point de vue qu'expérimental. De ces considérations structurales ressortiront les éléments du pharmacophore, c'est-à-dire l'ensemble des atomes et leurs orientations spécifiques essentiels pour la reconnaissance du récepteur. Ces éléments du pharmacophore devront servir de base à la conception rationnelle d'analogues non peptidiques, médicaments potentiels.

#### II.2 Recherche d'un "lead" peptidique

Un "lead" peptidique, le tripeptide UCB16101 a été préalablement mis en évidence à l'issue d'une recherche croisée de similitude avec des base de données antagonistes connus dans la de pharmaceutique UCB. Trois antagonistes connus des récepteurs NK2 qui présentent des structures différentes : le GR100679, le SR48968 et le MEN10414 sont choisies comme molécules de référence (Figure 23). La topologie de chaque molécule de référence est décrite par le programme en termes de clés. A chaque molécule de référence est associée une liste produits similaires. L'intersection de ces ensembles fournira prioritairement des produits susceptibles de reconnaître le récepteur. Parmi tous les produits testés est ressorti le tripeptide UCB16101, Nα-Z-Nε-Bz-Lys-Ala-Sar-OBzl. Ce tripeptide UCB16101, bien qu'il présente une faible affinité pour les récepteurs NK1 humains (< 10<sup>-6</sup> M), possède néanmoins des propriétés antagonistes. L'UCB16101 est en fait un mélange des deux diastéréoisomères (S,S) et (S,R) (Figure 23). Les quatre ont été synthétisés, puis séparés par diastéréoisomères possibles chromatographie liquide haute performance sur colonne chirale. L'intérêt d'une telle molécule réside dans la simplicité relative de sa structure en regard des peptides naturels, ce qui permet d'identifier plus aisément les éléments déterminants pour l'interaction avec le récepteur.

Figure 23 : molécules de référence et résultat de la recherche du "lead" peptidique.

#### II.3 Analyse conformationnelle

L'analyse conformationnelle permet d'étudier l'arrangement spatial des groupements fonctionnels des peptides très flexibles pour émettre des hypothèses quant à la conformation bioactive, et par la même, atteindre le pharmacophore. Dans cet objectif, elle revêt deux aspects complémentaires : l'un théorique qui fait appel à des techniques sophistiquées de modélisation moléculaire, l'autre expérimental reposant sur les techniques de spectroscopies infrarouge, Raman et de résonance magnétique nucléaire capables d'apporter des informations sur la structure, les interactions intramoléculaires et intermoléculaires.

#### II.3.1 Aspect théorique

Dans ce travail, nous nous sommes fixé comme but d'utiliser la modélisation moléculaire pour explorer l'espace conformationnel des diastéréoisomères du tripeptide UCB16101. En fait, nous limiterons le champ de nos investigations aux deux seuls diastéréoisomères (S,S) et (S,R), leurs énantiomères respectifs (R,R) et (R,S) seront considérés par inversion des atomes. La modélisation moléculaire fournit les outils nécessaires pour permettre l'étude de toutes les conformations possibles adoptées par ces structures très flexibles et la sélection des plus basses en énergie et des plus différentes du point de vue topologique (sélection de chefs de file).

#### II.3.2 Aspect expérimental

#### II.3.2.1 Spectrométries vibrationnelles infrarouge (IR) et Raman

Les spectrométries vibrationnelles infrarouge (IR) et Raman permettent d'atteindre les niveaux de vibration de groupes fonctionnels présents dans une molécule. Certains de ces groupes présentent une sensibilité à l'environnement intramoléculaire propre à la conformation de la molécule elle-même, aux forces intermoléculaires (dans le cas d'associations en milieu liquide ou solide), mais également aux liaisons hydrogène. Ceci est le cas des groupements amide présents dans les peptides lorsqu'ils sont impliqués dans des structures secondaires (hélices α, feuillet β, coudes intramoléculaires,...). Les deux techniques (IR et Raman) présentent chacune des avantages et des inconvénients.

En spectrométrie infrarouge, les bandes Amide concernant les vibrations spécifiques du groupe N-H sont plus intenses qu'en spectrométrie Raman. La bande Amide A, correspondant à l'élongation de la liaison N-H, se situe entre 3600 et 3200 cm<sup>-1</sup> selon la présence ou non de liaisons hydrogène. Lorsque le groupement N-H est libre, c'est-à-dire lorsqu'il n'est pas impliqué dans une liaison hydrogène, elle se trouve entre 3600 et 3400 cm<sup>-1</sup>. Par contre, lorsque le groupement N-H est lié, elle se déplace entre 3300 et 3200 cm<sup>-1</sup>. La bande Amide II correspond principalement à la déformation dans le plan du groupement N-H ainsi qu'à l'élongation de la liaison  $C\alpha$ -N. Elle se situe entre 1570 et 1510 cm<sup>-1</sup>. La bande Amide III correspond à la déformation dans le

plan du groupement N-H à laquelle viennent s'ajouter les élongations des liaisons  $C\alpha$ -C et  $C\alpha$ -N. Elle apparaît entre 1300 et 1210 cm<sup>-1</sup>. La bande Amide V traduit largement la déformation hors du plan du groupement N-H et se lit entre 750 et 680 cm<sup>-1</sup>. Les bandes des groupements C=O sont intenses et sont d'autant plus fines que la est localisée ou engagée dans une structure correspondant à l'élongation du groupement C=O d'un ester, bandes impliquant le groupement C=O d'un amide : Amide I, IV et VI). La bande Amide I correspond principalement à l'élongation de la liaison C=O. La bande Amide IV reflète plus particulièrement la déformation dans le plan du groupement C=O et l'élongation de la liaison Cα-C. La bande Amide VI concerne presque exclusivement la déformation hors du plan du groupement C=O (Krimm et Bandekar, 1986). La spectrométrie infrarouge présente deux inconvénients majeurs. D'une part, les solutions aqueuses ne peuvent être étudiées (à l'exception de solutions deutérées dans certaines fenêtres de fréquence) et, d'autre part, de bandes de combinaison peuvent venir recouvrir les fréquences fondamentales, c'est le cas des cycles aromatiques.

En spectrométrie Raman, les bandes Amide faisant intervenir le groupement N-H ont des intensités faibles. Les bandes vibrationnelles sont en général plus fines qu'en spectrométrie infrarouge et il n'existe pas de raies de combinaison. Ceci rend le spectre beaucoup plus simple. De plus l'eau diffuse peu en spectrométrie Raman, les solutions aqueuses peuvent être facilement étudiées. Par ailleurs, il est important de signaler que, dans le cas d'un produit cristallisé, des bandes de vibration peuvent être dédoublées tant en spectrométrie infrarouge qu'en spectrométrie Raman.

#### II.3.2.2 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de déterminer les conformations des peptides en solution à travers l'étude du comportement dans un champ magnétique des noyaux <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N <sup>17</sup>O. Le proton <sup>1</sup>H est de loin le noyau le plus étudié. Le choix du solvant est une considération importante dans les études structurales des peptides. Pour l'étude des peptides d'intérêt biologique, les solvants organiques offrent une alternative intéressante lorsque la molécule est insoluble dans l'eau. Les spectres de résonance

magnétique nucléaire sont caractérisés par un certain nombre paramètres en relation directe avec l'aspect structural de la molécule étudiée. Le déplacement chimique δ correspond à la différence de fréquence de résonance d'un signal particulier par rapport à un signal de référence. Parce qu'ils sont significatifs de l'environnement électronique du noyau, les déplacements chimiques fournissent des informations appréciables sur les structures chimiques et les interactions possibles au Le déplacement chimique peptide. des protons groupements N-H est très intéressant dans la mesure où il est sensible aux élévations de température selon leur implication ou non dans des liaisons hydrogène. Le couplage entre les noyaux se manifeste par la séparation des résonances en multiplets. Il est transmis par les électrons des liaisons chimiques et ne peut normalement apparaître qu'entre des protons séparés par moins de trois à quatre liaisons. Cette interaction est caractérisée par la constante de couplage J qui est particulièrement utile pour calculer les angles dièdres NH-αH et Hα-Hβ qui définissent la conformation du peptide. En détectant un grand nombre de NOE (Nuclear Overhauser Effect) entre des paires de protons, il est possible de mesurer les distances entre ces protons et, par la même, d'accéder à la structure du peptide étudié (Craik et Jarvis, 1994).

#### II.3.3 Confrontation de la théorie à l'expérience

Les résultats expérimentaux issus de l'interprétation des spectres infrarouge, Raman et de résonance magnétique nucléaire sont confrontés aux résultats théoriques de la modélisation moléculaire afin de proposer des hypothèses de conformation bioactive.

Ces hypothèses pourront être vérifiées par l'imposition de contraintes conformationnelles visant à rigidifier le squelette. De cette façon, les groupements fonctionnels essentiels seront maintenus dans les positions spatiales prédéfinies.

# III. LA MODELISATION MOLECULAIRE

#### III. LA MODELISATION MOLECULAIRE

L'essor qu'a connu la modélisation moléculaire au cours de la 1ié décennie est étroitement à la commercialisation d'ordinateurs de plus en plus puissants qui offrent à la fois une très grande capacité de calcul et une qualité graphique exceptionnelle. L'avènement des stations de travail (SILICON GRAPHICS, SUN, IBM,...) a permis d'étendre et d'amplifier considérablement le champ d'action de cette discipline dans les industries pharmaceutiques et les universités. La conception de molécules assistée par ordinateur fournit au travers de très performants (SYBYL, Insight-Discover, Chem-X. logiciels HyperChem,...) les outils nécessaires à la construction, la représentation graphique tridimensionnelle, l'analyse et le stockage des modèles moléculaires. C'est maintenant une démarche essentielle en chimie thérapeutique, pour l'interprétation des relations structure-activité et pour la conception de nouvelles structures toujours plus actives. Ces méthodes sont également devenues, ces dernières années, des outils dans l'étude des molécules biologiques complexes indispensables (protéines, acides nucléiques,...) où, parfois, elles représentent la seule approche capable de déterminer des propriétés moléculaires qui ne sont pas accessibles par des mesures expérimentales directes.

La plupart des études de modélisation moléculaire menées au moyen de l'outil informatique font appel à un modèle mathématique qui décrit l'énergie de la molécule en fonction de la position des atomes qui la constituent.

Dans certaines conditions bien définies, il est possible d'établir la structure d'une molécule par le calcul. Pour ce faire, il existe différentes méthodes.

#### III.1. Mécanique quantique

#### III.1.1 Méthodes ab initio

Ces méthodes font appel à la mécanique quantique et reposent sur la résolution de l'équation de Schrödinger qui décrit complètement, en théorie, un système moléculaire.

$$H\psi = E\psi$$

H : opérateur hamiltonien représentant l'énergie totale ;  $\Psi$  : fonction d'onde ; E : énergie du système

L'équation est une suite d'équations différentielles dont les solutions sont un nombre d'orbitales moléculaires  $\Psi_j$  auxquelles correspond un quantum d'énergie  $E_j$ . Cependant, en pratique, la complexité du calcul rend nécessaire certaines approximations.

L'approximation de Born-Oppenheimer est fondée sur le fait que la masse des noyaux peut être considérée comme infinie devant celle des électrons et, par conséquent, le comportement des électrons dans une molécule peut s'étudier en supposant que les noyaux occupent des positions fixes dans l'espace. Elle permet la résolution du terme électronique de l'équation de Schrödinger pour une géométrie fixée.

La procédure la plus courante utilisée pour résoudre le terme électronique de l'équation de Schrödinger est la méthode du "self-consistent field" (SCF) de Hartree-Fock. Dans cette approximation, chaque électron peut se mouvoir dans le champ moyen des autres électrons.

L'approximation LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) consiste à exprimer la distribution spatiale de chaque électron d'une molécule comme une orbitale moléculaire (MO) sous la forme d'une combinaison linéaire des orbitales atomiques centrées sur chaque noyau.

$$\phi_i = \sum_j c_{ij} x_j$$

 $\phi_i$ : fonction d'onde moléculaire ;  $x_j$ : orbitale atomique ;  $c_{ij}$ : contribution de chaque orbitale atomique dans l'orbitale moléculaire

L'ensemble des orbitales atomiques choisies pour représenter la distribution spatiale des électrons est appelé le set de base. Les orbitales de type Slater (STO) sont très représentatives des orbitales atomiques et peuvent être très bien décrites par des fonctions de probabilité gaussiennes. Il existe différents sets de base plus ou moins complexes dans le nombre de fonctions gaussiennes mises en jeu (STO-3G, 3-21G, 6-31G\*, 6-31G\*\*) (Loew et Burt, 1990).

Les calculs de cette approximation de l'orbitale moléculaire restent fastidieux. C'est l'une des raisons de la manifestation d'un intérêt croissant pour deux autres méthodes de mécaniques quantiques : la méthode de liaison de valence (Valence Bond) et la théorie de la fonctionnelle de densité (Density Functional Theory).

La méthode de liaison de valence (VB) construit la fonction d'onde comme la somme des structures électroniques possibles (formes canoniques) adoptées par une molécule (March, 1985).

La théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) repose sur le théorème de Kohn-Sham qui postule que l'énergie d'un système moléculaire est une fonction unique de la distribution de sa charge électronique. Dans l'approximation de densité locale, elle suppose que les électrons se comportent localement comme un gaz électronique uniforme (Lesyng et McCammon, 1993).

Dans les méthodes *ab initio*, tous les électrons sont pris en compte. Elles ont l'avantage de ne requérir aucun paramètre et, de ce fait, peuvent être appliquées à tous les systèmes. Cependant, en pratique, elles sont très difficiles à mettre en oeuvre et sont actuellement limitées à des systèmes de 30 à 40 atomes. De nouvelles approximations s'imposent donc par le biais des méthodes semi-empiriques.

#### III.1.2 Méthodes semi-empiriques

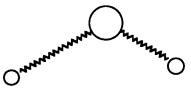
Les principales méthodes semi-empiriques ne considèrent que les orbitales de Slater de la couche de valence, négligeant les couches profondes. Le calcul est simplifié au maximum en négligeant certains termes ou en les approchant par des paramètres expérimentaux. Les méthodes développées diffèrent essentiellement dans la nature des termes négligés et dans la manière d'évaluer les termes restants (Méthodes PCILO (Perturbative Configuration Interaction using Localized Orbitals), INDO (Intermediate Neglect of Differential Overlap), NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap), MINDO (Modified INDO), MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap), CNDO (Complete Neglect of Differential Overlap), AM1 (Austin Model 1) (Dewar et al., 1985) et PM3 (Parametric Method 3) (Stewart, 1989a, 1989b)) (Clark, 1985). Leur utilisation n'est actuellement possible que pour des molécules n'excédant pas plus de 100 à 150 atomes.

#### III.2 Mécanique moléculaire

Développée par Westheimer, la méthode du champ de forces est également basée sur l'approximation de Born-Oppenheimer, mais à la différence des autres méthodes, seul le comportement des noyaux est étudié. Le système électronique n'est pas considéré explicitement ; il est supposé trouver une distribution optimale autour des noyaux. La surface d'énergie potentielle décrit l'énergie de la molécule en fonction de la position des noyaux des atomes qui la constituent. Le calcul de la surface d'énergie potentielle peut être approché par des méthodes "classiques" de mécanique moléculaire. Le champ de forces regroupe l'ensemble des fonctions d'énergie potentielle auquel sont associés des paramètres empiriques issus de données spectroscopiques (spectroscopie de vibration infrarouge ou Raman) ou cristallographiques (Allinger, 1976).

#### III.2.1 Champ de forces

La molécule est considérée comme une série de masses (atomes) reliées entre-elles par des ressorts (liaisons) de différentes élasticités (constantes de force).



Les forces reliant les atomes entre-eux peuvent être décrites par des fonctions d'énergie potentielle qui constituent le champ de forces. Une fonction d'énergie potentielle contient des termes l'élongation, la déformation angulaire, la torsion de la liaison considérée, liés interactions atomes non (Van der Waals entre électrostatiques). L'énergie totale de la molécule peut ainsi être approchée par la somme des différentes contributions énergétiques.

E<sub>totale</sub> = E<sub>élongation</sub> + E<sub>déformation</sub> angulaire + E<sub>torsion</sub> + E<sub>Van</sub> der Waals + E<sub>électrostatique</sub> + E<sub>liaison</sub> hydrogène + ...

D'autres termes peuvent être également introduits tels que la déformation angulaire hors du plan pour les atomes trigonaux (sp<sup>2</sup>), des

termes croisés d'interaction élongation-déformation angulaire et torsion-déformation angulaire. Ces fonctions d'énergie potentielles, relativement simples, doivent être paramétrées afin d'obtenir une représentation correcte des conformations et des propriétés moléculaires étudiées en mécanique moléculaire. La mécanique moléculaire permet l'étude de systèmes moléculaires constitués jusqu'à 3000 à 4000 atomes.

Le choix du champ de forces est très important car la fonction d'énergie potentielle doit décrire au mieux le système moléculaire étudié. Il existe plusieurs champs de forces dont la vocation est ,bien souvent, de décrire aussi bien des protéines, des acides nucléiques, des sucres que des petites molécules. A côté de ces champs de forces généralistes (COSMIC (Vinter et al., 1987), MM2 (Molecular Mechanics 2) (Allinger, 1976), MM3 (Allinger et al., 1989), OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations) (Jorgensen et Tirado-Rives, 1988), TRIPOS (Clark et al., 1989),...), existent des champs de force bien comportement particulier des macromolécules telles que les protéines et les peptides (AMBER (Assisted Building with Energy Refinement) (Weiner et Kollman, 1981; Weiner et al., 1984; Weiner et al., 1986), CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) (Brooks et al., 1983), CVFF (Consistent Valence Force Field) (Dauber-Osguthorpe et al., 1988), ECEPP/3 (Empirical Conformational Energy Program for Peptides) (Nemethy et al., 1983), GROMOS (GROningen MOlecular Simulation) (Van Gunsteren et Berendsen, 1977), **SPASIBA** Potential for (Spectroscopy Algorithm SImulating Biomolecular conformational Adaptability) (Derreumaux et Vergoten, 1995),...).

Lors de nos travaux sur le tripeptide UCB16101, notre choix s'est porté sur les champs de forces AMBER et SPASIBA qui diffèrent essentiellement dans leur conception. Les paramètres du champ de forces AMBER sont déterminés à partir des structures et des énergies de composés de référence tandis que ceux de SPASIBA sont déterminés à partir des spectres de vibration et vérifiés par rapport aux structures et aux énergies. SPASIBA permet ainsi de reproduire les fréquences vibrationnelles associées à une structure. Dans son développement récent, le champ de forces SPASIBA combine des potentiels du champ de forces AMBER et du champ de forces Urey-Bradley-Shimanouchi (Shimanouchi, 1963).

$$V_{SPASIBA} = \begin{bmatrix} V_{torsion} + V_{Van \ der} + V_{\'electrostatique} + V_{liaison} \\ Waals \end{bmatrix}_{AMBER} + \begin{bmatrix} V_{\'elongation} + V_{\'d\'eformation} \\ V_{\'elongation} \end{bmatrix}_{UBS}$$

Ce champ de forces a été paramétré pour un grand nombre de composés tel que les alcanes (Derreumaux et al., 1993), les acides aminés aliphatiques (Derreumaux et al., 1995), les acides carboxyliques (Chhiba et al., 1994), les éthers aliphatiques (Tristram et al., 1996a), les alcools (Tristram et al., 1996b) et les phospholipides (Chhiba et al., 1996). Cependant l'UCB16101 présente trois groupements pour lesquels les paramètres spécifiques au sein du champ de forces SPASIBA n'ont pas encore été déterminés. Il s'agit plus particulièrement des groupements benzamide, benzylamide et ester. Ces trois groupements faisant défaut au champ de forces SPASIBA ont été paramétrés tout spécialement (Chhiba et al., 1996). Le paramétrage s'effectue en minimisant la déviation standard entre les énergies, les torsions et les fréquences vibrationnelles des structures observées et des structures calculées dans le but d'obtenir des paramètres transférables. Ces constantes de forces être capables reproduire ainsi de les expérimentales avec une marge d'erreur très limitée.

L'énergie d'une molécule étant fonction de la position des atomes qui la constituent, la minimisation de l'énergie permet l'optimisation de sa géométrie.

#### III.2.2 Minimisation de l'énergie

Les méthodes de minimisation d'énergie sont généralement des méthodes itératives qui modifient les coordonnées atomiques pour diminuer l'énergie. Tous les paramètres de la géométrie de départ sont modifiés par petits incréments pour atteindre un minimum local de la fonction d'énergie potentielle dont la représentation est une hypersurface. Ces méthodes sont incapables de trouver le minimum global d'énergie, c'est-à-dire l'énergie la plus basse du système moléculaire considéré (Figure 24). La seule manière de trouver ce point relève de l'analyse conformationnelle. Elles sont également confrontées au problème de trouver le minimum d'une fonction non linéaire de 3 x N variables qui correspondent en fait au trois coordonnées cartésiennes des N atomes constituant la molécule. Ces méthodes peuvent être classées selon la façon de trouver le minimum de la fonction. C'est ainsi

qu'il existe des méthodes n'utilisant pas de dérivée, des méthodes utilisant uniquement la dérivée première et des méthodes utilisant à la fois les dérivées première et seconde.

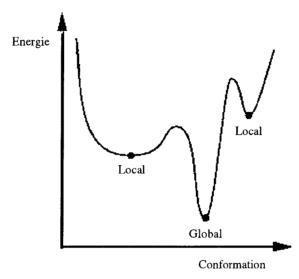


Figure 24 : Hypersurface d'énergie potentielle.

Ces algorithmes supposent qu'au voisinage d'un minimum, la surface d'énergie est approximativement harmonique et peut être assimilée à une fonction quadratique à deux dimensions représentant une surface elliptique (Mackay et al., 1989).

$$E(x,y) = x^2 + 5y^2$$

Le minimiseur Maximin2 (Labanowki et al., 1986), implémenté dans le logiciel de modélisation moléculaire SYBYL, est une combinaison de méthodes n'utilisant pas de dérivée et utilisant uniquement la dérivée première. La méthode Simplex est une méthode non dérivative qui permet de corriger approximativement et rapidement la géométrie d'un système moléculaire. L'expression de l'énergie potentielle est ensuite affinée par une méthode utilisant la dérivée première. Nous avons choisi la méthode de Powell car elle converge rapidement vers le minimum sans être trop exigeante en termes de puissance informatique.

Ces minimiseurs d'énergie permettent l'accession à un minimum local proche de la conformation de départ et qui n'est pas forcément le minimum global. De par leur conception, ils ignorent les conformations dont l'énergie augmente et, de ce fait, sont incapables de franchir les

barrières de l'énergie potentielle. D'autres méthodes sont donc nécessaires pour explorer convenablement l'espace conformationnel.

#### III.3 Analyse conformationnelle

Les atomes d'une molécule peuvent occuper de nombreuses positions relatives dans l'espace sans pour autant supporter un réarrangement de leurs liaisons chimiques. Chacune de ces dispositions relatives des atomes dans l'espace est appelée conformation. Le passage d'une conformation à l'autre peut se faire simplement par la rotation des simples liaison avec quelques altérations mineures de la géométrie. L'analyse conformationnelle a pour objectif principal de déterminer parmi les conformations viables, celles de plus basses énergies et de les classer en familles structurales. Ceci est effectué dans le but d'émettre des hypothèses quant à la conformation qui interagit avec le site actif d'un récepteur donné. Cette conformation n'est pas forcément la conformation de plus basse énergie trouvée.

#### III.3.1 Recherche conformationnelle systématique

#### III.3.1.1 Recherche systématique (Systematic search)

La recherche conformationnelle par la variation systématique des angles de torsion permet la recherche de toutes les conformations (Dammkoehler et al., 1989). Toutes les distances interatomiques sont calculées afin de rejeter les conformations qui présentent au moins une distance inférieure à la somme des rayons de Van der Waals des deux atomes considérés. La limitation de cette approche est étroitement liée à la flexibilité de la molécule étudiée et à l'incrément utilisé pour modifier les angles dièdres. Même pour des petites molécules, cette méthode qui couvre tout l'espace conformationnel pour toutes les liaisons rotatoires définies, engendre un nombre important de conformations. Le temps nécessaire pour générer un espace conformationnel augmente de façon exponentielle avec le nombre de liaisons rotatoires et rend la méthode quasiment inutilisable au dessus de 12 à 13 liaisons rotatoires. De même, la diminution de l'incrément contribue à l'accroissement du nombre de conformations (Cohen et al., 1990). Toutefois, sa taille doit être suffisante pour explorer de manière exhaustive l'espace conformationnel sans

oublier de minima (Figure 25). Par conséquent, il est exclu d'utiliser cette méthode pour générer l'espace conformationnel de petits peptides.

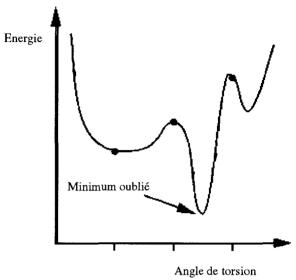


Figure 25: Recherche conformationnelle systématique.

#### III.3.1.2 "Build-up"

La méthode du "build-up" est une alternative à l'exploration de l'espace conformationnel des peptides qui possèdent un grand nombre de degrés de liberté. Le peptide est construit lentement par l'enchaînement successif des conformations de plus basse énergie des acides aminés qui le composent. Ces conformations sont issues de la recherche conformationnelle systématique effectuée en modifiant les angles de torsion  $\varphi$ ,  $\psi$  et éventuellement  $\tau$  (Figure 26). A chaque étape, les combinaisons sont minimisées et celle de plus basse énergie sert de point de départ pour l'étape suivante (Villani et Tamburro, 1992). La limitation de cette méthode réside principalement dans le fait que la conformation optimale de chaque acide aminé dans la molécule finale peut être rejetée uniquement sur la base de son énergie (Howard et Kollman, 1988).

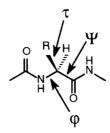


Figure 26 : Angles de torsion d'un acide aminé composant un peptide.

#### III.3.2 Recherche conformationnelle aléatoire

problème précédemment évoqué peut être contourné en réalisant un échantillonnage aléatoire de l'espace conformationnel. Le problème qui surgit avec cette démarche est de savoir si toutes les conformations issues de l'échantillonnage couvrent suffisamment la totalité de l'espace conformationnel. Il est alors possible d'évaluer cela en enregistrant le nombre de fois que chaque conformation a été trouvée lors de l'échantillonnage car si chaque conformation de l'espace conformationnel généré par cette méthode, a été trouvée au moins n fois, il y a une probabilité égale à  $(1 - (1/2)^n)$  pour que toutes les conformations possibles soient trouvées. Par conséquent, si toutes les conformations ont été trouvées au moins cinq fois, il y a 96,9% de chances pour que toutes les conformations possibles soient trouvées. Cette méthode n'offre jamais l'assurance que la conformation de plus basse énergie soit parmi les conformations trouvées. La génération d'un espace conformationnel repose sur la transformation d'une conformation en une autre. Ceci peut se faire soit en modifiant les coordonnées cartésiennes, soit en perturbant les angles de torsions, soit en considérant les distances interatomiques maximales et minimales.

#### III.3.2.1 Monte Carlo Metropolis

La méthode Monte Carlo Metropolis (Howard et Kollman, 1988; Hann, 1994) choisit un atome de la molécule au hasard et le déplace de manière aléatoire vers de nouvelles coordonnées. L'énergie de la molécule est ensuite calculée et la molécule est alors acceptée si elle répond à l'un des deux critères suivant:

(1) 
$$\Delta E \le 0$$
 (2)  $e^{\frac{\Delta E}{kT}} > x$ 

 $\Delta E$  : différence d'énergie entre la structure de départ et la structure finale ; k : constante de Boltzmann ; T : température ; x : nombre aléatoire compris entre 0 et 1

#### III.3.2.2 Recherche aléatoire (Random search)

La méthode de recherche conformationnelle aléatoire (Random search), implémentée dans SYBYL, perturbe aléatoirement les angles dièdres de trois liaisons rotatoires choisies au hasard parmi celles qui ont été sélectionnées pour explorer l'espace conformationnel. La géométrie de la conformation obtenue est ensuite optimisée. Cette structure est alors comparée à celles obtenues préalablement pour finalement être incorporée dans la base de données si son caractère unique est établi (Saunders et al., 1990). La comparaison repose sur la valeur du RMS (Root Mean Square) calculée pour la superposition des atomes correspondants. Dans ce cas, le RMS définit le niveau de résolution de l'espace conformationnel.

$$RMS = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}}$$

d: distance entre les atomes; n: nombre d'atomes

## III.3.2.3 Géométrie de distance (distance geometry)

Une autre façon de générer un espace conformationnel consiste à utiliser la géométrie de distance (distance geometry). La géométrie de distance est une méthode générale pour convertir un ensemble de N<sup>2</sup>-N contraintes de distance en ensemble de 3Ncoordonnées un tridimensionnelles compatibles avec les contraintes. Les contraintes de distance des longueurs de liaison et des angles de liaison utilisés par DGEOM proviennent de la structure de départ. Les liaisons non rotatoires (liaisons doubles ou aromatiques) ou partiellement rotatoires (liaisons amide et ester) sont identifiées automatiquement à partir de la connectivité des atomes de la structure de départ. Ces contraintes de distance entre atomes non liés sont dans le cas de DGEOM90 (Blaney et al., 1990) assignées aux valeurs trouvées dans la structure initiale. Dans le cas de DGEOM95 (Blaney et al., 1995), elles sont assignées à des valeurs qui autorisent une torsion comprise entre -15 et +15°. Des valeurs propres sont également assignées pour des groupements particuliers (disulfure, hydrazine, phénol, biphényle, aniline,...). Dans les autres cas, les contraintes de distance de torsion minimales sont fixées à

des valeurs correspondant, soit à une configuration gauche (-60° ou +60°) pour les liaisons non impliquées dans un cycle, soit éclipsée (0°) pour les liaisons impliquées dans un cycle ou en α d'une liaison aromatique ou double. Les contraintes de distance de torsion maximales sont assignées à une configuration anti (180°). Les contraintes de distance pour tous les autres paires d'atomes sont assignées, pour les valeurs minimales, à la somme des rayons de Van der Waals ou à la longueur de la liaison hydrogène dans le cas des interactions polaires, tandis que pour les valeurs maximales, elles sont déterminées par de la l'inégalité triangulaire équivalent à la longueur atomes. La complètement étendue reliant les deux contraintes de distance décrit complètement l'espace conformationnel d'une molécule en considérant les distances maximales et minimales possibles entre chaque paire d'atomes. Pour une même paire d'atomes, leur distance interatomique pour toutes les conformations possibles se situent donc entre ces deux valeurs extrêmes. L'information de distance est ensuite convertie en coordonnées cartésiennes (Crippen, 1981 Crippen et Havel, 1988). Le logiciel DGEOM (Distance GEOMetry) permet un échantillonnage aléatoire de l'espace conformationnel en générant au hasard des distances interatomiques, pour chaque paire d'atomes, comprises entre les valeurs minimale et maximale prédéfinies. Le temps requis pour générer un espace conformationnel avec cette méthode est indépendant du nombre de liaisons rotatoires et dépend uniquement du nombre d'atomes suivant approximativement une en quadratique. Toutefois, le temps nécessaire à l'optimisation de la géométrie d'une molécule engendrée de cette manière est plus long par comparaison avec les méthodes de perturbation des angles de torsions qui laissent les angles et les longueurs de liaison à des valeurs proches de leurs positions d'équilibre respectives. Cette approche peut générer rapidement et efficacement un échantillon de l'espace conformationnel d'une molécule flexible mais n'offre aucune garantie quant à sa couverture complète.

Afin de pallier cet inconvénient, le programme Confex a été développé à UCB par Michel Neuwels pour générer, en utilisant DGEOM, un espace conformationnel à un niveau de résolution défini jusqu'au degré de convergence choisi (Goldstein *et al.*, 1995). Le programme CONFEX se déroule en deux étapes sucessives (Figure 27).

#### **CONFEX PREPARATION**

Génération aléatoire avec DGEOM d'un set échantillon de conformères Classement selon une énergie (Tripos, Kollman,...) croissante Elimination des conformations dépassant un seuil énergétique choisi

Analyse de l'échantillon => Proposition d'un RMS pour sélection topologique Sélection selon la position relative des atomes choisis (seuil RMS = résolution) en tenant compte des symétries d'ordre C3 et C2

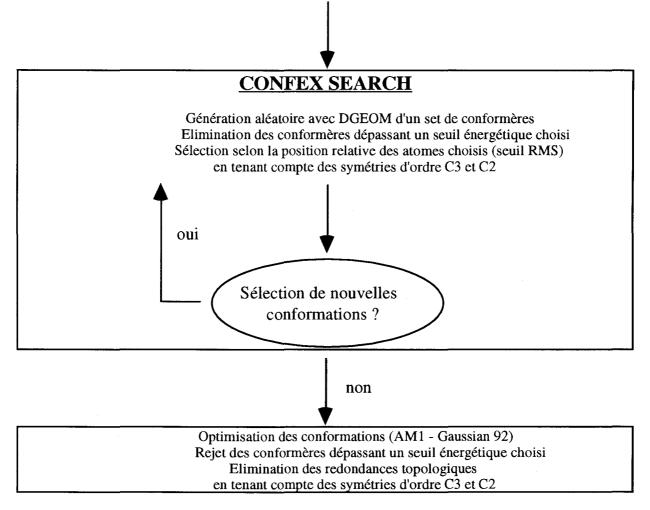


Figure 27: Algorithme descriptif de Confex.

L'étape préparatoire utilise la molécule de référence pour générer un lot de conformations par DGEOM. Les énergies de ces conformations sont calculées en utilisant le champ de forces choisi, en l'occurrence le champ de forces de Kollman "all-atom", toutes les conformations dont les énergies sont supérieures à la limite prédéfinie (500 kcal/mole) sont éliminées. Toutes les molécules sont comparées entre-elles par la superposition de tous les atomes lourds pour proposer automatiquement une valeur de RMS à utiliser qui correspond à la moyenne des RMS

moins l'écart-type. Toutefois, le libre choix de la valeur du RMS reste possible. Elle définit la limite pour laquelle deux conformations seront considérées semblables ou différentes. A ce niveau, il est également possible de tenir compte des symétries d'ordre 2, notamment pour les noyaux aromatiques. Les conformations les plus différentes et les plus basses en énergie sont alors conservées dans une base de données.

Dans la seconde étape, la base de données initiale est enrichie itérativement. Elle utilise la même molécule de référence pour générer un lot de conformations par DGEOM et les mêmes paramètres que précédemment pour retenir des conformations. A chaque tour, elle ne retient que les conformations dont les énergies sont inférieures à la valeur limite prédéfinie et dont les superpositions avec les conformations contenues dans la base de données initiale sont toutes au dessus du seuil choisi, et ce pour toutes les symétries possibles. Le processus itératif s'arrête lorsqu'il n'y a plus moyen de générer une nouvelle conformation pendant au moins cinq tours.

La méthode de recherche conformationnelle aléatoire Confex utilisant la géométrie de distance semble bien adaptée pour générer rapidement l'espace conformationnel d'une molécule flexible telle qu'un peptide. Toutefois elle mérite d'être comparée avec la méthode plus classique Random search qui utilise la modification des angles de torsion ou la dynamique moléculaire.

#### III.3.3 Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire est une méthode destinée à étudier les mouvements et l'espace conformationnel des systèmes moléculaires par l'intégration des équations classiques de mouvement de Newton suivant une fonction d'énergie potentielle donnée et le champ de forces qui lui est associé. Contrairement, aux structures cristallines obtenues par la diffraction des rayons X qui représentent en fait une structure moyenne d'un système en mouvement continu, la dynamique moléculaire simule le mouvement actuel du système donnant une suite de conformations permises dans le vide ou dans un environnement proche de la réalité puisqu'il est possible de réaliser cette étude en simulant la présence d'un solvant. Chaque atome est considéré comme une particule qui subit au temps t, une force calculée comme le gradient négatif de la fonction d'énergie potentielle.

$$m\frac{\delta^2 r(t)}{\delta t^2} = ma(t) = \overrightarrow{F} = -\nabla E$$

m : masse de l'atome ; r : position de l'atome

Les équations de mouvement sont en général intégrées par la méthode de Verlet ou la méthode dénommée "leapfrog" (saut de grenouille). La position d'un atome au temps  $t+\delta t$  est prédite à partir de sa position au temps t et sa vitesse v au temps  $t+(\delta t/2)$ . Le temps  $\delta t$  est de l'ordre de la femtoseconde ( $10^{-15}$  seconde) (Verlet, 1967).

$$r(t+\delta t) = r(t) + v(t+\delta t/2)\delta t$$

La vitesse de l'atome au temps  $t+\delta t/2$  se déduit de la vitesse au temps  $t-\delta t/2$  et de l'accélération a au temps t qui est calculée directement à partir de la force agissant sur l'atome.

$$v(t+\delta t/2) = v(t-\delta t/2) + a(t)\delta t$$

Connaissant les vitesses v, la température T d'un système moléculaire à un moment donné peut être connue.

$$T(t) = 1/(3N - n)K_b \Sigma m(v(t))^2$$

N : nombre d'atomes ; 3N-n : nombre de degrés de liberté ; Kb : constante de Boltzmann

En intégrant de manière itérative les équations de mouvement jusqu'à ce que l'intervalle de temps désiré soit couvert, la trajectoire du système moléculaire, c'est-à-dire l'histoire du mouvement, est reproduite. Cet intervalle de temps est de l'ordre d'une centaine de picosecondes (100.10-12 seconde). Tous les calculs sont effectués à chaque pas δt pour chaque coordonnées de chaque atome (McCammon et Harvey, 1987; Brooks et al., 1988; Howard et Kollman, 1988; Cohen et al., 1990; McCammon, 1990). Pour une macromolécule, le nombre de calculs nécessaires est considérable. Il est possible de diminuer le temps de calcul en appliquant le procédé SHAKE (Ryckaert et al., 1977) qui fixe

les longueurs des liaisons interatomiques comprenant un atome d'hydrogène (O-H, N-H, C-H,...) aux valeurs d'équilibre. Ceci permet d'augmenter le pas d'intégration.

La dynamique moléculaire crée généralement un grand nombre de conformations pour un système particulier. Cet ensemble est défini par le choix des conditions initiales. Un ensemble microcanonique (NVE) requiert un nombre d'atomes constant (N), un volume constant (V) et une énergie constante (E). Un ensemble canonique (NVT) correspond à une simulation menée à température constante. Une simulation menée à une pression constante conduit à un ensemble isobare. Les études de dynamique moléculaire menées pour générer un espace conformationnel sont souvent effectuées en considérant l'ensemble canonique. La température T étant calculée à partir de la vitesse v, pour maintenir le système à une température constante T°, il est nécessaire de coupler le système à un bain thermique (Berendsen et al., 1984). Cette méthode consiste à modifier les équations du mouvement en ajustant à chaque étape, la vitesse v à une nouvelle valeur λ v qui est fonction de la température de référence T°.

$$\lambda = 1 + \frac{\delta t}{2\tau} (T^{\circ}/T - 1)$$
  $\tau$ : constante de couplage

### III.3.3.1 Dynamique moléculaire "classique"

Une simulation de dynamique moléculaire déroule généralement en trois phases. La structure de départ relaxée par une méthode de minimisation de l'énergie subit une étape de thermalisation qui doit être conduite avec soin pour obtenir un système bien équilibré. Le système moléculaire est amené progressivement à la température désirée (de l'ordre de 300K) par paliers successifs de 50K d'une durée de quelques picosecondes. A chaque palier de température, des vitesses initiales aléatoires différentes sont attribuées à chaque atome à partir d'une distribution de Maxwell-Boltzmann. Pendant toute cette étape, la constante de couplage est forte (de l'ordre de 10 femtosecondes). Puis, comme les conditions initiales de la simulation sont arbitraires et bien souvent non réalistes, vient l'étape d'équilibrage qui se déroule à la température désirée pendant une période de l'ordre 100 picosecondes pendant laquelle les vitesses des atomes sont celles de l'intervalle précédent. Le couplage au bain thermique est diminué, la constante de couplage est faible (de l'ordre de 100 femtosecondes). A la fin de cette période, la température doit rester stable autour de la température désirée et la valeur de l'énergie doit être conservée. Finalement, pendant l'étape de production, les équations de mouvements sont intégrées pendant une période assez longue (de l'ordre de 500 picosecondes). Le pas d'intégration doit être suffisamment petit (de l'ordre de la femtoseconde). Tout le long de la trajectoire, à intervalles réguliers (de l'ordre de 25 femtosecondes), les différentes conformations du système sont alors stockées pour en effectuer une analyse détaillée.

Toutefois, certaines transitions intéressantes restent inaccessibles car elles ne peuvent être atteintes qu'après plusieurs minutes à la température de 300K. Le recuit simulé permet de contourner cette limitation de la dynamique moléculaire.

#### III.3.3.2 Recuit simulé (Simulated annealing)

Le recuit simulé est une technique inspirée des méthodes de recuit expérimental au cours desquelles une matière est chauffée puis refroidie lentement à maintes reprises de manière à obtenir l'état le plus stable possible sur le plan thermodynamique. Appliquée à un système moléculaire, elle permet d'accéder à l'arrangement atomique le plus stable. Le protocole est répété plusieurs fois de façon à obtenir de multiples conformations de plus basse énergie (Auffinger et al., 1990; et Gready, 1995). Cette méthode donne aux suffisamment d'énergie cinétique pour franchir les barrières de rotation. Il est impératif de choisir une température qui génère une labilité conformationnelle sans entraîner une distorsion des angles longueurs de liaisons. Pour obtenir une conformation stable, il est nécessaire de diminuer l'énergie cinétique en abaissant la température. La simulation démarre à la température maximale spécifiée (de l'ordre de 1000K) et le système moléculaire est maintenu à cette température pendant toute la durée du plateau (de l'ordre de la picoseconde), c'est-àdire le temps alloué à la molécule pour changer de conformation. Puis, la température décroît jusqu'à ce que la température minimale (de l'ordre 300K) soit atteinte en suivant plusieurs protocoles possibles (exponentielle, linéaire ou en escalier).

# IV. METHODOLOGIES

#### IV. METHODOLOGIES

#### IV.1 Espaces conformationnels des diastéréoisomères (S,S) et (S,R)

Afin de choisir la méthode la plus efficiente pour couvrir au mieux les espaces conformationnels des diastéréoisomères (S,S) et (S,R) du tripeptide UCB16101, nous avons, dans un premier temps, généré plusieurs espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,S) par différentes méthodes. La génération d'un espace conformationnel repose sur la transformation d'une conformation en une autre. Ceci peut se faire de façon statique et aléatoire, soit en modifiant les torsions (Random search), soit en considérant les distances interatomiques maximales et minimales (Confex), ou de manière dynamique (dynamique moléculaire). Les trois approches ont été comparées entre elles.

Pour générer ces espaces conformationnels, la même démarche est effectuée quelle que soit la méthode :

- 1) Génération de conformations à différents niveaux de résolution topologique (RMS).
- 2) Minimisation de l'énergie.
- 3) Elimination des conformations qui n'ont pas pu converger vers un minimum d'énergie local pendant l'étape d'optimisation des géométries.
- 4) Elimination des conformations redondantes d'un point de vue topologique.
- 5) Sélection des chefs de file, constitution et analyse des familles conformationnelles.

Dans le but de simuler différents milieux, nous avons calculé les charges par la méthode CNDO disponible dans le programme GAUSSIAN 92 (Frisch *et al.*, 1992) et minimisé les énergies en simulant différents milieux. La constante diélectrique est ajustée à 1 pour le vide, à 4 pour un milieu biologique et à 80 pour l'eau.

#### IV.1.1. Génération des conformations

La méthode Confex repose sur le logiciel de géométrie de distance DGEOM dont les deux versions, DGEOM 90 et DGEOM 95, ont pu être comparées. Les conformations sont générées de façon aléatoire (par lots de 200) à différents niveaux de résolution (RMS) jusqu'à convergence (5 lots sans en trouver de nouvelles).

La méthode Random search, telle qu'elle est implémentée dans le logiciel SYBYL, consiste à générer 1000 conformations en perturbant à chaque fois au hasard 3 des 16 liaisons rotatoires de la molécule. Le degré de convergence est atteint lorsque toutes les conformations ont été générées ou lorsque chaque conformation a été trouvée au moins 6 fois. Le choix de la valeur du RMS fixe le niveau de résolution.

d'une expérience de dynamique moléculaire "classique" température constante, le système été la à progressivement à la température de 300K par paliers successifs de 50K pendant 4 ps. A chaque palier de température, des vitesses aléatoires ont été attribuées à chaque atome à partir d'une distribution de Maxwell-Boltzmann propre à la température choisie. Un couplage fort (0,01 ps) est utilisé pendant toute cette période de thermalisation. Ensuite au cours d'une étape d'équilibration d'une durée de 100 ps, les vitesses des atomes sont celles de l'intervalle précédent et le couplage bain thermique est diminué (0,1 ps). Finalement, conformations sont générées au cours de la phase de production d'une durée de 500 ps. Pendant la phase de production, le système est bien stabilisé. L'énergie potentielle moyenne est égale à 102,4 ± 7,8 kcal/mole (Figure 28). Cependant, ce nombre de conformations est trop important pour pouvoir être considéré. La taille de l'échantillon a donc été réduite au moyen du programme COMPARE implémenté dans le logiciel DGEOM95. COMPARE, dans un premier temps, superpose deux à deux toutes les conformations et calcule les RMS. La valeur du RMS est mesure simple mais effective de la similarité conformations. Il convertit ensuite cette matrice de RMS en matrice de distances dont il extrait une liste des plus proches voisins. Finalement, il utilise l'algorithme de Jarvis-Patrick pour classer cet ensemble de conformations en familles. Nous avons fixé la valeur du RMS maximum permis entre deux familles à 2,50 Å car la valeur proposée par défaut correspondant à la moyenne des RMS, environ 4,00 Å, diminue considérablement les possibilités de couvrir l'espace conformationnel qui ne se réduit à la fin qu'à quelques conformations. Les centres de ces familles sont retenus pour représenter la trajectoire de cette simulation dynamique. La capacité de traitement de cette version de COMPARE étant limitée à 1050 conformations, nous avons procédé par un classement successif de lots de 1000 conformations réparties au hasard.

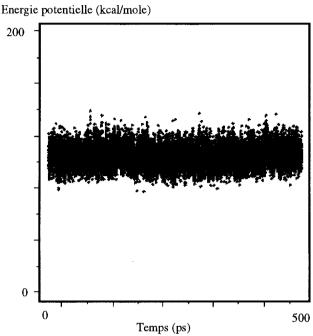


Figure 28 : Evolution de l'énergie potentielle pendant la phase de production.

#### IV.1.2 Minimisation des énergies

Les énergies des conformations sont minimisées par Maximin2, sans tenir compte des charges, en utilisant le champ de forces de Kollman "all-atom" tel qu'il est implémenté dans SYBYL. Ce champ de forces qui a été spécialement développé pour la modélisation des acides nucléiques et des protéines s'inscrit parfaitement dans notre étude. Cependant, dans ce champ de forces, certains paramètres de déformation angulaire sont manquants, plus précisément pour les fonctions benzamide et benzylester. Les paramètres manquant sont obtenus par des valeurs bien définies relevées dans extrapolation originales du champ de forces pour les angles C<sub>S</sub>p<sub>3</sub>-C<sub>S</sub>p<sub>3</sub>-O<sub>ester</sub>, C<sub>S</sub>p<sub>3</sub>-C<sub>sp2</sub> carbonyle-Namide et C<sub>sp3</sub>-C<sub>sp2</sub> carbonyle-O<sub>carbonyle</sub> (Tableau 5). La substitution empirique de ces paramètres manquant s'impose dans la mesure où elle est nécessaire pour obtenir une représentation correcte de la molécule étudiée.

Paramètres	K <sub>θ</sub> (kcal/mole.rad <sup>2</sup> )	θ0 (°)
CA-CT-OS	80	109,5
CA-C-N	70	116,6
CA-C-O	80	120,4

CA: carbone aromatique; CT: carbone sp3; OS: oxygène d'ester; C: carbone sp2 de carbonyle; O: oxygène de carbonyle; N: azote d'amide

Tableau 5 : Paramètres de substitution utilisés dans le champ de forces de Kollman "all-atom".

La convergence vers un minimum d'énergie est atteinte lorsque la valeur du gradient est inférieure à 0,01 kcal/mole.Å.

La méthode Random search intègre la minimisation des énergies.

#### IV.1.3 Elimination des conformations semblables

La minimisation des énergies peut faire converger vers un même minimum deux structures, initialement différentes. 11 nécessaire d'éliminer les conformations semblables, en ne conservant que celles de plus basse énergie. Ceci a été réalisé par une procédure d'élimination des redondances topologiques (Neuwels, 1994). procédure, dans un premier temps, calcule les énergies de toutes les conformations et les classe selon ce critère. Elle conformations d'énergies trop élevées. Un premier test est réalisé sur un échantillon représentatif afin de proposer un niveau de RMS à utiliser pour rejeter les conformations redondantes (moyenne des RMS moins l'écart-type). L'utilisateur peut valider cette proposition ou entrer une valeur de son choix. Les symétries d'ordre 2 peuvent être prises en compte. Dans un second temps, elle recherche toutes les conformations qui se situent au dessus du seuil de RMS pour les retenir dans une nouvelle base de données. La base de données initiale est ainsi réduite pour ne conserer que les conformations les plus différentes possibles et les plus basses en énergie. Il est possible de rechercher parmi toutes les conformations initiales, les conformations apparentées pour un niveau de RMS donné (constitution des familles topologiques).

#### IV.1.4 Sélection des chefs de file et constitution des familles

La sélection des conformations les plus basses en énergie et les plus différentes du point de vue topologique, c'est-à-dire les chefs de file, est effectuée par une procédure qui permet la création de familles de conformations (Neuwels et Van de Water, 1994). La sélection énergétique repose sur le classement des conformations par énergie croissante. La sélection topologique est basée sur la superposition de toutes les conformations entre-elles. Le résultat final est tributaire de la sélection des atomes et de la valeur du RMS. Pour constituer ces familles, nous avons choisi tous les atomes constituant le squelette, à l'exception du groupement N-H amide de la lysine, et du groupement carboxyle de la sarcosine, soit les 11 atomes marqués de la figure 29, et nous avons fixé le RMS à 0,40 Å de façon à discriminer au mieux les chefs de file et générer les familles les plus homogènes possibles. Pour représenter shématiquement au mieux chaque famille, nous avons utilisé leur conformation moyenne (Fonction "average" de SYBYL). Les principaux angles de torsion  $\varphi$  et  $\psi$  du squelette des conformations ont été mesurés (Figure 29).

Figure 29 : Atomes du squelette utilisés pour constituer les familles (la numérotation est arbitraire).

#### IV.1.5 Optimisation par AM1 des espaces conformationnels

Pour chaque diastéréoisomère, (S,S) ou (S,R), les deux espaces conformationnels provenant de Confex, utilisant les deux versions de DGEOM, 90 et 95, ont été optimisés au niveau semi-empirique AM1 en employant le programme GAUSSIAN 92 (Frisch et al., 1992). Les conformations qui n'avaient pu converger vers un minimum local

d'énergie ont été réintégrées. Les conformations similaires ont été éliminées en ne conservant que celles de plus basse énergie. La valeur du RMS a été fixée à 2,50 Å afin d'atteindre pour chaque espace conformationnel, le même niveau de résolution. Ensuite, pour chaque diastéréoisomère, nous avons procédé au regroupement des deux espaces conformationnels issus de Confex. Puis, nous avons de nouveau éliminé les conformations semblables avec une valeur de RMS fixée à 2,50 Å. Finalement, nous avons créé des familles de conformations.

#### IV.2 Dynamique moléculaire avec SPASIBA

Dans une autre approche du problème, nous avons utilisé, pour générer des espaces conformationnels des diastéréoisomères (S,S) et (S,R), la dynamique moléculaire couplée au champ de forces SPASIBA. Les structures de départ des deux diastéréoisomères (S,S) et (S,R) ont été construites à l'aide du logiciel SYBYL. Leurs charges partielles ont été calculées par la méthode AM1 (Dewar et al., 1985). Leurs géométries ont tout d'abord été relaxées par la méthode de la plus forte pente (100 cycles) suivie par la méthode du gradient conjugué (5400 cycles). Tout au long de cette simulation, nous avons considéré explicitement tous les atomes et degrés de liberté des molécules à l'exception des longueurs de liaison qui ont été contraintes à leurs valeurs d'équilibre par le procédé SHAKE. Le potentiel de Lennard-Jones pour les interactions non liées de type Van der Waals a été réduit de 50% tandis que la totalité du potentiel de Coulomb pour les interactions électrostatiques a été prise en compte avec une constante diélectrique égale à 1 (Derreumaux et al., Dans un souci de considérer convenablement toutes les interactions non liées, nous avons fixé la distance maximale pour ce type d'interaction à 12 Å. Pour chaque composé, une étude de dynamique moléculaire est menée à la température constante de 300 K pendant une ps. Le système moléculaire est amené à période de 600 température par paliers de 50 K, d'une durée de 4 ps, au début desquels des vitesses initiales aléatoires différentes sont attribuées à chaque atome à partir d'une distribution de Maxwell-Boltzmann. Les équations de mouvement sont intégrées par l'algorithme de Verlet avec un pas de 0,001 ps. Durant cette dynamique moléculaire, les coordonnées, énergies et vitesses sont collectées tout le long de la trajectoire toutes les 0,025 ps. Seules les 500 dernières ps sont analysées, ce qui correspond à 20000 conformations. Nous avons classé ces nombreuses conformations en faisant appel au programme COMPARE implémenté dans le logiciel DGEOM95. Nous avons pris une valeur de 2,50 Å comme limite supérieure du RMS maximum permis entre deux familles. Les centres de ces familles ont été retenus pour représenter la trajectoire de cette simulation dynamique et leurs énergies minimisées. Les conformations redondantes ont été éliminées en prenant une valeur limite de RMS égale à 1,25 Å. Les géométries des conformations restantes dont la différence d'énergie par rapport au minimum global trouvé est inférieure à 5 kcal/mole ont été optimisées par la méthode de Newton-Raphson jusqu'à ce que la valeur du gradient soit inférieure à  $10^{-5}$  kcal/mole.Å. Les modes normaux ont été calculés.

#### IV.3 Spectrométries vibrationnelles infrarouge et Raman

Les spectres vibrationnels des quatre diastéréoisomères (R,R), (S,S), (R,S) et (S,R) de l'UCB16101 ont été enregistrés en spectrométrie d'absorption infrarouge. Un spectre vibrationnel du diastéréoisomère (R,R) a été enregistré en spectrométrie de diffusion Raman.

Les spectres infrarouge ont été réalisés sur un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier IFS48 BRUKER équipé d'un détecteur MCT (Mercure-Cadmium-Tellure). 100 enregistrements à partir d'un échantillon solide ont été nécessaires pour obtenir une résolution égale à 4 cm<sup>-1</sup>.

Le spectre Raman a été obtenu à partir d'un module FRA106 monté sur un spectromètre IFS88 BRÜKER qui utilise la raie d'excitation à 1,06  $\mu$ m d'un laser Nd-YAG. L'obtention d'une résolution égale à 4 cm<sup>-1</sup> a requis 200 à 400 passages. Le spectre Raman provient également d'un échantillon solide.

## IV.4 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés pour le diastéréoisomère (R,R) à température ambiante sur un spectromètre BRUKER AC 300P (300 MHz). Ils ont été effectués dans le chloroforme et le diméthylsulfoxyde (DMSO) car l'UCB16101 est insoluble dans l'eau. Les expériences bidimensionnelles ont été réalisées avec les séquences COSY et NOESY.

# V. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### V. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### V.1 Espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,S)

#### V.1.1 Description des espaces conformationnels

#### V.1.1.1 Confex

# V.1.1.1.1 DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å

#### V.1.1.1.1 Optimisation sans charges

L'espace conformationnel obtenu est constitué de 31 conformations. Après minimisation des énergies, sans tenir compte des charges, 4 conformations n'ont pas pu converger vers un minimum local et ont été écartées. Parmi les 27 conformations restantes, 4 sont éliminées à cause de leur similitude avec une conformation de plus basse énergie. Cet espace conformationnel est donc réduit à 23 conformations dont les énergies se répartissent entre 25,6 et 39,4 kcal/mole. 7 chefs de file ont été choisis. Il n'y a pas de redondance dans les familles (Tableau 6) (Figure 30).

N°	Na	Torsions <sup>b</sup> (°)		Code <sup>C</sup>	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	ψ2			
1	4	$-158,1 \pm 1,5$	$144,3 \pm 2,6$	Е	25,6	0,0
2	4	$-57,7 \pm 10,9$	$-49,2 \pm 8,4$	Α	28,2	2,6
3	4	$54,6 \pm 2,3$	$69,6 \pm 4,1$	A*	28,5	2,9
4	2	$-158,5 \pm 1,5$	$69,9 \pm 10,6$	D	30,2	4,6
5	3	$-66,0 \pm 4,1$	$128,7 \pm 11,8$	C/F	30,5	4,9
6	5	$-169,8 \pm 9,7$	$-66,5 \pm 2,8$	G	33,1	7,5
7	1	128,7	-49,9	D*	35,4	9,8

a Nombre de conformations.

Tableau 6 : Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å.

b Valeurs moyennes des torsions φ2 et ψ2 caractéristiques des familles.

<sup>&</sup>lt;sup>C</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

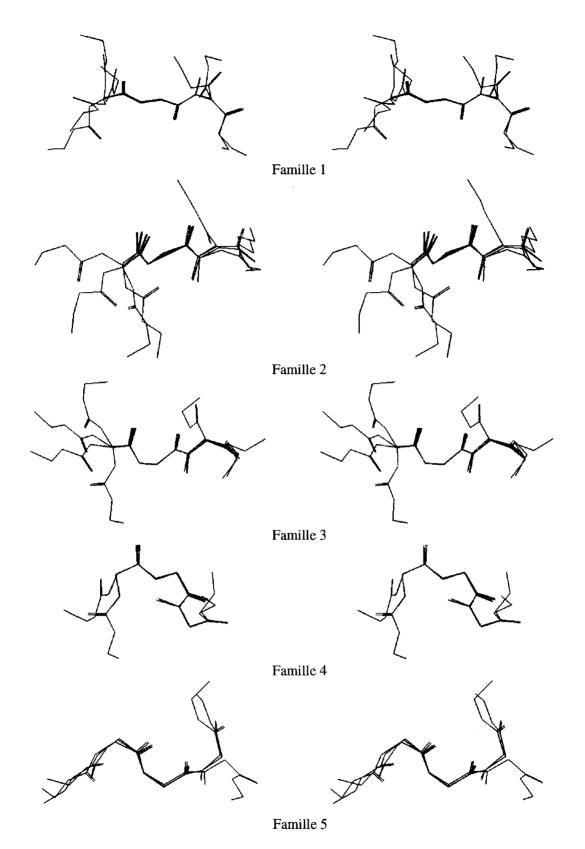


Figure 30 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 7 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å.

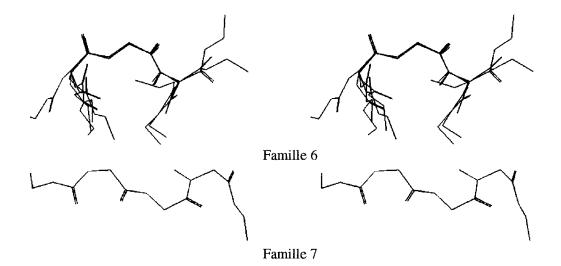


Figure 30 (Suite): Vues stéréo des squelettes des conformations des 7 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å.

Dans le but de simuler différents milieux (le vide, un milieu biologique, l'eau), les 4 conformations qui n'avaient pas pu converger vers un minimum local ont été réintégrées pour le calcul des charges CNDO suivie de la minimisation de l'énergie.

#### V.1.1.1.2 Optimisation avec charges CNDO - $\varepsilon = 1$

5 conformations n'ont pas pu converger vers un minimum et sont éliminées. Aucune similitude entre conformations n'apparaissant, l'espace conformationnel est constitué de 22 éléments dont les énergies varient entre 23,3 et 34,9 kcal/mole.

#### V.1.1.1.3 Optimisation avec charges CNDO - $\varepsilon = 4$

3 conformations ne peuvent converger vers un minimum local; ce qui réduit l'espace conformationnel à 24 éléments dont les énergies sont comprises entre 25,1 et 38,0 kcal/mole. Il n'y a aucune similitude entre les conformations.

#### V.1.1.1.4 Optimisation avec charges CNDO - $\varepsilon = 80$

3 conformations sont exclues pour non convergence vers un minimum. Par conséquent, l'espace conformationnel est ramené à 24

éléments. Les énergies sont comprises entre 25,3 et 38,9 kcal/mole. Aucune similitude n'apparaît entre les différentes structures.

Le changement de constante diélectrique ne semble pas avoir une grande influence sur les géométries des conformations qui restent identiques. Nous l'avons vérifié sur l'ensemble des familles et présentons à titre d'exemple les conformations de plus basse énergie (Figure 31).

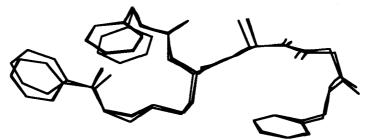


Figure 31 : Représentation de la superposition des conformations de plus basse énergie des 4 espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,S) optimisés sans charges, avec charges CNDO et  $\epsilon=1,4,80$ .

Quel que soit le milieu simulé, le nombre de chefs de file choisis est toujours égal à 7 et il n'y a aucune redondance dans les familles. Cependant, bien que certains chefs de file diffèrent d'un espace conformationnel à l'autre, la constitution des familles ne change pas.

# V.1.1.1.2 DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å

Dans ces conditions, nous obtenons 215 conformations. 31 conformations qui ne peuvent pas converger vers un minimum local lors de la minimisation des énergies, sont éliminées. Parmi les 184 conformations restantes, 44 sont éliminées à cause de leur similitude avec une conformation de plus basse énergie. Finalement, l'espace conformationnel est réduit à 140 conformations dont les énergies se répartissent entre 21,0 et 37,6 kcal/mole.11 chefs de file ont été sélectionnés. Il y a 38 redondances dans les familles (Tableau 7) (Figure 32).

N°	N a	Torsions b (°)		Code c	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	ψ2			
1	20	$55,7 \pm 2,7$	$69,5 \pm 4,9$	A*	21,0	0,0
2	16	$-164.8 \pm 5.6$	$-61,7 \pm 7,3$	G	23,1	2,1
3	6	$-77,2 \pm 8,4$	$120,1 \pm 6,7$	С	24,4	3,4
4	13	$-144,5 \pm 10,8$	$75,8 \pm 8,1$	D	25,2	4,2
5	19	$-154,8 \pm 7,5$	$71,6 \pm 7,1$	D	26,1	5,1
6	25	$-68.8 \pm 7.9$	$133,7 \pm 10,4$	C/F	26,6	5,6
7	16	$-160,1 \pm 4,3$	$145,8 \pm 2,5$	E	27,1	6,1
8	26	$-59,2 \pm 8,1$	$-52,9 \pm 8,6$	Α	28,1	7,1
9	2	$129,4 \pm 1,1$	$-62,1 \pm 18,2$	D*	31,1	10,1
10	25	$-62,9 \pm 7,8$	$-53,0 \pm 8,8$	Α	31,2	10,2
11	10	$71.8 \pm 2.2$	$147,6 \pm 10,3$	H*/F*	31,5	10,5

a Nombre de conformations.

Tableau 7: Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å.

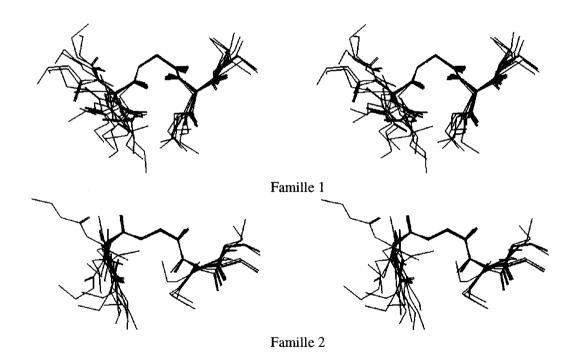


Figure 32 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 11 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å.

b Valeurs moyennes des torsions φ2 et ψ2 caractéristiques des familles.

Code utilisé par Zimmerman et al. (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

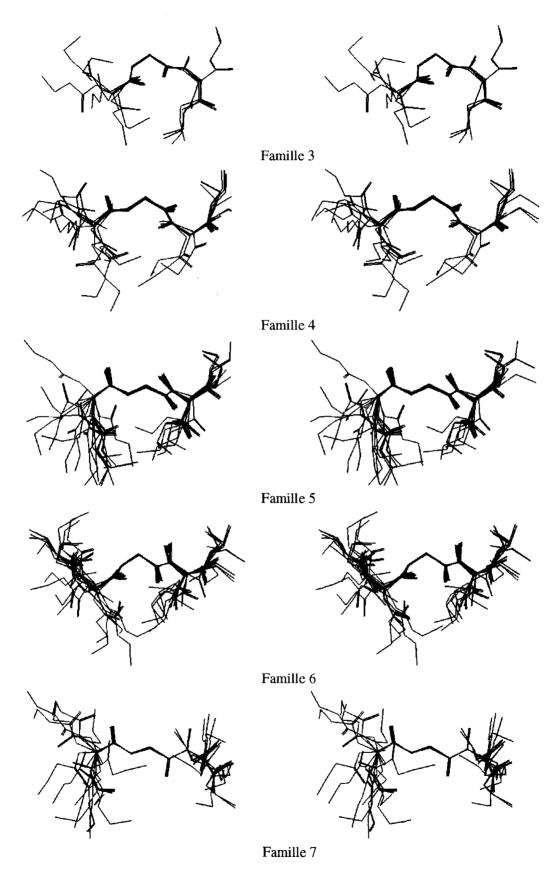


Figure 32 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 11 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å.

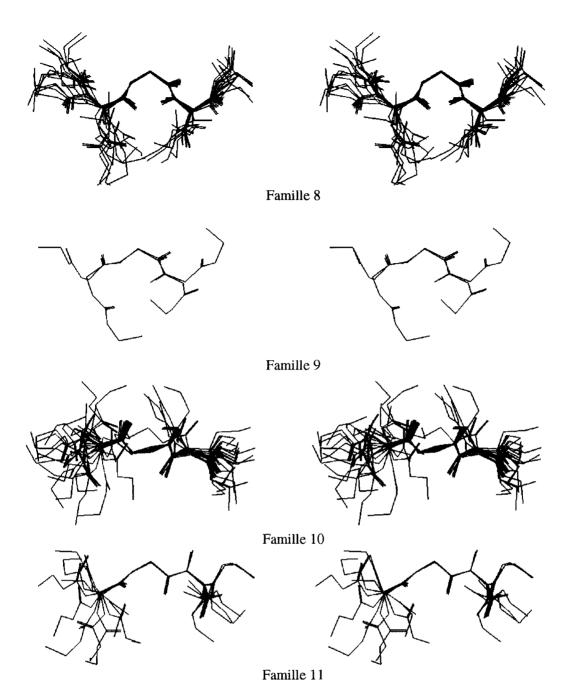


Figure 32 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 11 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å.

# V.1.1.1.3 DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å

113 conformations sont retenues pour représenter cet espace conformationnel. 20 conformations n'ont pas pu converger vers un minimum local lors de la minimisation des énergies, sans tenir compte des charges, et sont donc écartées. 47 autres ont été éliminées sur la base de leur similitude avec une conformation de plus basse énergie. Par

conséquent, il reste 46 conformations pour des énergies comprises entre 19,1 et 34,9 kcal/mole. 9 chefs de file ont été sélectionnés. On observe 4 redondances dans les familles (Tableau 8) (Figure 33).

N°	N a	Torsions <sup>b</sup> (°)		Code c	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	ψ2			
1	5	$-68,2 \pm 9,7$	$125,3 \pm 10,3$	C/F	19,1	0,0
2	8	$-156,5 \pm 10,1$	$72,2 \pm 9,6$	D	21,7	2,6
3	3	$-55,0 \pm 15,2$	$139,8 \pm 2,9$	F	22,1	3,0
4	9	$57,5 \pm 2,7$	$71,6 \pm 5,3$	A*	22,1	3,0
5	6	$-160,8 \pm 2,1$	$-64,4 \pm 8,3$	G	22,1	3,0
6	7	$-132,7 \pm 16,6$	$79,9 \pm 8,6$	D	23,9	4,8
7	5	$-54,7 \pm 5,6$	$-53,6 \pm 8,2$	Α	24,9	5,8
8	5	$-160,3 \pm 2,5$	$150,9 \pm 2,6$	E	28,0	8,9
9	2	$71,9 \pm 0,3$	149,8 ± 17,1	H*/F*	30,7	11,6

a Nombre de conformations.

Tableau 8 : Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å.

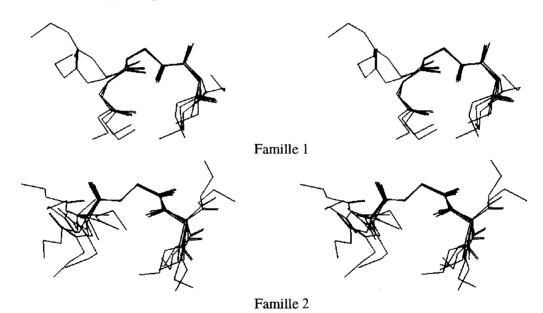


Figure 33 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å.

b Valeurs moyennes des torsions φ2 et ψ2 caractéristiques des familles.

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

<sup>&</sup>lt;sup>e</sup> Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

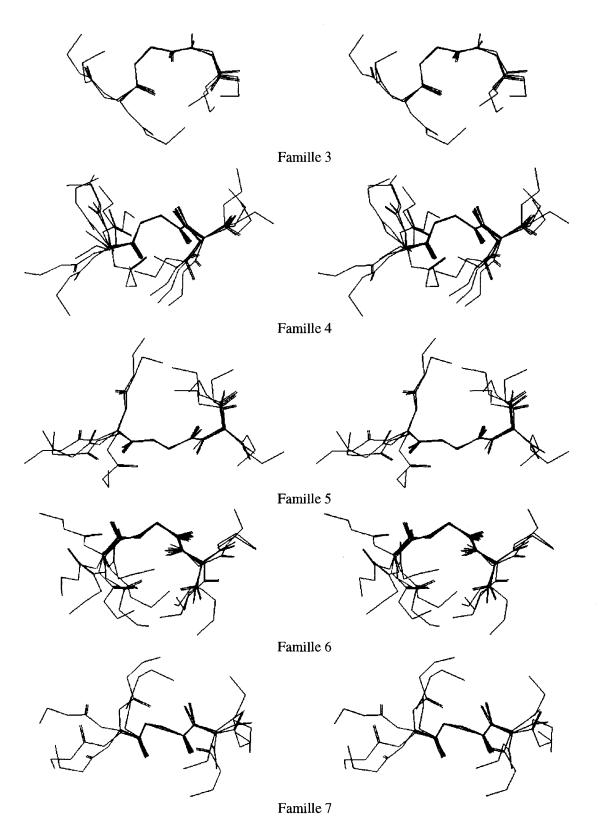


Figure 33 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å.

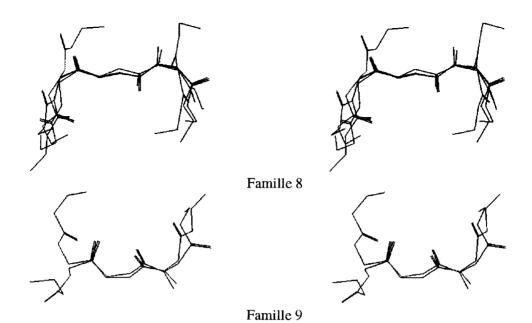


Figure 33 (Suite): Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å.

#### V.1.1.2 Random search

### V.1.1.2.1 RMS = 2.00 Å

349 conformations optimisées sans tenir compte des charges, représentent l'espace conformationnel généré par Random search (RMS = 2,00 Å). Après vérification de la convergence des énergies vers un minimum, 57 conformations sont éliminées. Parmi les 292 conformations restantes, 37 sont écartées car elles possèdent une similitude avec d'autres conformations de plus basse énergie. La méthode Random search ne tient pas compte des symétries C2 au sein de la molécule. L'espace conformationnel se réduit donc à 255 conformations dont les énergies varient entre 21,4 et 38,2 kcal/mole. Cependant, l'observation des structures obtenues révèle des anomalies dans leur géométrie, notamment dans la planéité des fonctions ester. 48 conformations sont donc éliminées sur ce critère (Une variation de 40° par rapport au plan a été tolérée). Les fonctions amide ont toujours gardé une géométrie correcte. Par conséquent, parmi les 349 conformations de départ, 207 sont conservées. Leurs énergies varient entre 21,4 et 37,4 kcal/mole.12 chefs de file ont été choisis (Tableau 9) (Figure 34). Il y a 28 redondances dans les familles.

N°	Νa	Torsi	ons <sup>b</sup> (°)	Code <sup>C</sup>	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	ψ2			
1	38	$55,9 \pm 5,0$	$69,8 \pm 7,2$	A*	21,4	0,0
2	8	$-121,5 \pm 19,2$	$92,5 \pm 12,5$	D	22,9	1,5
3	38	$-149,3 \pm 11,1$	$74,0 \pm 9,3$	D	23,2	1,8
4	19	$-165,3 \pm 11,6$	$59,0 \pm 8,8$	D	23,6	2,2
5	34	$-67,5 \pm 7,3$	$136,3 \pm 13,5$	C/F	24,1	2,7
6	16	$70,3 \pm 3,1$	$155,9 \pm 13,7$	H*/F*	24,7	3,3
7	11	$132,8 \pm 21,5$	$-60,6 \pm 10,2$	D*	25,6	4,2
8	13	$-158,4 \pm 8,9$	$144,8 \pm 3,6$	E	26,3	4,9
9	30	$-55,4 \pm 14,8$	$-56,1 \pm 8,9$	Α	26,9	5,5
10	2	$56,1 \pm 15,7$	$-101.8 \pm 3.9$	C*	28,1	6,7
11	18	$-67,5 \pm 7,2$	$124,0 \pm 10,4$	C/F	28,2	6,8
12	8	$-72.0 \pm 10.8$	$62,2 \pm 8,6$	С	30,4	9,0

a Nombre de conformations.

Tableau 9 : Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Random search - RMS = 2,00 Å.

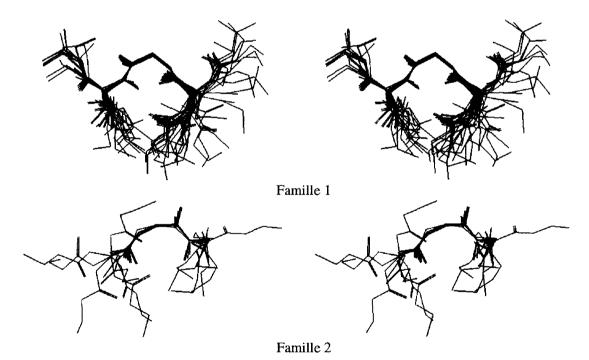


Figure 34 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 12 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Random search - RMS = 2,00 Å.

b Valeurs moyennes des torsions  $\phi 2$  et  $\psi 2$  caractéristiques des familles.

<sup>&</sup>lt;sup>C</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

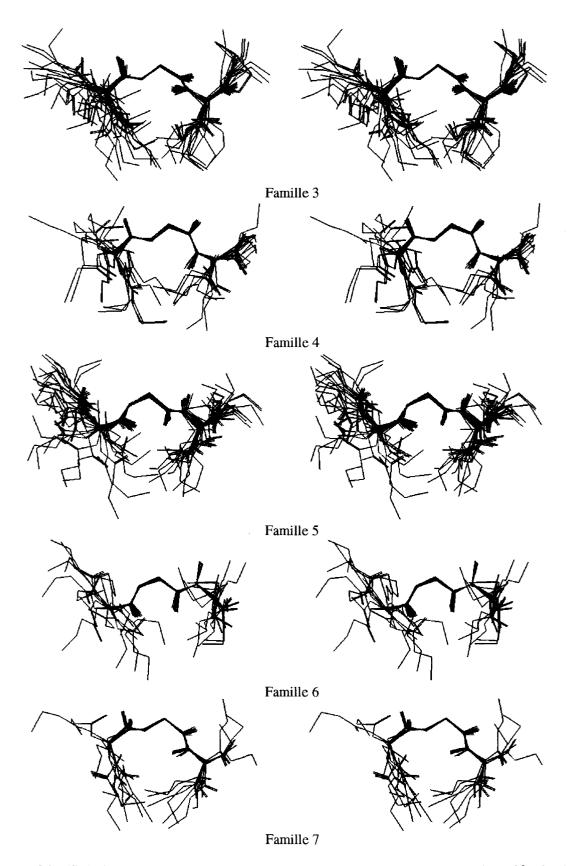


Figure 34 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 12 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Random search - RMS = 2,00 Å.

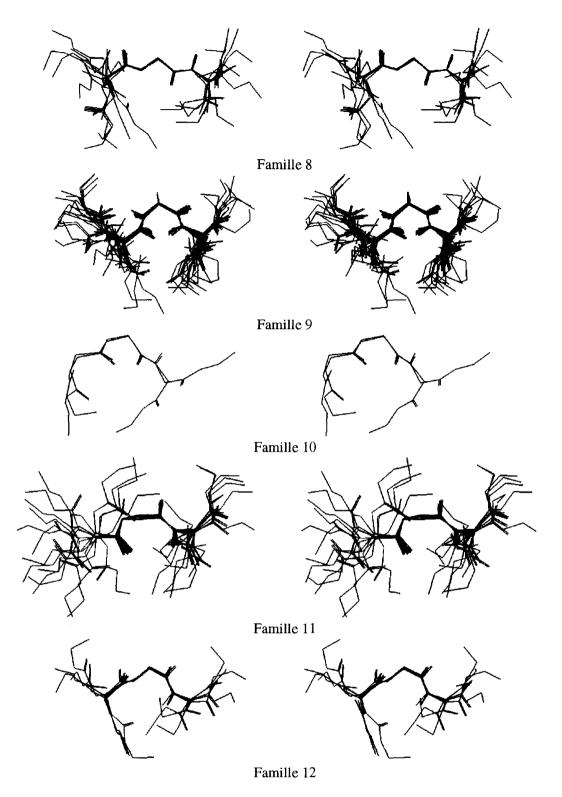


Figure 34 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 12 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Random search - RMS = 2,00 Å.

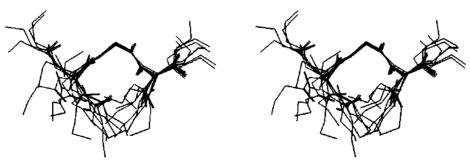
# V.1.1.2.2 RMS = 2,50 Å

A l'issue des différentes étapes, 79 conformations dont les énergies varient entre 21,4 et 36,0 kcal/mole sont retenues pour constituer cet espace conformationnel. Cependant, 17 conformations présentant des anomalies dans leur géométrie (planéité des fonctions ester) ont été éliminées. Finalement, l'espace conformationnel possède 62 conformations dont les énergies sont réparties entre 21,4 et 34,5 kcal/mole. 9 chefs de files ont été choisis (Tableau 10) (Figure 35). Il y a 3 redondances dans les familles.

N°	Na	Torsions <sup>b</sup> (°)		Code c	E d(kcal/mole)	ΔE <sup>e</sup> (kcal/mole)
İ		φ2	ψ2			
1	17	$57,2 \pm 4,8$	$72,1 \pm 6,3$	A*	21,4	0,0
2	4	$-125,5 \pm 9,2$	$90,1 \pm 10,0$	D	22,9	1,5
3	7	$-165,9 \pm 2,8$	$-61,4 \pm 7,5$	D	23,6	2,2
4	9	$-67.8 \pm 7.9$	$139,3 \pm 16,1$	C/F	24,1	2,7
5	18	$-147,0 \pm 13,8$	$74,8 \pm 10,1$	D	25,2	3,8
6	3	-155,1 ± 14,3	$148,0 \pm 3,2$	Е	26,3	4,9
7	5	$-55,2 \pm 3,5$	$-48,0 \pm 8,2$	Α	26,9	5,5
8	1	71,1	133,3	H*	29,2	7,8
9	1	65,6	172,2	F*	33,6	12,2

a Nombre de conformations.

Tableau 10 : Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Random search - RMS = 2,50 Å.



Famille 1

Figure 35 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Random search - RMS = 2,50 Å.

b Valeurs moyennes des torsions φ2 et ψ2 caractéristiques des familles.

<sup>&</sup>lt;sup>C</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

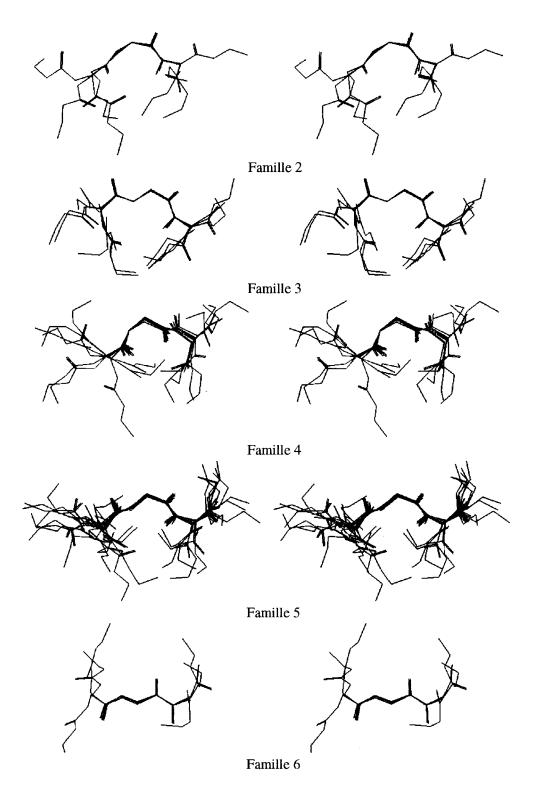


Figure 35 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Random search - RMS = 2,50 Å.

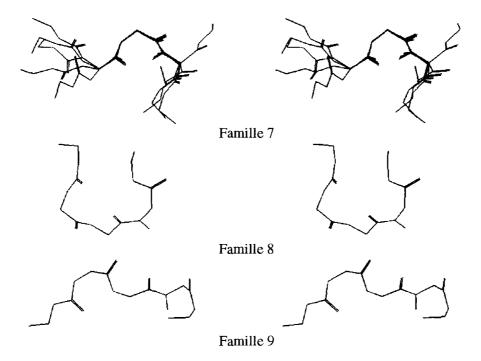


Figure 35 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par Random search - RMS = 2,50 Å.

# V.1.1.3 Dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å

252 conformations ont été sélectionnées pour représenter la trajectoire de la dynamique moléculaire. Après minimisation de l'énergie, l'espace conformationnel se réduit à 57 conformations dont les énergies sont comprises entre 16,1 et 33,0 kcal/mole. 195 conformations ont été éliminées uniquement sur la base de leur similitude avec d'autres conformations de plus basse énergie car elles ont toutes convergé vers un minimum d'énergie local. 9 chefs de files ont été choisis (Tableau 11) (Figure 36). Il y a 13 redondances dans les familles.

N°	Na	Torsions b (°)		Code c	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	ψ2			
1	14	$-150,4 \pm 12,0$	$81,5 \pm 9,3$	D	16,1	0,0
2	7	$-123,5 \pm 21,8$	$96,5 \pm 12,8$	D	19,4	3,3
3	11	$-68,9 \pm 7,6$	$133,7 \pm 12,3$	C/F	20,0	3,9
4	7	$-59,1 \pm 6,8$	$-49,4 \pm 8,8$	A	21,1	5,0
5	1	-170,7	142,4	E	21,1	5,0
6	13	$55,4 \pm 5,1$	$72,9 \pm 6,0$	A*	21,7	5,6
7	4	$-160,8 \pm 2,8$	$-57,2 \pm 10,6$	G_	23,3	7,2
8	3	$75,4 \pm 2,1$	$143,1 \pm 0,9$	F*	25,5	9,4
9	10	$58,7 \pm 5,0$	$78,0 \pm 7,2$	A*	30,8	14,7

a Nombre de conformations.

Tableau 11 : Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å.

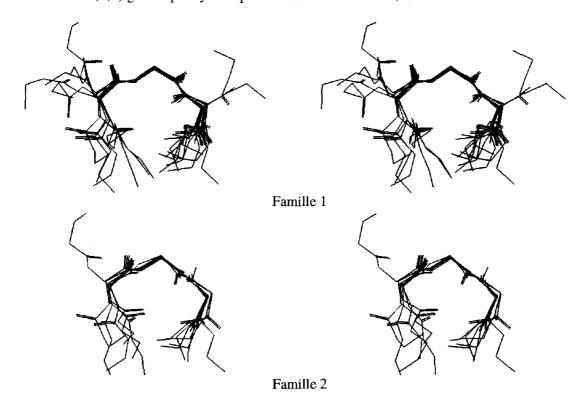


Figure 36 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å.

b  $\;\;$  Valeurs moyennes des torsions  $\phi 2$  et  $\psi 2$  caractéristiques des familles.

<sup>&</sup>lt;sup>C</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

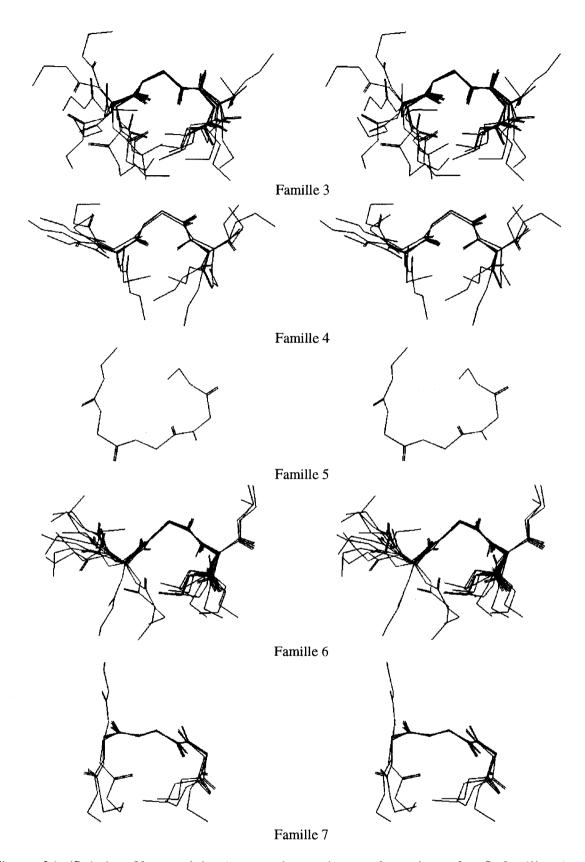


Figure 36 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å.

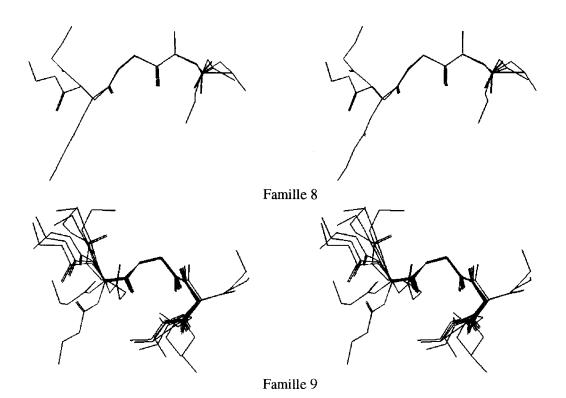


Figure 36 (Suite): Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) généré par dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å.

# V.1.2 Comparaison des espaces conformationnels

Sur le plan quantitatif, Random search génère neuf fois (207/23) plus de conformations viables que Confex utilisant DGEOM 90, pour un même niveau de résolution (RMS = 2,00 Å).

L'examen de la répartition énergétique (Figure 37) montre que 17 conformations générées par Random search possèdent des énergies inférieures au minimum énergétique global trouvé par Confex (25,6 kcal/mole). Ces 17 conformations se répartissent sur une fourchette de 4,2 kcal/mole. Il apparaît également que Confex ne puisse couvrir la partie de l'espace conformationnel située entre 21 et 28 kcal/mole. Dans cette fourchette d'énergie, on trouve 1 conformation issue de Confex (4% de l'espace conformationnel) contre 55 conformations issues de Random search (26% de l'espace conformationnel).

Sur le plan qualitatif, les conformations de Random search sont plus globulaires que les conformations de Confex qui ont plutôt tendance à être étendues (Figures 38 et 39) (Tableau 12).

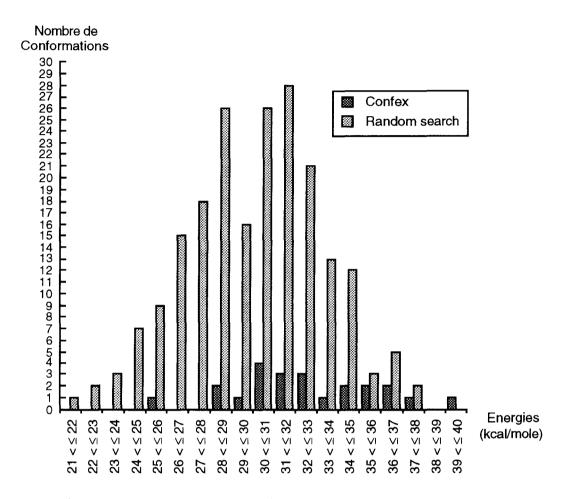


Figure 37: Répartition énergétique des espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,S) générés par les méthodes Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å et Random search - RMS = 2,00 Å.

Lors de la répartition des conformations en familles, Random search permet apparemment de créer 5 familles de plus que Confex. La comparaison par superposition des squelettes moyens des 12 familles de Random search par rapport aux squelettes moyens des 7 familles de Confex montre en fait que Random search apporte deux familles de plus que Confex : les familles 6 et 10. A chaque famille issue de Confex correspond au moins une famille issue de Random search (Tableau 13).

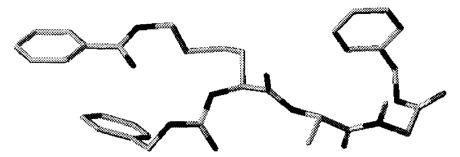


Figure 38 : Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par Confex -DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å - Conformation étendue.

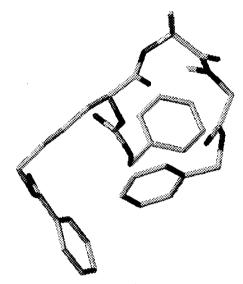


Figure 39 : Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par Random search - RMS = 2,00 Å - Conformation globulaire.

Confex - DGEOM 90 - RMS = $2,00 \text{ Å}$								
Energie		Angles dièdres (°)						
(kcal/mole)	Lys		Ala		S	ar	Code a	
	φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3		
25,6	- 84,0	122,7	-157,3	147,0	92,4	-65,5	CEC*	

	Random search - RMS = 2,00 Å							
Energie		Angles dièdres (°)						
(kcal/mole)	L	ys	A	la	Sar		Code a	
	φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3		
21,4	-128,0	91,7	58,2	64,7	86,8	-95,3	DA*C*	

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Code utilisé par Zimmermann *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$ .

Tableau 12 : Energie et angles de torsion des conformations de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générées par Confex - DGEOM90 - RMS = 2,00 Å et Random search - RMS = 2,00 Å.

Confex DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å	Random search RMS = 2,00 Å	Superposition RMS (Å)
7 familles	12 familles	
Famille 1	Famille 8	0,01
Famille 2	Famille 9 Famille 12	0,07 0,28
Famille 3	Famille 1	0,03
Famille 4	Famille 2 Famille 3	0,49 0,11
Famille 5	Famille 5 Famille 11	0,09 0,07
Famille 6	Famille 4	0,09
Famille 7	Famille 7	0,13
	Famille 6	
	Famille 10	

Tableau 13 : Tableau de correspondance des familles de Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å et de Random search - RMS = 2,00 Å.

Afin de compléter cette analyse, les 207 conformations de Random search ont été confrontées aux 7 chefs de file de Confex et classées en familles. Il en résulte que 175 conformations de Random search (soit 84% de l'espace conformationnel) peuvent se répartir en 7 familles. 32 conformations ne peuvent être classées. A l'inverse, la totalité des 23 conformations de Confex , confrontées aux 12 chefs de file de Random search, peuvent se répartir en 8 familles. 4 familles restent vides.

Au vu de ces résultats, il ressort que la méthode Confex utilisant DGEOM 90 ne couvre pas la totalité de l'espace conformationnel car DGEOM 90 semble incapable de générer des conformations globulaires qui sont beaucoup plus basses en énergie que les conformations étendues. Cet état de fait peut être également en partie dû à la faible taille de l'espace conformationnel généré par Confex. Pour ce faire, un espace conformationnel de taille plus importante a été généré en diminuant la valeur du RMS à 1,70 Å pour être comparé à Random search.

La diminution du RMS (de 2,00 Å à 1,70 Å) a eu pour conséquence l'augmentation du nombre de conformations viables (de 23 à 140). Elle a permis de trouver une conformation de plus basse énergie globulaire

(Figure 40) (Tableau 14) dont l'énergie est égale à 21,0 kcal/mole (différence de 4,6 kcal/mole).

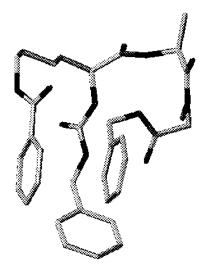


Figure 40 : Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par Confex - DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å - Conformation globulaire.

	Confex - DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å							
Energie	-	Angles dièdres (°)						
(kcal/mole)	L	ys	Ala		S	ar	Code a	
	φ1 ψ1		φ2	ψ2	φ3	ψ3		
21,0	-157,4	82,8	53,4	65,7	94,1	-75,9	DA*C*	

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Code utilisé par Zimmermann *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

Tableau 14: Energie et angles de torsion de la conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par Confex - DGEOM90 - RMS = 1,70 Å.

De même, cela a permis de trouver 4 familles supplémentaires (le nombre de familles passe de 7 à 11). En fait, si on compare par superposition les squelettes moyens des 7 familles de Confex - RMS = 2,00 Å aux squelettes moyens des 11 familles de Confex - RMS = 1,70 Å, il n'y a qu'une famille de plus : la famille 11 (Tableau 15).

125 conformations parmi les 140 de Confex - RMS = 1,70 Å (89% de l'espace conformationnel) peuvent être classées en 7 familles ayant pour chefs de file, ceux de Confex - RMS = 2,00 Å. 15 conformations ne peuvent être classées. A l'inverse, les 23 conformations de Confex - RMS = 2,00 Å, confrontées aux 11 chefs de file de Confex - RMS = 1,70 Å, peuvent se répartir en 9 familles. 2 familles sont vides et toutes les conformations de Confex sont classées.

Confex DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å	Confex DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å	Superposition RMS (Å)
7 familles	11 familles	
Famille 1	Famille 7	0,03
Famille 2	Famille 8 Famille 10	0,06 0,09
Famille 3	Famille 1	0,04
Famille 4	Famille 4 Famille 5	0,18 0,06
Famille 5	Famille 3 Famille 6	0,19 0,07
Famille 6	Famille 2	0,09
Famille 7	Famille 9	0,15
	Famille 11	

Tableau 15 : Tableau de correspondance des familles de Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å et de Confex - DGEOM 90 - RMS = 1.70 Å.

Bien que le minimum global d'énergie se trouve à 21,0 kcal/mole, on ne trouve dans la partie de l'espace conformationnel située entre 21 et 28 kcal/mole, que 13 conformations de Confex (9% de l'espace conformationnel) contre 55 conformations de Random search (26% de l'espace conformationnel) (Figure 41).

Si on considère la constitution des familles, Random search fournit une famille de plus que Confex. La comparaison par superposition des squelettes moyens des 12 familles de Random search par rapport aux squelettes moyens des 11 familles de Confex confirme que Random search apporte une famille de plus que Confex : la famille 10. A chaque famille de Confex correspond au moins une famille de Random search (Tableau 16).

Les 207 conformations de Random search ont été confrontées aux 11 chefs de file de Confex et classées en familles. Il en résulte que 204 conformations de Random search (soit 99% de l'espace conformationnel) peuvent se répartir en 11 familles. 3 conformations ne peuvent être classées. Finalement, les 140 conformations de Confex, confrontées aux 12 chefs de file de Random search, peuvent se répartir en 11 familles. 1 famille demeure vide et toutes les conformations de Confex sont classées.

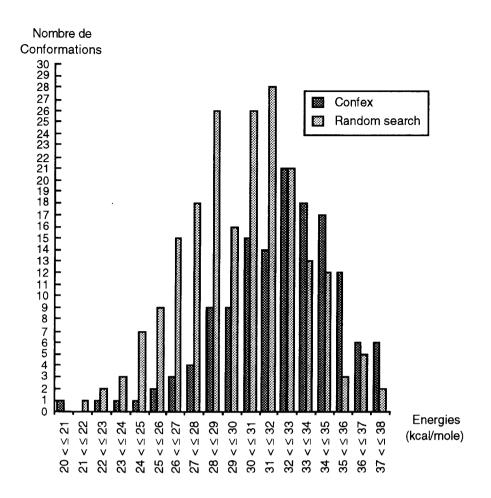


Figure 41: Répartition énergétique des espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,S) générés par les méthodes Confex - DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å et Random search - RMS = 2,00 Å.

Confex DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å	Random search RMS = 2,00 Å	Superposition RMS (Å)
11 familles	12 familles	
Famille 1	Famille 1	0,01
Famille 2	Famille 4	0,03
Famille 3	Famille 5	0,25
	Famille 11	0,14
Famille 4	Famille 2	0,31
	Famille 3	0,07
Famille 5	Famille 2	0,44
	Famille 3	0,06
Famille 6	Famille 5	0,04
	Famille 11	0,12
Famille 7	Famille 8	0,03
Famille 8	Famille 9	0,04
	Famille 12	0,23
Famille 9	Famille 7	0,07
Famille 10	Famille 9	0,07
	Famille 12	0,19
Famille 11	Famille 6	0,09

Tableau 16: Tableau de correspondance des familles de Confex - DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å et de Random search - RMS = 2,00 Å.

Ces résultats montrent qu'il existe toujours une différence dans le nombre de conformations de basse énergie entre Confex et Random search. Random search couvre mieux l'espace conformationnel que Confex. Ceci ne remet pas en cause la méthode Confex par elle-même mais probablement l'utilisation de DGEOM 90 qui semble limité dans ce domaine. DGEOM 90 ne donnant pas entière satisfaction, DGEOM 95, une nouvelle version de DGEOM, a été utilisée. Les méthodes Confex et Random search ont de nouveau été comparées.

Confex utilisant DGEOM 95 génère moins de conformations viables (46/62) que Random search, pour un même niveau de résolution (RMS = 2,50 Å). A l'examen de la répartition énergétique (Figure 42), il apparaît que Confex génère plus de conformations de basse énergie que Random search. Dans la partie de l'espace conformationnel située entre 19 et 26 kcal/mole, on trouve 14 conformations de Confex (30% de l'espace conformationnel) contre 9 conformations de Random search (14% de l'espace conformationnel). Entre les conformations de plus basse énergie trouvées par les deux méthodes, il y a une différence de 2,3 kcal/mole (Figure 43) (Tableau 17).

Confex fournit autant de familles que Random search. La superposition des squelettes moyens des 9 familles de Random search par rapport aux squelettes moyens des 9 familles de Confex montre que ces familles sont identiques. A chaque famille de Confex correspond au moins une famille de Random search (Tableau 18).

La totalité des 46 conformations de Confex, confrontées aux 9 chefs de file de Random search, peuvent se répartir en 9 familles. Inversement, parmi les 62 conformations de Random search, confrontées aux 9 chefs de file de Confex, 61 conformations peuvent se répartir en 9 familles. 1 conformation ne peut être classée.

Si on réalise l'intersection des deux ensembles en comparant, d'une part les 62 conformations de Random search aux 46 conformations de Confex, et d'autre part, en comparant les 46 conformations de Confex aux 62 conformations de Random search, on montre que l'espace conformationnel issu de Random search possède 15 conformations

différentes. A l'inverse, 6 conformations de l'espace conformationnel issues de Confex sont vraiment différentes des 62 conformations de Random search. Les comparaisons sont effectuées en superposant tous les atomes lourds.

Dans ces conditions, il apparaît que la méthode Confex est meilleure que Random search car elle permet de trouver dans un plus petit nombre de conformations, des conformations plus stables que celles trouvées par Random search. L'utilisation de DGEOM 95 permet de mieux couvrir l'espace conformationnel dans les conformations de basse énergie.

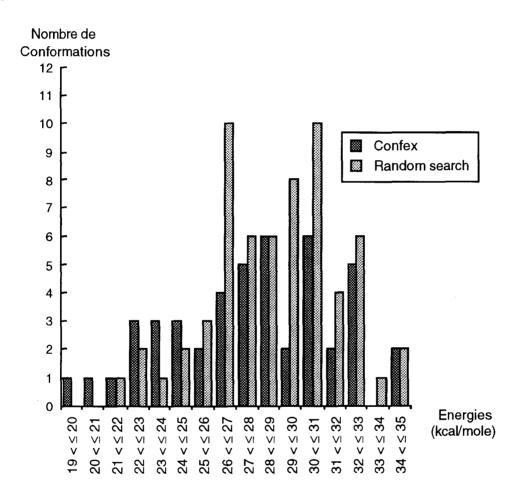


Figure 42 : Répartition énergétique des espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,S) générés par les méthodes Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å et Random search - RMS = 2,50 Å.

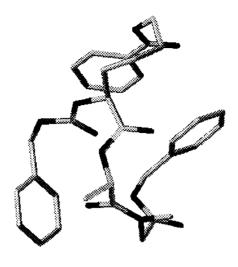


Figure 43 : Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å - Conformation globulaire.

Confex - DGEOM 95 - RMS = $2,50 \text{ Å}$								
Energie		Angles dièdres (°)						
(kcal/mole)	Lys		Ala		S	ar	Code a	
	φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3		
19,1	-68,4	-27,4	-84,8	123,2	93,2	-69,7	ACC*	

a Code utilisé par Zimmermann et al. (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

Tableau 17: Energie et angles de torsion de la conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par Confex - DGEOM95 - RMS = 2,50 Å.

Confex DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å	Random search RMS = 2,50 Å	Superposition RMS (Å)
9 familles	9 familles	
Famille 1	Famille 4	0,18
Famille 2	Famille 2 Famille 5	0,41 0,12
Famille 3	Famille 4	0,17
Famille 4	Famille 1	0,03
Famille 5	Famille 3	0,05
Famille 6	Famille 2 Famille 5	0,15 0,18
Famille 7	Famille 7	0,07
Famille 8	Famille 6	0,07
Famille 9	Famille 8 Famille 9	0,20 0,25

Tableau 18: Tableau de correspondance des familles de Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å et de Random search - RMS = 2,50 Å.

V.1.2.5 Comparaison de Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å et

Dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å

La dynamique moléculaire génère 11 conformations viables de plus que Confex utilisant DGEOM 95 (57/46) pour un même niveau de résolution (RMS = 2,50 Å). Considérant la répartition énergétique (Figure 43), dans la partie de l'espace conformationnel située entre 16 et 25 kcal/mole, la dynamique moléculaire génère deux fois plus de conformations de basse énergie que Confex. On trouve 12 conformations de Confex (26% de l'espace conformationnel) contre 24 conformations de la dynamique moléculaire (46% de l'espace conformationnel). Entre les conformations de plus basse énergie trouvées par les deux méthodes, il y a une différence de 3,0 kcal/mole. La dynamique moléculaire permet de trouver deux conformations plus basses en énergie que le minimum trouvé par Confex. Ces conformations globulaires sont fortement stabilisées par l'empilement des trois noyaux aromatiques (Figure 44) (Tableau 19).

Les conformations de la dynamique moléculaire se répartissent en autant de familles que celles provenant de Confex, en l'occurrence 9. La superposition des squelettes moyens des 9 familles de Confex avec les squelettes moyens des 9 familles de la dynamique moléculaire montre que toutes les familles de Confex trouvent au moins une correspondance avec celles provenant de la dynamique moléculaire (Tableau 20).

Toutes les conformations de Confex lorsqu'elles sont confrontées aux 9 chefs de file de la dynamique moléculaire peuvent être classées en familles. Il y a 6 redondances. De même, les 57 conformations issues de la dynamique moléculaire ont été confrontées aux 9 chefs de file de Confex. 56 d'entre-elles peuvent se répartir en 9 familles. 1 conformation ne peut être classée. Il y a 9 redondances dans les familles.

comparaison des deux espaces conformationnels 46 également effectuée en superposant tous les atomes lourds des Confex 57 conformations de sur les atomes homologues dynamique moléculaire. 12 conformations de Dans cas. la conformations de Confex diffèrent de celles générées par la dynamique moléculaire. A l'inverse, lorsque les 57 conformations de la dynamique moléculaire sont comparées aux 46 conformations de Confex, 18 conformations issues de la dynamique moléculaire ne trouvent pas de correspondance dans Confex.

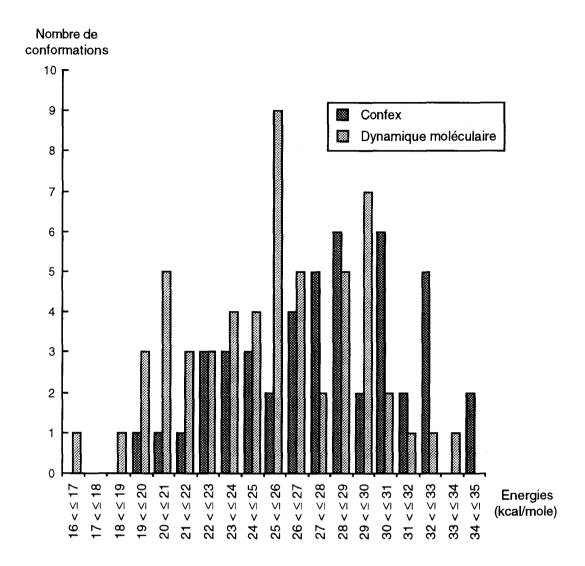


Figure 43 : Répartition énergétique des espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,S) générés par les méthodes Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å et de dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å.

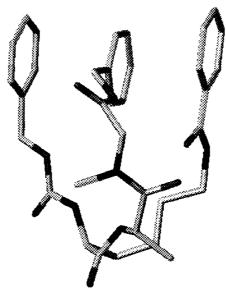


Figure 44 : Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par la dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å - Conformation globulaire.

Dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å							
Energie		Angles dièdres (°)					
(kcal/mole)	L	ys	A	Ala		ar	Code a
	φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	
16,1	-154,8	-41,1	-157,8	76,7	120,1	-64,5	GDD*

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Code utilisé par Zimmermann *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

Tableau 19 : Energie et angles de torsion de la conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par la dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å.

Confex DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å	Dynamique moléculaire RMS = 2,50 Å	Superposition RMS (Å)	
9 familles	9 familles		
Famille 1	Famille 3	0,11	
Famille 2	Famille 1	0,13	
	Famille 2	0,39	
Famille 3	Famille 3	0,21	
Famille 4	Famille 6	0,05	
	Famille 9	0,08	
Famille 5	Famille 7	0,66	
Famille 6	Famille 1	0,17	
	Famille 2	0,20	
Famille 7	Famille 4	0,05	
Famille 8	Famille 5	0,15	
Famille 9	Famille 8	0,09	

Tableau 20 : Tableau de correspondance des familles de Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å et de dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å.

Au vu de ces résultats, il apparaît que la dynamique moléculaire couvre mieux l'espace conformationnel dans les conformations de plus basse énergie que Confex. Mais, il nous semble important de souligner que le nombre total de conformations qui ont été générées par la moléculaire (20000 conformations) est 4,5 fois plus important que l'échantillonnage effectué par Confex conformations). De plus, en considérant les familles trouvées pour chacun des espaces conformationnels, et plus particulièrement nombre de redondances, il apparaît que les conformations générées par Confex sont plus différentiables que celles issues de la dynamique moléculaire. La comparaison des deux espaces conformationnel montre qu'il y a presque un tiers des conformations de chaque espace conformationnel qui ne trouve pas de correspondance dans l'autre. Par conséquent, chaque espace conformationnel a en commun avec l'autre plus de deux tiers de ses conformations.

### V.1.3 Conclusions

Trois méthodes d'analyse conformationnelle ont été étudiées : Confex, Random search et la dynamique moléculaire.

Confex utilisant DGEOM 90 pour générer des conformations ne permet pas de couvrir l'espace conformationnel que couvre Random search, notamment dans les basses énergies. Ceci a pour conséquence, une convergence rapide de Confex qui se traduit par un petit nombre de conformations et un nombre de familles inférieur à celui trouvé par Random search. Dans ces conditions, Confex est inférieur sur les plans quantitatifs et qualitatifs à Random search.

Confex utilisant DGEOM 95 permet de mieux couvrir l'espace conformationnel dans les basses énergies que Random search. Le nombre de familles trouvées est identique dans les deux méthodes. Confex est donc supérieur à Random search sur le plan qualitatif. Sur le plan quantitatif, Random search génère un plus grand nombre de conformations mais beaucoup ne sont pas viables car elles présentent des anomalies structurales (environ 20%). Ceci a pour effet un allongement des temps de calcul. Confex est beaucoup plus rapide que Random search pour créer un espace conformationnel.

Comparé à la dynamique moléculaire, Confex utilisant DGEOM 95 couvre moins bien l'espace conformationnel dans les basses énergies. La dynamique moléculaire est donc plus efficiente que Confex de ce point de vue. Toutefois, bien que le nombre de familles trouvées soit identique quelle que soit la méthode, sur le plan qualitatif, les familles de Confex sont mieux différenciées que celles de la dynamique moléculaire. La comparaison de toutes les conformations entre-elles révèle qu'aucun des deux espaces conformationnels ne peut être considéré comme un sous-ensemble de l'autre. L'analyse de la trajectoire de la dynamique moléculaire est très lourde à mettre en oeuvre car le nombre de conformations à traiter est très important (20000) alors que Confex permet la générescence très rapide d'un nombre de conformations abordable en matière de traitement des données (113).

Confex apparaît donc comme une méthode bien adaptée pour générer les espaces conformationnels des diastéréoisomères (S,S) et (S,R).

### V.2 Espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,R)

La méthode Confex a donc été choisie pour générer, suivant le protocole défini pour le diastéréoisomère (S,S), des espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,R).

V.2.1 Description des espaces conformationnels

V.2.1.1 Confex

V.2.1.1.1 DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å

#### V.2.1.1.1 Optimisation sans charges

27 conformations constituent cet espace conformationnel. Après minimisation des énergies, sans tenir compte des charges, 4 conformations sont éliminées pour ne pas avoir convergé vers un minimum local. 4 autres sont éliminées à cause de leur similitude avec une conformation de plus basse énergie. Il reste donc 21 conformations dont les énergies varient entre 25,2 et 37,0 kcal/mole. 8 chefs de file ont

été choisis (RMS = 0,30 Å). Il n'y a aucune redondance dans les familles (Tableau 21) (Figure 45).

N°	N a	Torsions <sup>b</sup> (°)		Code c	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	Ψ2			
1	1	87,3	-111,5	C*	25,2	0,0
2	6	$64,7 \pm 4,3$	57,6 ± 8,1	A*	25,5	0,3
3	2	$171,1 \pm 5,2$	61,2 ± 14,9	G*	28,0	2,8
4	3	$-56,1 \pm 2,2$	$-62,8 \pm 2,2$	Α	28,0	2,8
5	1	117,8	72,3	G*	28,1	2,9
6	3	$154,0 \pm 4,7$	$-66,8 \pm 6,7$	D*	28,3	3,1
7	4	$66,0 \pm 5,2$	$-131,3 \pm 12,7$	C*/F*	29,4	4,2
8	1	156,9	-141,5	E*	31,7	6,5

- a Nombre de conformations.
- b Valeurs moyennes des torsions φ2 et ψ2 caractéristiques des familles.
- <sup>c</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.
- d Energie du chef de file.
- e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

Tableau 21 : Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å.

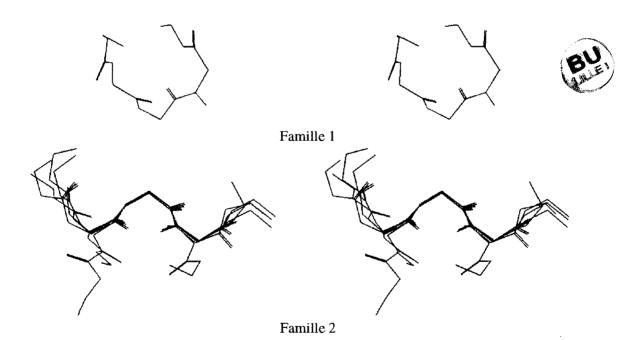


Figure 45 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 8 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å.

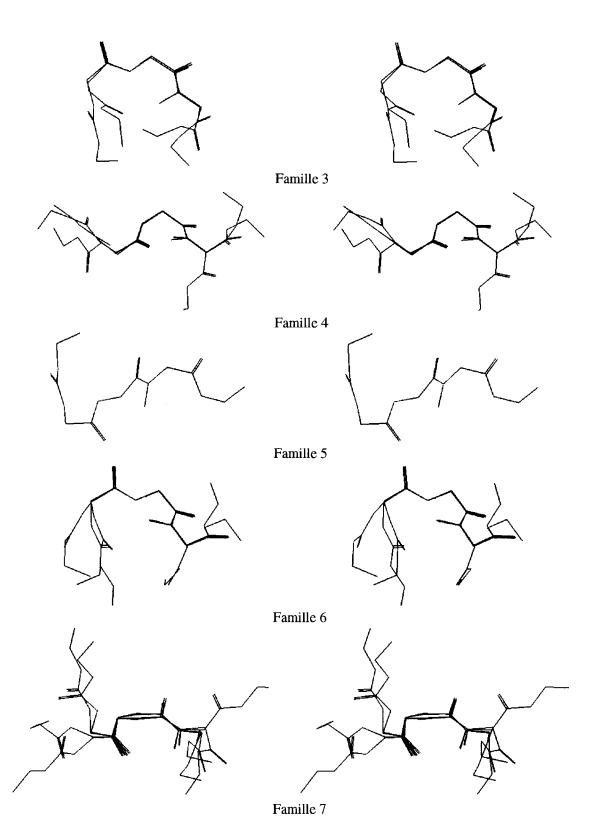


Figure 45 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 8 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å.



Famille 8

Figure 45 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 8 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) généré par Confex - DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å.

De la même manière que pour le diastéréoisomère (S,S), les 4 conformations qui n'avaient pu converger vers un minimum local ont été réintégrées pour le calcul des charges par la méthode CNDO, puis leurs énergies ont été minimisées en ajustant la constante diélectrique de façon à simuler différents milieux (le vide, un milieu biologique, l'eau).

# V.2.1.1.1.2 Optimisation avec charges CNDO - $\varepsilon = 1$

Après minimisation des énergies, 4 conformations n'ont pas pu converger vers un minimum et sont donc éliminées. Une conformation similaire à une autre de plus basse énergie n'a pas été retenue. L'espace conformationnel est donc constitué de 20 éléments dont les énergies varient entre 21,0 et 34,0 kcal/mole.

### V.2.1.1.3 Optimisation avec charges CNDO - $\varepsilon = 4$

4 conformations ne peuvent converger vers un minimum. Une similitude entre deux conformations a été également trouvée. Ce qui réduit l'espace conformationnel à 20 éléments dont les énergies sont comprises entre 24,0 et 36,8 kcal/mole.

#### V.2.1.1.1.4 Optimisation avec charges CNDO - $\varepsilon = 80$

4 conformations sont exclues pour non convergence. Une similitude apparaît entre deux structures différentes. Par conséquent, l'espace conformationnel est ramené à 20 éléments. Les énergies sont comprises entre 24,8 et 37,0 kcal/mole.

Les géométries des conformations restent stables lorsque la valeur de la constante diélectrique est changée (Figure 46).

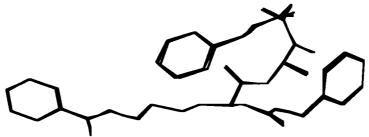


Figure 46: Représentation de la superposition des conformations de plus basse énergie des 4 espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,R) optimisés sans charges, avec charges CNDO et  $\varepsilon=1$ ,  $\varepsilon=4$ ,  $\varepsilon=80$ .

Quel que soit le milieu simulé, le nombre de chefs de file choisis est toujours égal à 8 et il n'y a jamais de redondance dans les familles. On retrouve toujours les mêmes conformations dans toutes les familles. A l'exception d'une famille, les chefs de file sont toujours identiques.

# V.2.1.1.2 DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å

95 conformations sont retenues. Après minimisation des énergie, sans tenir compte des charges, 8 conformations ont été supprimées pour non convergence vers un minimum local et 39 autres pour similitude avec d'autres conformations de plus basses énergies. 48 conformations dont les énergies oscillent entre 18,8 et 38,0 kcal/mole représentent cet espace conformationnel. 7 chefs de file ont été choisis (RMS = 0,50 Å). Il y a 6 redondances dans les familles (Tableau 22) (Figure 47). Pour un RMS égal à 0,30 Å, on trouve 14 chefs de file, mais il y a 18 redondances dans les familles.

N°	N a	Torsions b (°)		Code <sup>C</sup>	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	ψ2			
1	11	$144,8 \pm 13,8$	$-78,3 \pm 5,6$	D*	18,8	0,0
2	10	$63,7 \pm 11,5$	$59,3 \pm 8,8$	A*	20,9	2,1
3	11	$-57,7 \pm 4,7$	$-74.8 \pm 8.5$	Α	22,3	3,5
4	9	66,4 ± 10,4	$-134,0 \pm 11,5$	F*	22,4	3,6
5	2	$-92,2 \pm 28,5$	$-140,6 \pm 1,3$	E/F/H	27,4	8,6
6	4	$167,2 \pm 11,0$	$-146,6 \pm 3,7$	E*	29,7	10,9
7	2	$-68,6 \pm 4,8$	$-157,7 \pm 22,8$	F	31,5	12,7

a Nombre de conformations.

Tableau 22 : Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) généré par Confex - DGEOM95 - RMS = 2,50 Å.

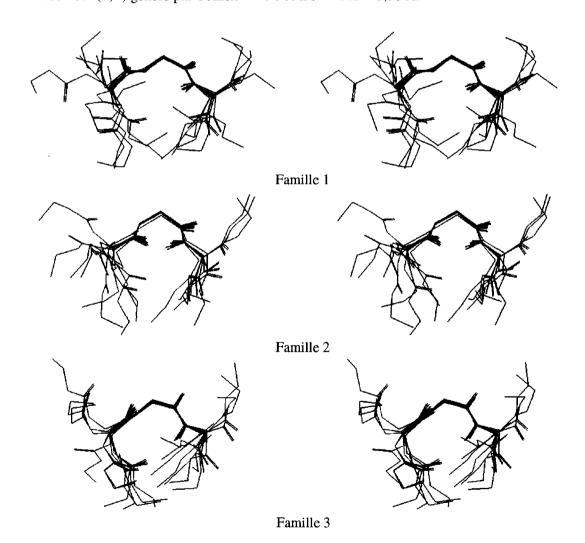


Figure 47: Vues stéréo des squelettes des conformations des 7 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) généré par Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å.

b Valeurs moyennes des torsions  $\varphi$ 2 et  $\psi$ 2 caractéristiques des familles.

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

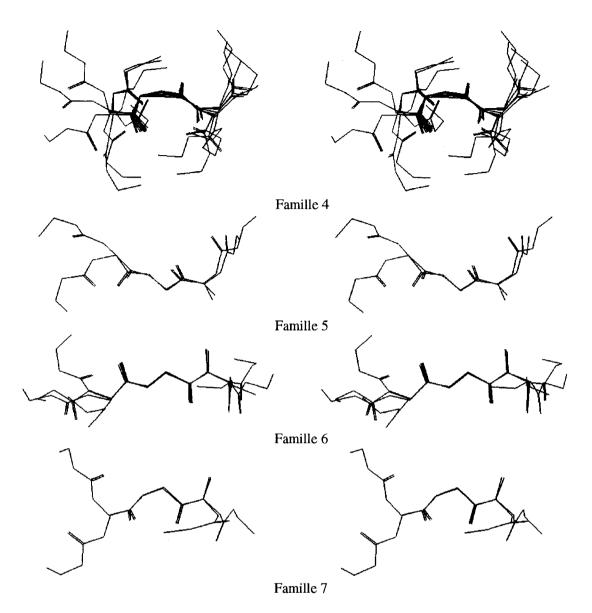


Figure 47 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 7 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) généré par Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å.

On observe une différence de 6,4 kcal/mole entre la conformation de plus basse énergie de Confex utilisant DGEOM 90 (Figure 48) et celle de Confex utilisant DGEOM 95 (Figure 49) (Tableau 23).

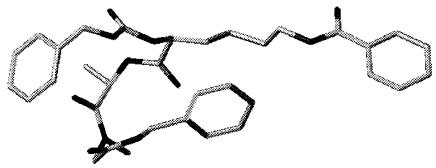


Figure 48 : Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,R) générée par Confex -DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å - Conformation étendue.

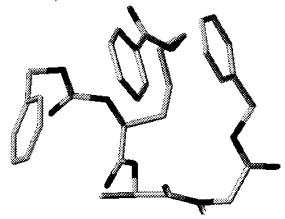


Figure 49: Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,R) générée par Confex - DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å - Conformation globulaire.

Confex - DGEOM $90 - RMS = 2,00 \text{ Å}$							
Energie		Angles dièdres (°)					
(kcal/mole)	L	ys	A	Ma	S	ar	Code a
	φ1 ψ1		φ2	ψ2	φ3	ψ3	
25,2	- 84,6	66,0	87,3	-111,5	-66,6	-39,7	CC*A

	Confex - DGEOM 95 - RMS = $2,50 \text{ Å}$							
	Energie		Angles dièdres (°)					
	(kcal/mole)	L	ys	Ala		Sar		Code a
L		φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	
	18,8	-76,0	-61,6	149,4	-76,2	-97,5	70,8	AD*C

a Code utilisé par Zimmermann *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

Tableau 23 : Energie et angles de torsion des conformations de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,R) générées par Confex - DGEOM90 - RMS = 2,00 Å et Confex - DGEOM95 - RMS = 2,50 Å

Pour un niveau de résolution moindre (RMS = 2,50 Å), on trouve plus de conformations dans Confex utilisant DGEOM 95 que dans Confex utilisant DGEOM 90 (RMS = 2,00 Å). DGEOM 95 permet de générer plus de conformations de plus basses énergies que DGEOM 90.

### V.3 Optimisation par AM1 des espaces conformationnels

### V.3.1 Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S)

Les énergies des 27 conformations de l'espace conformationnel issu de Confex utilisant DGEOM 90, se répartissent entre -212,8 et -202,3 kcal/mole. 12 conformations sont éliminées sur la base de leur similitude avec une autre conformation de plus basse énergie. Cet espace conformationnel est donc réduit à 15 conformations dont les énergies se répartissent entre -212,8 et -202,3 kcal/mole. De même, après élimination des conformations similaires, l'espace conformationnel issu de Confex utilisant DGEOM 95, contenant initialement 66 conformations réparties entre -212,0 et -200,4 kcal/mole, se réduit à 33 conformations dont les énergies s'échelonnent entre -212,0 et -202,5 kcal/mole. Le regroupement effectué, l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) contient donc 48 conformations. Finalement, après réduction, il se compose de 38 conformations dont les énergies varient entre -212,8 et -202,5 kcal/mole. 28% (11/38) des conformations proviennent de Confex utilisant DGEOM 90. 9 chefs de file ont été choisis (RMS = 0,32 Å). Il y a 2 redondances dans les familles (Tableau 24) (Figure 50).

N°	N a	Torsions <sup>b</sup> (°)		Code c	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	ψ2			
1	12	$-104,9 \pm 8,5$	$105,3 \pm 9,0$	С	-212,8	0,0
2	9	$-99,2 \pm 11,9$	$142,1 \pm 8,2$	F	-211,8	1,0
3	8	$-107,4 \pm 9,6$	$-53,0 \pm 7,0$	A/G	-210,9	1,9
4	2	$-156,9 \pm 13,5$	$66,5 \pm 3,8$	D	-209,0	3,8
5	3	$96,1 \pm 12,3$	$66,4 \pm 7,1$	A*	-208,5	4,3
6	1	114,8	-46,9	D*	-206,5	6,3
7	1	82,2	141,2	F*	-205,9	6,9
8	2	$-158,4 \pm 7,3$	$-59,6 \pm 8,5$	G	-205,4	7,4
9	2	$75,4 \pm 9,1$	$63,6 \pm 3,0$	A*	-204,3	8,5

a Nombre de conformations.

Tableau 24: Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) optimisé par AM1.

b Valeurs moyennes des torsions φ2 et ψ2 caractéristiques des familles.

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

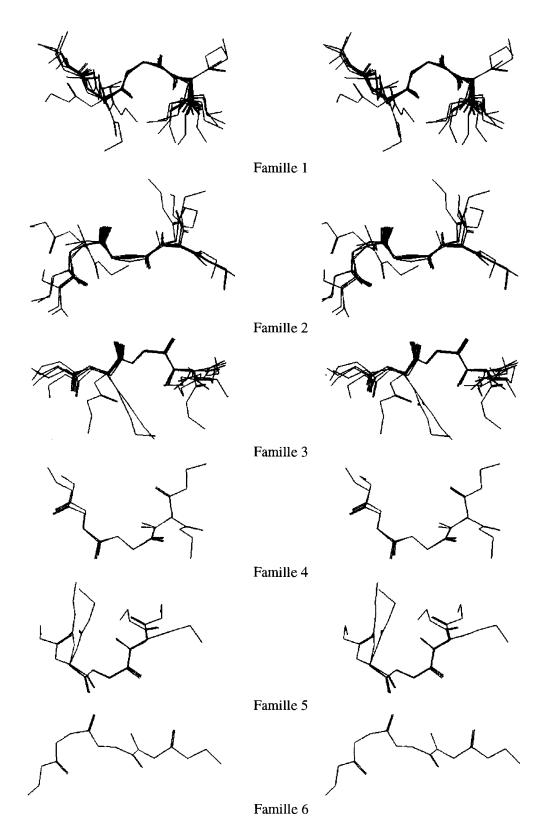


Figure 50 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) optimisé par AM1.

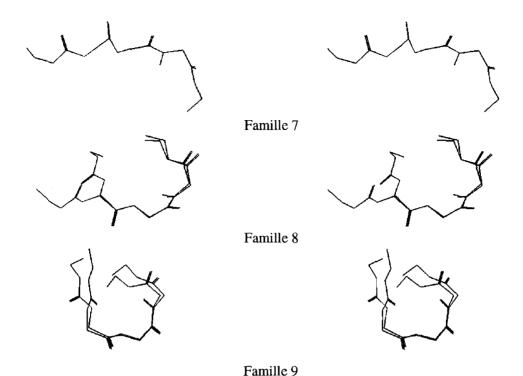


Figure 50 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 9 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) optimisé par AM1.

### V.3.2 Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R)

Les énergies des 25 conformations de l'espace conformationnel obtenu par Confex utilisant DGEOM 90, se répartissent entre -212,5 et -201,5 kcal/mole. Après la recherche des similitudes, il reste 13 dont les énergies varient entre -211,0 et -209,4 conformations kcal/mole. Celles des 56 conformations de l'espace conformationnel obtenu par Confex utilisant DGEOM 95, se situent entre -212,0 et -201,4 kcal/mole. Suite à l'élimination des conformations similaires, il reste 30 conformations dont les énergies se situent entre -212,0 et -202,8 kcal/mole. Suite regroupement, l'espace conformationnel au diastéréoisomère (S,R) est constitué de 43 conformations. Il est réduit à 35 finalement conformations après l'élimination conformations semblables. Leurs énergies se répartissent entre -212,5 et -202,8 kcal/mole. 31% des conformations (11/35) proviennent de Confex utilisant DGEOM90. 8 chefs de file ont été choisis (RMS = 0,27 Å). On n'observe qu'une redondance dans les familles (Tableau 25) (Figure 51).

N°	N a	Torsions <sup>b</sup> (°)		Code c	E d(kcal/mole)	ΔE e (kcal/mole)
		φ2	ψ2			
_1	10	$102,3 \pm 7,0$	$-107,7 \pm 7,5$	C*	-212,5	0,0
2	9	$99,6 \pm 10,8$	$-146,6 \pm 3,7$	F*	-210,9	1,6
3	4	$118,5 \pm 9,3$	55,6 ± 1,9	A*/G*	-209,9	2,6
4	3	$93,6 \pm 11,0$	$48,7 \pm 4,4$	A*	-209,5	3,0
5	1	173,6	-145,2	E*	-208,4	4,1
6	5	$-90,3 \pm 7,4$	$-64,2 \pm 3,1$	Α	-208,3	4,2
7	1	-109,3	55,3	С	-205,6	6,9
8	3	$-66,5 \pm 4,9$	$-58,8 \pm 2,1$	Α	-204,1	8,4

a Nombre de conformations.

Tableau 25 : Familles de conformations issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) optimisé par AM1.

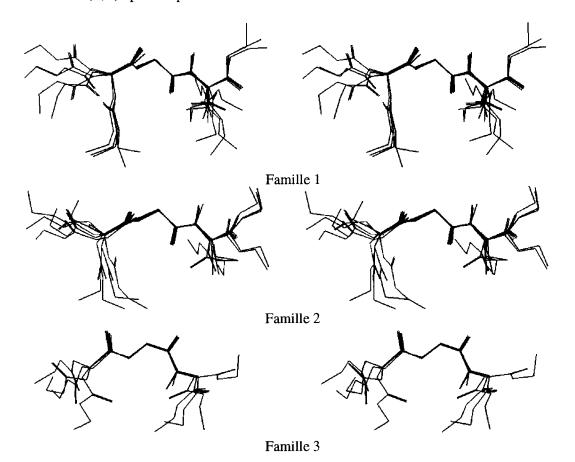


Figure 51 : Vues stéréo des squelettes des conformations des 8 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) optimisé par AM1.

b Valeurs moyennes des torsions  $\varphi$ 2 et  $\psi$ 2 caractéristiques des familles.

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Code utilisé par Zimmerman *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

d Energie du chef de file.

e Différence d'énergie du chef de file exprimée par rapport au minimum global.

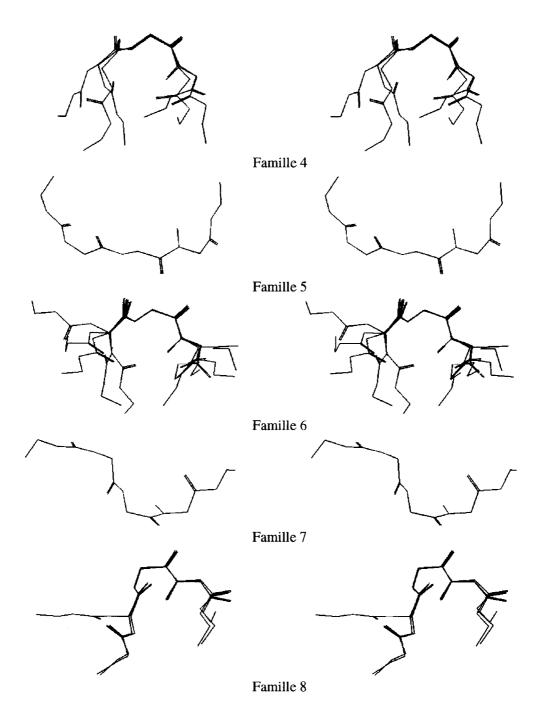


Figure 51 (Suite) : Vues stéréo des squelettes des conformations des 8 familles issues de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) optimisé par AM1.

Le tableau 26 récapitule tous les espaces conformationnels générés pour les diastéréoisomères (S,S) et (S,R). Ces espaces conformationnels sont prêts à être confrontés aux résultats expérimentaux.

Confex	Diastéréoisomère (S,S)		Diastéréoisomère (S,R)		
DGEOM 90	Nombre de	Energies	Nombre de	Energies	
RMS = 2,00  Å	conformations	Kcal/mole	conformations	Kcal/mole	
Sans charges	23 (7 familles)	25,6/39,4	21 (8 familles)	25,2/37,0	
	(, , , , , , , , , , , , , , , , , ,		(	,,	
Charges CNDO	22 (7 familles)	23,3/34,9	20 (8 familles)	21,0/34,0	
$\varepsilon = 1$	(,	- <del> </del>	(0	-, ,,~	
Charges CNDO	24 (7 familles)	25,1/38,0	20 (8 familles)	24,0/36,8	
$\varepsilon = 4$	_ ( ( )	,_,	(+,	,,-	
Charges CNDO	24 (7 familles)	25,3/38,9	20 (8 familles)	24,8/37,0	
$\epsilon = 80$	21 (7 141111100)	20,0,00,	20 (0 14411100)	21,0/37,0	
AM1	27	-212,8/-202,3	25	-212,5/-201,5	
111111		212,07 202,3		212,5, 201,5	
DGEOM 90	Nombre de	Energies	1		
RMS = 1,70  Å	conformations	Kcal/mole			
<del></del>	140	21,0/37,6	†		
Sans charges	(11familles)	41,0/5/,0			
	(111allilles)		1		
DGEOM 95	Nombre de	Energies	Nombre de	Engraina	
	ľ	Energies Van Imple		Energies Vaclemela	
RMS = 2,50 Å	conformations	Kcal/mole	conformations	Kcal/mole	
Sans charges	46 (9 familles)	19,1/34,9	48 (7 familles)	18,8/38,0	
		010.01.004.1		212.67.201.7	
AM1	66	-212,0/-201,4	56	-212,0/-201,4	
	<u> </u>		1		
Random	Diastéréois	somère (S,S)			
search			]		
			1		
0	Nombre de	Energies			
RMS = 2,00  Å	conformations	Kcal/mole	1		
Sans charges	207	21,4/37,4			
	(12 familles)				
			•		
	Nombre de	Energies			
RMS = 2,50  Å	conformations	Kcal/mole	]		
Sans charges	62 (9 familles)	21,4/34,5	]		
			_		
Dynamique	Diastéréois	somère (S,S)	1		
moléculaire		,			
			-		
	Nombre de	Energies	1		
RMS = $2,50 \text{ Å}$	conformations	Kcal/mole			
Sans charges	57 (9 familles)	16,1/33,0	1		
Dano Onargos	21 (2 Immiou) [	20,2755,0	,		
Confex	Dinetáráni	somère (S,S)	Diactéréa	isomère (S,R)	
Comex	Diastereon	30mere (3,3)	Diasteleo	Bomere (B,K)	
DCEOM 00/05	No 1 - 1	Eng:-	Nombro de	Engagin	
DGEOM 90/95	Nombre de	Energies	Nombre de	Energies	
	20m C	[/ 1/ · 1 -			
RMS = 2,50 Å	conformations	Kcal/mole	conformations	Kcal/mole	
$\frac{\text{RMS} = 2,50 \text{ A}}{\text{AM1}}$	conformations 38 (9 familles)	-212,8/-202,5	35 (8 familles)	-212,5/-202,8	

Tableau 26: Tableau récapitulatif des résultats de l'analyse conformationnelle des diastéréoisomères (S,S) et (S,R) issus de Confex, de Random search et de la dynamique moléculaire.

# V.4 Interprétation des spectres infrarouge et Raman

L'interprétation des spectres infrarouge est rendue difficile par la présence de nombreuses raies de combinaison ou de raies particulièrement larges qui masquent les raies fondamentales. De ce fait, nous nous sommes à priori basé sur le spectre Raman du diastéréoisomère (R,R) beaucoup plus simple (Figures 52, 53, 54, 55 et 56).

# V.4.1 Région Amide A

Pour la région Amide A relative à l'élongation de la liaison N-H, les fréquences sont généralement observées entre 3450 et 3500 cm<sup>-1</sup>. Pour tous les composés, nous observons une bande intense vers 3300 cm<sup>-1</sup>. Cette bande est caractéristique d'un ou plusieurs groupements N-H liés par une liaison hydrogène intra ou intermoléculaire. Toutefois, le groupement N-H libre du benzamide se retrouve à 3300 cm<sup>-1</sup> puisque sur le spectre infrarouge de la N-méthylbenzamide (spectre du composé solide obtenu à partir d'un film dans le chloroforme), il est donné d'observer une bande vers 3300 cm<sup>-1</sup> (Atlas de spectres IR/Raman Sadtler et Meier). La comparaison des spectres infrarouge et Raman du composé (R,R) ne montre aucun glissement des bandes de vibration en relation avec une possible symétrie cristalline ou une secondaire. Les mêmes fréquences vibrationnelles sont retrouvées tant en infrarouge qu'en Raman. Par contre, pour les composés (R,S) et (S,R), cette bande centrée à 3304 cm<sup>-1</sup> présente une dissymétrie qui se traduit par un épaulement respectivement vers 3212 et 3214 cm<sup>-1</sup>. Nous attribuons cette bande au mode Amide B qui est le résultat de la combinaison du mode Amide II. La bande Amide II correspond principalement à la déformation dans le plan du groupement N-H ainsi qu'à l'élongation de la liaison Cα-N. Elle se situe entre 1570 et 1510  $cm^{-1}$ 

# V.4.2 Région Amide I

La région Amide I, située entre 1630 et 1700 cm<sup>-1</sup> est caractéristique des élongations des groupements C=O des fonctions amide. Les fréquences comprises entre 1700 et 1750 cm<sup>-1</sup> sont

caractéristiques des élongations des groupements C=O des fonctions ester. Lorsque ces groupements C=O des fonctions amide ou ester sont impliqués dans une liaison hydrogène, on observe un abaissement de la fréquence. Pour le composé (R,R), les bandes du spectre infrarouge à 1750, 1688, 1653 (épaulement) et 1635 cm<sup>-1</sup> peuvent être reliées aux bandes à 1751, 1688, 1653 et 1629 cm<sup>-1</sup> du spectre Raman. Cette analogie des fréquences montre qu'il n'existe pas de glissement des bandes de vibration dû à une symétrie cristalline ou une structure secondaire. Cependant, le spectre infrarouge du diastéréoisomère (S,S) présente des différences avec ceux des diastéréoisomères (S,R), (R,S) et (R,R) pour les fréquences comprises entre 1600 et 1750 cm<sup>-1</sup>. Ce spectre révèle deux bandes intenses à 1745 et 1715 cm<sup>-1</sup> et une large bande centrée à 1643 cm<sup>-1</sup>. L'apparition de la bande à 1715 cm<sup>-1</sup> et la disparition de la large bande à 1688 cm<sup>-1</sup> avec l'épaulement à 1730 cm<sup>-1</sup> reste difficile à expliquer. L'épaulement à 1653 cm<sup>-1</sup> et la bande à 1635 cm<sup>-1</sup> visibles dans les spectres infrarouge des diastéréoisomères (S,R), (R,S) et (R,R) sembleraient se combiner pour donner une nouvelle bande à 1643 cm<sup>-1</sup> sur le spectre infrarouge du diastéréoisomère (S,S). De même, l'épaulement à 1730 cm<sup>-1</sup> et la large bande à 1688 cm<sup>-1</sup> donneraient une bande résultante à 1715 cm<sup>-1</sup>. Ceci pourrait être dû à un changement dans la nature de la liaison hydrogène entre un groupement N-H et un groupement C=O d'une fonction ester. Le spectre Raman présente une seule bande de faible intensité à 1751 cm<sup>-1</sup> facilement attribuable à l'élongation de la liaison C=O d'une fonction ester libre. Les spectres infrarouge des quatre composés sont plus complexes. Nous pouvons observer pour les composés (S,R) et (R,S), une forte bande respectivement à 1741 et 1736 cm<sup>-1</sup> correspondant vraisemblablement à l'élongation de la liaison C=O d'une fonction ester libre et un épaulement respectivement vers 1723 et 1730 cm<sup>-1</sup> qui peut être attribué à l'élongation de la liaison C=O d'une fonction ester engagée dans une liaison hydrogène. La bande fine observée à 1688 cm<sup>-1</sup>, à la fois dans les spectres infrarouge et Raman du composé (R,R), est attribuée au groupement C=O de la fonction amide du squelette de la lysine qui serait impliqué dans une structure rigide comme un cycle à 7 sommets fermé par une liaison hydrogène entre le groupement N-H du résidu alanine et le C=O du groupement bloquant benzylester N-terminal. Cette bande est retrouvée dans les spectres des composés (R,S) et (S,R). Ceci est en accord avec l'hypothèse faite précédemment de l'implication du groupement C=O d'une fonction ester dans une liaison hydrogène. Les bandes observées sur le spectre Raman à 1657 et 1629 cm<sup>-1</sup> trouvent leur correspondance en infrarouge à 1649 et 1635 cm<sup>-1</sup>. Elles proviennent des groupement C=O libres des fonctions amides dont les fréquences, pour les peptides, sont en général aux environs de 1660 cm<sup>-1</sup>. La bande à 1620 cm<sup>-1</sup> observée sur le spectre Raman et la bande correspondante du spectre infrarouge à 1635 cm<sup>-1</sup> sont attribuées au groupement C=O libre du benzamide dans la mesure où ce groupement possède une fréquence d'élongation inférieure à celle du groupement C=O d'une fonction amide. Le spectre de la N-méthylbenzamide montre pour ce groupement une bande vers 1630 cm<sup>-1</sup> (Atlas de spectres IR/Raman Sadtler et Meier). De plus, les spectres infrarouges des composés (S,R) et (R,S) montrent un respectivement épaulement à 1674 et 1670 cm<sup>-1</sup>. Il est difficile d'affirmer s'il existe un lien entre cet épaulement et la bande à 1688 cm<sup>-1</sup> qui n'est ni affectée dans sa forme ni dans son intensité. Cet épaulement est plus intense pour le composé (R,S) que pour le composé (S,R). Il est simplement à noter que les bandes vers 1670 cm<sup>-1</sup> et 1655 cm<sup>-1</sup> peuvent provenir du couplage dipolaire d'un groupement C=O libre d'une fonction amide avec ses homologues voisins.

# V.4.3 Région Amide III

La région Amide III, correspondant à la déformation dans le plan du groupement N-H et en partie aux élongations des liaisons  $C\alpha$ -C et  $C\alpha$ -N, est située entre 1200 et 1300 cm<sup>-1</sup>. La position des bandes dans cette région est étroitement liée à la structure secondaire du peptide (hélice  $\alpha$ , chaîne  $\beta$ ,...). En l'absence de composé deutéré, nous attribuons néanmoins les bandes infrarouge qui apparaissent pour le composé (R,R) à 1253 et 1267 cm<sup>-1</sup> au mode de vibration Amide III sans pour autant pouvoir les attribuer exactement à une ou des structures particulières car dans ce domaine de fréquences, de nombreuses déformations des groupements méthylènes peuvent surgir. Les deux bandes visibles sur le spectre Raman à 1217 et 1230 cm<sup>-1</sup>, correspondant en infrarouge aux bandes à 1229 et 1246 cm<sup>-1</sup>, sont respectivement caractéristiques de l'élongation de la liaison  $C_{aryle}$ - $C_{alkyle}$  et de l'élongation de la liaison C-O de la fonction ester. Dans cette région, les quatre spectres infrarouge ne présentent pas de différences majeures.

## V.4.4 Région Amide V

La région Amide V, correspondant à la déformation hors du plan du groupement N-H, est elle aussi très dépendante de la conformation adoptée par le peptide (hélice α, feuillet β, coude β,...). Pour les composés (R,R), (S,S), (S,R) et (R,S), des bandes apparaissent respectivement à 703, 698, 705 et 688 cm<sup>-1</sup>. La similarité des fréquences observées montrent que si la bande de la région Amide V est correctement attribuée, le type de conformation adoptée par les quatre diastéréoisomères doit être très proche. Le tableau 27 rassemble les principales raies caractéristiques des spectres de vibrations.

#### V.4.5 Conclusions

vibrationnelle quatre diastéréoisomères L'analyse des de l'UCB16101 ne donne que des résultats très partiels concernant les conformations adoptées. Toutefois, elle a révélé avec une quasi-certitude que tous les groupements N-H des fonctions amide (à l'exception du groupement benzamide) sont impliqués dans des liaisons hydrogène, qu'une des deux fonctions ester est également impliquée dans une liaison hydrogène par son groupement carbonyle et qu'il n'existe pas de symétries locales car les fréquences infrarouge et Raman identiques. Il n'y a donc pas d'arrangement en hélice  $\alpha$  ou de chaîne  $\beta$ qui agirait sur les bandes Amide I du peptide par éclatement ou déplacement de fréquences dues aux interactions dipolaires entre groupements carbonyle. Par conséquent, nous proposons un modèle qui corrobore les faits expérimentaux. Il se caractérise par la présence d'une structure cyclique à 7 sommets (C7) fermée par une liaison hydrogène [Z]C=O...HN[Ala] entre le groupement C=O (ester) du groupement benzyloxycarbonyle bloquant la lysine et le groupement N-H de l'alanine. Cette première structure est accolée à une structure cyclique à 10 sommets (C<sub>10</sub>) fermée par une liaison hydrogène [Bz]C=0...HN[Lys] impliquant le groupement C=O du groupement benzoyle bloquant la chaîne latérale de la lysine et le groupement N-H de la lysine (Figure 57). De cette façon, à part le N-H particulier du groupement benzamide, tous les N-H du peptide sont engagés dans des liaisons hydrogène.

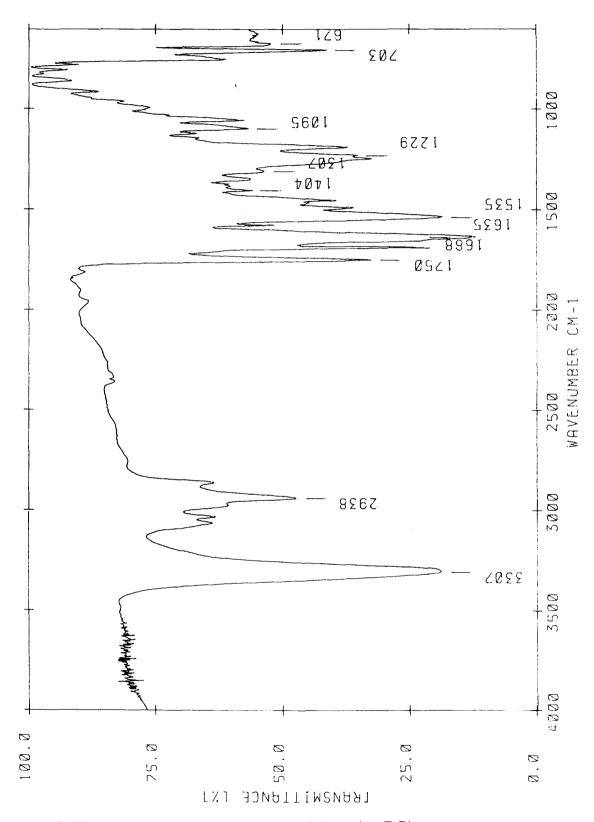


Figure 52 : Spectre de vibration infrarouge du diastéréoisomère (R,R).

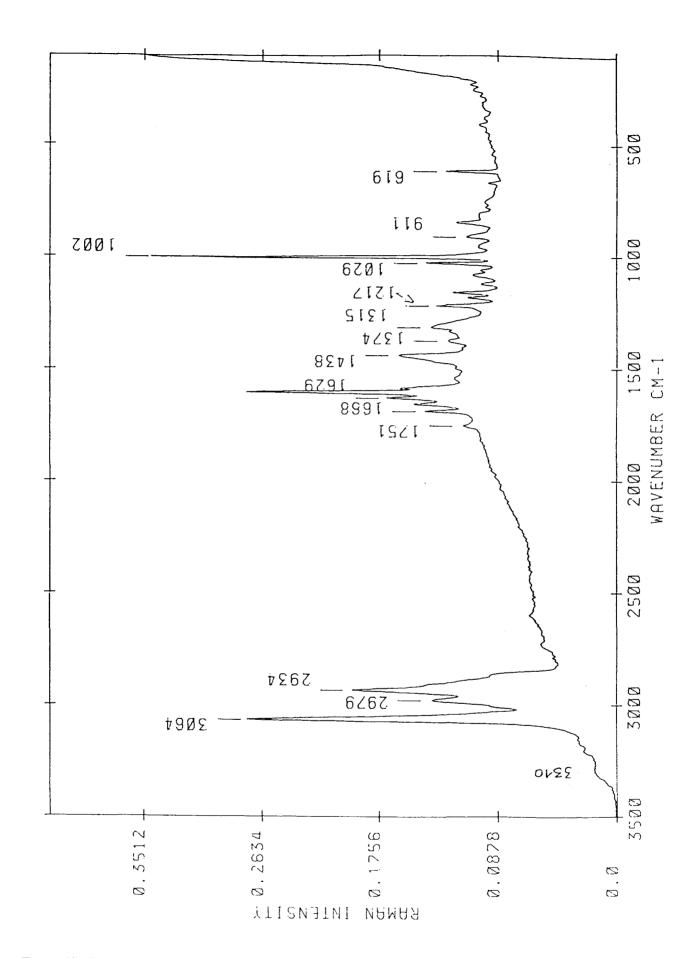


Figure 53 : Spectre de vibration Raman du diastéréoisomère (R,R).

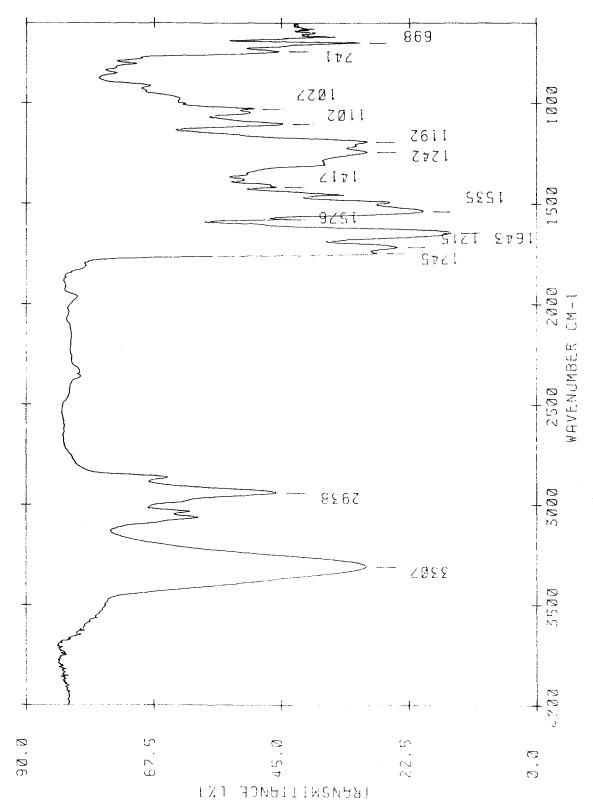


Figure 54 : Spectre de vibration infrarouge du diastéréoisomère (S,S).

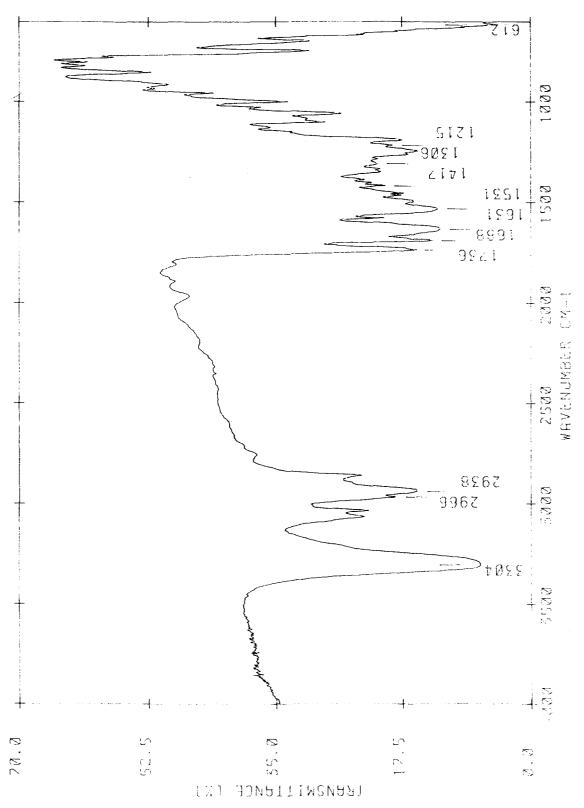


Figure 55 : Spectre de vibration infrarouge du diastéréoisomère (R,S).

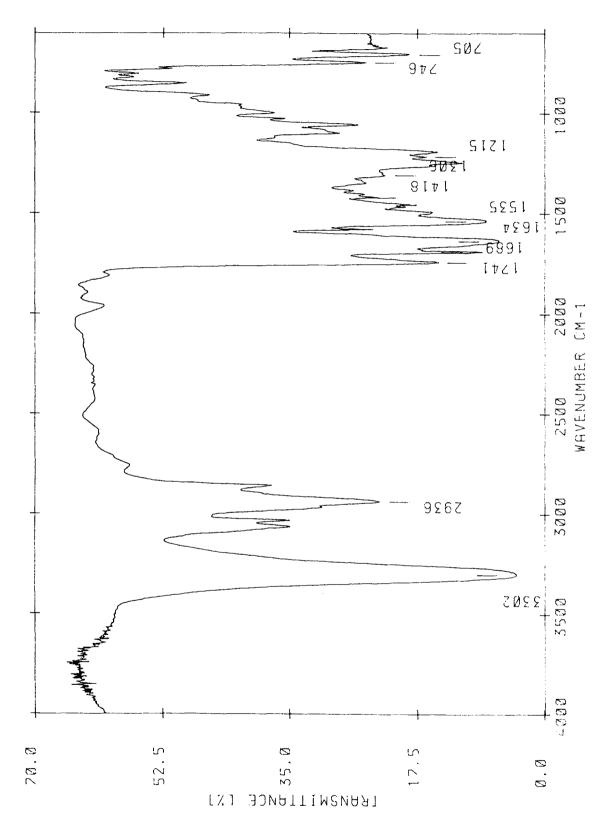


Figure 56 : Spectre de vibration infrarouge du diastéréoisomère (S,R).

Composé (R,R	)	Composé (S,S)	Composé (R,S)	Composé (S,R)
IR (cm <sup>-1</sup> )	Raman (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )	IR (cm <sup>-1</sup> )
[3305] 3307 (F) vNH lié { [3297] 3221 (ep) vNH benzamide 3090-3020 vCH aromatique 3000-2850 vCH aliphatique	3310 (f) 3064 2979-2934	3307 (F) vNH lié 3090-3020 3000-2850	3304 (F) vNH lié 3312 (ep) vNH benzamide 3090-3020 3000-2850	3302 (F) vNH lié 3314 (ep) vNH benzamide 3090-3020 3000-2850
1750 (S) vC=O ester libre 1730 (ep) 1705 (ep) 1688 vC=O Amide I lié (C7) 1649 vC=O amide 1635	1751 (f) 1688 (M) 1657 (M) 1629	1745 1715 (F,L) 1643 (L)	1736 (F) 1730 (ep) 1688 1670 (ep) 1653 (F,L) 1631	1741(F) 1723 (ep) 1689 1674 (ep) ? 1657 1634 (F,L)
1610-1535 (S) vCC aromatique	1610-1535 vCC ar.	1600-1575 vCC ar. 1535	1577 vCC ar. 1531	1600,1577 vCC ar. 1535
1490 } 1464 } & CH <sub>2</sub> ester et CH <sub>2</sub> lysine 1404 } 1345 } 1307 }	1438 1374 8CH <sub>2</sub> 1315	1491 1454 1417 δCH <sub>2</sub> 1379 1298	1495 1464 1417 1401 1346 1306	1490 1464 1418 1403 δCH <sub>2</sub> 1346 1206
1267 (ep) δNH, vCaN 1253 (ep) Amide III δCH <sub>2</sub> 1246 vCO ester et 1229 vC-CH <sub>2</sub> ar.	1230 (ep) 1217 ( <b>M</b> )	1242 (M) 1214	1256 (M) 1243 (M) 1215 (M)	1260 (M) 1245 (M) 1215 (M)
1192 δCH ar. 1150-1000 δCH ar. rocking CH <sub>2</sub> lysine 843 (f)	1180 1002 δCCC ar.	1192 } &CH ar. 1102 } &CH ar. 1047 }rocking CH <sub>2</sub> lysine 1027 842 (f)	1189 (F) 1058 993 (M) 842 (M)	1191 (F) δCH ar. 1057 846 (M)
750 vNH Amide V 703 vCH ar. [697] 671	668 619	741 698 669-648	740 (F) 688 (F)	746 705 671

(F): forte; (f): faible; (M): moyenne, (ep): épaulement; (L): large; ν: élongation; δ: déformation dans le plan

Tableau 27 : Tableau récapitulatif des principales raies des spectres de vibrations, réalisés sur solide, en infrarouge pour les diastéréoisomères (S,S), (R,R), (S,R), (R,S) et en Raman pour le diastéréoisomère (R,R).

Figure 57 : Modèle issu de l'analyse vibrationnelle infrarouge et Raman (les fréquences annotées proviennent du spectre infrarouge du composé (R,R)).

# V.5 Interprétation des spectres de résonance magnétique nucléaire

Quel que soit le spectre, les protons sont numérotés de façon arbitraire selon l'ordre présenté sur la figure 58.

Figure 58: Numérotation arbitraire des protons.

## V.5.1 Analyse structurale dans le DMSO

Le composé existe sous forme de deux conformations différentes dans des proportions respectives de l'ordre de 75% et 25%. Les protons de la conformation minoritaire seront indiqués par le signe prime "'". Les massifs ont été intégrés en prenant comme référence le méthyle de la sarcosine (3) de la conformation majoritaire ( $\delta = 3,09$  ppm) avec une intégration de 3 protons égale à 3. Ce qui se traduit, pour la forme minoritaire, par des intégrations de 0,35, 0,70 et 1,05, respectivement pour 1 , 2 et 3 protons. Plusieurs signaux sont rapidement identifiables (Figure 59). A 8,44 ppm, la présence d'un triplet correspond aux protons

14 et 14' des groupements N-H avec une intégration égale à 0,83 qui théoriquement devrait être égale à 1,35. A 7,85 ppm, apparaît un doublet dédoublé qui est attribué aux protons aromatiques situés en ortho de la fonction amide du groupement benzamide avec une intégration égale à 2,75. De 7,30 à 7,55 ppm, sont groupés les protons aromatiques. L'intégration est égale à 18,60. Elle est supérieure à la valeur théorique qui est égale à 17,55. De 1,20 à 1,70 ppm, un massif correspond aux protons, 10, 12, 11 et 10', 12', 11', de la chaîne aliphatique de la lysine. L'intégration est un peu trop forte. Elle est égale à 9,10 alors que la valeur théorique est égale à 8,10. A 1,18 ppm, un doublet peut être attribué aux protons 5 du groupement méthyle de l'alanine de la conformation majoritaire avec une intégration égale à 3,08. Son homologue de la conformation minoritaire se situe à 1,12 ppm avec une intégration égale à 1,37. Les autres signaux sont plus difficilement attribuables. L'excès constaté pour l'intégration des protons aromatiques (1,05) montre que ce massif cache un proton d'un groupement N-H, correspondant vraisemblablement au proton 8 ou 6. La grande différence constatée entre les déplacements chimiques des protons du groupement méthyle de l'alanine et ceux de la sarcosine, pour chacune des deux conformations, semble indiquer une forte influence de la structure tridimensionnelle à cet endroit de la molécule. Cette influence se retrouve pour un proton d'un groupement N-H à 8,06 ppm et à 8,15 ppm avec des intégrations respectives égales à 0,51 et 0,20. Il s'agit vraisemblablement des protons 6 et 6'. Par conséquent, les protons 8 et 8' seraient cachés par les protons aromatiques. A 5,03, 5,15 et 5,2 ppm, avec des intégrations respectives égales à 2,70, 2,00 et 0,75, singulets peuvent correspondre aux groupements méthylène benzylique sans aucune différentiation possible. Le premier correspond à une superposition d'un groupement méthylène majoritaire et d'un second groupement méthylène minoritaire, le à un groupement méthylène majoritaire, le à groupement méthylène dernier un minoritaire. A 4,77 ppm, un massif, dont l'intégration est égale à 1,02, peut être attribué au proton 4 porté par le carbone asymétrique de l'alanine. A 4,61 ppm, un massif, dont l'intégration est égale à 0,70, correspond à deux protons minoritaires. L'un serait la partie A d'un système AB attribué à l'un des protons 2' du groupement méthylène de la sarcosine, l'autre pourrait être attribué au proton 4' porté par le carbone asymétrique de l'alanine. A 4,28 et 4,30 ppm, nous observons la

superposition de deux doublets de systèmes AB. Celui à 4,28 ppm, correspond à la partie B du système AB constitué par les deux protons 2' du groupement méthylène de la sarcosine. L'autre doublet, à 4,30 ppm, correspond à l'un des protons 2, partie A du système AB du groupement méthylène de la sarcosine. La partie B est observée à 4,01 ppm. Elle se superpose à un massif dont l'intégration totale est égale à 2,35. Cela équivaut à un proton majoritaire et un proton minoritaire qui peuvent être attribués aux protons 7 et 7' portés par le carbone asymétrique de la lysine. Seuls les protons 13 et 13' du groupement méthylène de la lysine situé en α du groupement benzamide ne sont pas attribués car ils se trouvent près du pic de l'eau à 3,35 ppm. Une étude menée à 40°C a permis le déplacement du pic de l'eau à 3,25 ppm révélant ainsi les pics attendus. Le tableau 28 rassemble les principales observations faites.

Attribution	δ (ppm)	Couplage	Intégration	J (Hz)
N-H (14/14')	8,44	triplet	0,83	5,68
N-H (6')	8,15	doublet	0,20	7,70
N-H (6)	8,06	doublet	0,51	7,51
CH aromatique (en	7,85	doublet	2,75	
ortho)		dédoublé		
CH aromatique et N-H (8/8')	7,30 à 7,55	massif	18,6	
CH <sub>2</sub> benzyle (1' ou 9')	5,20	singulet	0,75	
CH <sub>2</sub> benzyle (1 ou 9)	5,15	singulet	2,00	
CH <sub>2</sub> benzyle (9 ou 1)	5,03	singulet	2,75	
et (9' ou 1')				
CH (4)	4,77	massif	1,02	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
CH (4')	4,61	massif	0,35	
CH (2')		système AB (A)	0,35	
CH (2')	4,28	système AB (B)	0,37	
CH (2)	4,30	système AB (A)	1,01	
CH (2)	4.01	système AB (B)	1,00	
CH (7/7')		massif	1,35	
CH <sub>3</sub> 3	3,09	singulet	3,00	
CH <sub>3</sub> (3')	2,85	singulet	1,05	
CH <sub>2</sub> (10,12,11) et	1,20 à 1,70	massif	9,10	
(10',12',11')				
CH <sub>3</sub> (5)	1,18	doublet	3,08	6,94
CH <sub>3</sub> (5')	1,12	doublet	1,37	6,75

Tableau 28 : Attributions des signaux du spectre de résonance magnétique nucléaire à une dimension du diastéréoisomère (R,R) enregistré à température ambiante dans le DMSO.

Ces différentes attributions ont été confirmées par l'étude des spectres à 2 dimensions COSY (Figure 60).

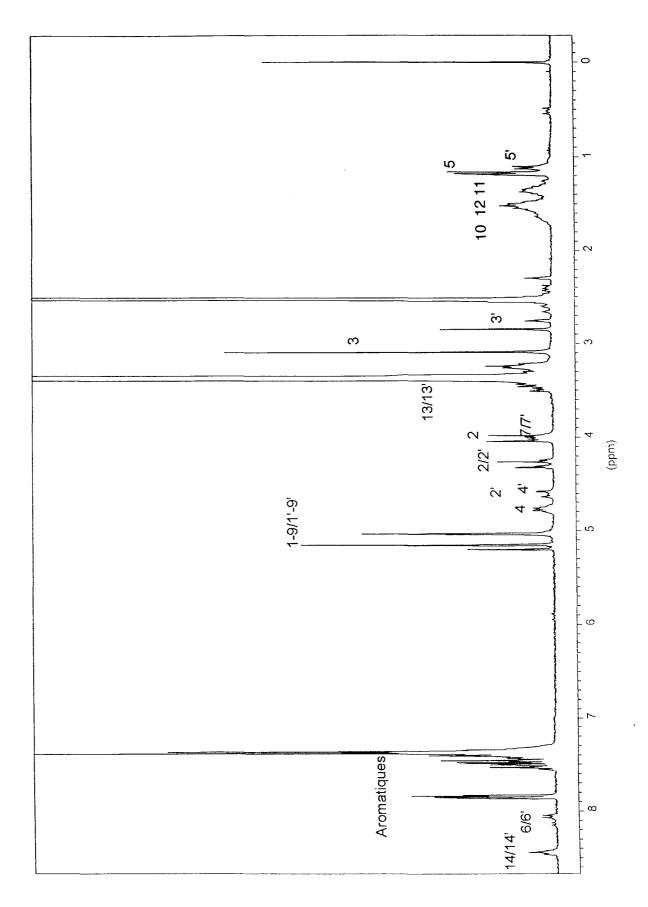


Figure 59 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à une dimension du diastéréoisomère (R,R) enregistré à température ambiante dans le DMSO.

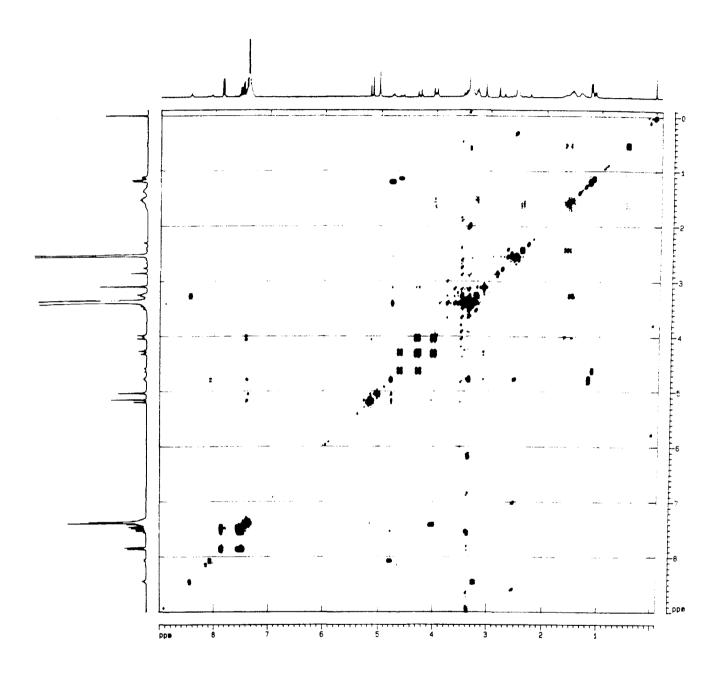


Figure 60 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions COSY du diastéréoisomère (R,R) enregistré à température ambiante dans le DMSO.

# V.5.2 Analyse structurale dans le chloroforme

Le spectre enregistré dans le chloroforme deutéré est sensiblement différent de celui enregistré dans le DMSO (Figure 61). Les différences apparaissent tant dans les déplacements chimiques que dans les proportions des deux conformations qui sont respectivement de l'ordre de 84% et 16%. Ces valeurs sont basées sur les intégrations des pics des protons 3 du groupement méthyle de la sarcosine. Les attributions des différents signaux sont rassemblées dans le tableau 29. Elles ont été confirmées par une expérience à 2 dimensions COSY (Figure 62).

Attribution	δ (ppm)	Couplage	Intégration	J (Hz)
CH aromatique (en	7,71	doublet	1,81	
ortho)		dédoublé		
CH aromatique	7,30	massif		
N-H (6/6')	6,80	doublet (1)	1,05	6,64
N-H (14)	6,42	massif	0,83	
N-H (8/8')	5,51	doublet (1)	0,71	7,91
CH <sub>2</sub> benzyle (1' ou 9')	5,12	singulet	0,40	
CH <sub>2</sub> benzyle (1 ou 9)	5,07	singulet	1,84	
CH <sub>2</sub> benzyle (9 ou 1)	5,01 et 4,99	2 singulets (2)	1,81	
et (9' ou 1')				
CH (4)	4,84	multiplet	1,00	
CH (4')	4,64	massif		
CH (2')	4,31	système AB (A)	1,10	
CH (2)	4,28	système AB (A)		
CH (7/7')	4,12	massif	1,03	
CH (2')	3,96	système AB (B)	0,27	
CH (2)	3,86	système AB (B)	0,90	
CH <sub>2</sub> (13/13')	3,38	multiplet	2,37	
CH <sub>3</sub> (3)	3,04	singulet	3,00	
CH <sub>3</sub> (3')	2,88	singulet	0,55	
CH <sub>2</sub> (10,12,11) et	1,30 à 1,90	massif	9,61	
(10',12',11')				
CH <sub>3</sub> (5)	1,28	doublet	2,80	6,64
CH <sub>3</sub> (5')	1,20	doublet	0,87	6,00

<sup>(1) :</sup> Les signaux de ces protons de la conformation minoritaire ne sont pas visibles. Les attributions ont été confirmées par l'étude des spectres COSY.

Tableau 29 : Attributions des signaux du spectre de résonance magnétique nucléaire à une dimension du diastéréoisomère (R,R) enregistré à température ambiante dans le chloroforme.

<sup>(2) :</sup> Ce signal apparaît comme la superposition de 2 singulets d'intensité équivalente.

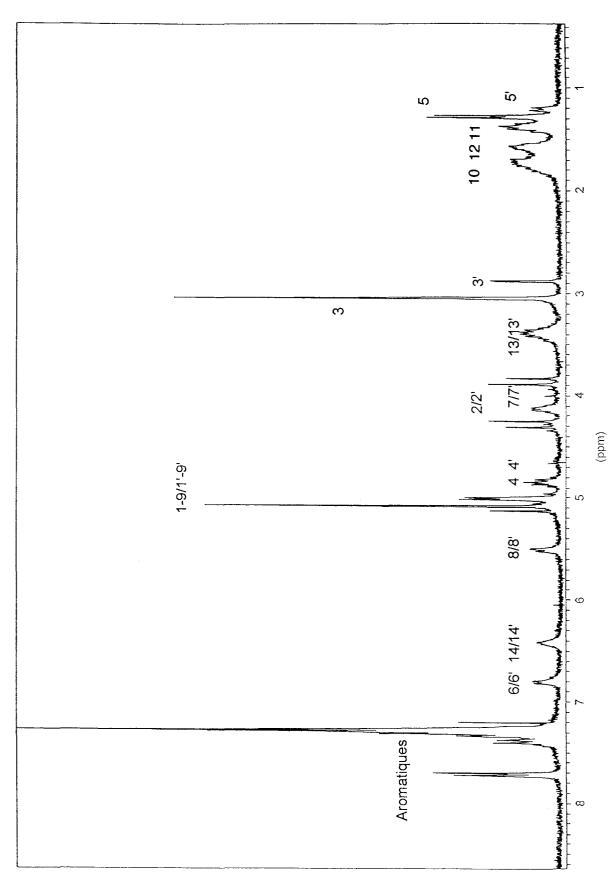


Figure 61: Spectre de résonance magnétique nucléaire à une dimension du diastéréoisomère (R,R) enregistré à température ambiante dans le chloroforme.

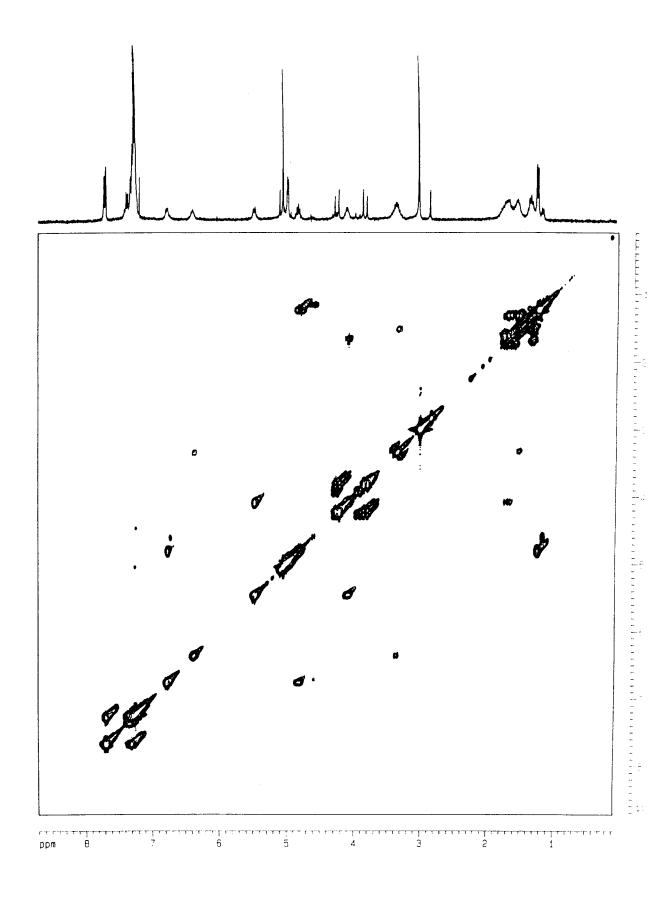


Figure 62: Spectre de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions COSY du diastéréoisomère (R,R) enregistré à température ambiante dans le chloroforme.

# V.5.3 Analyse conformationnelle dans le chloroforme

Plusieurs spectres de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions NOESY ont été enregistrés dans le chloroforme à température ambiante avec différents temps de mélange. Le résultat optimal est obtenu avec un temps de mélange égal à 500 millisecondes (Figure 63). Seulement cinq taches de corrélation de proximité sont observées (Tableau 30). Leur intensité est inversement proportionnelle à la distance entre les protons (Tableau 31).

Coordonnées (ppm)	Attribution	Intensité
1,6 - 6,4	CH <sub>2</sub> (12 ou 10) - N-H (14)	Forte
1,6 - 5,5	CH <sub>2</sub> (12 ou 10) - N-H (8)	Forte
3,0 - 4,8	CH <sub>3</sub> (3) - CH (4)	Moyenne
4,1 - 6,8	CH (7) - N-H (6)	Faible
1,3 - 4,8	CH <sub>3</sub> (5) - CH (4)	Faible

Tableau 30 : Attributions et intensités des taches de corrélation observées sur le spectre de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions NOESY du diastéréoisomère (R,R) enregistré dans le chloroforme à température ambiante.

Intensité	Distance
Forte	inférieure à 2 Å
Moyenne	entre 2 et 4 Å
Faible	supérieure à 4 Å

Tableau 31 : Correspondances entre l'intensité des taches de corrélation observées sur les spectres NOESY 2D et la distance entre les protons impliqués.

Ces différentes proximités sont représentées de manière schématique sur la figure 64. Par contre aucune proximité n'a pu être déterminée pour la conformation minoritaire.

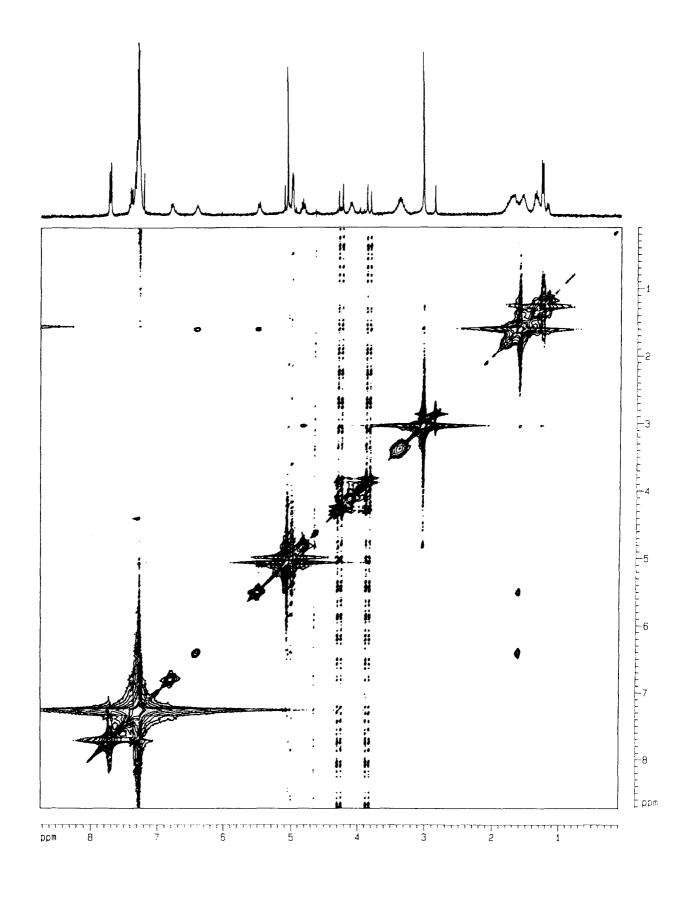


Figure 63 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions NOESY du diastéréoisomère (R,R) enregistré à température ambiante dans le chloroforme.

Figure 64: Représentation schématique des différentes proximités trouvées par l'analyse du spectre de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions NOESY du diastéréoisomère (R,R) enregistré dans le chloroforme à température ambiante.

# V.5.4 Analyse conformationnelle dans le DMSO

Plusieurs spectres de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions NOESY ont été également enregistrés dans le DMSO à température ambiante avec différents temps de mélange. Le meilleur temps de mélange est aussi obtenu à 500 millisecondes (Figure 65). 11 taches de corrélation de proximité sont observées (Tableau 32).

Coordonnées (ppm)	Attribution	Intensité
3,1 - 4,8	CH <sub>3</sub> (3) - CH (4)	Forte (1)
4,0 - 4,3	CH <sub>2</sub> (2) (AB)	Forte
4,3 - 4,6	CH <sub>2</sub> (2') (AB)	Moyenne
1,2 - 4,8	CH <sub>3</sub> (5) - CH (4)	Moyenne (1)
1,2 - 3,1	CH <sub>3</sub> (5) - CH <sub>3</sub> (3)	Moyenne
3,1 - de 4,0 à 4,3	CH <sub>3</sub> (3) - CH <sub>2</sub> (2)	Faible
1,1 - 4,6	CH <sub>3</sub> (5') - CH <sub>3</sub> (3')	Faible
1,5 - 8,2	CH <sub>2</sub> (12 ou 10) - N-H (14)	Faible (1)
1,2 - 8,1	CH <sub>3</sub> (5) - N-H (6)	Faible
2,8 - de 4,2 à 4,6	CH <sub>3</sub> (3') - CH <sub>2</sub> (2')	Très Faible
4,0 - 8,1	CH (7) - N-H (6)	Très Faible (1)

(1) : Ces corrélations ont été trouvées dans le chloroforme avec des intensités différentes.

Tableau 32: Attributions et intensités des taches de corrélation observées sur le spectre de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions NOESY du diastéréoisomère (R,R) enregistré dans le DMSO à température ambiante.

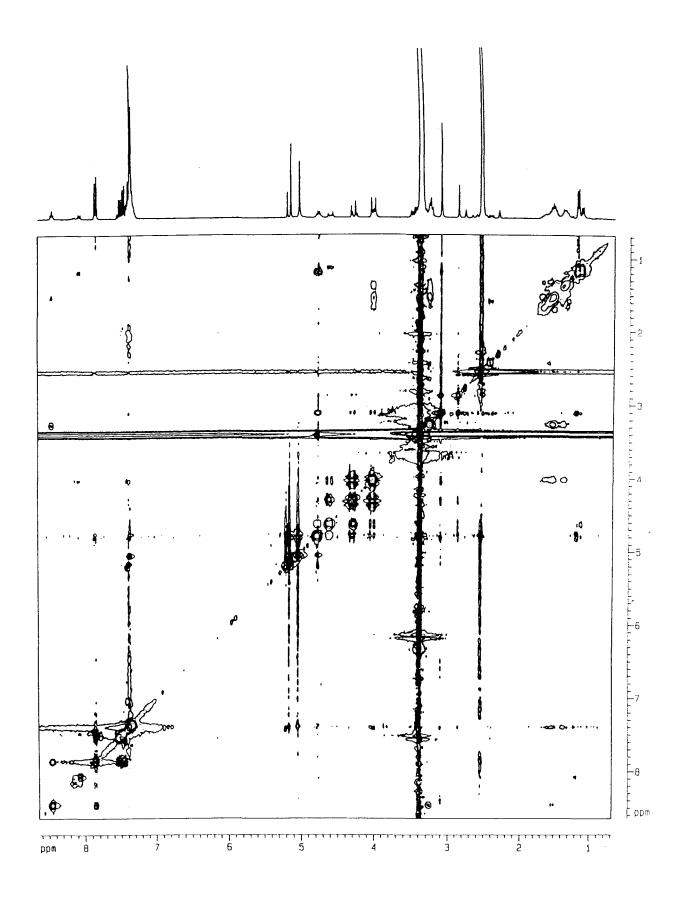


Figure 65 : Spectre de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions NOESY du diastéréoisomère (R,R) enregistré à température ambiante dans le DMSO.

Il faut également noter la présence de corrélations attendues entre les protons aromatiques et les groupements méthylène benzylique, entre les protons aromatiques en ortho de la fonction amide du groupement benzamide et le proton du groupement N-H de cette fonction amide, et finalement, entre ce proton du groupement N-H et les protons des différents groupements méthylène de la chaîne latérale de la lysine. Des taches de corrélation qui intéressent la mobilité de la partie alaninesarcosine sont également observées et montrent le passage de la conformation la plus abondante à la moins abondante. Ces taches corrèlent des protons homologues des conformations majoritaires et minoritaires, plus particulièrement les protons 3 et 3' du groupement méthyle de la sarcosine, les protons 2 et 2' du groupement méthylène de la sarcosine et les protons 4 et 4' porté par le carbone asymétrique de l'alanine. La proximité entre le proton 8 du groupement N-H de la lysine et les protons 12 (ou 10) des groupements méthylène de la chaîne latérale de la lysine n'est pas retrouvée car le proton amide est masqué par les protons aromatiques. La proximité entre les protons 3 et 5 laisse supposer que la conformation de la sarcosine est transoïde. La figure 66 donne une représentation schématique des différentes interactions observées.

Figure 66 : Représentation schématique des différentes proximités trouvées par l'analyse du spectre de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions NOESY du diastéréoisomère (R,R) enregistré dans le DMSO à température ambiante.

### V.5.5 Conclusions

Au vu de ces résultats, le diastéréoisomère (R,R) semble présenter une assez forte rigidité du résidu lysine vraisemblablement due à la présence de liaisons hydrogène impliquant les groupements N-H du squelette et de la chaîne latérale de la lysine avec des groupements carboxyles correspondants. Le reste de la molécule, à savoir la chaîne alanine-sarcosine, présente quant à elle, une flexibilité suffisante pour qu'elle puisse se trouver dans deux conformations différentes avec la possibilité de passer facilement d'une conformation à l'autre. Toutefois, les résultats des expériences de résonance magnétique nucléaire sont insuffisants pour trouver avec certitude les deux conformations visibles en milieu liquide. Peu de taches de corrélation de proximité ont été trouvées et ne concernent que des protons très proches. Il serait donc souhaitable de refaire d'autres expériences en modifiant principalement les conditions de température pour amplifier les NOE et, par conséquent, détecter, sur les deux conformations observées, un plus grand nombre de taches de proximité. Cette source de contraintes de distance serait alors utilisée pour générer des nouvelles conformations représentatives des expérimentations.

#### V.6 Confrontation des résultats théoriques et expérimentaux

Les résultats de l'analyse conformationnelle ont été confrontés à ceux de l'étude expérimentale résultant de l'interprétation des spectres de vibration infrarouge et Raman. Sur la base établie précédemment, les conformations possédant plusieurs liaisons hydrogène intramoléculaires ont été recherchées dans tous les espaces conformationnels des diastéréoisomères (S,S) et (S,R). Une liaison hydrogène résulte de l'attraction d'au moins deux atomes électronégatifs voisins et de la mise en commun d'un atome d'hydrogène lié de manière covalente à l'un de ces atomes (Figure 67).

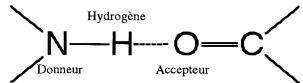


Figure 67: Liaison hydrogène.

Les paramètres utilisés pour définir la liaison hydrogène sont ceux pris par défaut par le logiciel SYBYL. L'angle formé par l'atome donneur, l'hydrogène et l'atome accepteur doit avoir une valeur supérieure à  $120^{\circ}$ . La distance entre l'hydrogène lié par liaison covalente à un atome donneur et un atome accepteur doit être comprise entre 0.8 Å et 2.8 Å.

Les atomes pouvant être théoriquement impliqués dans une liaison hydrogène sont numérotés de façon arbitraire selon l'ordre présenté à la figure 68. En théorie, quel que soit le diastéréoisomère considéré, il y a 26 liaisons hydrogène possibles. Chaque type de liaison hydrogène est identifié par un chiffre romain (Tableau 33).

Figure 68 : Numérotation arbitraire des atomes pouvant théoriquement être impliqué dans une liaison hydrogène.

				Donneur de proton				
				N-H				
			1	2	3			
		5		I	II			
		6	III		IV			
	C±O [	7	V	VI	VII			
		8	VIII	IX	X			
Accepteur		10	XI	XII				
de	C-O-C	4		XIII	XIV			
proton		9	XV	XVI	XVII			
		11	XVIII	XIX				
	>N-	12		XX	XXI			
		13	XXII		XXIII			
		14	XXIV	XXV	XXVI			

Tableau 33 : Liaisons hydrogène intramoléculaires théoriquement possibles.

Parmi tous les espaces conformationnels générés, seuls les espaces conformationnels issus des optimisations AM1 présentent des conformations qui possèdent deux liaisons hydrogène intramoléculaires. On ne trouve au plus qu'une liaison hydrogène intramoléculaire dans les espaces conformationnels issus des études en mécanique moléculaire.

# V.6.1. Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S)

liaisons hydrogène intramoléculaires ont été recherchées 38 conformations de l'espace conformationnel diastéréoisomère (S,S) optimisé par AM1. Cette étude a montré que cet espace conformationnel se répartit en 10 conformations présentant deux liaisons hydrogène intramoléculaires, 22 conformations présentant une liaison hydrogène intramoléculaire et 6 conformations n'en présentant Les présentant conformations des liaisons hydrogène intramoléculaires ont ensuite été classées suivant les types de liaison hydrogène préalablement définis au tableau 33 (Tableau 34).

	2 liaisons hydrogène							
Type de liaison	Nombre de conformations	ΔE <sub>minimum</sub> (kcal/mole)	ΔE <sub>maximum</sub> (kcal/mole)					
I et IV	6	0,0	4,3					
I et XI	2	2,8	3,2					
I et II	1	1,9	·					
II et XII	1	3,3						

	1 liaison hydrogène							
Type de liaison	Nombre de conformations	$\Delta E_{minimum}$ (kcal/mole)	ΔE <sub>maximum</sub> (kcal/mole)					
I	14	0,8	7,1					
XII	3	1,9	5,9					
VII	1	1,0						
X	1	6,9						
IV	1	7,4						
XIV	1	7,7						
XV	1	8,5						

Tableau 34 : Répartition par type de liaison hydrogène des conformations de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) présentant des liaisons hydrogène.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressé aux conformations présentant deux liaisons hydrogène intramoléculaires. Les différences d'énergie par rapport au minimum global trouvé (ΔΕ) sont, pour ces 10 conformations, comprises entre à 0,0 et 4,3 kcal/mole et sont donc parfaitement compatibles. Il est également intéressant de remarquer que 9 des 10 conformations présentent une liaison hydrogène intramoléculaire de type I, [Z]C=O...HN[Ala], impliquant le groupement N-H de l'alanine et le groupement C=O du groupement benzyloxycarbonyle bloquant la lysine (Figure 69) (Tableau 35).

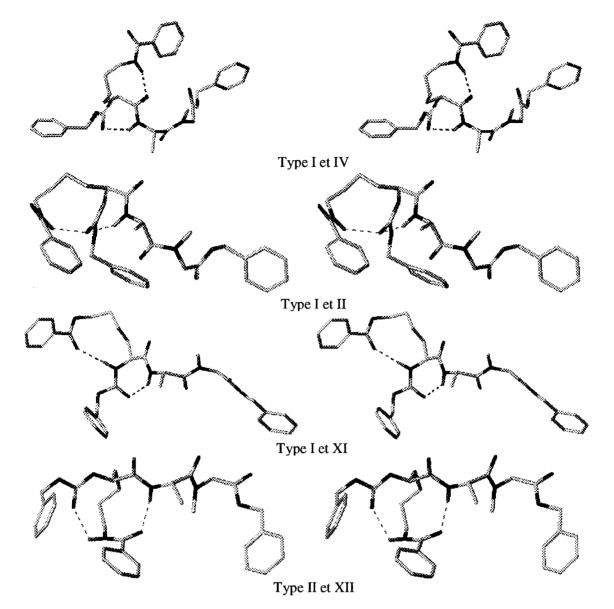


Figure 69 : Représentations des différents types de liaison hydrogène trouvés dans l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) - Vues stéréo des conformations de plus basse énergie.

На	ΔE b		Angles dièdres (°)					
		Lys Ala		S	ar	Code c		
		φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	
I et IV	0,0	82	-49,3	-96,2	114,9	104,9	-155,3	C*CF*
I et II	1,9	77,1	-63,6	-119,3	148,4	99,7	47,2	C*EA*
I et XI	2,8	-88,2	58,3	-100,0	140,8	-110,0	147,7	CFE/F
II et XII	3,3	-130,2	155,1	-112,0	-56,8	93,3	24,1	EGA*

a Types de liaison hydrogène.

Tableau 35 : Energie et angles de torsion des conformations de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) présentant deux liaisons hydrogène intramoléculaires.

b Différence d'énergie par rapport au minimum global pour la conformation de plus basse énergie exprimée en kcal/mole.

Code utilisé par Zimmermann et al. (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

En procédant par élimination, parmi ces 9 conformations nous ne retiendrons que celles qui possèdent également une liaison hydrogène de type XI, c'est-à-dire impliquant le groupement N-H de la lysine et le groupement C=O du groupement benzamide bloquant la chaîne latérale de la lysine, car les autres possibilités laissent toujours le groupement N-H de la lysine libre. Ce qui est en contradiction avec les résultats de l'analyse vibrationnelle qui a révélé que tous les groupements N-H des fonctions amide (à l'exception du groupement benzamide) sont impliqués dans des liaisons hydrogène. De même, la conformation possédant des liaisons hydrogène intramoléculaires de type II et XII ne convient pas car elle laisse également le groupement N-H de la lysine libre. Les différences d'énergie par rapport au minimum global trouvé  $(\Delta E)$  pour ces conformations retenues (1) et (2) sont respectivement égales à 2,8 et 3,2 kcal/mole (Figure 70). Elles sont parfaitement compatibles avec le modèle proposé par l'analyse vibrationnelle (Figure 57).

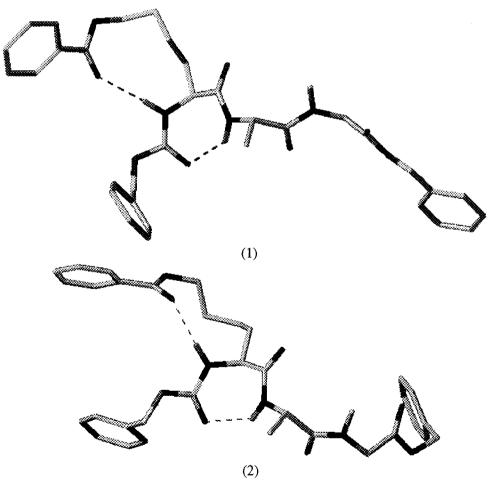


Figure 70 : Conformations du diastéréoisomère (S,S) résultant de la confrontation des études de modélisation moléculaire et vibrationnelle.

## V.6.1.2 Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R)

La même démarche a été effectuée pour les 35 conformations de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) optimisé par AM1. Seules 5 conformations possèdent deux liaisons hydrogène intramoléculaires, 26 conformations n'en possèdent qu'une et 4 conformations n'en possèdent pas. Le tableau 36 montre la répartition des conformations présentant des liaisons hydrogène intramoléculaires en fonction des types de liaison tels qu'ils ont été préalablement définis au tableau 33.

2 liaisons hydrogène								
Type de liaison	Nombre de conformations	$\Delta E_{ ext{minimum}}$ (kcal/mole)	ΔE <sub>maximum</sub> (kçal/mole)					
I et IV	3	0,0	3,0					
VII et X	1	1,6						
I et XI	1	2,3						

1 liaison hydrogène									
Type de liaison	Nombre de conformations	$\Delta E_{ ext{minimum}}$ (kcal/mole)	$\Delta E_{ ext{maximum}}$ (kcal/mole)						
I	13	2,3	9,7						
XII	3	2,0	4,2						
VII	3	2,6	4,3						
II	2	4,2	4,3						
XI	1	0,6							
XIV	1	5,8							
X	1	7,0							
IV	1	8,0							

Tableau 36 : Répartition par type de liaison hydrogène des conformations de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) présentant des liaisons hydrogène.

н а	ΔEb		Angles dièdres (°)					
		Lys		Ala		Sar		Code <sup>c</sup>
		φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	
I et IV	0,0	-84,1	69,3	106,3	-99,5	98,3	29,2	CC*A*
VII et X	1,6	-114,7	-23,7	91,7	-147,1	-84,9	126,8	BF*C
I et XI	2,3	84,0	-60,2	103,7	-106,0	-94,7	177,7	C*C*F

a Types de liaison hydrogène.

Tableau 37 : Energie et angles de torsion des conformations de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,R) présentant deux liaisons hydrogène intramoléculaires.

b Différence d'énergie par rapport au minimum global pour la conformation de plus basse énergie exprimée en kcal/mole.

Code utilisé par Zimmermann et al. (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres φ et ψ.

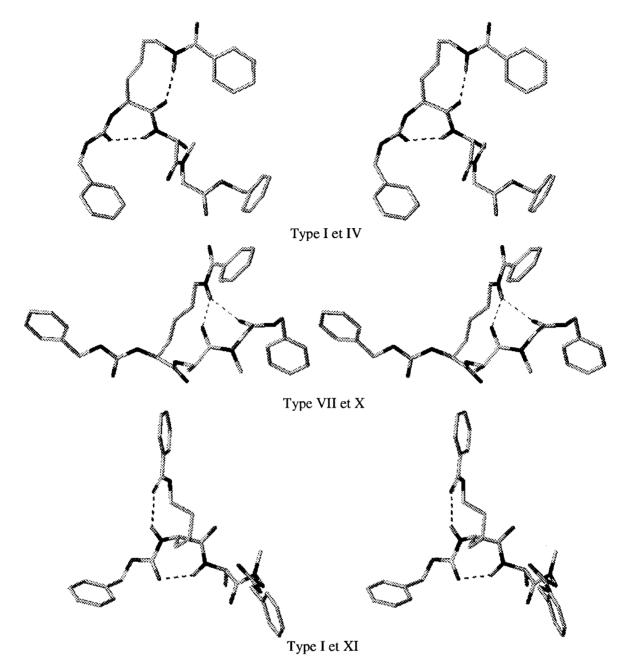


Figure 71 : Représentations des différents types de liaison hydrogène trouvés dans l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) - Vues stéréo des conformations de plus basse énergie.

La conformation possédant des liaisons hydrogène intramoléculaires de type VII et X ne convient pas pour deux raisons car, d'une part, elle laisse libre les groupements N-H de la lysine et de l'alanine, et d'autre part, les groupements C=O impliqués dans les liaisons hydrogène, à savoir le groupement C=O de l'alanine et le groupement C=O C-terminal de la sarcosine, rigidifient la partie alanine-sarcosine de la molécule. Ce dernier point est en contradiction avec les résultats des expériences de résonance magnétique nucléaire qui montrent une

flexibilité de cette chaîne. Pour les mêmes raisons que celles évoquées pour le composé (S,S), nous ne pouvons retenir les 3 conformations présentant des liaisons hydrogène intramoléculaires de type I et IV. Par conséquent, il ne reste qu'une seule conformation (1) qui possède des liaisons hydrogène intramoléculaires de type I et XI. Cette conformation est en adéquation avec le modèle proposé à l'issue de l'analyse vibrationnelle (Figure 72). La différence d'énergie par rapport au minimum global trouvé est égale à 2,3 kcal/mole.

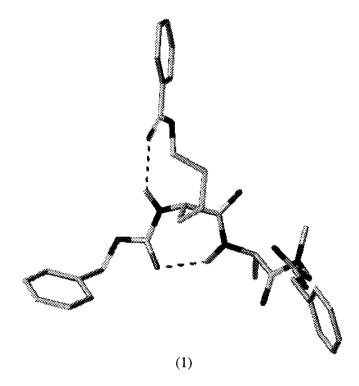


Figure 72 : Conformation du diastéréoisomère (S,R) résultant de la confrontation des études de modélisation moléculaire et vibrationnelle.

#### V.6.1.3 Conclusions

La confrontation des résultats de la modélisation moléculaire à ceux de l'analyse vibrationnelle a permis de trouver pour chaque diastéréoisomère, au moins une conformation. Ces conformations, provenant d'un milieu solide, se caractérisent par la présence de deux liaisons hydrogène intramoléculaire de type I et XI. La partie N-terminale de la molécule est très rigide. Ceci est dû à l'accolement de deux cycles fermés par les liaisons hydrogène qui possèdent respectivement 7 et 10 sommets. La partie C-terminale formée par la chaîne alanine-sarcosine reste très flexible. Ces résultats sont en parfait

accord avec le modèle proposé à l'issue des expériences. Les conformations trouvées pour chaque composé peuvent être superposées (Figure 73).

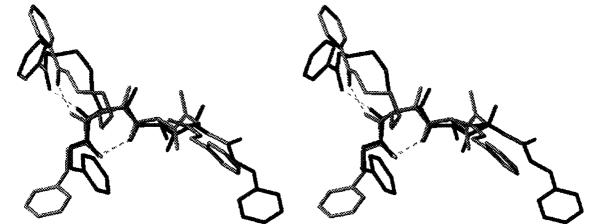


Figure 73 : Vue stéréo de la superposition des conformations (1) des diastéréoisomères (S,S) (en rouge) et (S,R) (en bleu).

Ces conformations pourraient servir de modèle dans le but de passer de cette structure peptidique vers un composé non-peptidique analogue en rigidifiant par des liaisons covalentes la partie N-terminale de la molécule de manière à respecter l'orientation des noyaux aromatiques dans cette zone de l'espace.

# V.7 Dynamique moléculaire avec SPASIBA

#### V.7.1 Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S)

177 conformations ont été retenues pour représenter la trajectoire de la dynamique moléculaire utilisant le champ de forces SPASIBA. Après minimisation de l'énergie, l'espace conformationnel se réduit à 120 conformations dont les énergies sont comprises entre -51,7 et -32,3 kcal/mole. L'examen de sa répartition énergétique montre une distribution continue symétrique centrée sur les plus hautes fréquences qui apparaissent entre 6 et 12 kcal/mole au dessus du minimum global (Figure 74).

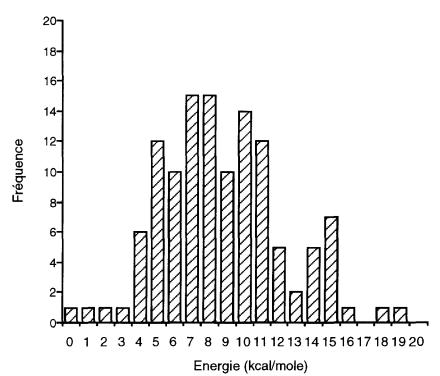


Figure 74 : Répartition énergétique des 120 conformations du diastéréoisomère (S,S) générées par la dynamique moléculaire utilisant le champ de forces SPASIBA - l'énergie est exprimée par rapport au minimum global.

La conformation de plus basse énergie ne présente aucune liaison hydrogène (Figure 75) (Tableau 38).

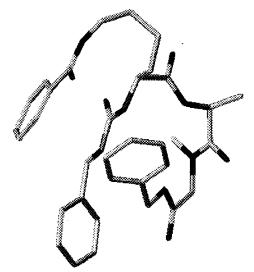


Figure 75 : Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par la dynamique moléculaire utilisant le champ de forces SPASIBA.

Energie	Angles dièdres (°)						
(kcal/mole)	L	ys	A	la	S	ar	Code a
	φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	
-51,7	-68,8	-41,1	-149,4	87,1	77,1	-10,3	ADB*

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Code utilisé par Zimmermann *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$ .

Tableau 38 : Energie et angles de torsion de la conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,S) générée par la dynamique moléculaire utilisant le champ de forces SPASIBA.

Nous avons recherché parmi les 10 conformations de basse énergie, c'est-à-dire les conformations dont la différence d'énergie par rapport au minimum global trouvé est inférieure à 5,0 kcal/mole, la présence de liaisons hydrogène intramoléculaires. Une seule conformation présente deux liaisons hydrogène, 5 conformations présentent une liaison hydrogène et 4 n'en présentent aucune (Tableau 39). L'énergie de la conformation possédant deux liaisons hydrogène s'écartent du minimum global d'énergie trouvé de 4,2 kcal/mole (Figure 76) (Tableau 40). Elle est en parfait accord avec le modèle proposé.

	2 liaisons hydrogène					
Type de liaison	Nombre de conformations	$\Delta E_{ ext{minimum}}$ (kcal/mole)	ΔE <sub>maximum</sub> (kcal/mole)			
I et XI	1	4,2				

	1 liaison	hydrogène	
Type de liaison	Nombre de conformations	ΔE <sub>minimum</sub> (kcal/mole)	ΔE <sub>maximum</sub> (kçal/mole)
XI	1	2,0	
VII	2	4,2	4,3
VIII	2	4.3	4,5

Tableau 39 : Répartition par type de liaison hydrogène des conformations de basse énergie ( $\Delta E < 5.0$  kcal/mole) de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S) présentant des liaisons hydrogène.

H a	ΔE b		Angles dièdres (°)					
		L	ys	A	la	S	Sar	Code c
		φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	
I et XI	4,2	-79,4	84,8	-136,6	84,2	86,5	-52,6	CCC*

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Types de liaison hydrogène.

Tableau 40 : Energie et angles de torsion de la conformation de basse énergie du diastéréoisomère (S,S) corroborant les faits expérimentaux.

b Différence d'énergie par rapport au minimum global pour la conformation de plus basse énergie exprimée en kcal/mole.

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Code utilisé par Zimmermann *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$ .

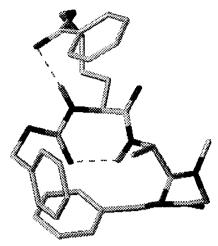


Figure 76 : Conformation de basse énergie du diastéréoisomère (S,S) corroborant les faits expérimentaux.

Les modes normaux ont été calculés pour les 10 conformations de basse énergie. Nous avons comparées les principales fréquences vibrationnelles calculées pour la conformation retenue à celles observées. Les attributions sont faites sur la base de la distribution de l'énergie potentielle (Potential Energy Distribution : P.E.D.) qui est calculée en fonction des coordonnées internes (Tableau 41).

Obs.a	Calc.b	Attribution et P.E.D. (%)
3307	3323	νN-H [LYS] (100%)
3307	3302	vN-H benzamide (100%)
3307	3293	νN-H [ALA] (100%)
1745	1711	vC=O <sub>ester</sub> [SAR] (17%)
1715	1688	$vC=O_{ester}[Z]$ (39%)
1643	1658	$\nu C=O_{amide}$ [LYS] (74%)
1643	1659	νC=O <sub>amide</sub> [ALA] (70%)
1643	1643	νC=O <sub>amide</sub> benzamide (14%)
?	1571	vC-N [Z-LYS] (31%)
?	1556	νC-N [LYS-ALA] (28%)
1535	1533	δN-H benzamide (17%)
?	1278	vC-N [LYS-ALA] (23%) + vN-C [ALA] (22%) + &N-H [ALA] (10%)
?	1278	$\nu$ C-O <sub>ester</sub> [SAR-OBzl] (25%) + $\nu$ C-C[SAR] (14%)
1242	1236	νC-N [ALA-SAR] (15%) + νN-CCH3 [SAR] (16%)
?	763	γN-H benzamide (59%)

a Fréquence observée exprimée en cm<sup>-1</sup>.

Tableau 41 : Tableau comparatif des principales fréquences observées et calculées pour la conformation retenue du diastéréoisomère (S,S).

Tous les modes de vibration sont trouvés dans les bonnes zones de fréquence. A l'exception des élongations des groupements C=O des deux

b Fréquence calculée exprimée en cm<sup>-1</sup>.

fonctions ester, l'écart entre les fréquences calculées et observées est très réduit (de l'ordre de 10 cm<sup>-1</sup>). Les écarts de l'ordre de 40 cm<sup>-1</sup> enregistrés pour les élongations des groupements C=O des deux fonctions ester peut s'expliquer par un manque d'affinage du paramétrage du champ de forces SPASIBA pour les esters de type benzyloxycarbonyle. Le champ de forces SPASIBA a été paramétré pour les esters à partir du formate de méthyle, du formate d'éthyle et de l'acétate de méthyle (Chhiba et al., 1996). Ces résultats confirment, à travers la capacité du champ de forces SPASIBA à reproduire les fréquences vibrationnelles, que la conformation théorique retenue correspond effectivement aux données expérimentales.

#### V.7.2 Espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,R)

177 conformations ont été retenues pour représenter la trajectoire de la dynamique moléculaire utilisant le champ de forces SPASIBA. Après minimisation de l'énergie, 29 conformations redondantes sont éliminées. L'espace conformationnel est finalement constitué de 102 conformations dont les énergies sont comprises entre -53,1 et -34,7 kcal/mole. La figure 77 montre une distribution énergétique continue et symétrique centrée sur les plus hautes fréquences qui apparaissent entre 8 et 10 kcal/mole au dessus du minimum global. La conformation de plus basse énergie est stabilisée par deux liaisons hydrogène intramoléculaire [Z]C=O...HN[Ala] et [Sar]C=O...HN[Lys]. formant respectivement deux cycles C7 et C11 (Figure 78) (Tableau 42).

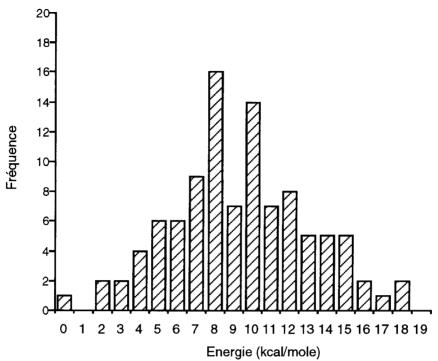


Figure 77 : Répartition énergétique des 102 conformations du diastéréoisomère (S,R) générées par la dynamique moléculaire utilisant le champ de forces SPASIBA - l'énergie est exprimée par rapport au minimum global.

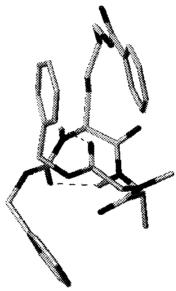


Figure 78 : Conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,R) générée par la dynamique moléculaire utilisant le champ de forces SPASIBA.

Energie		Angles dièdres (°)					
(kcal/mole)	L	ys	A	Ala	S	ar	Code a
	φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	
-53,1	-88,0	72,4	80,0	-119,4	-63,8	157,6	BC*F

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> Code utilisé par Zimmermann *et al.* (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$ .

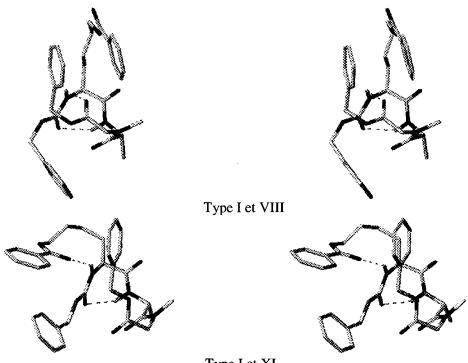
Tableau 42: Energie et angles de torsion de la conformation de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,R) générée par la dynamique moléculaire utilisant le champ de forces SPASIBA.

Les conformations de basse énergie, c'est-à-dire conformations dont la différence d'énergie par rapport au minimum global trouvé est inférieure à 5,0 kcal/mole, ont été classées en fonction du nombre de liaisons hydrogènes intramoléculaires qu'elles présentent. 4 conformations possèdent deux liaisons hydrogène intramoléculaires et 5 conformations n'en possèdent qu'une. Les conformations présentant des liaisons hydrogène intramoléculaires sont ensuite réparties en fonction des types de liaison tels qu'ils ont été préalablement définis au tableau 33 (Tableau 43) Nous nous intéressons plus particulièrement conformations qui présentent deux liaisons hydrogène intramoléculaires (Figure 79). Les énergies et les principaux angles de torsion des conformations de plus basse énergie de chaque famille sont présentées dans le tableau 44.

	2 liaisons hydrogène						
Type de liaison	Nombre de conformations	ΔEminimum (kcal/mole)	ΔE <sub>maximum</sub> (kcal/mole)				
I et VIII	3	0,0	4,6				
I et XI	1	4,5					

1 liaison hydrogène					
Type de liaison	Nombre de conformations	ΔEminimum (kcal/mole)	ΔE <sub>maximum</sub> (kcal/mole)		
VIII	1	2,8			
ī	3	3.5	5.0		

Tableau 43 : Répartition par type de liaison hydrogène des conformations de basse énergie ( $\Delta E < 5.0$  kcal/mole) de l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) présentant des liaisons hydrogène.



Type I et XI

Figure 79 : Représentations des différents types de liaison hydrogène trouvés dans l'espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R) - Vues stéréo des conformations de plus basse énergie.

На	ΔEb		Angles dièdres (°)					
		L	Lys Ala Sar				Code <sup>c</sup>	
		φ1	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	
I et VIII	0,0	-88,0	72,4	80,0	-119,4	-63,8	157,6	BC*F
I et XI	4,5	-83,1	80,5	94,4	-124,7	-76,2	-44,7	CC*A

a Types de liaison hydrogène.

Tableau 44 : Energie et angles de torsion des conformations de plus basse énergie du diastéréoisomère (S,R) présentant deux liaisons hydrogène intramoléculaires.

Parmi les conformations qui possèdent deux liaisons hydrogène intramoléculaires, nous ne retiendrons que celle qui présente des liaisons hydrogène de type I et XI (Figure 80). Nous écartons les conformations qui présentent des liaisons hydrogène de type I et VIII car les groupements C=O des deux fonctions esters sont effectivement impliqués dans une liaison hydrogène avec les groupements N-H de l'alanine et de la lysine. Or les résultats de l'analyse vibrationnelle montrent que l'un des groupements C=O des deux fonctions esters doit rester libre.

b Différence d'énergie par rapport au minimum global pour la conformation de plus basse énergie exprimée en kcal/mole.

Code utilisé par Zimmermann et al. (1977) pour déterminer le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres  $\varphi$  et  $\psi$ .

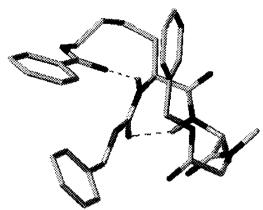


Figure 80 : Conformation de basse énergie du diastéréoisomère (S,R) corroborant les faits expérimentaux.

Les modes normaux ont été calculés pour les 9 conformations de basse énergie. Les fréquences calculées pour la conformation retenue du diastéréoisomère (S,R) sont comparées à celles observées (Tableau 45).

Obs.a	Calc.b	Attribution et P.E.D. (%)
3314	3299	νN-H benzamide (98%)
3302	3298	νN-H [ALA] (100%)
3302	3297	νN-H [LYS] (98%)
1741	1710	$vC=O_{ester}[SAR]$ (17%)
1723	1691	$\nu$ C=O <sub>ester</sub> [Z] (39%)
1674	1667	νC=O <sub>amide</sub> [LYS] (74%)
1657	1657	νC=O <sub>amide</sub> [ALA] (70%)
1634	1642	$\nu$ C=O $_{ m amide}$ benzamide (14%)
?	1597	νN-C benzamide (24%)
?	1574	νC-N [Z-LYS] (31%)
?	1570	νC-N [LYS-ALA] (28%)
?	1558	vC-N[ALA-SAR] (1%)
1535	1532	δN-H benzamide (17%)
?	1290	vC-N [LYS-ALA] (23%) + vN-C [ALA] (22%) + &N-H [ALA] (10%)
?	1287	$\nu$ C-O <sub>ester</sub> [SAR-OBzl] (25%) + $\nu$ C-C[SAR] (14%)
1245	1242	$\nu$ C-N [ALA-SAR] (15%) + $\nu$ N-CCH3 [SAR] (16%)
?	757	γN-H benzamide (59%)

a Fréquence observée exprimée en cm<sup>-1</sup>.

Tableau 45 : Tableau comparatif des fréquences observées et calculées pour la conformation retenue du diastéréoisomère (S,R).

Il apparaît que les fréquences vibrationnelles calculées pour la conformation choisie du diastéréoisomère (S,R) concordent avec celles relevées sur le spectre.

b Fréquence calculée exprimée en cm<sup>-1</sup>.

#### V.7.3 Conclusions

Le champ de forces SPASIBA a permis de trouver pour les composés (S,S) et (S,R), parmi les conformations choisies pour représenter la trajectoire de la dynamique moléculaire, des conformations de basse énergie qui corroborent le modèle proposé à l'issue de l'analyse vibrationnelle infrarouge et Raman. L'analyse des modes normaux montre la cohérence des conformations théoriques avec les données expérimentales.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

#### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La méthode CONFEX utilisée pour l'analyse conformationnelle des diastéréoisomères (S,S) et (S,R) du tripeptide UCB16101, donne une bonne représentation des espaces conformationnels de ces molécules, surtout quand elle utilise DGEOM95, par comparaison aux méthodes Random search et de dynamique moléculaire.

Toutefois, il est apparu nécessaire d'optimiser ces conformationnels au niveau semi-empirique AM1 pour trouver des conformations en accord avec les résultats de l'interprétation des spectres infrarouge et Raman qui ont révélé l'implication de tous les groupements N-H des fonctions amide (à l'exception du groupement benzamide) et de l'une des deux fonctions ester dans des liaisons hydrogène. Nous avons proposé un modèle qui corrobore les faits expérimentaux. Il se caractérise par la présence d'une structure cyclique à 7 sommets (C7) fermée par une liaison hydrogène entre le groupement C=O (ester) du groupement benzyloxycarbonyle (Z) bloquant la lysine et le groupement N-H de l'alanine. Cette première structure est accolée à une structure cyclique à 10 sommets (C10) fermée par une liaison hydrogène impliquant le groupement C=O du groupement benzoyle bloquant la chaîne latérale de la lysine et le groupement N-H de la lysine. La confrontation des résultats de la modélisation moléculaire à ceux de l'analyse vibrationnelle a permis de trouver pour chaque diastéréoisomère, au moins une conformation compatible avec les résultats expérimentaux. Ces conformations se caractérisent par la présence de deux liaisons hydrogène intramoléculaire qui rigidifient la partie N-terminale de la molécule par la formation de deux cycles accolés qui possèdent respectivement 7 et 10 sommets. La partie C-terminale formée par la chaîne alanine-sarcosine reste toutefois très flexible.

Par contre, les résultats préliminaires des expériences de résonance magnétique nucléaire sont insuffisants pour trouver avec certitude les deux conformations visibles en solution. Les expériences NOESY n'ont révélées que quelques taches de corrélation de proximité ne concernant que des protons très proches. Il est nécessaire de refaire d'autres expériences en modifiant principalement les conditions de température pour amplifier les NOE et, par conséquent, pouvoir détecter,

pour les deux conformations observées, un plus grand nombre de taches de proximité. Cette source de contraintes de distance serait alors utilisée pour générer des nouvelles conformations représentatives de ces expérimentations.

Dans une autre approche du problème, le champ de forces SPASIBA, a permis de trouver, pour chaque diastéréoisomère étudié, parmi les conformations choisies pour représenter la trajectoire de la dynamique moléculaire, des conformations présentant des liaisons hydrogène intramoléculaires et corroborant les résultats de l'analyse vibrationnelle. L'analyse des modes normaux a démontré la cohérence de ces conformations théoriques issues de la modélisation moléculaire avec les données expérimentales provenant de l'interprétation des spectres infrarouge et Raman.

Ces conformations caractéristiques retenues serviront de base à la conception de nouvelles molécules rigides qui devraient permettre l'approche de la conformation bioactive de l'UCB16101.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

#### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allinger, N.L.

Calculation of molecular structure and energy by force-field methods *Adv. Phys. Org. Chem.* **1976**, *13*, 2-81.

Allinger, N.L.; Yuh, Y.H.; Lii, J.H.

Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1

J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8551-8588.

Anastasi, A.; Montecucchi, P.; Erspamer, V.; Visser, J.

Amino acid composition and sequence of kassinin, a tachykinin dodecapeptide from the skin of the african frog Kassina senegalensis Experientia 1977, 33, 857-858.

Appell, K.C.; Fragale, B.J.; Loscig, J.; Singh, S.; Tomczuk, B.E.

Antagonists that demonstrate species differences in neurokinin-1 receptors

Mol. Pharmacol. 1992, 41, 772-778.

Atsumi, S.; Sakamoto, H.; Kawate, T.; Zhai, X.Y.

Substance P-containing primary afferent receives inhibitory modulation directly from enkephalin- and GABA-containing interneurons in the dorsal horn of the chicken

Regul. Peptides 1993, 46, 410-412.

Auffinger, P.; Wipff, G.

High temperature annealed molecular dynamics simulations as tools for conformational sampling. Application to the bicyclic '222' cryptand *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 19-31.

Barrow, C.J.; Doleman, M.S.; Bobko, M.A.; Cooper, R.

Structure determination, pharmacological evaluation, and structure-activity studies of a new cyclic peptide substance P antagonist containing the new amino acid 3-prenyl- $\beta$ -hydroxytyrosine, isolated from Aspergillus flavipes

J. Med. Chem. 1994, 37, 356-363.

Baruch, P.; Artaud, F.; Godeheu, G.; Barbeito, L.; Glowinski, J.; Cheramy, A. Substance P and neurokinin A regulate by different mechanisms,

dopamine release from dendrites and nerve terminals of the nigrostriatal dopaminergic neurons

Neuroscience 1988, 25, 889-898.

Berendsen, H.J.C.; Postma, J.P.N.; Van Gunsteren, W.F.; Dinola, A.; Haak, J.R. Molecular dynamics with coupling to an external bath *J. Chem. Phys.* **1984**, *81*, 3684-3690.

Blaney, J.M.; Crippen, G.M.; Dearing, A.; Dixon, J.S.; Spellmeyer, D.C.

DGEOM95 - Distance geometry, QCPE program 590

1995, Quantum Chemistry Program Exchange, Creative Arts Building 181, Indiana University, Bloomington, IN 47405, U.S.A..

Blaney, J.M.; Crippen, G.M.; Dearing, A.; Dixon, J.S.; Spellmeyer, D.C.

DGEOM90 - Distance geometry, QCPE program 590

1990, Quantum Chemistry Program Exchange, Creative Arts Building 181, Indiana University, Bloomington, IN 47405, U.S.A..

Boden, P.; Eden, J.M.; Hodgson, J.; Horwell, D.C.; Hughes, J.; McKnight, A.T.; Lewthwaite, R.A.; Pritchard, M.C.; Raphy, J.; Meecham, K.; Ratcliffe, G.S.; Suman-Chauan, N.; Woodruff, G.N.

Use of dipeptide chemical library in the development of non-peptide tachykinin NK3 receptor selective antagonists

J. Med. Chem. 1996, 39, 1664-1675.

Boyle, S.; Guard, S.; Higginbottom, M.; Horwell, D.C.; Howson, W.; McKnight, A.T.; Martin, K.; Pritchard, M.C.; O'Toole, J.; Raphy, J.; Rees, D.C.; Roberts, E.; Watling, K.J.; Woodruff, G.N.; Hughes, J.

Rational design of high affinity tachykinin NK1 receptor antagonists

Bioorg. Med. Chem. 1994, 2, 357-370.

Brodal, P.

The central nervous system

1992, Oxford University Press: New York.

Brooks, B.R.; Bruccoleri, R.E.; Olafson, B.D.; States, D.J.; Swaminathan, S.; Karplus, M.

CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations

J. Comput. Chem. 1983, 4, 187-217.

Brooks, C.L.; Karplus, M.; Pettitt, B.M.

Proteins: theoretical perspectives of structure, dynamics and thermodynamics

Adv. Chem. Phys. 1988, 71, 1-259.

Chang, M.M.; Leeman, S.E.; Niall, H.D.

Amino acid sequence of substance P

Nature New Biol. 1971, 232, 86-87.

Chhiba, M., Tristram, F.; Vergoten, G.

The SPASIBA force field of esters

1996, C.R.E.S.I.M.M., Bâtiment C8, 1er étage, U.S.T.L., 59655 Villeneuve d'Ascq.

Chhiba, M.; Derreumaux, P.; Vergoten, G.

The use of the SPASIBA spectroscopic potential for reproducing the structures and vibrational frequencies of a series of acids: acetic acid, pivalic acid, succinic acid, adipic acid and L-glutamic acid

J. Mol. Struct. 1994, 317, 171-184.

Chhiba, M.; Vergoten, G.

The SPASIBA force field of model compounds related to lipids of biomembranes

J. Mol. Struct. 1996, sous presse.

Clark, M.; Cramer III, R.D.; Opdenbosch, N.

Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field

J. Comput. Chem. 1989, 10, 982-1012.

#### Clark, T.

A handbook of computational chemistry. A practical guide to chemical structure and energy calculations

1985, John Wiley & Sons: New York.

Craik, D.J.; Jarvis, J.A.

Conformational studies of bioactive peptides by NMR

Curr. Med. Chem. 1994, 1, 115-144.

Crippen, G.M.

Distance geometry and conformational calculations

1981, Research Studies Press (Wiley): New York.

Crippen, G.M.; Havel, T.F.

Distance geometry and molecular conformation

1988, Research Studies Press (Wiley): New York.

Dammkoehler, R.A.; Darasek, S.F.; Shands, E.F.B.; Marshall, G.R.

Constrained search of conformational hyperspace

J. Comput-Aided Mol. Des. 1989, 3, 3-21.

Dauber-Osguthorpe, P.; Roberts, V.A.; Osguthorpe, D.J.; Wolff, J.; Genest, M.; Hagler, A.T.

Structure and energetics of ligand binding to proteins: E. coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug receptor system

Proteins: Structure, Function and Genetics, 1988, 4, 31-47.

Derreumaux, P.; Dauchez, M.; Vergoten, G.

The structures and vibrational frequencies of a series of alkanes using the SPASIBA force field

J. Mol. Struct. 1993, 295, 203-221.

Derreumaux, P.; Vergoten, G.

A new spectroscopic molecular mechanics force field. Parameters for proteins

J. Chem. Phys. 1995, 102, 8586-8604.

Desai, M.C.; Lefkowitz, S.L.; Thadeio, P.F.; Longo, K.P.; Snider, R.M.

Discovery of a potent substance P antagonist: recognition of the key molecular determinant

J. Med. Chem. 1992, 35, 4911-4913.

Desai, M.C.; Vincent, L.A.; Rizzi, J.P.

Importance of parallel vectors and "hydrophobic collapse" of the aligned aromatic rings: discovery of a potent substance P antagonist

J. Med. Chem. 1994, 37, 4263-4266.

Dewar, M.J.S.; Zoebish, E.G.; Healy, E.F.; Stewart, J.P.P.

AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model

J. Am. Chem. Soc. 1985, 107, 3902-3909.

Dietl, M.M.; Torrens, Y.

Substance P et tachykinines

in Epelbaum, J.

Neuropeptides et neuromédiateurs

1995, 2, INSERM: Paris, 281-293.

Edmonds-Alt, X.; Advenier, C.; Croci, T.; Manara, L.; Neliat, G.; Poncelet, M.; Proietto, V.; Santucci, V.; Soubrié, P.; Van Broeck, D.; Vilain, P.; Le Fur, G.; Brelière, J.C.

SR 48968, a neurokinin A (NK<sub>2</sub>) receptor antagonist

Regul. Peptides 1993, 46, 31-36.

Edmonds-Alt, X.; Doutremepuich, J.D.; Heaulme, M.; Neliat, G.; Santucci, V.; Steinberg, R.; Vilain, P.; Bichon, D.; Ducoux, J.P.; Proietto, V.; Van Broeck, D.; Soubrié, P.; Le Fur, G.; Brelière, J.C.

In vitro and in vivo biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist

Eur. J. Pharmacol. 1993, 250, 403-413.

Edmonds-Alt, X.; Vilain, P.; Goulaouic, P.; Proietto, V.; Van Broeck, D.; Advenier, C.; Naline, E.; Neliat, G.; Le Fur, G.; Brelière, J.C.

A potent and selective non-peptide antagonist of the neurokinin A (NK2) receptor

Life Sci. 1992, 50, 101-106.

Erspamer, V.

Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin Ann. Rev. Pharmacol. 1971, 11, 327-350.

Erspamer, V.; Anastasi, A.

Structure and pharmacological actions of eledoisin, the vasoactive undecapeptide of the posterior salivatory glands of eledone *Experientia* **1962**, *18*, 58-59.

Erspamer, V.; Anastasi, A.; Bertaccini, G.; Cei, J.M.

Structure and pharmacological actions of physalaemin, the main active polypeptide of the skin of *Physalaemus fuscumaculatus* Experientia **1964**, 20, 489-491.

Fardin, V.; Foucault, F.; Bock, M.D.; Jolly, A.; Flamand, O.; Clerc, F.; Garret, C.

Variations in affinities for the NK1 receptor: differences between the non-peptide substance P antagonist RP 67580 and CP-96,345 and the agonist septide

Regul. Peptides 1993, 46, 300-303.

Folkers, K.; Feng, D.M.; Asano, M.; Hakanson, R.; Weissenfeld-Hallin, Z.; Leander, S.

Spantide II, an effective tachykinin antagonist having high potency and negligible neurotoxicity

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 4833-4835.

Folkers, K.; Hakanson, R.; Horig, H.; Xu, J.C.; Leander, S.

Biological evaluation of SP antagonists

Br. J. Pharmacol. 1984, 83, 449-456.

Fong, T.M.; Cascieri, M.A.; Yu, H.; Bansal, A.; Swain, C.J.; Strader, C.D.

Amino-aromatic interaction between histidine-197 of the neurokinin-1 receptor and CP-96,345

Nature (London) 1993, 362, 350-353.

Fong, T.M.; Huang, R.R.C.; Hino, J.; Yu, H.; Strader, C. Mapping the ligand binding-site of the NK-1 receptor *Regul. Peptides* **1993**, *46*, 43-48.

Fong, T.M.; Yu, H.; Cascieri, M.A.; Underwood, D.; Swain, C.J.; Strader, C.D. Interaction of glutamine 165 in the fourth transmembrane segment of the human neurokinin-1 receptor with quinuclidine antagonists *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 14957-14961.

Frisch, M.; Foresman, J.; Frisch, A.

Gaussian 92

1992, Gaussian, Inc, Carnegie Office Park, Building 6, Pittsburgh, PA 15106, U.S.A.

Frossard, N.; Advenier, C. Tachykinin receptors and the airways *Life Sci.* **1991**, *49*, 1941-1953.

Garret, C.; Caruette, A.; Fardin, V.; Moussaoui, S.; Montier, F.; Peyronel, J.F.; Laduron, P.M.

Antinociceptive properties and inhibition of neurogenic inflammation with potent SP antagonists belonging to perhydroisoindolones *Regul. Peptides* 1993, 46, 24-30.

Gaussian, Inc, Carnegie Office Park, Building 6, Pittsburgh, PA 15106, U.S.A..

Gether, U.; Johansen, T.E.; Snider, R.M.; Lowe III, J.A.; Edmonds-Alt, X.; Yokota, Y.; Nakanishi, S.; Schwartz, T.W.

Binding epitopes for peptides and non-peptides ligands on the NK1 (substance P) receptor

Regul. Peptides 1993, 46, 49-58.

Giannis, A.; Kolter, T.

Peptidomimetics for receptor ligands - discovery, development, and medical perspectives

Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1993, 32, 1244-1267.

Goadsby, P.J., Edvinsson, L.; Ekman, R.

Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system Ann. Neurol. 1988, 23, 193-196.

Goldstein, S.; Neuwels, M.; Moureau, F.; Berckmans, D.; Lassoie, M.A.; Differding, E.; Houssin, R.; Hénichart, J.P.

Bioactive conformations of peptides and mimetics as milestones in drug design: Investigation of NK1 receptor antagonists LIPS 1995, 2, 125-134.

Gorse, A.D.; Gready, J.E.

Ligand docking orientations for DHFR and binding affinity determination The Second Electronic Computational Chemistry Conference, 1-30 Novembre 1995, World-Wide Web.

#### Groves, P.M.

A theory of the functional organization of the neostriatum and the neostriatal control of voluntary movement Brain Res. Rev. 1983, 205, 109-132.

Hagan, R.M.; Beresford, I.J.M.; Stables, J.; Dupere, J.; Stubbs, C.M.; Elliot, P.J.; Sheldrick, R.L.G.; Chollet, A.; Kawashima, E.; McElroy, A.B.; Ward, P. Characterisation, CNS distribution and function of NK2 receptors studied using potent NK2 receptor antagonists Regul. Peptides 1993, 46, 9-19.

Hagiwara, D.; Miyake, H.; Igari, N.; Karino, M.; Maeda, Y.; Fujii, T.; Matsuo,

Studies on neurokinin antagonists. 4. Synthesis and structure-activity relationships of novel dipeptide substance P antagonists N2-[(4R)-4hydroxy-1-[(1-methyl-1H-indol-3-yl)carbonyl]-L-prolyl]-N-methyl-N-(phenylmethyl)-3-(2-naphtyl)-L-alaninamide and its related compounds J. Med. Chem. 1994, 37, 2090-2099.

Hagiwara, D.; Miyake, H.; Igari, N.; Murano, K.; Morimoto, H.; Murai, M.; Fujii, T.; Matsuo, M.

Design of a novel dipeptide substance P antagonist FK888 Regul. Peptides 1993, 46, 332-334.

Hagiwara, D.; Miyake, H.; Morimoto, H.; Murai, M.; Fujii, T.; Matsuo, M. Studies on neurokinin antagonists. 1. The design of novel tripeptides glutaminyl-D-tryptophylphenylalanine sequence possessing the substance P antagonists

J. Med. Chem. 1992, 35, 2015-2025.

Hagiwara, D.; Miyake, H.; Morimoto, H.; Murai, M.; Fujii, T.; Matsuo, M. Studies on neurokinin antagonists. 2. Design and structure-activity relationships of novel tripeptide substance P antagonists,  $N^{\alpha}$ -[ $N^{\alpha}$ -( $N^{\alpha}$ -acetyl-L-threonyl)- $N^1$ -formyl-D-tryptophyl]-N-methyl-N-(phenyl-methyl)-L-phenylalaninamide and its related compounds J. Med. Chem. 1992, 35, 3184-3191.

Hagiwara, D.; Miyake, H.; Murano, K.; Morimoto, H.; Murai, M.; Fujii, T.; Nakanishi, I.; Matsuo, M.

Studies on neurokinin antagonists. 3. Design and structure-activity relationships of new branched tripeptides  $N^{\alpha}$ -(substituted L-aspartyl, L-ornithyl, or L-lysyl)-N-methyl-N-(phenylmethyl)-L-phenylalaninamides as substance P antagonists

J. Med. Chem. 1993, 36, 2266-2278.

Hale, J.J.; Mills, S.G.; McCross, M.; Shah, S.K.; Qi, H.; Mathre, D.J.; Cascieri, M.A.; Sadowski, S.; Strader, C.D.; McIntyre, D.E.; Metzger, J.M. 2(S)-((3,5-bis(trifluoromethyl)benzyl)-oxy)-3(S)-phenyl-4-((3-oxo1,2,4-triazol-5-yl)methyl)morpholine (1): a potent orally active, morpholine-based human neurokinin-1 receptor antagonist *J. Med. Chem.* 1996, 39, 1760-1762.

Hall, J.M.; Caulfield, M.P.; Watson, S.P.; Guard, S. Receptor subtypes or species homologues: relevance to drug discovery *TiPS* **1993**, *14*, 376-383.

Hann, M.M.

Considerations for the use of computational chemistry techniques by medicinal chemists

in King, F.D.

Medicinal chemistry: principles and practice

**1994**, The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 130-142.

Harbeson, S.L.; Shatzer, S.A.; Le, T.B.; Buck, S.H.

A new class of high affinity ligands for the neurokinin A NK2 receptor:  $\psi(\text{CH}_2\text{NR})$  reduced peptide bond analogues of neurokinin A4-10 J. Med. Chem. 1992, 35, 3949-3955.

Harrison, T.; Williams, B.J.; Swain, C.J.; Ball, R.G.

Ether based hNK1 antagonists 1: determination of the relative and absolute stereochemical requirements

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4, 2545-2550.

Hashimoto, M.; Hayashi, K.; Murai, M.; Fujii, T.; Nishikawa, M.; Kiyotoh, S.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Imanaka, H.

WS9326A, a novel tachykinin antagonist isolated from *Streptomyces* violaceusniger no. 9326. II. Biological and pharmacological properties of WS9326A and tetrahydro-WS9326A (FK224)

J. Antibiot. 1992, 45, 1064-1070.

Hermans, E.; Jeanjean, A.P.; Octave, J.N.; Maloteaux, J.M.

Biologie moléculaire des récepteurs aux tachykinines

6èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, 8 et 9 octobre 1992, Bruxelles.

Hipskind, P.A.; Howbert, J.J.; Bruns, R.F.; Cho, S.S.Y.; Crowell, T.A.; Foreman, M.M.; Gehlert, D.R.; Iyengar, S.; Johnson, K.W.; Krushinski, J.H.; Li, D.L.; Lobb, K.L.; Mason, N.R.; Muehl, B.S.; Nixon, J.A.; Lee, A.P.; Regoli, D.; Simmons, R.M.; Threlkeld, P.G.; Waters, D.C.; Gitter, B.D.

3-aryl-1,2-diacetamidopropane derivatives as novel and potent NK-1 receptor antagonists

J. Med. Chem. 1996, 39, 736-748.

Hölzemann, G.

Tachykinin conformations

Kontakte (Darmstadt) 1989, 2, 3-11.

Howard, A.E.; Kollman, P.A.

An analysis of current methodologies for conformational searching of complex molecules

J. Med. Chem. 1988, 31, 1669-1675.

Huang, R.R.C.; Yu, H.; Strader, C.D.; Fong, T.M.

Interaction of substance P with the second and seventh transmembrane domains of the neurokinin-1 receptor *Biochemistry* **1994**, 33, 3007-3013.

Huang, R.R.C.; Yu, H.; Strader, C.D.; Fong, T.M.

Localization of the ligand binding site of the neurokinin-1 receptor: interpretation of chimeric mutations and single-residue substitutions *Mol. Pharmacol.* **1994**, 45, 690-695.

Ichinose, M.; Nakajima, N.; Takahashi, T.; Yamauchi, H.; Inoue, H.; Takishima, T.

Protection agaisnt bradykinin-induced bronchoconstriction in asthmatic patients by neurokinin receptor antagonist *Lancet* 1992, 340, 1248-1251.

165

Jeanjean, A.P.; Hermans, E.; Maloteaux, J.M.

Tachykinines et récepteurs aux tachykinines

6èmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie, 8 et 9 octobre 1992, Bruxelles.

Jessel, T.M.; Iversen, L.L.

Opiates analgesics inhibit substance P release from rat trige-minal nucleus

Nature (London) 1977, 268, 549-551.

Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J.

The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin.

J. Am. Chem. Soc. 1988, 110, 1657.

Josien, H.; Lavielle, S.; Brunissen, A.; Saffroy, M.; Torrens, Y.; Beaujouan, J.C.; Glowinski, J.; Chassaing, G.

Design and synthesis of side-chain conformationally restricted phenylalanines and their use for structure-activities studies on tachykinin NK-1 receptor

J. Med. Chem. 1994, 37, 1586-1601.

Kangawa, K.; Kosawa, H.; Hino, J.; Minamino, N.; Matsuo, H. Four novels tachykinins in frog (*Rana catesbaina*) brain and intestine *Regul. Peptides* **1993**, *46*, 81-88.

Khalil, Z.

Annual report 1993/94

1995, Basic Biology Laboratory, National Ageing Research Institute Incorporated, PO Box 31, Parkville VIC 3052, Australia.

Krimm, S.; Bandekar, J.

Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins

Adv. Prot. Chem. 1986, 38, 181-364.

Labanowski, J.; Motoc, I; Naylor, C.B.; Mayer, D.; Dammkoehler, R.A.

Three-dimensional quantitative structure-activity relationships. 2 Conformational mimicry and topographical similarity of flexibles molecules

Quant. Struct.-Act. Relat. 1986, 5, 138-152.

Ladduwahetty, T.; Baker, R.; Cascieri, M.A.; Chambers, M.S.; Haworth, K.; Keown, L.E.; McIntyre, D.E.; Metzger, J.M.; Owen, S.; Rycroft, W.; Sadowski, S.; Seward, E.M.; Shepheard, S.L.; Swain, C.J.; Tatersall, F.D.; Watt, A.P.; Williamson, D.W.; Hargreaves, R.J.

N-Heteroaryl-2-phenyl-3-(benzyloxy)piperidines: a novel class of potent orally active human NK1 antagonists

J. Med. Chem. 1996, 39, 2907-2914.

Lesyng, B.; McCammon, J.A.

Molecular modeling methods. Basic techniques and challenging problems *Pharmac. Ther.* **1993**, *60*, 149-167.

Lewis, R.T.; McLeod, A.M.; Merchant, K.J.; Kelleher, F.; Sanderson, I.; Herbert, R.H.; Cascieri, M.A.; Sadowski, S.; Ball, R.G.; Hoogsteen, K.

Tryptophan-derivated NK1 antagonists: conformationally constrained heterocyclic bioisosteres of the ester linkage

J. Med. Chem. 1995, 38, 923-933.

Loew, G.H.; Burt, S.K.

Quantum mechanics and the modeling of drug properties in Hansch, C.; Sammes, P.G.; Taylor, J.B.; Ramsden, C.A.

Comprehensive medicinal chemistry

1990, 4, Pergamon Press: Oxford, 105-123.

Lotz, M.; Carson, D.A.; Vaughan, J.H.

Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: neural pathway in pathogenesis of arthritis

Science 1987, 235, 893-895.

Lotz, M.; Vaughan, J.H.; Carson, D.A.

Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes

Science 1988, 241, 1218-1221.

Lowe III, J.A.

Substance P antagonists

Drugs Fut. 1992, 17, 1115-1121.

Lowe III, J.A.; Drozda, S.E.; McLean, S.; Crawford, R.T., Bryce, D.K.; Bordner, J.

N-alkyl quinuclidinium substance P antagonists

Bioorg. Med. Chem. Lett. 1994, 4, 1153-1156.

Lowe III, J.A.; Drozda, S.E.; Snider, R.M.; Longo, K.P., Rizzi, J.P. Nuclear variations of quinuclidine substance P antagonists: 2-diphenylmethyl-1-azabicyclo[3.2.2]nonan-3-amines *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 5, 921-924.

Lowe III, J.A.; Drozda, S.E.; Snider, R.M.; Longo, K.P., Zorn, S.H.; Morrone, J.; Jackson, E.R.; McLean, S.; Bryce, D.K.; Bordner, J.; Nagahisa, A.; Kanai, Y.; Suga, O.; Tsuchiya, M.

The discovery of (2S,3S)-cis-2-(diphenylmethyl)-N-[(2-methoxyphenyl)methyl]-1-azabicyclo[2.2.2]-octan-3-amine as a novel, nonpeptide substance P antagonist *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2591-2600.

Lowe III, J.A.; Snider, R.M. Substance P antagonists Drug News & Perspectives 1992, 5, 223-228.

Lowe III, J.A.; Snider, R.M. The role of tachykinins in pulmonary disease *Ann. Rep. Med. Chem.* **1993**, 28, 99-107.

Mackay, D.H.L.; Cross, A.J.; Hagler, A.T.

The role of energy minimization in simulation strategies of biomolecular systems

in Fasman, G.D.

Prediction of protein structure and the principles of protein conformation

1989, Plenum Publishing Corporation: New York, 317-358.

Maggi, C.A.; Patacchini, R.; Rovero, P.; Giachetti, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists *J. Auton Pharmacol.* **1993**, *13*, 23-93.

Mantyh, C.R.; Gates, T.S.; Zimmerman, R.P.; Welton, M.L.; Passaro, E.P.; Vigna, S.R.; Maggio, S.R.; Kruger, L.; Mantyh, P.W.

Receptor binding sites for substance P, but not for substance K or neuromedin K, are expressed in high concentration by arterioles, venules and lymph nodes in surgical specimens obtained from patients with ulcerative colitis and Crohn disease

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 3235-3239.

Mantyh, P.W.; Johnson, D.J.; Boehmer, C.J.; Catton, M.D.; Vinters, H.V.; Maggio, J.E.; Kruger, L.; Mantyh, P.W.; Too, H.P.; Vigna, S.R.

Substance P receptor binding sites are expressed by glia in vivo after neuronal injury

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 5193-5197.

#### March, J.

Advanced organic chemistry

**1985**, *3*, John Wiley & Sons: New York.

Masu, Y.; Nakayama, K.; Tamaki, H.; Harada, Y.; Kuno, M.; Nakanishi, S. cDNA cloning of bovine substance K receptor through oocytes expression system

Nature (London) 1987, 329, 836-838.

#### McCammon, J.A.

Dynamic simulation and its applications in drug research

in Hansch, C.; Sammes, P.G.; Taylor, J.B.; Ramsden, C.A.

Comprehensive medicinal chemistry

1990, 4, Pergamon Press: Oxford, 125-138.

McCammon, J.A.; Harvey, S.C.

Dynamics of proteins and nucleic acids

1987, Cambridge University Press: Cambridge.

McElroy, E.B.; Clegg, S.P.; Deal, M.J.; Ewan, G.B.; Hagan, R.M.; Ireland, S.J.; Jordan, C.C.; Porter, B.; Ross, B.C.; Ward, P.; Whittington, A.R.

Highly potent and selective heptapeptides antagonists of the neurokinin NK-2 receptor

J. Med. Chem. 1992, 35, 2582-2591.

McLean, S.; Snider, R.M.; Desai, M.C.; Rosen, T.; Bryce, D.K.; Longo, K.P.: Schmidt, A.W.; Heym, J.

CP-99,994, a nonpeptide antagonist of the tachykinin NK<sub>1</sub> receptor *Regul. Peptides* **1993**, *46*, 329-331.

McLeod, A.M.; Cascieri, M.A.; Merchant, K.J.; Sadowski, S.; Hardwicke, S.; Lewis, R.T.; McIntyre, D.E.; Metzger, J.M.; Fong, T.M.; Shepheard, S.; Tattersall, F.D.; Hargreaves, R.; Baker, R.

Synthesis and biological evaluation of NK1 antagonists derived from L-tryptophane

J. Med. Chem. 1995, 38, 934-941.

McLeod, A.M.; Merchant, K.J.; Brookfield, F.; Kelleher, F.; Stevenson, G.; Owens, A.P.; Swain, C.J.; Cascieri, M.A.; Owens, A.P.; Sadowski, S.; Ber, E.; Strader, C.D.; McIntyre, D.E.; Metzger, J.M.; Ball, R.G.; Baker, R.

Identification of L-tryptophan derivatives with potent and selective antagonist activity at the NK1 receptor

J. Med. Chem. 1994, 37, 1269-1274.

Nakanishi, S.; Nakajima, Y.; Yokota, Y.

Signal transduction and ligand-binding domains of the tachykinin receptors

Regul. Peptides 1993, 46, 37-42.

Nemethy, G.; Pottle, M.S..; Scheraga, H.A.

Energy parameters in polypeptides. 9. Updating the geometrical parameters nonbonded interactions, and hydrogen bond interactions for the naturally occurring amino-acids

J. Phys. Chem. 1983, 87, 1883-1887.

Neuwels, M.

1994, UCB S.A. Secteur Pharma, Chemin du Foriest, 1420 Braine-l'Alleud, Belgique.

Neuwels, M., Van de Water, E.

1994, UCB S.A. Secteur Pharma, Chemin du Foriest, 1420 Braine-l'Alleud, Belgique.

Quartara, L.; Fabbri, G.; Ricci, R.; Pattachini, R.; Pestellini, V.; Maggi, C.A.; Pavone, V.; Giachetti, A.; Arcamone, F.

Influence of lipophilicity on the biological activity of cyclic pseudopeptide NK-2 receptor antagonists *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3630-3638.

Randic, M.; Jiang, M.C.; Rusin, K.I.; Cerne, R.; Kolaj, M.

Interactions between excitatory amino acids and tachykinins and long-term changes of synaptic responses in the rat spinal horn Regul. Peptides 1993, 46, 418-420.

Regoli, D.; Nguyen, Q.T.; Jukic, D.; Rouissi, N.

Functional characterization of neurokinin receptors with agonists and antagonists

Regul. Peptides 1993, 46, 287-289.

Rogers, D.F.; Aursudkij, B.; Barnes, P.J.

Effects of tachykinins on mucus secretion in human bronchi in vitro

Eur. J. Pharmacol. 1989, 174, 283-286.

Ryckaert, J.P.; Ciccoti, G.; Berendsen, H.J.C.; States, D.J.; Swaminathan, S.; Karplus, M.

Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes *J. Comp. Phys.* 1977, 23, 327-341.

Sachais, B.S.; Snider, R.M.; Lowe III, J.A.; Krause, J.E.

Molecular basis for the species selectivity of the substance P antagonist CP-96.345

J. Biol. Chem. 1993, 268, 2319-2323.

Saunders, M.; Houk, K.N.; Yun-Dong, W.; Still, W.C.; Lipton, M.; Chang, G.; Guida, W.C.

Conformations of cycloheptadecane. A Comparison of methods for conformational searching

J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 1419-1427.

Schilling, W.; Bittiger, H.; Brugger, F.; Criscione, L.; Hauser, K.; Ofner, S.; Olpe, H.R., Vassout, A.; Veenstra, S.

Approaches towards the design and synthesis of nonpeptidic substance-P antagonists

in Testa, B.; Kyburz, E.; Fuhrer, W.; Giger, R.

Perspectives in medicinal chemistry

1993, Verlag Helvetica Chimica Acta: Basel, 209-220.

Shigemoto, R.; Yokota, Y.; Tsuchida, K.; Nakanishi, S. Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 623-628.

Shimanouchi, T.

Force constants of small molecules

Pure Appl. Chem. 1963, 7, 131-145.

Snider, R.M.; Constantine, J.W.; Lowe III, J.A.; Longo, K.P.; Lebel, W.S.; Woody, H.A.; Drozda, S.E.; Desai, M.C.; Vinick, F.J.; Spencer, R.W.; Hess, H. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor *Science* 1991, 251, 435-437.

Stewart, J.J.P.

MOPAC a semi-empirical molecular orbital program

J. Comput-Aided Mol. Des. 1990, 4, 1-105.

Stewart, J.J.P.

Optimization of parameters for semi-empirical methods I. Methods

J. Comput. Chem. 1989, 10, 209-220.

#### Stewart, J.J.P.

Optimization of parameters for semi-empirical methods II. Applications *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 221-264.

Swain, S.J.; Seward, E.M.; Cascieri, M.A.; Fong, T.M.; Herbert, R.; McIntyre, D.E.; Merchant, K.J.; Owen, S.N.; Owens, A.P.; Sabin, V.; Teall, M.; VanNiel, M.B.; Williams, B.J.; Sadowski, S.; Strader, C.; Ball, R.G.; Baker, R. Identification of a series of 3-(benzyloxy)-1-azabicyclo[2.2.2]-octane human NK1 antagonists

J. Med. Chem. 1995, 38, 4793-4805.

#### SYBYL 6.2 - Molecular modeling software

1995, Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, MO 63144-2913, U.S.A..

Tabart, M.; Peyronel, J.F.

Synthesis of RPR 100893, prototype of a new series of potent and selective non peptide NK1 antagonists: the triarylperhydroisoindolols. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1994**, *4*, 673-676.

Tregear, G.W.; Niall, H.D.; Potts, J.T.; Leeman, S.E.; Chang, M.M. Synthesis of substance P *Nature New Biol.* **1971**, 232, 87-89.

Tristram, F.; Durier, V.; Vergoten, G.

The structures and vibrational frequencies of a series of aliphatic ethers obtained using the spectroscopic potential SPASIBA J. Mol. Struct. 1996, 377, 47-56.

Tristram, F.; Durier, V.; Vergoten, G.

The structures and vibrational frequencies of a series of aliphatic alcohols as obtained using the spectroscopic potential SPASIBA

J. Mol. Struct. 1996, sous presse.

Van Gunsteren, W.F.; Berendsen, H.J.C. Algorithms for macromolecules dynamics and constraints dynamics *Mol. Phys.* **1977**, *34*, 1311-1327.

#### Verlet, L.

Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules *Phys. Rev.* **1967**, *159*, 98-103.

Villani, V.; Tamburro, A.M.

Molecular mechanics calculations of the conformers of the dipeptide Boc-Gly-Leu-NMe and tripeptide Boc-Gly-Leu-Gly-NMe. Searching the conformational space by the build-up method

J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2 1992, 2263-2270.

Vinter, J.G.; Davis, A.; Saunders, M.R.

Strategic approaches to drug design. 1. An integrated software framework for molecular modelling

J. Comput-Aided Mol. Des. 1987, 1, 31-51.

Von Euler, U.S.; Gaddum, J.H.

An unidentified depressor substance in certain tissue extracts

J. Physiol. (London) 1931, 72, 74-87.

Ward, P.; Ewan, G.B.; Jordan, C.C.; Ireland, S.J.; Hagan, R.M.; Brown, J.R.

Potent and highly selective neurokinin antagonists

J. Med. Chem. 1990, 33, 1848-1851.

Watling, K.J.

Nonpeptide antagonists herald new era in tachykinin research

TiPS 1992, 13, 266-269.

Watling, K.J.; Krause, J.E.

The rising sun shines on substance P and related peptides

TiPS 1993, 14, 81-84.

Weiner, P.K.; Kollman, P.A.

AMBER: assisted model building with energy refinement. A general program for modeling molecules and their interactions

J. Comput. Chem. 1981, 2, 287-303.

Weiner, S.J.; Kollman, P.A.; Case, D.A.; Singh, U.C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta Jr, S.; Weiner, P.

A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins

J. Am. Chem. Soc. 1984, 106, 765-784.

Weiner, S.J.; Kollman, P.A.; Nguyen, D.T.; Case, D.A.

An all atom force field for simulations of proteins and nucleic acids

J. Comput. Chem. 1986, 7, 230-252.

Williams, B.J.; Curtis, N.R.; McKnight, A.T.; Maguire, J.J.; Young, S.C.; Veber, D.F.; Baker, R.

Cyclic peptides as selective tachykinin antagonists *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 2-10.

Yokota, Y.; Sasai, Y.; Tanaka, K.; Fujiwara, T.; Tsuchida, K.; Shigemoto, R.; Kakizuka, A.; Ohkubo, H.; Nakanishi, S.

Molecular characterization of functional cDNA for rat substance P precursor

J. Biol. Chem. 1989, 264, 17649-17652.

Yurek, D.M.; Sladek Jr, J.R. Dopamine cell replacement Annu. Rev. Neurosci. 1990, 13, 415-440.

Zimmermann, S.S.; Pottle, M.S.; Nemethy, G.; Scheraga, H.A. *Macromolecules* **1977**, *10*, 1.

### **ANNEXES**

#### **ANNEXES**

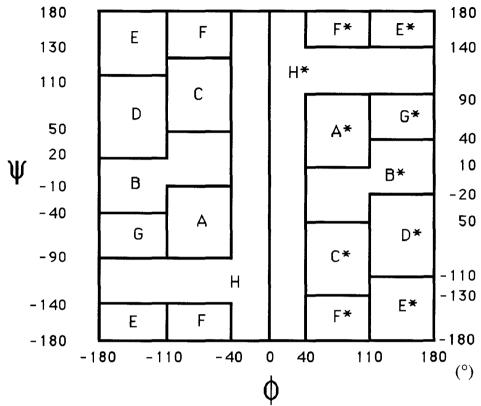


Figure 81 : Carte de Ramachandran donnant le type de conformation d'un résidu d'acide aminé en fonction des valeurs des angles dièdres  $\phi$  et  $\psi$  (Zimmerman et al., 1977).

### **UCB16101**

### TABLE DES MATIERES

#### TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	
L LEG ANTA CONVETED DE LA CUE CELLO DE	
I. LES ANTAGONISTES DE LA SUBSTANCE P	•
I.1 Structure de la substance P	•
I.2 Les tachykinines	•
I.3 Biosynthèse et dégradation des tachykinines	7
I.4 Localisation des tachykinines	8
I.5 Les récepteurs des tachykinines	8
I.5.1 Localisation	9
I.5.2 Structure	10
I.5.3 Transduction du signal	11
I.5.4 Relations structure-fonction	13
I.5.4.1 Fixation des agonistes	13
I.5.4.2 Fixation des antagonistes	15
I.6 Rôle des tachykinines	17
I.7 Antagonistes des tachykinines	20
I.7.1 Antagonistes peptidiques	21
I.7.2 Antagonistes non-peptidiques	26
II. STRATEGIE DE RECHERCHE D'ANTAGONISTES	33
II.1 Stratégie générale	33
II.2 Recherche d'un "lead" peptidique	34
II.3 Analyse conformationnelle	35
II.3.1 Aspect théorique	36
II.3.2 Aspect expérimental	36

II.3.2.1 Spectrométries vibrationnelles infrarouge	
(IR) et Raman	36
II.3.2.2 Spectrométrie de résonance magnétique	
nucléaire	37
II.3.3 Confrontation de la théorie à l'expérience	38
III. LA MODELISATION MOLECULAIRE	40
III.1. Mécanique quantique	40
III.1.1 Méthodes ab initio	40
III.1.2 Méthodes semi-empiriques	42
III.2 Mécanique moléculaire	43
III.2.1 Champ de forces	43
III.2.2 Minimisation de l'énergie	45
III.3 Analyse conformationnelle	47
III.3.1 Recherche conformationnelle systématique	47
III.3.1.1 Recherche systématique (Systematic	
search)	47
III.3.1.2 "Build-up"	48
III.3.2 Recherche conformationnelle aléatoire	49
III.3.2.1 Monte Carlo Metropolis	49
III.3.2.2 Recherche aléatoire (Random search)	50
III.3.2.3 Géométrie de distance (distance	
geometry)	50
III.3.3 Dynamique moléculaire	53
III.3.3.1 Dynamique moléculaire "classique"	55
III.3.3.2 Recuit simulé	56
IV. METHODOLOGIES	58

IV.1 Espaces conformationnels des diastereoisomere (S,S) et		
(S,R)	58	
IV.1.1. Génération des conformations	59	
IV.1.2 Minimisation des énergies		
IV.1.3 Elimination des conformations semblables	61	
IV.1.4 Sélection des chefs de file et constitution des		
familles	62	
IV.1.5 Optimisation par AM1 des espaces		
conformationnels	62	
IV.2 Dynamique moléculaire avec SPASIBA	63	
IV.3 Spectrométries vibrationnelles infrarouge et Raman		
IV.4 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire	64	
V. RESULTATS ET DISCUSSIONS	66	
V.1 Espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,S)	66	
V.1.1 Description des espaces conformationnels	66	
V.1.1.1 Confex	66	
V.1.1.1.1 DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å	66	
V.1.1.1.1 Optimisation sans charges	66	
V.1.1.1.2 Optimisation avec charges		
CNDO - $\varepsilon = 1$	68	
V.1.1.1.3 Optimisation avec charges		
CNDO - $\varepsilon = 4$	68	
V.1.1.1.4 Optimisation avec charges		
CNDO - $\varepsilon = 80$	68	
V.1.1.1.2 DGEOM 90 - RMS = 1,70 Å	69	
V.1.1.1.3 DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å	72	
V 1.1.2 Random search	75	

V.1.1.2.1  RMS = 2,00  A	75
V.1.1.2.2  RMS = 2,50  Å	<b>7</b> 9
V.1.1.3 Dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å	81
V.1.2 Comparaison des espaces conformationnels	84
V.1.2.1 Comparaison de Confex - DGEOM 90 - RMS =	
2,00  Å et Random search - RMS = 2,00  Å	84
V.1.2.2 Comparaison de Confex - DGEOM 90 - RMS =	
2,00  Å et Confex - DGEOM  90 - RMS = 1,70  Å	87
V.1.2.3 Comparaison de Confex - DGEOM 90 -	
RMS = 1,70 Å et Random search - RMS = 2,00 Å	89
V.1.2.4 Comparaison de Confex - DGEOM 95 - RMS =	
2,50  Å et Random search - RMS = 2,50  Å	91
V.1.2.5 Comparaison de Confex - DGEOM 95 - RMS =	
2,50 Å et Dynamique moléculaire - RMS = 2,50 Å	94
V.1.3 Conclusions	97
V.2 Espaces conformationnels du diastéréoisomère (S,R)	98
V.2.1 Description des espaces conformationnels	98
V.2.1.1 Confex	98
V.2.1.1.1 DGEOM 90 - RMS = 2,00 Å	98
V.2.1.1.1 Optimisation sans charges	98
V.2.1.1.1.2 Optimisation avec charges	
CNDO - $\varepsilon = 1$	101
V.2.1.1.1.3 Optimisation avec charges	
CNDO - $\varepsilon = 4$	101
V.2.1.1.1.4 Optimisation avec charges	
CNDO - $\varepsilon = 80$	101
V.2.1.1.2 DGEOM 95 - RMS = 2,50 Å	102
V.3 Optimisation par AM1 des espaces conformationnels	106

V.3.1 Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S)	106
V.3.2 Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R)	108
V.4 Interprétation des spectres infrarouge et Raman	112
V.4.1 Région Amide A	112
V.4.2 Région Amide I	112
V.4.3 Région Amide III	114
V.4.4 Région Amide V	115
V.4.5 Conclusions	115
V.5 Interprétation des spectres de résonance magnétique	
nucléaire	122
V.5.1 Analyse structurale dans le DMSO	122
V.5.2 Analyse structurale dans le chloroforme	127
V.5.3 Analyse conformationnelle dans le chloroforme	130
V.5.4 Analyse conformationnelle dans le DMSO	132
V.5.5 Conclusions	135
V.6 Confrontation des résultats théoriques et expérimentaux	135
V.6.1 Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,S)	137
V.6.2 Espace conformationnel du diastéréoisomère (S,R)	140
V.6.3 Conclusions	142
V.7 Dynamique moléculaire avec SPASIBA	143
V.7.1 Espaces conformationnels du diastéréoisomère	
(S,S)	143
V.7.2 Espaces conformationnels du diastéréoisomère	
(S,R)	147
V.7.3 Conclusions	152
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	154

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157
ANNEXES	176
TABLE DES MATIERES	179