



**HAL**  
open science

# Etude conformationnelle par RMN et Modélisation Moléculaire d'analogues de l'acide glutamique comme sonde de la carboxylase vitamine k dépendante

Valéry Larue

► **To cite this version:**

Valéry Larue. Etude conformationnelle par RMN et Modélisation Moléculaire d'analogues de l'acide glutamique comme sonde de la carboxylase vitamine k dépendante. Chemo-informatique. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), 1996. Français. NNT: . tel-02886244

**HAL Id: tel-02886244**

**<https://hal.science/tel-02886244>**

Submitted on 1 Jul 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE  
PIERRE ET MARIE CURIE**

**Spécialité: Spectrochimie**

présentée par

**VALERY LARUE**

pour obtenir le titre de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VI**

Sujet de la thèse:

**ETUDE CONFORMATIONNELLE PAR RMN ET  
MODELISATION MOLECULAIRE D'ANALOGUES  
DE L'ACIDE GLUTAMIQUE COMME SONDE DE LA  
CARBOXYLASE VITAMINE K DEPENDANTE**

Soutenue le 19 Septembre 1996

Devant le jury composé de

Monsieur	J. C. BELOEIL	
Monsieur	J. P. DOUCET	
Monsieur	D. GENEST	Rapporteur
Monsieur	J. P. GIRAULT	
Madame	M. C. GUILLIN	
Madame	C. HERVE DU PENHOAT	Rapporteur

## TABLE DES MATIERES

Chapitre I – Biologie .....	8
1. La coagulation sanguine .....	9
1.1 Le phénomène de la coagulation .....	9
2. La Vitamine K, l'acide $\gamma$ carboxyglutamique et la Prothrombine.....	10
2.1 Découverte de la Vitamine K .....	10
2.1.1 Historique.....	10
2.2 L'acide 4-carboxyglutamique.....	12
2.3 La Prothrombine .....	14
2.4 Rôle du Gla .....	14
3. Le cycle de la Vitamine K .....	16
3.1. le cycle .....	16
3.2. Enzymes impliquées dans le cycle .....	17
3.2.1. Réduction de la Vitamine K en hydroquinone $KH_2$ .....	17
3.2.2. Réduction de l'époxyde de la Vitamine K (KO) en Vitamine K ...	18
3.2.3. Epoxydation de l'hydroquinone .....	18
4. Le Mécanisme d'époxydation de la Vitamine K.....	18
4.1. Comparaison avec la biotine.....	18
4.2. Le Mécanisme de Suttie et De Metz .....	19
4.3. Le Mécanisme de Dowd .....	21
4.4. Mise en évidence de l'intermédiaire oxygéné .....	21
5. Le Mécanisme de la Carboxylation .....	24
5.1 La stéréochimie.....	24
5.2 Mécanisme d'arrachement du proton .....	25
5.2.1. Mécanisme radicalaire .....	26
5.2.2. Mécanisme ionique .....	26
5.3. Inversion de configuration durant la réaction de carboxylation .....	27
5.4. Site actif de la carboxylase selon Dowd .....	27
6. La Carboxylase .....	28
6.1. Localisation.....	28
6.2. Purification .....	29
6.3. Caractéristique .....	31
7. Les autres facteurs dans la réaction de carboxylation .....	31
7.1 Importance de l'oxygène $O_2$ et du $CO_2$ .....	31
7.2 Importance du milieu et du pH .....	31
8. Les Analogues de la Vitamine K.....	31
8.1. Les analogues actifs .....	31
8.2. Les Inhibiteurs .....	32
9. Les protéines substrats dans la cascade de la coagulation.....	33
9.1. Substrats et Propeptide .....	33
10. Les analogues peptidiques .....	35
10.1. Substrats modèles utilisé <i>in vitro</i> .....	35
10.2. Les inhibiteurs .....	35
10.2.1. Les dérivés aminobutyriques .....	36
10.2.2. Les dérivés glutamiques substitués ou modifiés en position 3 ....	37
10.2.3. Les dérivés glutamiques substitués ou modifiés en position 4 ....	37
10.2.4. Les dérivés glutamiques cycliques ou modifiés en position 2 ....	38
PRESENTATION DU TRAVAIL .....	40
BIBLIOGRAPHIE – Partie biologique .....	45

Chapitre II - RMN ET ANALYSE CONFORMATIONNELLE .....	51
1. Principe de base de la Résonance Magnétique Nucléaire .....	52
1.1. Le phénomène quantique .....	52
1.2. Le principe vectoriel .....	53
1.3. Le déplacement chimique .....	54
1.4. Le couplage spin-spin .....	54
1.5. Les transitions et la relaxation .....	55
1.5.1. Les différentes transitions .....	55
1.5.2. Les interactions créant le phénomène de relaxation .....	56
1.5.3. L'effet Overhauser (NOE) .....	57
2. La RMN à deux dimensions (2D) .....	59
2.1. Le principe de la RMN 2D .....	59
2.2. Les Opérateurs-Produits .....	60
2.3. Notion de cohérence .....	62
2.4. Le cyclage de phase .....	63
2.5. Les gradients de champ .....	63
2.6. Les impulsions sélectives .....	65
2.6.1. Les impulsions préformées .....	65
2.6.2. Les impulsions sélectives de type DANTE .....	65
3. Les expériences de RMN utilisées .....	66
3.1. Détermination des déplacements chimiques $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ .....	66
3.1.1. Séquence simple détection $^1\text{H}$ .....	66
3.1.2. Séquence de suppression du solvant .....	67
3.1.3. COSY gradient .....	68
3.1.4. Séquence DEPT 135 .....	69
3.1.5. Corrélation Proton-Carbone 2D .....	71
3.1.6. Expérience en détection inverse HMQC gradient .....	72
3.2.1. Séquence Inversion-Récupération pour le calcul des $T_1$ .....	75
3.3. Détermination des constantes de couplage $nJ^{1\text{H}-^1\text{H}}$ .....	75
3.3.1. COSY DQF gradient phasée .....	76
3.4. Détermination des constantes de couplage $^3J^{1\text{H}-^{13}\text{C}}$ .....	77
3.4.1. Séquence INEPT .....	77
3.4.2. INEPT Sélectif 2D .....	79
a) Description à l'aide du Modèle Vectoriel .....	80
b) Description par les Opérateurs Produits .....	81
3.4.3. Expérience en détection inverse HMBC gradient .....	83
L'intérêt des méthodes de détection inverse .....	84
3.5. Mise en évidence de la proximité des protons .....	85
3.5.1. Expérience NOEdifférence .....	85
3.5.2. Expérience NOESY .....	85
4. Le principe de l'analyse conformationnelle .....	87
4.1. Conformation des chaînes polypeptidiques .....	89
4.1.2. Les angles $\phi$ et $\psi$ .....	89
4.2. Conformation des analogues de l'acide glutamique .....	92
4.2.1. Les formes E ou T pour les analogues cyclopentaniques .....	92
4.2.2. Les formes chaises des analogues cyclohexaniques .....	94
4.2.3. Les formes décalées pour les analogues linéaires .....	95
4.3. Les équations de type Karplus .....	97



4.3.1. Cas des constantes de couplage homonucléaires .....	98
Equation d'Altona: .....	98
Equation de De-Marco: .....	98
4.4. Pourcentage en solution des différentes conformations .....	100
4.4.1. Cas des analogues cyclopentaniques .....	100
4.4.2. Cas des analogues cyclohexaniques.....	101
4.4.3. Cas des analogues linéaires méthylés .....	101
BIBLIOGRAPHIE – Partie RMN et analyse conformationnelle .....	103
Chapitre III – Modélisation Moléculaire .....	105
1. La modélisation moléculaire .....	106
2. Les méthodes possibles .....	106
2.1. La chimie quantique .....	107
2.2. La mécanique moléculaire .....	107
2.3. La dynamique moléculaire .....	108
3.1. Expression de l'énergie .....	109
3.1.1. Les termes communs du champ de forces .....	110
3.1.2. Déformation des angles dièdres .....	111
3.1.3. Interaction entre atomes non liés .....	111
3.1.3. a-Interaction de van der Waals .....	111
3.1.3. b. Energie électrostatique .....	112
3.2. La constante diélectrique .....	112
3.2.1. Simulation avec la constante diélectrique.....	113
3.2.2. Simulation en présence de solvant.....	113
3.3. L'importance de l'énergie et de la température .....	114
3.3.1. L'énergie en mécanique moléculaire.....	114
3.3.1. La température en dynamique moléculaire.....	115
4. La mécanique moléculaire .....	115
4.1. Les algorithmes de minimisation .....	116
4.1.1. L'algorithme "Steepest Descent" .....	116
4.1.2. L'algorithme "Conjugate Gradients" .....	116
5. La recherche systématique .....	117
6. La dynamique moléculaire .....	118
6.1. Les algorithmes de dynamique moléculaire .....	118
6.3. Le contrôle de la dynamique moléculaire.....	119
6.3.1. Le contrôle du nombre d'atomes .....	120
6.3.2. Le contrôle de l'échantillonnage .....	120
7. Les expériences de dynamique moléculaire .....	121
7.1. Les étapes de la dynamique moléculaire .....	121
7.2. Dynamique moléculaire à température variable .....	122
7.3. Dynamique moléculaire à température constante .....	125
8. Validité des résultats de modélisation .....	126
8.1. Les analogues cyclopentaniques .....	126
8.2. Les analogues cyclohexaniques .....	127
8.3. Les analogues linéaires méthylés.....	127
9. Analyse des structures .....	128
9.1. Classement par familles .....	128
9.2. Les superpositions .....	129
BIBLIOGRAPHIE – Partie Modélisation Moléculaire.....	130
Chapitre IV – Trois Publications .....	132

Chapitre V – Conclusion .....	134
Conclusion .....	135
Perspectives .....	140

## **Chapitre I – Biologie**

# 1. La coagulation sanguine

## 1.1 Le phénomène de la coagulation

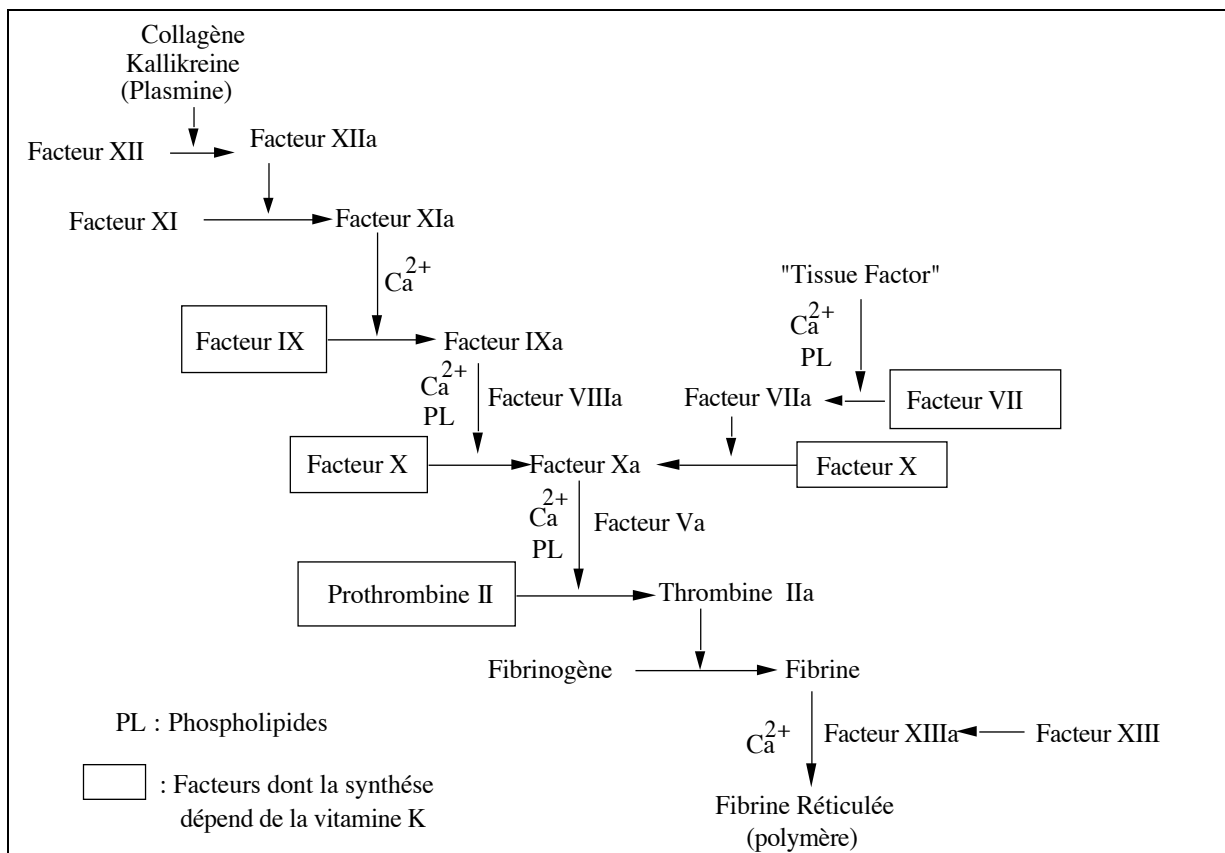
La formation d'un caillot sanguin est initiée par le contact du sang sur une surface "étrangère", c'est-à-dire différente de l'endothélium vasculaire.

La coagulation consiste en une suite de conversions de zymogènes d'enzymes protéolytiques en formes actives correspondantes (dénotées par l'indice "a") (schéma 1). La dernière étape de ce type est l'activation de la prothrombine en thrombine; celle-ci convertit ensuite le fibrinogène en monomères de fibrine qui polymérisent pour former le caillot sanguin. Ce schéma (Schéma 1), appelé "cascade", a été proposé en 1964, par Davie et Ratnoff<sup>(1)</sup> et par Mac Farlane<sup>(2)</sup>.

La coagulation intervient par deux voies:

-la voie **intrinsèque** qui ne met en jeu que des protéines plasmatiques et qui est déclenchée, *in vitro*, par le contact du sang avec une surface chargée négativement (verre, celite, kaolin).

-la voie **extrinsèque** qui fait intervenir, outre des protéines plasmatiques, une lipoprotéine tissulaire, appelée thromboplastine ou facteur tissulaire qui active le facteur VII.



**Schéma 1:** Les deux voies de la coagulation

le système intrinsèque (à gauche) et extrinsèque (à droite)

Ces deux voies convergent au niveau de la formation du facteur Xa; on sait aujourd'hui qu'elles ne sont pas indépendantes et qu'il existe plusieurs inter-relations.

Les différentes protéines mises en jeu, appelées facteurs de la coagulation, se répartissent en deux catégories:

-les zymogènes qui, après clivage limité et spécifique, sont activés en enzymes protéolytiques: la prothrombine (facteur II), les facteurs VII, IX, X, XI, XII, XIII et la prékallikréine.

-les cofacteurs protéiques comme les facteurs Va, VIIIa et la thromboplastine, qui n'ont pas d'activité enzymatique connue, mais sont considérés comme des accélérateurs de la réaction d'activation.

Une des caractéristiques majeures de cette cascade de réactions enzymatiques est qu'elle intervient non pas en phase liquide dans le plasma mais au contact des membranes des plaquettes et de l'endothélium vasculaire. Les phospholipides négatifs de ces membranes sont indispensables à l'activation de tous les facteurs de la coagulation et les ions  $Ca^{2+}$  sont essentiels pour assurer la liaison de ces facteurs aux phospholipides membranaires.

Parmi les facteurs de la coagulation, c'est certainement la prothrombine qui a fait l'objet des études les plus poussées.

## **2. La Vitamine K, l'acide $\gamma$ carboxyglutamique et la Prothrombine**

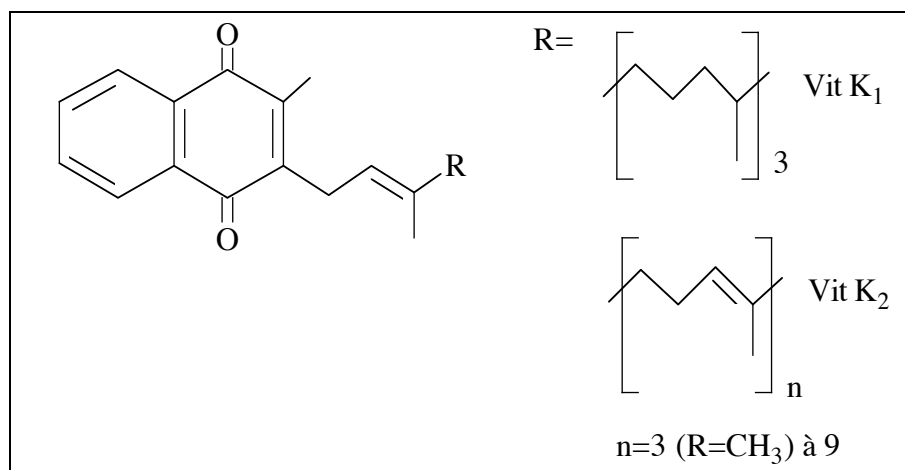
### **2.1 Découverte de la Vitamine K**

#### **2.1.1 Historique**

Dans les années 1929-1935, Dam et Coll, observant que des poulets soumis à un régime carencé en lipides présentaient des hémorragies et des temps de coagulation très longs, furent amenés à postuler l'existence d'une nouvelle vitamine liposoluble baptisée vitamine K (K pour "koagulation")<sup>(3,4)</sup>..

La vitamine K<sub>1</sub>, ou phylloquinone, fut isolée de la luzerne en 1939<sup>(5)</sup>. Sa structure fut déterminée par McCorquodale<sup>(6)</sup>.

Un second type de vitamine K, la vitamine K<sub>2</sub> ou ménaquinone fut isolée presque simultanément à partir de farine de poissons putréfiés et de certaines bactéries<sup>(7)</sup> (Figure 1).



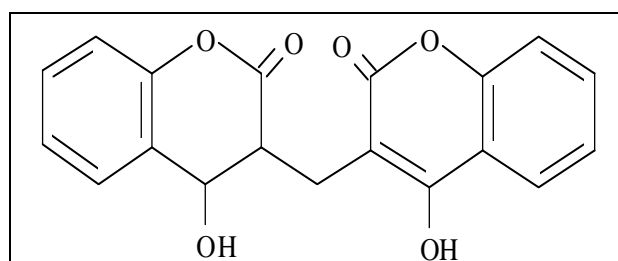
**Figure 1:** Structure des Vitamines K<sub>1</sub> et K<sub>2</sub>

Les vitamines K<sub>1</sub> et K<sub>2</sub> présentent une structure commune 1,4-naphtoquinone substituée par un méthyle en 2 et par un groupe phytyle (vitamine K<sub>1</sub>) ou par une chaîne polyprénique (vitamine K<sub>2</sub>) en position 3. Ces chaînes sont sans doute impliquées dans l'ancrage de la molécule dans la membrane lipidique.

En 1936, la déficience en vitamine K fut reliée à une diminution du taux de prothrombine<sup>(3,8,9)</sup>. En 1941, Campbell et Link isolent et caractérisent un antagoniste de la vitamine K, le dicoumarol (3, 3'-méthylène bis(4 hydroxycoumarine)<sup>(10)</sup>.

Cet anticoagulant va fournir un outil nouveau pour l'étude de la coagulation et va permettre de découvrir l'existence de trois autres facteurs vitamine K dépendants: les facteurs VII, IX et X. Mais il fallut attendre 1963 pour que Hemker décrive l'accumulation d'une prothrombine anormale chez des patients traités par le dicoumarol<sup>(11)</sup>(Figure 2) .

Enfin, en 1971, Shah et Suttie montrèrent que la vitamine K participe à la maturation de la préprothrombine en prothrombine<sup>(12,13)</sup>.



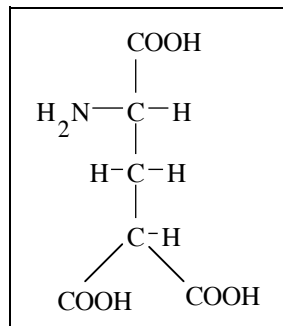
**Figure 2:** Le dicoumarol

## 2.2 L'acide 4-carboxyglutamique

L'étude de la préprothrombine (qualifiée de prothrombine "anormale") montre qu'elle a apparemment la même composition en acides aminés que la prothrombine et qu'elle est reconnue par les anticorps antiprothrombine. En revanche, leurs points isoélectriques sont différents et la préprothrombine ne s'absorbe pas sur citrate de baryum, de plus, elle n'est pas activable en thrombine<sup>(14-16)</sup> dans les conditions physiologiques.

En 1974, Stenflo et ses collaborateurs proposèrent l'existence d'un nouvel acide aminé, non codé par l'ADN et présent dans la prothrombine: l'acide 4-carboxyglutamique noté "Gla"<sup>(17)</sup>(Figure 3). C'est en isolant un peptide correspondant aux acides aminés 6-9 de la prothrombine de boeuf soit Leu<sup>6</sup>-Glu<sup>7</sup>-Glu<sup>8</sup>-Val<sup>9</sup> qu'ils montrèrent, grâce à la RMN et la spectrométrie de masse, que les deux résidus d'acide glutamique en 7 et 8 étaient carboxylés (incorporation d'un groupement carboxyle sur le carbone  $\gamma$  du Glu) alors qu'ils restaient non carboxylés dans la prothrombine "anormale"<sup>(17)</sup>.

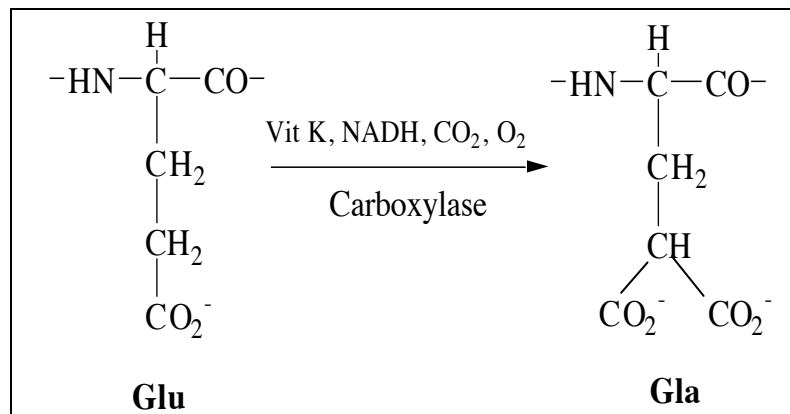
L'acide 4-carboxyglutamique noté "Gla" fut caractérisé par Nelsestuen<sup>(18)</sup> et Magnuson<sup>(19)</sup>. La nature malonique du Gla, sensible au milieu acide, explique qu'il ait échappé si longtemps à toute détection car il se décarboxyle facilement pour redonner le Glu.



**Figure 3:** L'acide 4-carboxyglutamique ou Gla

La spectrométrie de masse a montré que les dix (prothrombine) à douze (facteur X) premiers résidus d'acide glutamique de la séquence N-terminale sont substitués par des acides  $\gamma$  carboxyglutamiques dans la prothrombine normale, alors que la prothrombine "anormale", c'est à dire induite par le traitement au dicoumarol, possède dix résidus d'acide glutamique aux positions correspondantes<sup>(19,20)</sup>.

Il est clair maintenant que la carboxylation de 10 à 12 résidus d'acide glutamique dans les protéines considérées constitue la modification dépendant de la vitamine K, modification qui intervient dans une étape post-traductionnelle.



**Figure 4:** Passage du Glu en Gla

Ces résidus "Gla" sont des sites de fixation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui vont permettre la liaison des protéines de la coagulation aux phospholipides membranaires. L'acide  $\gamma$  carboxyglutamique a également été mis en évidence dans d'autres facteurs de la coagulation facteurs X, IX, VII, la protombine II<sup>(21-24)</sup> ainsi que dans trois protéines plasmatiques les protéines C<sup>(25)</sup>, S<sup>(26)</sup> et Z<sup>(27)</sup>.

De plus, il semble aussi que l'acide  $\gamma$  carboxyglutamique soit présent dans de nombreuses autres protéines ou récepteurs (Tableau 1 ci-dessous) qui ont en commun la propriété de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$  et peuvent jouer des rôles divers aussi bien dans la calcification osseuse, la régulation rénale ou dans la prolifération cellulaire du cancer<sup>(29-32)</sup>.

**Tableau I:** Les principales protéines ou tissus à Gla

<b>protéines ou tissus</b>	<b>fonctions</b>	<b>ref</b>
facteur VII facteur IX facteur X prothrombine	coagulation sanguine " " "	(21-24)
protéine C et S	antithrombose + participation au système du complément	(25,26)
protéine Z	inconnue	(27)
ostéocalcine "Matrix Gla protéin"	calcification des tissus osseux	(28,29)
dentine	calcification des dents	(30-32)
plaque	calcification	(33,34)



athérosclérotique		
reins, calculs rénaux	régulation de la formation des calculs	(35,36)
placenta	inconnue	(37)
rate	"	(38)
pancréas	"	(39)
poumon	"	(40)
spermatozoïde	"	(41)
ribosome d'E.coli	inconnue	(42-44)
ribosome de mammifère		
cellules tumorales	inconnue	(45-48)
toxines de venin de Conidae	inconnue	(49)

### 2.3 La Prothrombine

Le facteur de la coagulation le plus étudié jusqu'à présent est la prothrombine car il est l'un des plus abondants (100 mg/litre). En 1975, Magnusson et ses collaborateurs<sup>(50)</sup> ont établi la séquence complète de la prothrombine bovine. Il s'agit d'une glycoprotéine de poids moléculaire 72000 daltons, constituée par une seule chaîne polypeptidique.

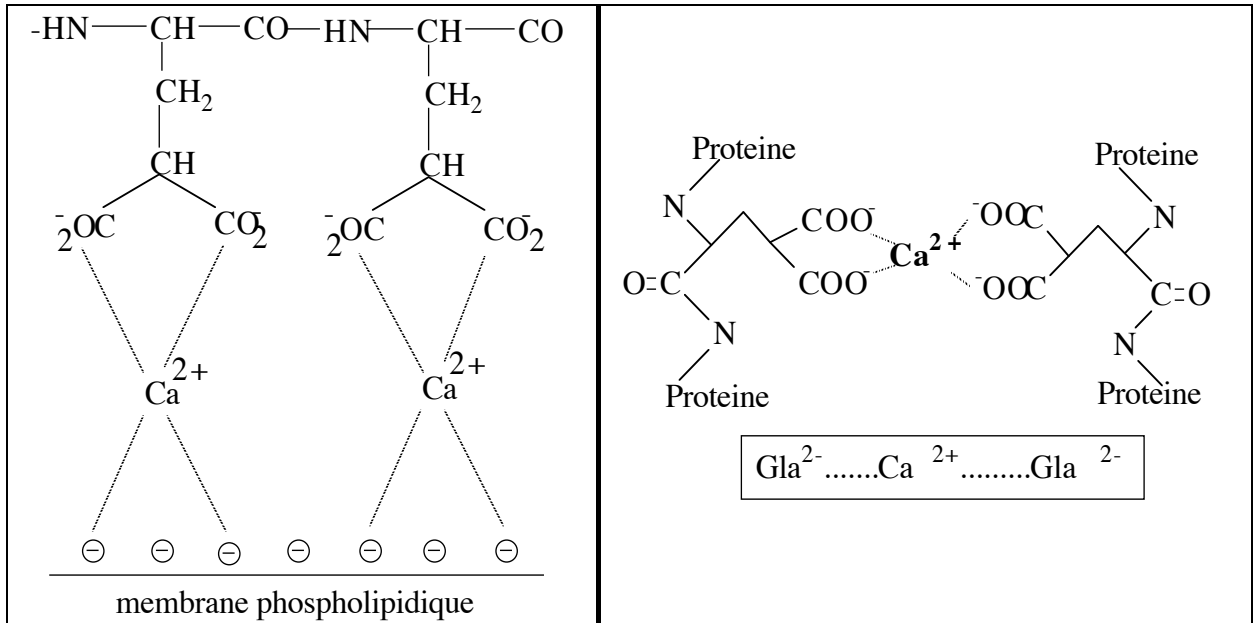
Elle comporte 582 acides aminés et 12% de sucres répartis en trois chaînes oligosaccharidiques liées à la protéine au niveau de trois résidus asparagine (Asn77, 101, et 376). Ces chaînes sont constituées de trois types de sucres: galactose, mannose et glucosamine, et terminées par des résidus d'acide sialique<sup>(51)</sup>.

Au cours de son activation en thrombine au sein du complexe facteur Va-phospholipides-Ca<sup>2+</sup>-prothrombine (facteur II), il y a coupure de la prothrombine en trois fragments en présence du facteur Xa. La thrombine correspond à la partie C-terminale de la prothrombine.

### 2.4 Rôle du Gla

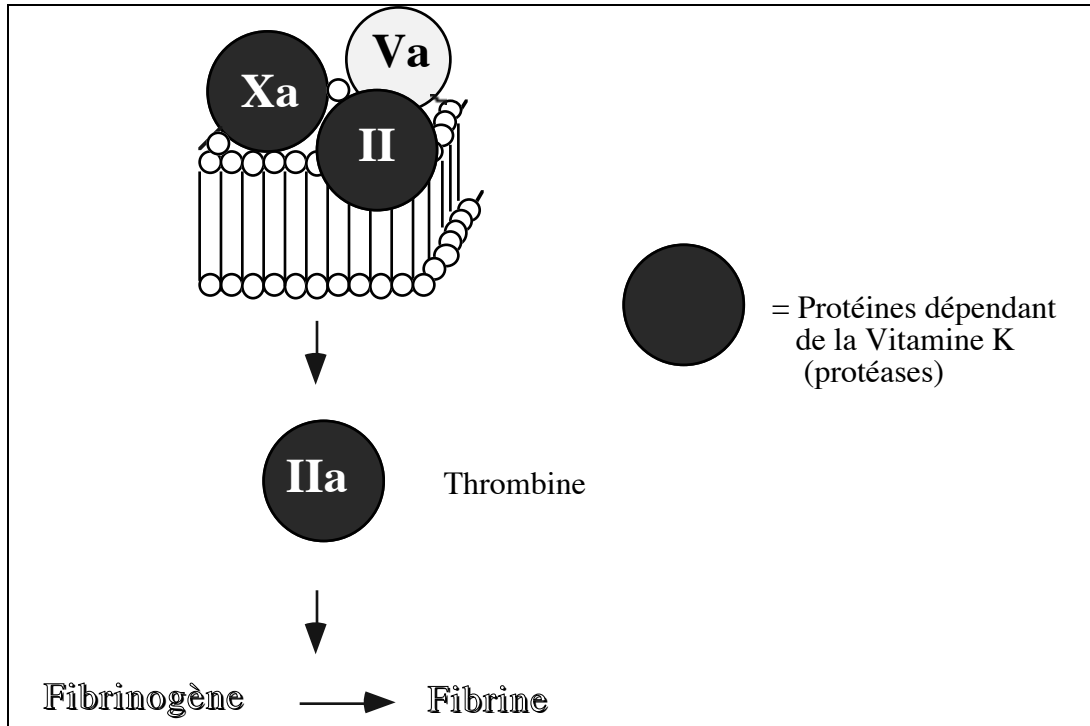
Il a été démontré que les résidus Gla peuvent chélater les ions Ca<sup>2+</sup><sup>(52)</sup> et ainsi permettre la liaison des protéines qui en possèdent aux phospholipides négatifs des membranes plaquettaires pour l'activation des facteurs de la coagulation. En effet, les ions Ca<sup>2+</sup> inhibent la précipitation des sels de calcium<sup>(53)</sup> et s'adsorbent sur l'hydroxyapatite (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>). De plus, le dipeptide Gla-Gla possède une affinité pour le calcium 100 fois supérieures à celle de l'acide aminé seul<sup>(54)</sup>.

Sur la base de ces résultats, un rôle de chélatant des ions  $\text{Ca}^{2+}$  a été proposé pour les couples Gla-Gla<sup>(55)</sup>. Les travaux invoquent une proximité conformationnelle des motifs glutamique qui pourrait induire une conformation particulière à la protéine. Cette structure Gla- $\text{Ca}^{2+}$ -Gla pourrait ressembler à un pont disulfure bien connu dans les protéines<sup>(56)</sup>.



**Figure 5:** Formation du complexe par chélation des ions  $\text{Ca}^{2+}$  par le Gla

Au niveau des facteurs de la coagulation sanguine, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  entraînent la formation d'un complexe quaternaire (prothrombine-facteur Va-calcium-phospholipides membranaires) qui provoque un changement de conformation de la protéine<sup>(42-44)</sup>. C'est à la surface de ces membranes qu'a lieu la formation de complexes responsables de l'activation de chaque facteur de la coagulation. Chacun de ces complexes est constitué d'une protéase et d'un cofacteur, notamment les facteurs Xa (protéase) et Va (cofacteur) pour l'activation de la prothrombine (II) en Thrombine (IIa). Ainsi, la prothrombine est activée en thrombine au cours de trois coupures protéasiques successives<sup>(57)</sup>. Cette cascade entraîne la formation de thrombine qui assure la dégradation du fibrinogène en fibrine. Lors de l'activation de la prothrombine, la thrombine (IIa) ayant perdu le domaine à "Gla" de liaison à la membrane est libérée en solution pour exercer son activité sur le fibrinogène plasmatique.



**Figure 6:** Complexes d'activation du facteur II au niveau de la cascade de la coagulation sanguine

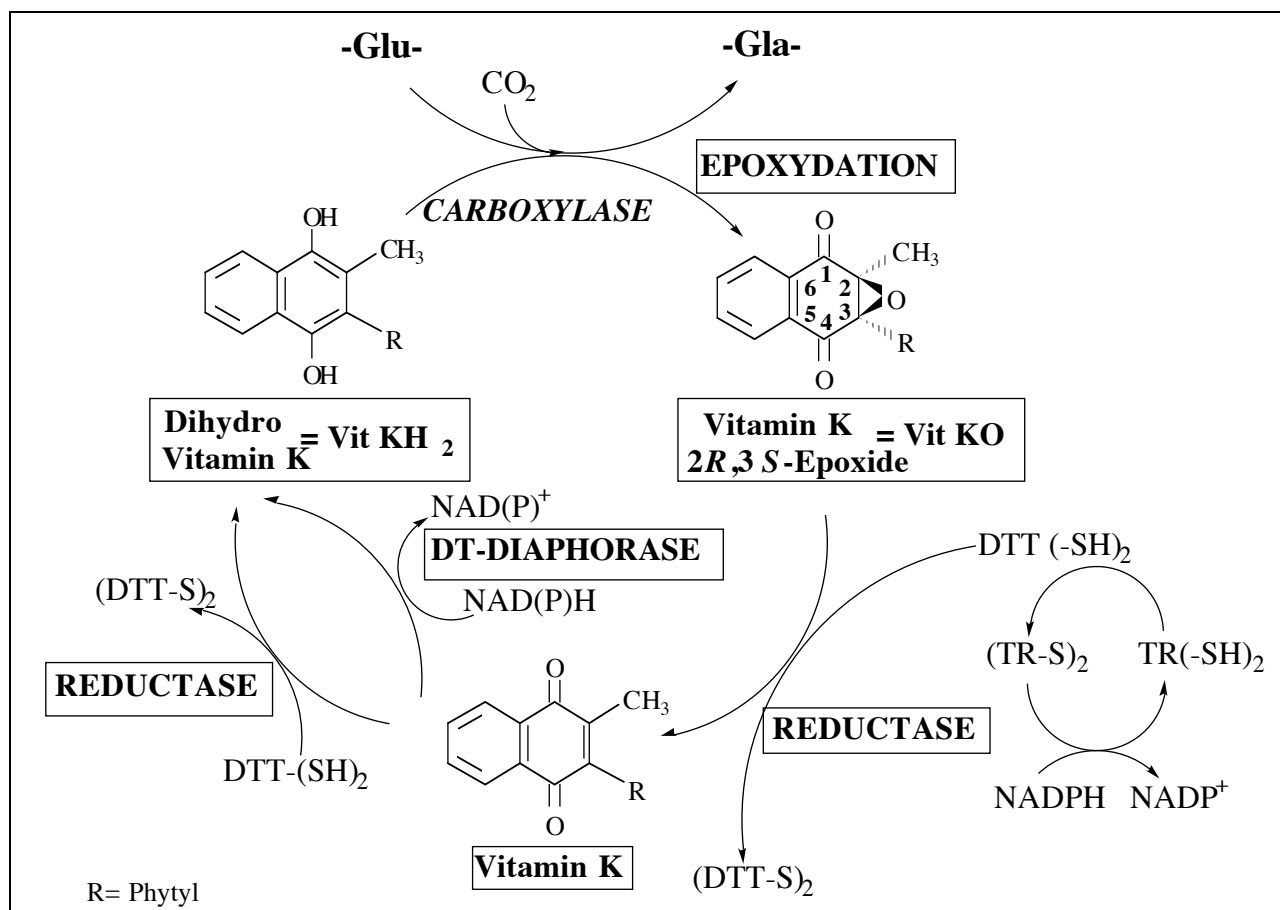
### 3. Le cycle de la Vitamine K

#### 3.1. le cycle

Dans l'organisme, trois formes de vitamine K ont été mises en évidence:

- quinone (K) en 1935
- 2-3 époxyde (KO) en 1970
- hydroquinone (KH<sub>2</sub>) en 1976

Des calculs basés sur la quantité quotidienne de vitamine K nécessaire à la formation des résidus Gla, montrent que chaque molécule de vitamine K doit être recyclée plusieurs milliers de fois avant d'être métabolisée et excrétée. Un cycle mentionnant ces trois formes a été proposé.



**Figure 7:** Cycle de la Vitamine K

### 3.2. Enzymes impliquées dans le cycle

#### 3.2.1. Réduction de la Vitamine K en hydroquinone KH<sub>2</sub>

Deux réductases sont impliquées dans le cycle de la vitamine K

1) Une réductase dépendant du  $\text{NAD(P)H}$  <sup>(58)</sup> (DT-Diaphorase), insensible aux anticoagulants coumariniques <sup>(59)</sup> et qui est localisée au niveau des membranes des mitochondries. La réduction catalysée par cette enzyme n'est qu'une voie mineure de la formation de  $\text{KH}_2$ .

2) Une autre réductase utilise le DTT (Dithiothréitol) *in vitro* et probablement la thiorédoxine *in vivo* <sup>(60)</sup>. C'est cette étape qui est sensible aux dérivés coumariniques. Cette activité réductase dépendant du DTT est exclusivement associée à la membrane pour la régénération de  $\text{KH}_2$ .

### 3.2.2. Réduction de l'époxyde de la Vitamine K (KO) en Vitamine K

Cette étape fait intervenir l'époxyde réductase de la vitamine K<sup>(61)</sup>. *In vitro*, cette activité dépend du DTT et son cofacteur *in vivo* pourrait être aussi la thiorédoxine. Il a été montré *in vitro*, que la thiorédoxine couplée à la thiorédoxine réductase pouvait remplacer le DTT et ce pour les deux étapes de réduction de la vitamine K<sup>(60,62,63)</sup>.

Ces deux étapes qui dépendent du DTT *in vitro*, sont la cible *in vivo* des anticoagulants coumariniques dont le mécanisme d'action n'est que partiellement résolu<sup>(64,65)</sup>. Ces drogues provoquent alors une accumulation de vitamine K sous forme époxyde empêchant la régénération de la Vitamine K ainsi que la carboxylation de résidus glutamiques et donc la maturation des facteurs de la coagulation.

### 3.2.3. Epoxydation de l'hydroquinone

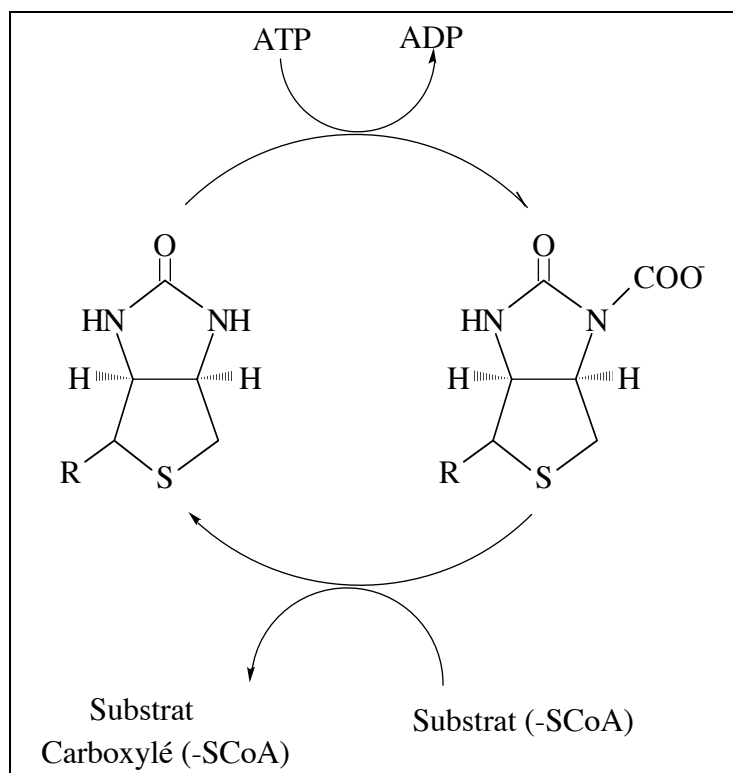
La découverte d'une époxydase de la Vitamine K en 1974 a permis de mettre en évidence l'oxydation de KH<sub>2</sub> en KO<sup>(66)</sup>. L'oxydation de l'hydroquinone de la vitamine K apporte l'énergie nécessaire à la carboxylation de résidus glutamiques<sup>(67)</sup>. De plus, ces deux réactions sont effectuées par une seule enzyme, la carboxylase. Un parallèle existe entre époxydation et carboxylation. Leurs activités sont localisées dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER)<sup>(68,69)</sup>. Elles nécessitent la présence de la vitamine K sous forme réduite. Elles ont le même Km vis-à-vis de l'oxygène et répondent de manière identique aux ions Mn<sup>2+</sup> et aux anticoagulants de type Chloro K ou tétrachloropyridinol<sup>(70-72)</sup>.

Le rapport époxydation-carboxylation est égal à 1 lorsqu'il y a concentration saturante d'oxygène et forte concentration de CO<sub>2</sub>. Si la carboxylation implique l'époxydation de la vitamine K, en revanche, à faible concentration en CO<sub>2</sub> ou en présence de cyanure, l'époxydation peut avoir lieu sans carboxylation<sup>(73)</sup>.

## 4. Le Mécanisme d'époxydation de la Vitamine K

### 4.1. Comparaison avec la biotine

Il existait une ressemblance entre les carboxylations dépendant de la biotine et les carboxylations dépendant de la vitamine K. Wilson et ses collaborateurs<sup>(74)</sup> proposèrent alors un mécanisme faisant intervenir un intermédiaire hydroperoxyde de la vitamine K carboxylée.



**Figure 8:** Carboxylation dépendant de la Biotine

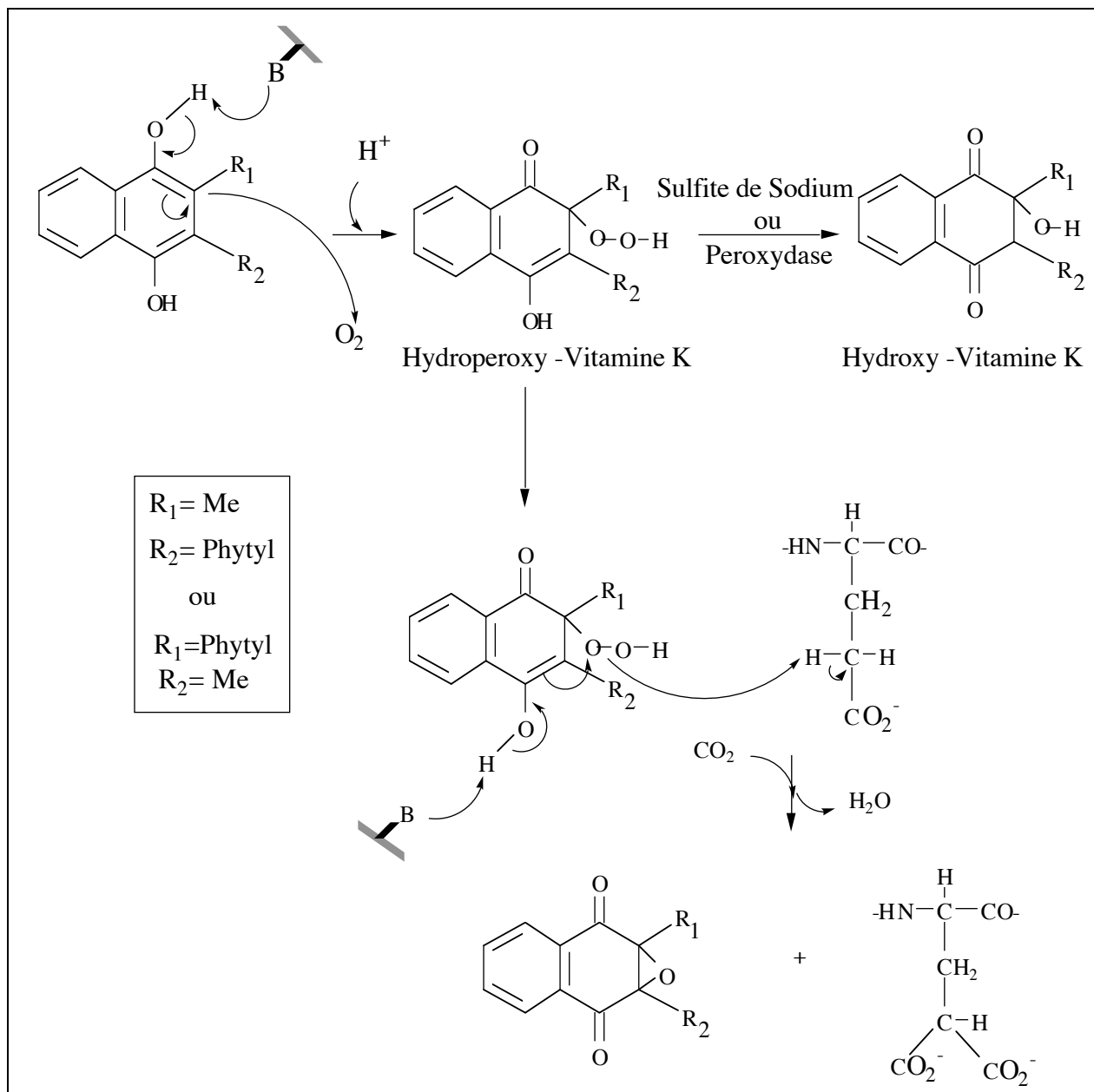
Les intermédiaires hydroperoxyde de la vitamine K carboxylée n'ayant jamais été mis en évidence, cette hypothèse n'a pas été retenue par la suite. Il est apparu, très vite, que les carboxylations dépendant de la vitamine K étaient indépendantes de la biotine<sup>(75)</sup> car la réaction n'est pas inhibée par l'avidine qui lie la biotine avec une forte affinité<sup>(75)</sup>. La carboxylation dépendant de la vitamine K ne dépend ni de l'ATP, ni du coenzyme A et utilise le dioxyde de carbone comme source de  $\text{CO}_2$ <sup>(76,77)</sup>.

Deux autres mécanismes ont alors été proposés pour l'époxydation de la vitamine K couplée à la carboxylation des résidus Glu dans le but d'établir le mécanisme d'action de la Vitamine K dans la réaction de carboxylation et d'époxydation.

#### 4.2. Le Mécanisme de Suttie et De Metz

Suttie et ses collaborateurs proposèrent en 1978, l'intervention d'un dérivé hydroperoxyde de la vitamine K pour l'arrachement du proton en  $\gamma$  des résidus glutamiques<sup>(78)</sup>. De Metz et al. ont également montré la formation d'hydroxy-vitamine K, par addition de peroxydase ou de sulfite de sodium, au milieu enzymatique<sup>(79)</sup>.

Sur la base de ces résultats, ils proposèrent le mécanisme suivant pour expliquer le couplage époxydation/carboxylation.

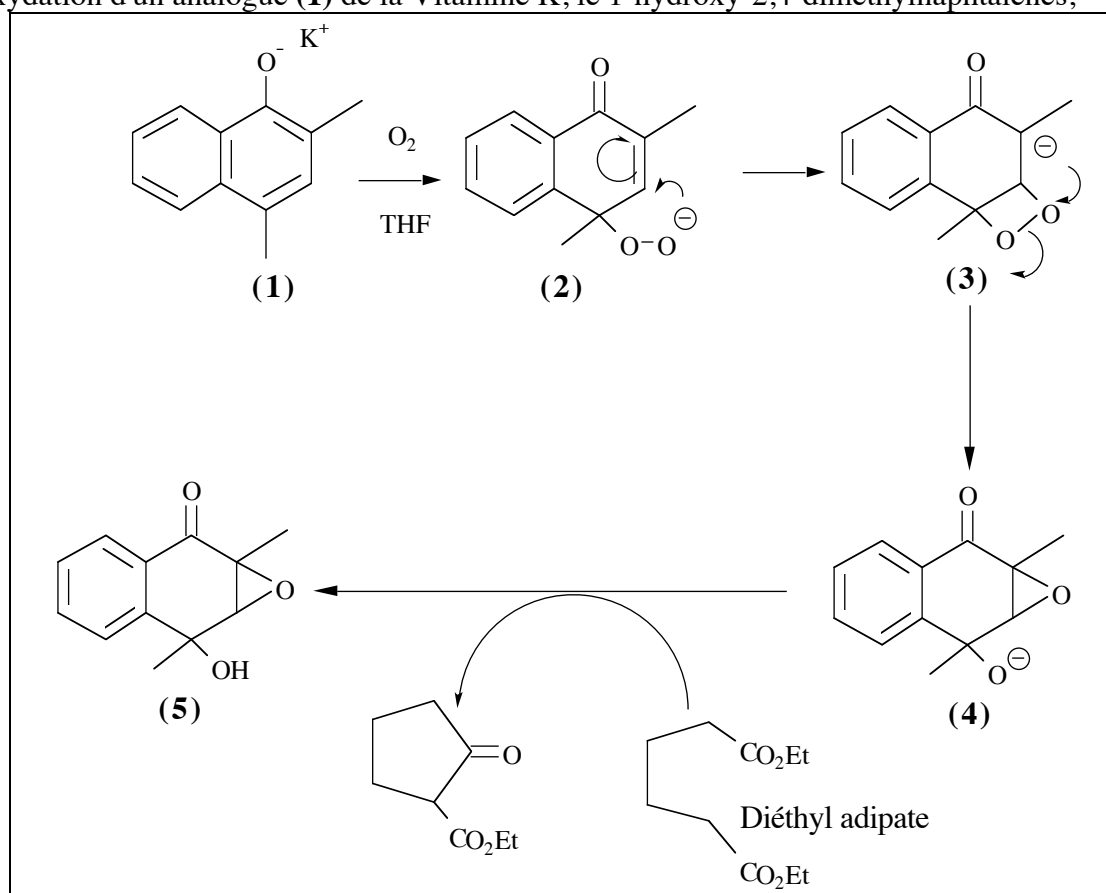


**Figure 9:** Mécanisme de Suttie et De Metz.

Dans ce mécanisme, le rôle de la carboxylase serait de coupler la coupure de l'hydroperoxyde à la libération d'un ion hydroxyle, responsable de l'arrachement du proton en  $\gamma$ . Le sulfite de sodium stimulerait cette coupure et libérerait massivement l'ion hydroxyle<sup>(79)</sup>. Le produit de la réaction dans ce cas, est l'hydroxy-vitamine K et non l'époxyde.

### 4.3. Le Mécanisme de Dowd

Un second mécanisme faisant intervenir un intermédiaire dioxétane pour l'époxydation de la vitamine K a été proposé plus récemment. Dowd et ses collaborateurs<sup>(80)</sup> ont montré que l'oxydation d'un analogue **(1)** de la Vitamine K, le 1-hydroxy-2,4-diméthyl-naphtalène,



**Figure 10:** Mécanisme de Dowd et passage au dioxétane.

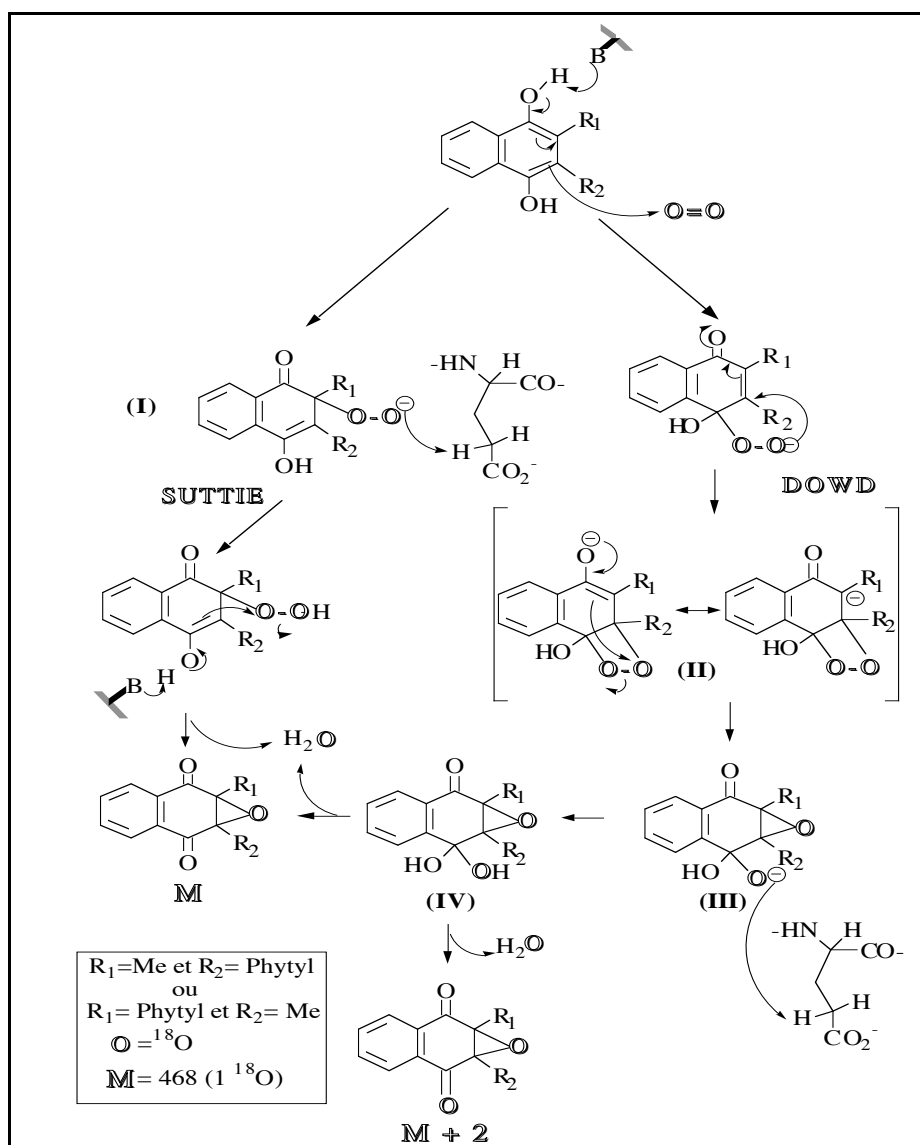
vraisemblablement en hydroperoxyde **(2)** pouvait conduire via un dioxétane intermédiaire **(3)**, à l'époxyde **(5)** et à la cyclisation du diéthyladipate. Sur la base de ce modèle, Dowd et al<sup>(80,81)</sup> proposèrent alors que le rôle de l'oxygène moléculaire, serait de transformer l'intermédiaire résultant de l'ionisation de l'hydroquinone de la vitamine K, en une espèce fortement basique analogue à **4** où l'anion serait capable d'arracher le proton en  $\gamma$  des résidus glutamiques. L'intermédiaire clé de ce réarrangement serait un dioxétane analogue à **3**.

### 4.4. Mise en évidence de l'intermédiaire oxygéné

Ces deux mécanismes (Figure 11 ci-dessous) présentent la formation d'un dérivé époxyde, mais l'hypothèse de Dowd se distingue de celle de Suttie par la participation ou non



d'un groupement carbonyle en C<sub>1</sub> (ou en C<sub>4</sub>) de la vitamine K durant le mécanisme et qui passe inévitablement par un intermédiaire dioxetane.

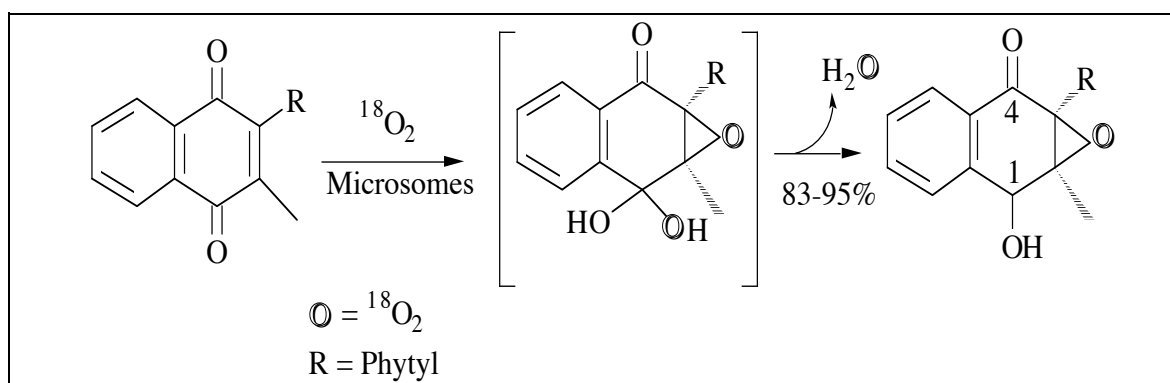


**Figure 11:** Hypothèse de Suttie et Dowd (Comparaison)

Afin de tester ces deux mécanismes, des études réalisées en présence d'oxygène 18 ont été réalisées et suivies par spectrométrie de masse.

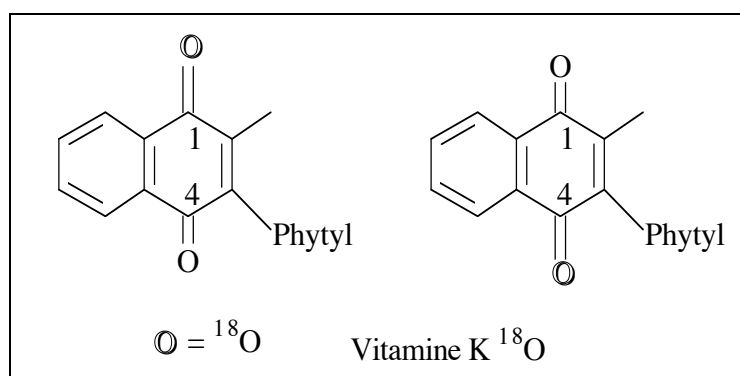
Sadowski et Suttie<sup>(82)</sup> furent les premiers à visualiser l'incorporation d'un oxygène 18 au niveau de l'époxyde de la Vitamine K. Ces auteurs n'ont pas cherché alors à mettre en évidence l'incorporation d'un deuxième oxygène et c'est en 1991 que Dowd<sup>(81)</sup> réexamina leurs analyses pour voir si un second oxygène 18 était présent dans KO. En présence d'oxygène 18, ils démontrèrent que la faible incorporation d'oxygène en 1 pourrait être dûe à

une déshydratation non-spécifique de l'hydroxyle en cis de l'époxyde, par la carboxylase<sup>(83,84)</sup>.



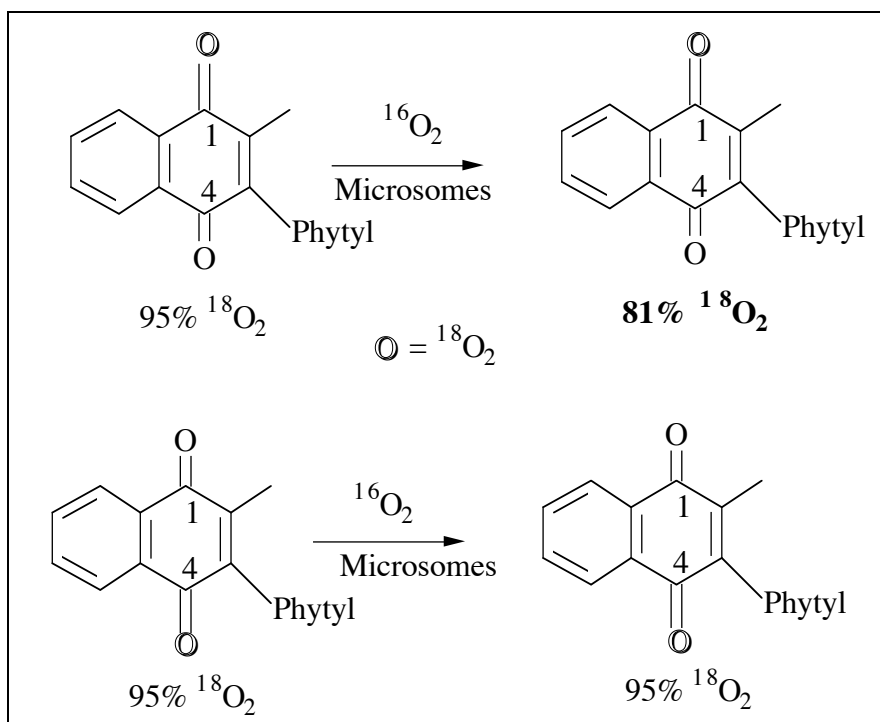
**Figure 12:** Incorporation partielle d'oxygène en 1 et deshydratation de l'intermédiaire

En 1994, Naganathan et Dowd<sup>(85,86)</sup> ont décrit alors la synthèse chimique de deux échantillons de vitamine K enrichies en oxygène 18 au niveau des deux groupes carboxyles.



**Figure 13:** Deux échantillons de la Vitamine K enrichie en  $\text{O}^{18}$

Au cours d'expériences de carboxylation, ils montrèrent que l'oxygène 18 du carbonyle 1 (du côté du méthyle) est spécifiquement échangé à 17% avec l'oxygène 16, alors qu'aucun échange n'était observé pour l'isomère enrichi en  $\text{O}^{18}$  au niveau du carbonyle 4 (côté phytol).



**Figure 14:** Echange spécifique de l'oxygène en 1 de la Vitamine K

Dans l'hypothèse de Dowd, c'est l' $\text{O}^{18}$  en échange avec l' $\text{O}^{16}$  qui serait l'oxygène intervenant dans l'intermédiaire dioxétane II (Figure 11) alors que l'oxygène en position 4 ne peut s'échanger car stable.

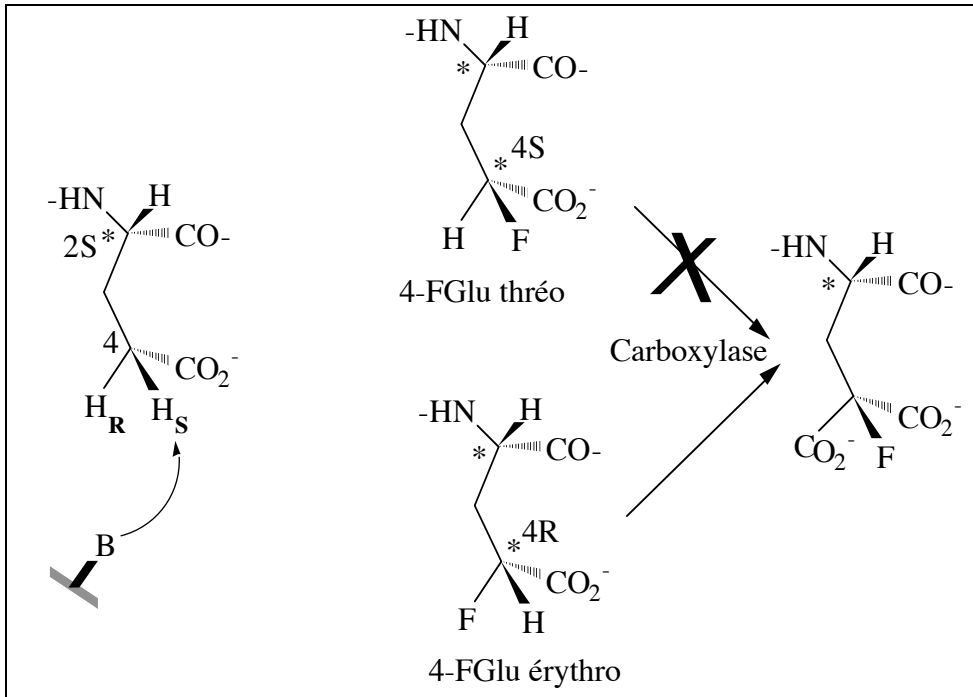
Cette expérience montre que l'intermédiaire serait le dioxétane II. Ce mécanisme ferait intervenir le carbonyle 1 du côté du méthyle dans le mécanisme de Dowd alors que dans celui de Suttie, aucun échange n'intervient au niveau des deux carbonyles en position 1 et 4.

Ces expériences démontrent donc que c'est du côté du groupe méthyle que ce fait la réaction avec l'oxygène moléculaire.

## 5. Le Mécanisme de la Carboxylation

### 5.1 La stéréochimie

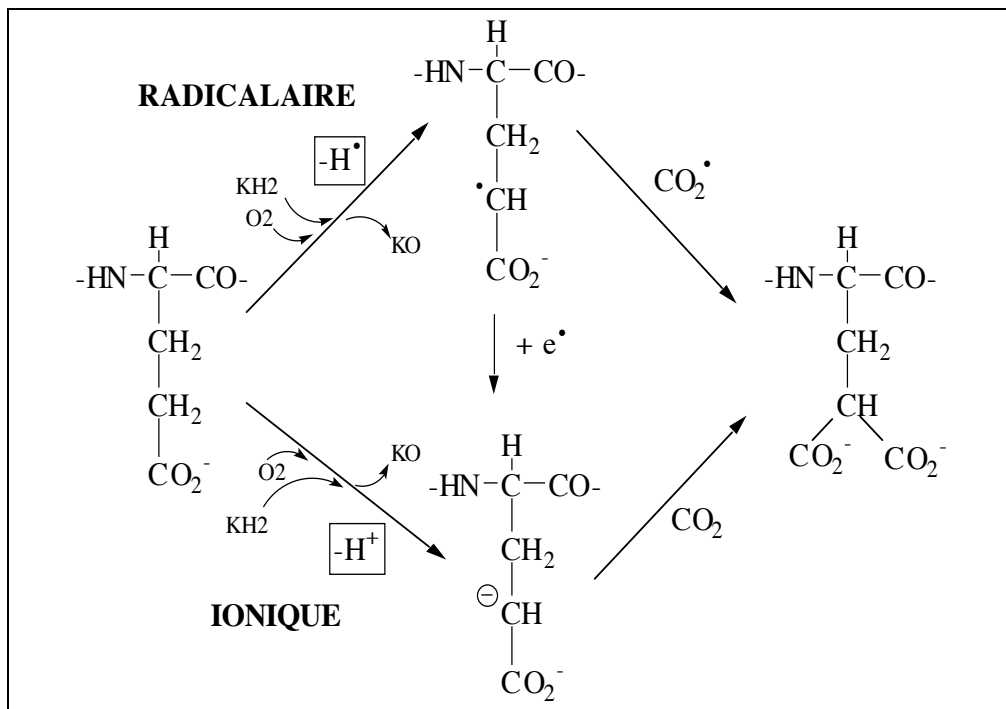
A l'aide de dérivés fluoroglutamates Thréo et Erythro, Dubois et ses collaborateurs<sup>(87)</sup> ont montré que l'hydrogène Pro S était arraché stéréospécifiquement au cours de la carboxylation. D'un autre côté, Azerad et ses collaborateurs<sup>(88)</sup> ont montré de façon irréfutable par carboxylation de glutamates spécifiquement deutérés en position 4 et d'autres expériences, sur des analogues substrats marqués au tritium<sup>(89)</sup> l'arrachement stéréospécifique du proton 4 pro S.



**Figure 15:** Stéréochimie de l'arrachement du proton

## 5.2 Mécanisme d'arrachement du proton

Trois mécanismes d'arrachement du proton en position 4 ont été proposés. L'un radicalaire, l'autre ionique et le dernier mixte.



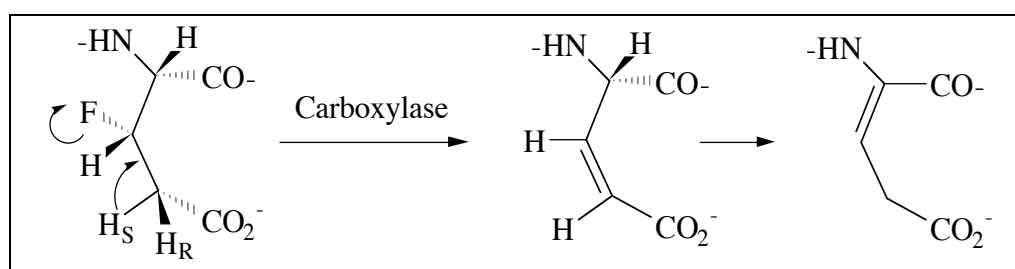
**Figure 16:** Mécanisme radicalaire, ionique et mixte

### 5.2.1. Mécanisme radicalaire

Jusqu'à ce jour, aucun résultat prouvant l'existence d'un intermédiaire radical en  $\alpha$  du carbonyle n'a été trouvé. Néanmoins, il semble que des radicaux soient impliqués dans le processus global de la carboxylase. Des composés comme le DMPO ou des dérivés nitroso pourraient piéger la forme semiquinone de la vitamine K <sup>(90)</sup>, mais cela n'exclut pas l'intervention d'autres radicaux comme les ions  $O_2^{\bullet}$  mis en évidence dans le milieu d'incubation par la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la décomposition de  $O_2^{\bullet}$  en eau oxygénée<sup>(91)</sup>. Cette enzyme inhibe faiblement la carboxylation en comparaison avec les complexes du cuivre, inhibiteurs plus généraux des réactions radicalaires. Le passage par un carbanion peut aussi mettre en jeu un radical intermédiaire qui serait ensuite réduit à un électron pour conduire au carbanion (mécanisme mixte).

### 5.2.2. Mécanisme ionique

Suttie<sup>(92)</sup> et Friedman<sup>(93)</sup> et leurs collaborateurs ont montré que l'hydrogène en position 4 du glutamate peut s'échanger avec le solvant en absence de  $CO_2$ . Cet échange est catalysé par la carboxylase et requiert la présence de vitamine K. Azerad et ses collaborateurs ont démontré de leur côté que cet échange est stéréospécifique et n'affecte à nouveau que l'hydrogène pro S<sup>(89)</sup>. Il est plus vraisemblable d'imaginer un échange de protons avec l'eau, qu'un échange de radicaux hydrogène. De plus, l'observation qu'un résidu (2S,3S) 3-fluoroglutamate non carboxylé conduit par élimination du fluor vraisemblablement par  $\beta$ -élimination, à la formation du 3,4-deshydroglutamate, constitue un argument en faveur d'un mécanisme ionique<sup>(94,95)</sup>.



**Figure 17:** Intermédiaire carbanionique par élimination du Fluor

Les derniers travaux de Dowd<sup>(96)</sup> montrent que l'arrachement du proton pourrait se faire avec l'aide d'une base forte (intermédiaire III figure 11). Tous ces différents travaux laissent présager que le mécanisme d'arrachement du proton serait un mécanisme ionique.

### 5.3. Inversion de configuration durant la réaction de carboxylation

Dubois et ses collaborateurs ont montré que la carboxylation s'effectue avec inversion de configuration<sup>(97)</sup>.

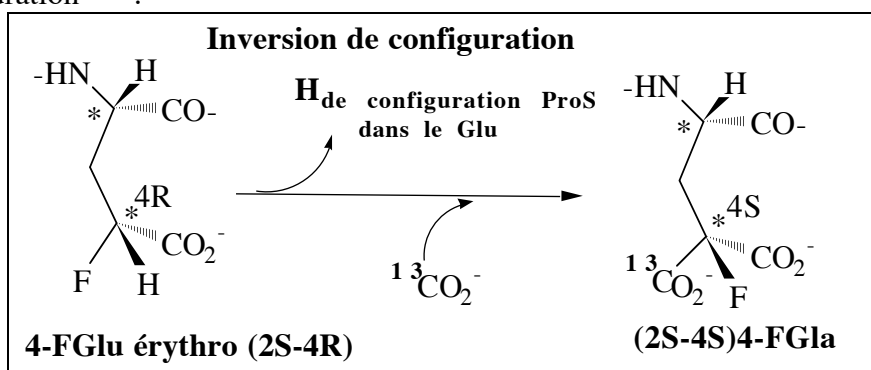
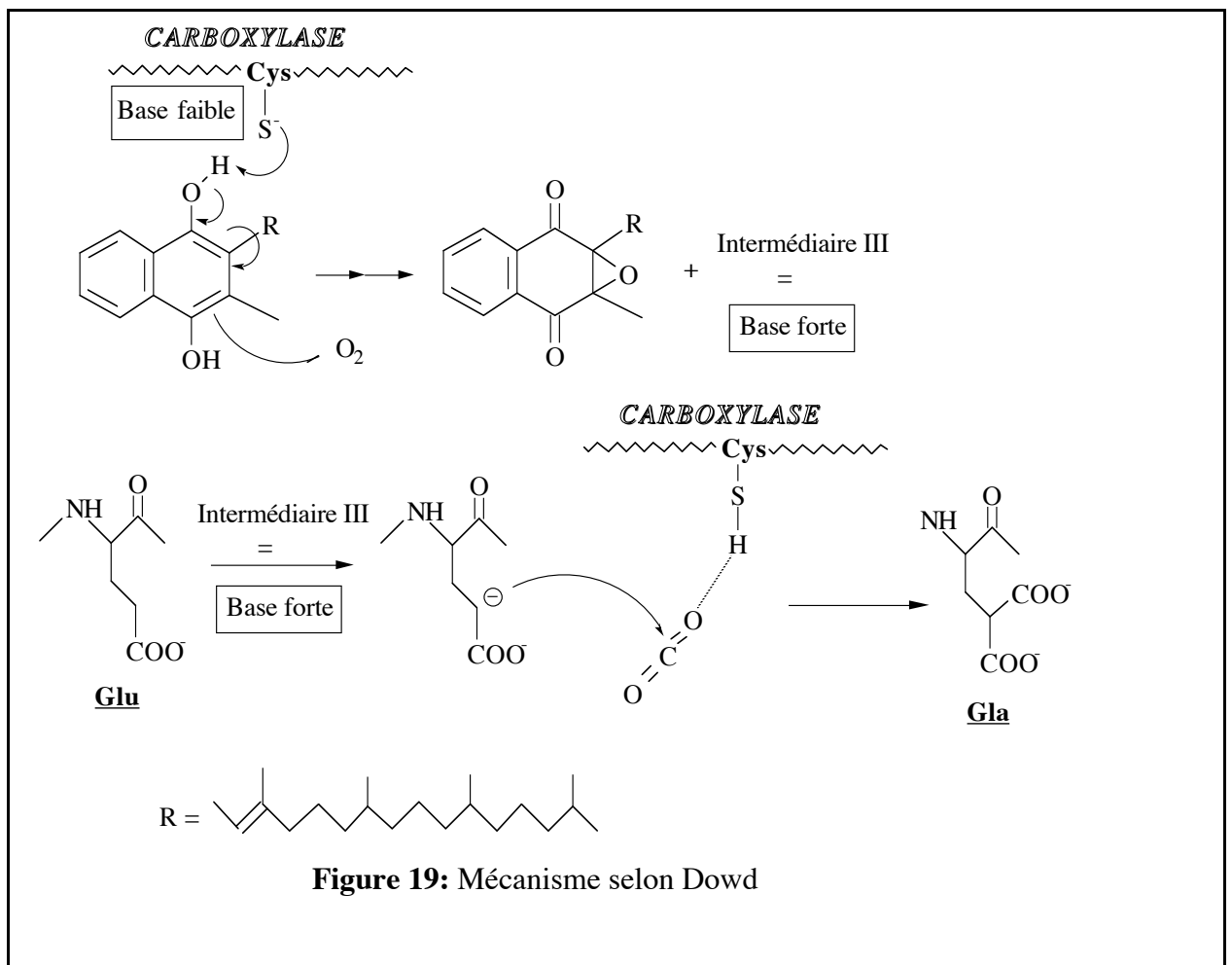


Figure 18: Inversion de configuration

### 5.4. Site actif de la carboxylase selon Dowd

Les travaux de Morris<sup>(98)</sup> et ses collaborateurs montrèrent l'inactivation de la carboxylase par des agents thiols réactifs tels que le N-éthylmaleimide et le p-mercuribenzoate. Ces travaux et ceux réalisés par Dowd<sup>(96)</sup>, suggèrent l'existence de deux thiols au niveau du site actif de la carboxylase (Figure 19 ci-dessous). Le premier serait impliqué dans la déprotonation de KH2 générant ainsi un intermédiaire en milieu hydrophobe, capable d'arracher le proton H<sub>4</sub> ProS d'un acide glutamique. L'intervention d'un intermédiaire 3-hydroxyperoxyde [(I)Figure 11] pourrait jouer le rôle de base (pK<sub>a</sub> ~ 13) pour l'arrachement du proton de l'acide glutamique dans l'hypothèse de Suttie. Dowd propose alors un modèle basé sur l'amplification de la base. Ce modèle passe par l'intermédiaire alkoxyde de la vitamine K [(III)Figure 11] avec un pK<sub>a</sub> ~ 20 qui augmente fortement la basicité pour la déprotonation de l'acide glutamique. Pour certains auteurs, il s'agit non pas d'un alcoolate (pK<sub>a</sub> de 20) mais d'un anion de la forme hydrate d'un carbonyle (pK<sub>a</sub> de 10 à 13) ce qui diminuerait l'intérêt de l'hypothèse de Dowd dans l'amplification de la force de la base<sup>(99)</sup>. Le second thiol serait impliqué dans une liaison avec le CO<sub>2</sub>.



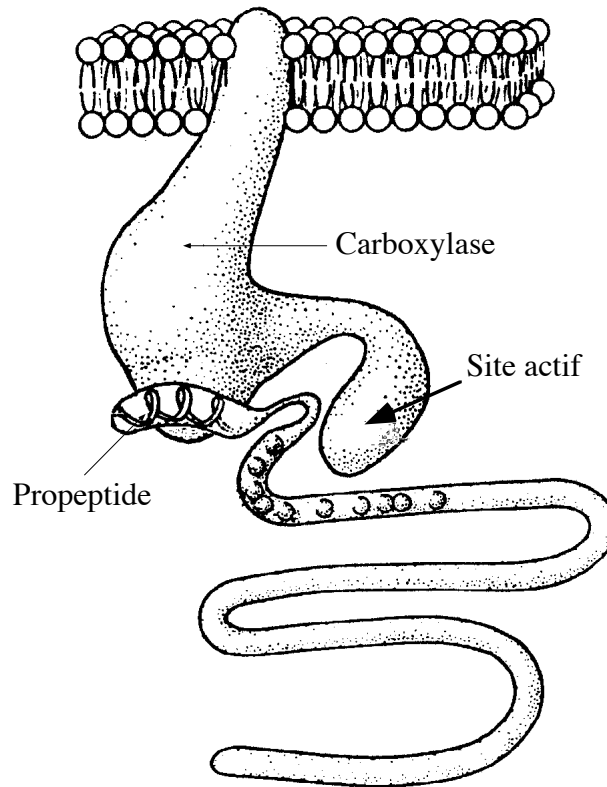
**Figure 19: Mécanisme selon Dowd**

**Figure 19: Mécanisme selon Dowd**

## 6. La Carboxylase

### 6.1. Localisation

De toutes les carboxylases connues, celles présentes dans le foie de rat ou de boeuf sont les plus abondantes et les plus faciles à étudier. L'activité carboxylase est donc principalement localisée dans le foie bien qu'elle ait été mise en évidence dans la plupart des tissus où le Gla est présent. Plus précisément, la carboxylase a été détectée au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (RER) présent dans le cytoplasme de ces cellules. Il s'agit d'une enzyme transmembranaire liée à la maturation post-traductionnelle des protéines<sup>(100)</sup>.



**Figure 20:** Carboxylase: protéine transmembranaire

## 6.2. Purification

Pendant longtemps toutes les tentatives d'isolement de la carboxylase se sont soldées par des échecs, l'activité disparaissant au cours des premières étapes de la purification. Les études de stabilité ont montré qu'il s'agit d'une enzyme très fragile *in vitro*, probablement du fait de sa nature transmembranaire<sup>(62,101,102)</sup>.

A partir du foie de boeuf, De Metz et ses collaborateurs purifièrent partiellement l'enzyme<sup>(101)</sup> et ce n'est qu'en 1991 et 1992 que l'ADN codant pour cette enzyme a été trouvé et sa structure primaire élucidée.<sup>(103-105)</sup>



## Séquence primaire de la carboxylase humaine et bovine

	1		50
HmCarb	MAVSAGSART SPSSDKVQKD KAEISGPRQ DSRIGKLLGF EWTDLSSWRR		
BoCarb	.....		
	51		100
HmCarb	LVTLLNRPTD PASLAVFRFL FGFLMVLDIP QERGLSSLDL KYLDGLDVCR		
BoCarb	.....LEVCR		
	101		150
HmCarb	FPLLDALRPL PLDWMYLVYT IMFLGALGMM LGLCYRISCV LFLLPYWYVF		
BoCarb	FPLLDALQPL PLDWMYLIYT IMFLGALGMM LGLCYRISCV LFLLPYWYVF		
	151		200
HmCarb	LLDKTSWNNH SYLYGLLAFQ LTFMDANHYW SVDGLLNAHR RNAHVPLWNY		
BoCarb	LLDKTSWNNH SYLYGLLAFQ LTFVDAHNYW SVDGLLRARK RNAHVPLWNY		
	201		250
HmCarb	AVLRGQIFIV YFIAGVKKLD ADWVEGYSME YLSRHWLFSP FKLLSEELT		
BoCarb	AVLRGQIFIV YFIAGIKKLD ADWVEGYSME YLSRHWLFSP FKLVLSEEMT		
	251		300
HmCarb	SLLVVHWGGL LLDLSAGFLL FFDVRSIGL FVSYFHCMN SQLFSIGMFS		
BoCarb	SLLVVHWGGL LLDLSAGFLL FFDASRPIGF FVSYFHCMN SQLFSIGMFP		
	301		350
HmCarb	YVMLASSPLF CSPWPRKLV SYCPQLQQL LPLKAAPQS VSCVYKRSRG		
BoCarb	YVMLASSPLF CSPWPRKLV AHCPKQLQL LPLRTAPQS TSCMYKRSRA		
	351		400
HmCarb	KSGQKPLRH QLGAFTLLY LLEQLFLPYS HFLTQGYNNW TNGLYGYSWD		
BoCarb	<u>RGSQKPLRH</u> KLSTAFTLLY LLEQLFLPYS HFLTQGYNNW TNGLYGYSWD		
	401		450
HmCarb	MMVHSRSHQH VKITYRDGRT GELGYLNPV FTOSRRWKDH ADMLKQYATC		
BoCarb	MMVHSRSHQH VKITYRDGRT GELGYLNPV FTOSRRWKDH ADMLKQYATC		
	451		500
HmCarb	LSRLLPKYNV TEPQIYFDIW VSINDRFQR IFDPRVDIVQ AAWSPFQRTS		
BoCarb	LSRLLPKYNV TEPQIYFDIW VSINDRFQR IFDPRVDIVQ AAWSPFQRTP		
	501		550
HmCarb	WVQPLLDLS PWRAKLQEI SSLDNHTEVV FIADFPGLHL ENFVSEDLGN		
BoCarb	WLQPLLDLS PWRTKLQEI SSLDNHTEVV FIADFPGLHL ENFVSEDLGN		
	551		600
HmCarb	TSIQLLQGEV TVELVAEQKN QTLREGEKMQ LPAGEYHKVY TTSPSPSCYM		
BoCarb	TSIQLLQGEV TVELVAEQKN QTLREGEKMQ LPAGEYHKVY TVSSSPSCYM		
	601		650
HmCarb	YVYVNTTELA LEQDLAYLQE LKEKVENGE TGPLPPELQP LLEGEVKGGP		
BoCarb	YIYVNTTEVA LEQDLAYLQE LKEKVENGE TGPLPPELQP LLEGEVKGGP		
	651		700
HmCarb	EPTPLVQTF LRRQRLQEI RRRNTPFHER FFRFLLRKLY VFRRSFLMTC		
BoCarb	EPTPLVQTF LRRQRLQEI RRRNAPFHER LVRFLLRKLY VFRRSFLMTC		
	701		750
HmCarb	ISLRNLILGR PSLEQLAQEV TYANLRPFEA VGELNPSNTD SSSNPPESN		
BoCarb	ISLRNLAFGR PSLEQLAQEV TYANLRPFEP AGEPSVNTD SSSNPPPEP		
	751		
HmCarb	PDPVHSEF	HmCarb : "Human Carboxylase"	
BoCarb	SHPVHSEF]	BoCarb : "Bovine Carboxylase"	

### 6.3. Caractéristique

Les carboxylases humaines et bovines présentent 758 acides aminés et 90% d'identité sur 663 résidus. Les 50 premiers résidus N terminaux sont hydrophiles et ne contiennent pas de peptide-signal. Il existe trois régions hydrophobes dans cette partie N terminale qui pourraient former trois segments transmembranaires. Dans la lumière du RER, il y a neuf sites potentiels de glycosylation situés sur la partie C terminale de cette protéine. Sa masse moléculaire déduite de la séquence primaire est de 87542 Da alors que celle estimée par électrophorèse sur gel est de 94000 Da. Ceci s'explique par un degré important de glycosylation de cette protéine <sup>(104,106)</sup>.

## 7. Les autres facteurs dans la réaction de carboxylation

### 7.1 Importance de l'oxygène O<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>

L'oxygène joue un rôle important dans son association avec la Vitamine K<sup>(107)</sup>. Sous atmosphère d'azote, plus de 99% de l'activité carboxylase est perdue<sup>(98)</sup>. Le CO<sub>2</sub> est la seule espèce carboxylante<sup>(108,109)</sup>. Le carbone du CO<sub>2</sub> subirait l'attaque nucléophile alors que l'espèce HCN ne pourrait s'incorporer à la place du CO<sub>2</sub><sup>(96)</sup>.

### 7.2 Importance du milieu et du pH

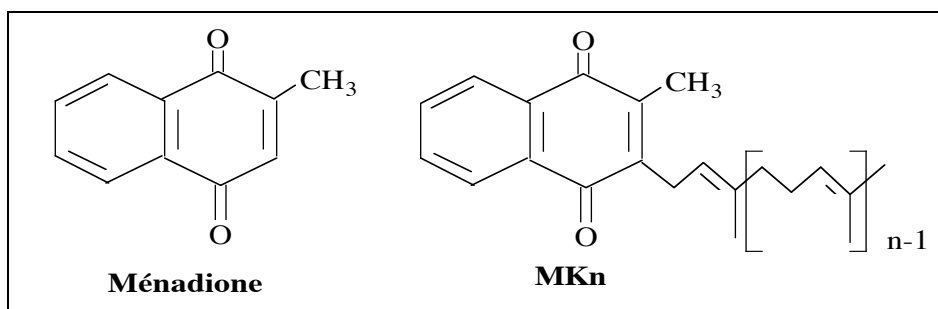
Dans les microsomes solubilisés, l'activité optimale de la carboxylase est aux alentours de pH 7. Elle est de plus sensible à la concentration en sels. *In vivo*, un environnement lipidique est nécessaire à cette enzyme membranaire. *In vitro*, la phosphatidylcholine (PC) assure l'environnement lipidique alors que des détergents (CHAPS) maintiennent l'enzyme soluble. Une stimulation de l'activité est obtenue par le Dithiothreitol (DTT) et par le sulfate d'ammonium<sup>(110)</sup>. Cette activation ne touche que la vitesse maximale V<sub>m</sub> sans modifier l'affinité.

## 8. Les Analogues de la Vitamine K

### 8.1. Les analogues actifs

Des études *in vitro* ont montré que plusieurs ménaquinones (MK<sub>n</sub>) semblables à la vitamine K<sub>1</sub> peuvent servir de cofacteur à la carboxylase alors que la ménadione et la 2, 3-diméthyle-naphtoquinone sont inactives ainsi que le composé cis de la vitamine K. La chaîne phytyle ou polyisoprénique de K<sub>1</sub> ne semblent pas jouer un rôle fondamentale dans la catalyse

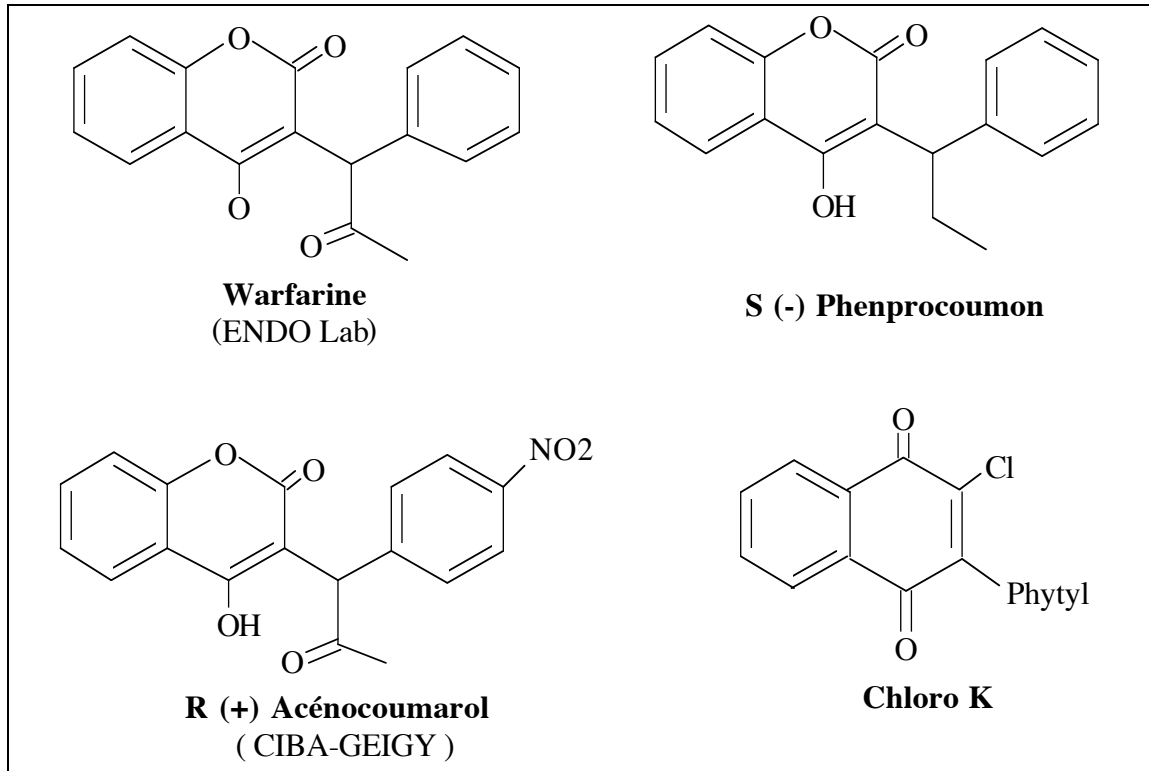
enzymatique puisqu'elles peuvent être remplacées par des courtes chaînes neutres<sup>(111)</sup>. De plus, il semble que le groupe méthyle en position 2 soit indispensable à l'activité<sup>(112)</sup>.



**Figure 21:** Ménéadione et MKn

## 8.2. Les Inhibiteurs

Afin de bloquer le cycle de régénération de la vitamine K, de nombreux analogues furent synthétisés et sont utilisés comme de puissants anticoagulants<sup>(113-116)</sup>. C'est le cas, de la warfarine, de l'acénocoumarol, du dicoumarol, du chloro K ou de la phenprocoumon, entre autre. C'est la réductase qui utilise le DTT *in vitro* et probablement la thiorédoxine *in vivo*<sup>(60)</sup> qui est sensible aux dérivés coumariniques. Leur utilisation s'associe le plus souvent à des lésions hépatiques et un déficit en vitamine K ce qui se traduit chez les patients par des accidents hémorragiques.

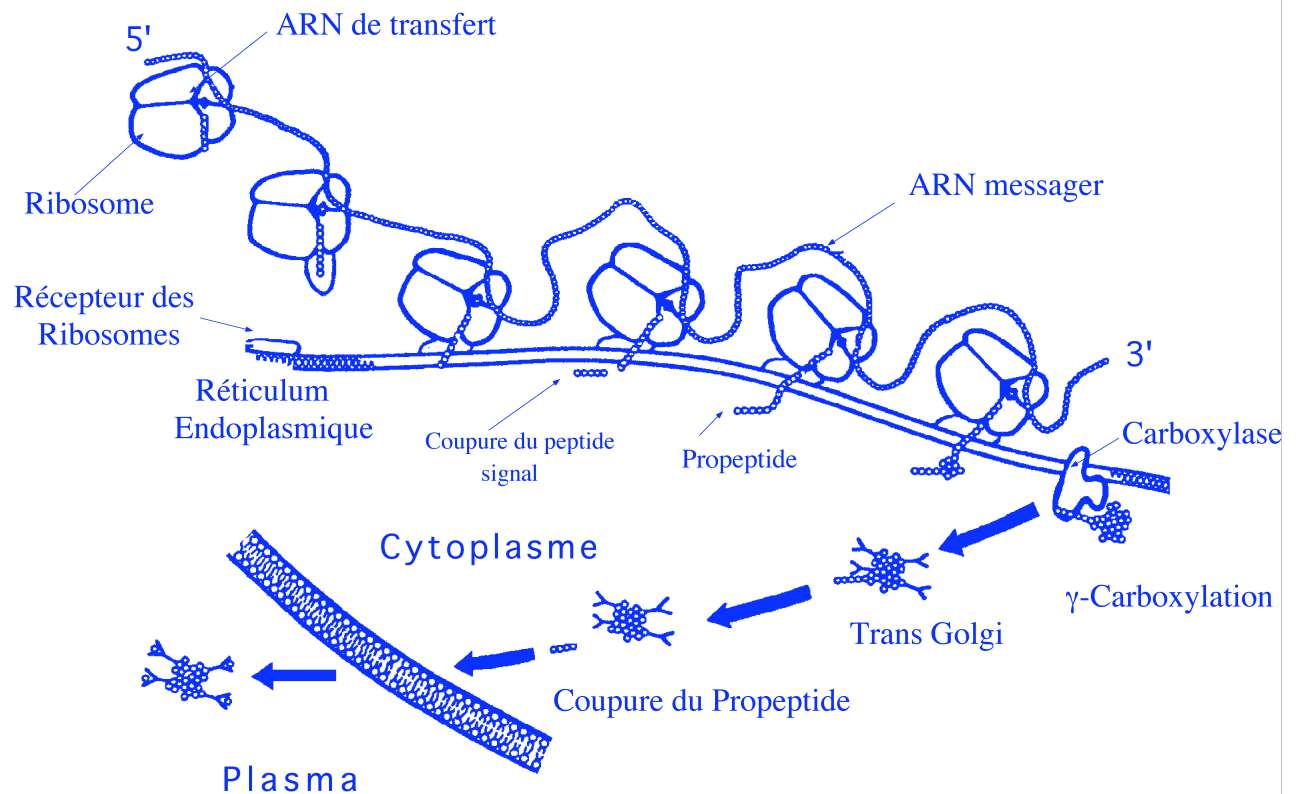


**Figure 22:** Différents analogues inhibiteurs de la Vitamine K

## 9. Les protéines substrats dans la cascade de la coagulation

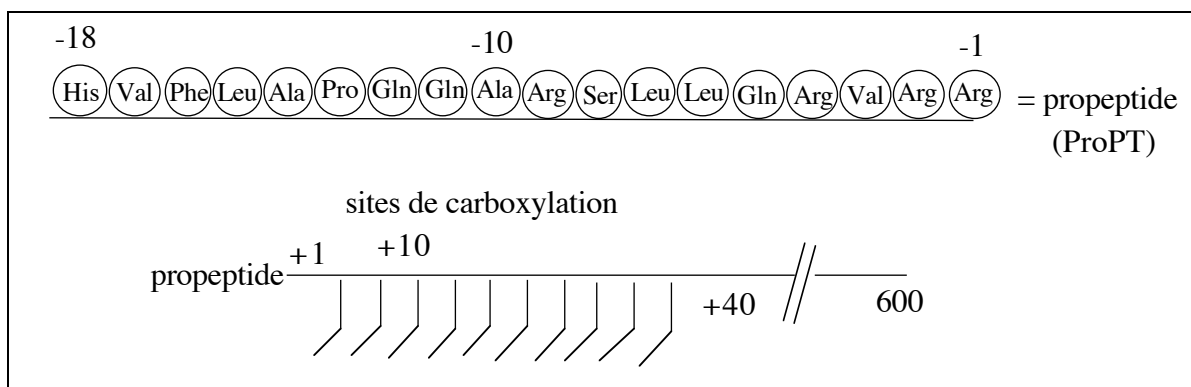
### 9.1. Substrats et Propeptide

Une indication sur la sélectivité des réactions de carboxylation fut obtenue lorsque il fut montré que la forme intracellulaire et précurseur de la prothrombine était plus longue et plus basique que la forme sécrétée dans le plasma. Cette forme intracellulaire comporte un peptide signal en position N-terminale qui sera clivé lors du processus de sécrétion de la prothrombine dans le plasma. Cette forme intracellulaire isolée de la prothrombine s'est avérée être meilleur substrat avec la carboxylase *in vitro* que la préprothrombine plasmatique (117). En effet, la carboxylation intracellulaire a lieu dans le RER immédiatement après la transduction. Cette maturation protéique précède la sécrétion dans le plasma de la prothrombine qui à ce moment là ne possède plus ce peptide signal.



**Figure 23:** Coupure du propeptide et maturation protéique

Des études de séquençage d'ADN<sup>(118)</sup> ont permis de mettre en évidence que l'ARN messager pour toutes les protéines du plasma vitamine K-dépendantes contenait un "propeptide". Cette extension au niveau N terminal de ces protéines a généré de nombreuses expériences de mutagenèse dirigée afin de savoir si cette partie de la protéine pouvait jouer un rôle important dans la reconnaissance avec la carboxylase et son site actif<sup>(119)</sup>. Ces études ont montré que la séquence propeptidique (résidus -18 à +1) est conservée d'un substrat à l'autre et qu'elle est située hors du domaine carboxylable où se trouvent les résidus glutamiques. De plus, ces études de mutagenèse dirigée ont démontré que les résidus -18, -17, -16, -15 et -10 étaient nécessaires dans la reconnaissance avec la carboxylase vitamine K dépendante<sup>(120,121)</sup>.



**Figure 24:** Substrats endogènes de la carboxylase et propeptide de la prothrombine

## 10. Les analogues peptidiques

### 10.1. Substrats modèles utilisés *in vitro*

Le premier substrat utilisé *in vitro* fut le substrat endogène: la préprothrombine. Suttie et al ont montré que des petits peptides, mimant une partie de la séquence N-terminale de la préprothrombine sont substrats de la carboxylase. L'utilisation de ces peptides a beaucoup facilité les études mécanistiques *in vitro*.

Les pentapeptides Phe-Leu-Glu-Glu-Val ou Phe-Leu-Glu-Glu-Leu, correspondant aux fragments 5-9 des préprothrombines de rat ou de boeuf (117,122), sont substrats de la carboxylase, avec une affinité ( $K_m \sim 1\text{mM}$ ) 300 à 1000 fois inférieure à la protéine endogène.

Le tripeptide Boc-Glu-Glu-Val possède une affinité équivalente, le groupe Boc remplaçant ici les résidus hydrophobes Phe et Leu du pentapeptide<sup>(123)</sup>. Un substrat de taille encore plus réduite a été utilisé: il s'agit de Boc-Glu(-OH)-OR (R= Me ou Bn), mais cette diminution de taille se traduit par une perte d'affinité d'un facteur 5 ( $K_m = 5\text{mM}$ ) par rapport au tripeptide ou au pentapeptide<sup>(124-126)</sup>. Néanmoins, ce substrat est intéressant comme modèle pour une étude du résidu Glu au niveau du site de reconnaissance avec la carboxylase.

### 10.2. Les inhibiteurs

Depuis plusieurs années, certains laboratoires se sont intéressés à la conception d'inhibiteurs spécifiques de la carboxylase dépendant de la vitamine K. Ces inhibiteurs comportent tous un résidu glutamique plus ou moins modifié. La spécificité est conférée par la chaîne peptidique qui mime la partie N-terminale de la préprothrombine.

### 10.2.1. Les dérivés aminobutyriques

Ces dérivés aminobutyriques comportent une modification au niveau du carboxyle en  $\gamma$  si on les compare à l'acide glutamique. Ils sont, dans l'ensemble, d'assez faibles inhibiteurs de la carboxylase en comparaison au Km du Boc-Glu-Glu-Val ( $K_m = 1.3\text{mM}$ )<sup>(127)</sup>.

Tableau 2:

Type	Peptide	Ki	Inhibition	Ref
$\begin{array}{c} \text{-HN-CH-CO-} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CO}_2\text{R} \end{array}$	Boc-Glu(-OR)- OH R=Me ou Bn	-	non reconnu	(124)
$\begin{array}{c} \text{-HN-CH-CO-} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CN} \end{array}$	Phe-Leu- Abu(CN)- Abu(CN)-Val	-	non reconnu	(128)
$\begin{array}{c} \text{-HN-CH-CO-} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{HN} \quad \diagup \quad \diagdown \quad \text{N} \\   \quad \quad \quad \quad   \\ \text{N} \quad \quad \quad \quad \text{N} \end{array}$	Phe-Leu- Abu(T)-Glu-Val  Phe-Leu- Abu(T)-Abu(T)- Val	~20  3.1	carboxylé sur le résidu 4  compétitive réversible	(128)
$\begin{array}{c} \text{-HN-CH-CO-} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{NO}_2 \end{array}$	Boc-Abu(NO <sub>2</sub> )- Glu-Val	3-5 (IC <sub>50</sub> )	ND	(127)

$  \begin{array}{c}  \text{-HN-CH-CO-} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{O} \\    \\  \text{HO-P-OH} \\     \\  \text{O}  \end{array}  $	Boc-PSer-OMe	1-3	Compétitive	(129)
--	--------------	-----	-------------	-------

### 10.2.2. Les dérivés glutamiques substitués ou modifiés en position 3

Les acides glutamiques substitués en 3 ont été principalement utilisés lors d'études mécanistiques. L'un des meilleurs inhibiteurs est l'ester méthylique du Boc-3,4-déhydroglutamate pour lequel un  $K_i$  de 280  $\mu\text{M}$  a été mesuré. Le rapport  $K_m/K_i$  étant égal à 18, il pourrait s'agir pour ce dernier composé, d'un analogue de l'état de transition .

Tableau 3:

Type	Peptide	isomère	$K_i$	Inhibition	Ref
$  \begin{array}{c}  \text{-HN-CH-CO-} \\    \\  \triangle \\    \\  \text{C} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CO}_2\text{H}  \end{array}  $	Boc-3cPrGlu-OMe		12	ND	(130)
$  \begin{array}{c}  \text{-HN-CH-CO-} \\    \\  \text{CH-F} \\    \\  \text{CH}_2 \\    \\  \text{CO}_2\text{H}  \end{array}  $	Boc-3FGlu-Glu-Val	thréo	-	mixte hyperbolique	(94,95)
		érythro	1.5	non compétitive	
$  \begin{array}{c}  \text{-HN-CH-CO-} \\    \\  \text{CH} \\     \\  \text{CH} \\    \\  \text{CO}_2\text{H}  \end{array}  $	Boc-3,4 $\Delta$ Glu-OMe		0.28	compétitive	(131)

### 10.2.3. Les dérivés glutamiques substitués ou modifiés en position 4

Différents dérivés glutamiques, substitués sur la position 4 par un méthyle, un méthylène ou un fluor, ont été synthétisés. Alors que le (2S, 4R)-4-fluoro-glutamate est substrat de la carboxylase, les dérivés méthylés et méthylène sont de bons inhibiteurs et leurs  $K_i$  sont



jusqu'à 20 fois plus faible que le Km du peptide substrat correspondant (Tableau 4 ci-dessous).

Tableau 4:

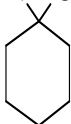
Type	Peptide	Isomère	Ki	Inhibition	Ref
$\begin{array}{c} \text{—HN—CH—CO—} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH—CH}_3 \\   \\ \text{CO}_2\text{H} \end{array}$	Phe-Leu-4MeGlu-Glu-Val	thréo érythro	0.08 3.0	réversible compétitive	(132,133)
$\begin{array}{c} \text{—HN—CH—CO—} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH—CH}_3 \\   \\ \text{CO}_2\text{H} \end{array}$	Boc-4Me-Glu-Glu-Val	thréo érythro	0.065 3.6	réversible compétitive	
$\begin{array}{c} \text{—HN—CH—CO—} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH—C}_2\text{H}_5 \\   \\ \text{CO}_2\text{H} \end{array}$	Boc-4EtGlu-Glu-Val	thréo érythro	0.23 1.2	réversible compétitive	(134)
$\begin{array}{c} \text{—HN—CH—CO—} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH—CN} \\   \\ \text{CO}_2\text{H} \end{array}$	Boc-4CNGlu-Glu-Val	thréo	0.85	compétitive réversible	(134)
$\begin{array}{c} \text{—HN—CH—CO—} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{C=CH}_2 \\   \\ \text{CO}_2\text{H} \end{array}$	Boc-4MnGlu-Glu-Val	-	0.05	réversible compétitive	(135)
$\begin{array}{c} \text{—HN—CH—CO—} \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH—F} \\   \\ \text{CO}_2\text{H} \end{array}$	Phe-Leu-4FGlu-Glu-Val	thréo érythro	- -	Carboxylé sur le résidu 4 substrat	(87,97)

#### 10.2.4. Les dérivés glutamiques cycliques ou modifiés en position 2

D'autres analogues ont été synthétisés sur la base du Boc-Glu-Glu-Val comme substrat. Ces différents analogues tripeptidiques incorporant des analogues  $\alpha$  substitués ou cycliques, tels que Boc-2MeGlu-Glu-Val, Boc-trans-C6 et C5 Glu-Val ainsi que les Boc-cis-C6 et C5-Glu-Val ont été testés (C5=cyclopentane et C6=cyclohexane) (Tableau 5). L'incorporation des analogues a été réalisée à la place du premier résidu Glu car il a été démontré que la réaction de carboxylation se faisait sur le premier Glu<sup>(136)</sup>. Les résultats obtenus par Acher et ses collaborateurs<sup>(137)</sup> ont montré que tous ces analogues étaient substrats de la carboxylase. Il a

été ensuite démontré que la carboxylation ne se faisait pas sur l'analogue glutamique mais sur le second Glu non transformé et mieux reconnu par l'enzyme.

Tableau 5:

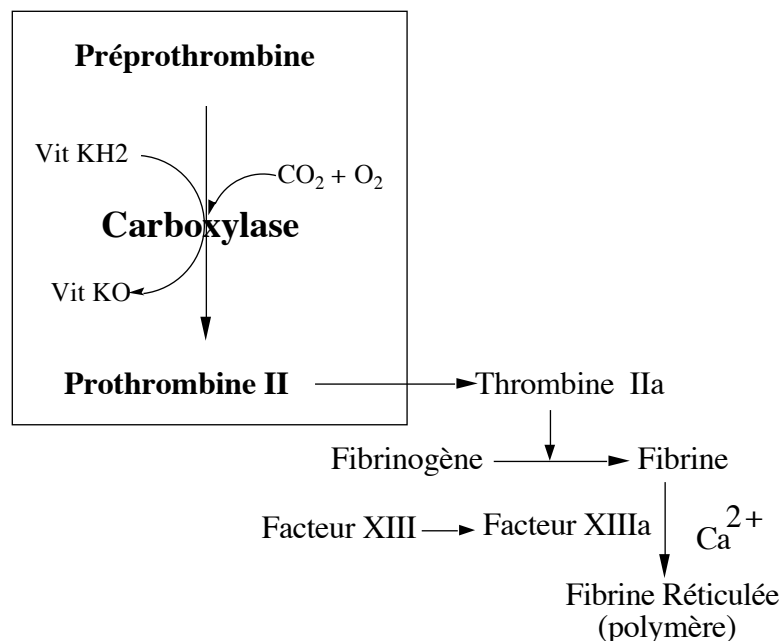
SUBSTRATS	Incorporation de CO <sub>2</sub> * (%) <sup>a</sup>	Km (mM)
<b>Boc-Glu-Glu-Val</b>	100	1.7
Boc2Me(2S)Glu-Glu-Val	17	18.5
Boc-trans-C6(1SR, 3RS)-Glu-Val	20	7.0
Boc-transC6(1S-3R)-Glu-Val	10	18.3
Boc-cisC6(1SR,3SR)-Glu-Val	29	15.5
Boc-cisC6(1S-3S)-Glu-Val	17	17.5
Boc-transC5(1SR,3RS)-Glu-VIa	32	4.4
Boc-cisC5(1SR,3SR)-Glu-VIa	33	12.2
(RS) Boc-NH CO-Glu-Val 	63	8.9

a) Normalisé à 100% pour le Boc-Glu-Glu-Val

b) Le temps d'incubation est de 30mn, la température de 293°K et la concentration finale de 5mM

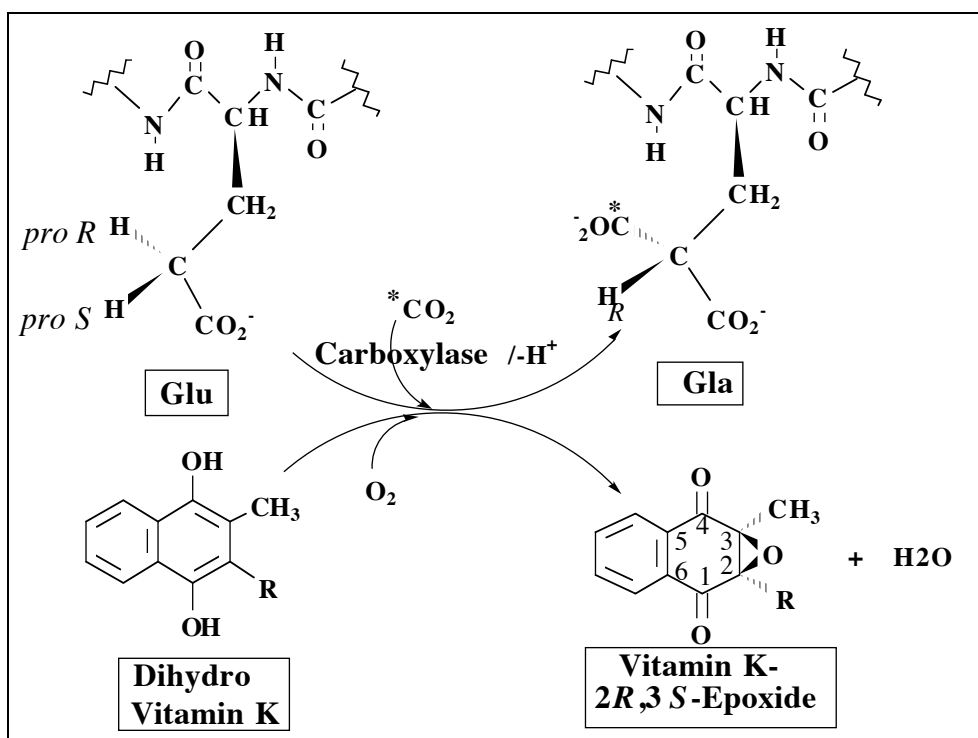
## PRESENTATION DU TRAVAIL

Le mécanisme de la coagulation sanguine est un mécanisme fort complexe, de maturation protéique, qui fait intervenir une cascade de réactions enzymatiques et notamment des carboxylations vitamine K dépendante de résidus Glu en Gla (schéma 1 de la partie biologique). Cette cascade de réactions intervient non pas en phase liquide dans le plasma mais au contact des membranes des plaquettes et de l'endothélium vasculaire. Les phospholipides négatifs de ces membranes sont indispensables à l'activation de tous les facteurs de la coagulation et les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont essentiels pour assurer la liaison de ces facteurs aux phospholipides membranaires. Cette maturation protéique précède la sécrétion dans le plasma de la prothrombine qui, à ce moment là, perd une partie de sa séquence (Propeptide). L'activation de la prothrombine en thrombine permet de convertir le fibrinogène en monomères de fibrine qui polymérisent pour former le caillot sanguin. La transformation de la préprothrombine en prothrombine, est la dernière réaction de carboxylation vitamine K dépendante de cette cascade. Nous nous sommes intéressés à cette réaction et principalement à la transformation des résidus Glu en Gla.



Les dix premiers résidus d'acide glutamique (Glu) de la séquence N-terminale de la préprothrombine sont transformés en acides  $\gamma$ -carboxyglutamiques (Gla) pour former la prothrombine. La réaction de carboxylation se fait en présence de la carboxylase (une enzyme transmembranaire), de la vitamine K, de CO<sub>2</sub> et de dioxygène. Le mécanisme de cette

réaction reste encore très étudié. Les résultats stéréochimiques mettent en évidence que l'hydrogène H<sub>4</sub>-ProS de l'acide glutamique est arraché de façon stéréospécifique au cours de la carboxylation. Dans cette réaction, le remplacement du proton 4-ProS par le groupe CO<sub>2</sub><sup>-</sup> est une étape qui s'effectue avec inversion de configuration.

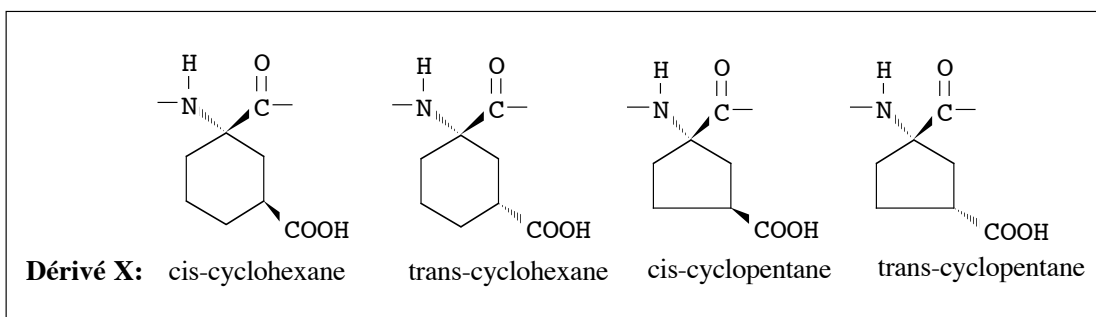


En l'absence, de préparation purifiée de carboxylase, une approche passant par l'élaboration de substrats ou d'inhibiteurs peut permettre de mieux définir les caractéristiques du site actif de la carboxylase. Dans ce contexte, nos recherches se sont orientées sur l'élaboration d'analogues de l'acide glutamique dont les conformations figées n'explorent qu'une partie de l'espace conformationnel du Glu. Les anticoagulants actuellement utilisés en thérapeutique sont en général des inhibiteurs du cycle de la vitamine K. Ils posent le problème, encore non résolu, de l'action secondaire de telles molécules sur les nombreuses autres protéines vitamine K-dépendante n'intervenant pas dans la coagulation. On voit donc l'intérêt de nouveaux inhibiteurs, dirigés exclusivement sur le site actif de la carboxylase, inhibant exclusivement la biosynthèse de facteurs de la coagulation. La connaissance du pharmacophore de l'enzyme serait d'une importance considérable pour l'élaboration de nouveaux inhibiteurs de la coagulation sanguine.

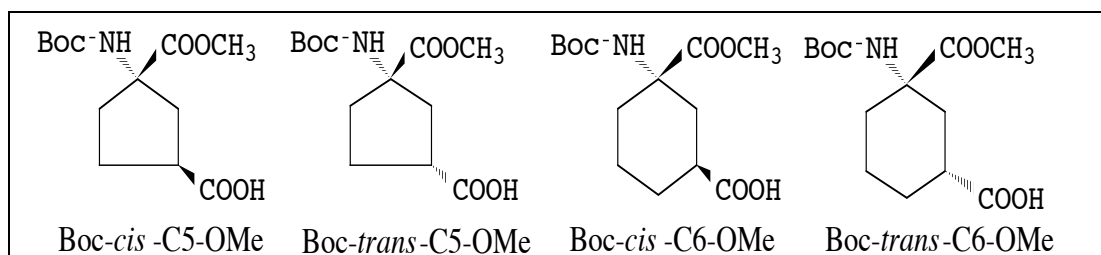
Les résultats les plus significatifs ont été obtenus dans le domaine des relations structure-activité des substrats peptidiques de la carboxylase. Rappelons que de nombreux peptides construits à l'imitation de la séquence N-terminale de la prothrombine et contenant deux résidus adjacents d'acide glutamique constituent des modèles de substrats

carboxylables *in vitro*. Généralement, la réaction a lieu sur le premier résidu glutamique, avec un  $K_M$  de l'ordre de 1-10mM c'est à dire beaucoup plus élevé que celui de substrats comportant une portion de séquence propeptidique spécifique. Celle-ci joue également un rôle essentiel dans la reconnaissance des substrats naturels par la carboxylase. Un certain nombre de petits peptides substrats (Boc-Glu-Glu-Val par exemple) dans lesquels est introduit en position carboxylable un analogue de l'acide glutamique constituent des inhibiteurs compétitifs puissants de la réaction de carboxylation. A l'heure actuelle, certains de ces dérivés Boc-X-Glu-Val, où X est l'acide *L-thréo*-4-méthyl- ou L-4-méthylène glutamique, constituent les meilleurs inhibiteurs compétitifs de petit poids moléculaire connus de la carboxylase (Tableau 4 de la partie biologique).

Afin de mieux comprendre les interactions du résidu glutamique carboxylable avec le site actif de l'enzyme, et particulièrement les aspects conformationnels, des analogues cycliques (X) de l'acide glutamique à conformations plus ou moins figées ont été incorporés dans le tripeptide Boc-X-Glu-Val. Dans ces conformations, l'orientation du  $\gamma$  carboxyle est déterminée à la fois par la stéréochimie du carbone qui le porte et par la conformation préférentielle du cycle pour chacun des stéréoisomères. Les résultats biologiques de ces tripeptides Boc-X-Glu-Val (où X représente un des analogues décrit ci-dessous) ont montré qu'ils étaient tous substrats de la carboxylase. La carboxylation ne se fait pas sur l'analogue glutamique X mais sur le second Glu non transformé mieux reconnu par l'enzyme.



De plus petits analogues Boc-X-OMe (où X est l'analogue cyclique à six ou à cinq carbones introduit dans le substrat Boc-Glu-OMe) ont été utilisés dans le but de tester réellement la reconnaissance de la carboxylase vis à vis de ces acides glutamiques modifiés. Ces dérivés Boc-X-OMe présentent des activités inhibitrices différentes suivant l'orientation *cis* ou *trans* du  $\gamma$  carboxylate mais aussi en fonction de la nature du cycle (Tableau 5 de la partie biologique).

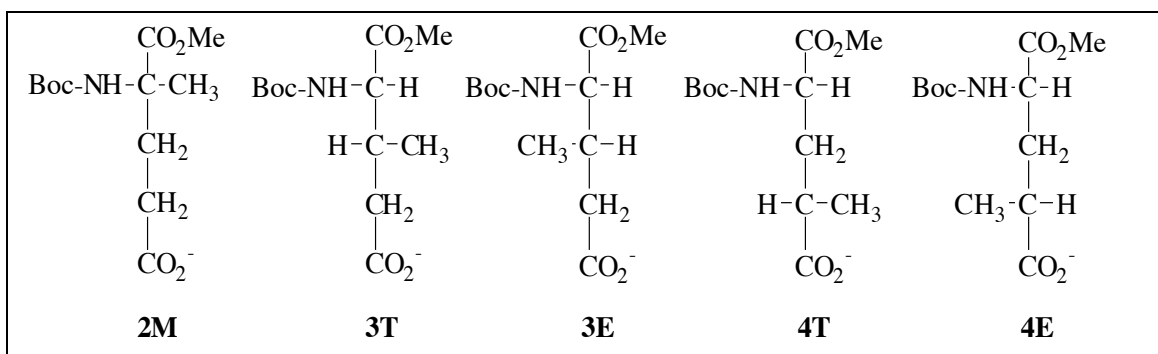


Ces analogues Boc-X-OMe et le substrat associé (Boc-Glu-OMe), représentent la plus petite entité reconnue par la carboxylase. Malgré leur petite taille et une diminution d'affinité, la reconnaissance de l'enzyme pour le résidu carboxylable ne semble pas altérée.

Les analogues Boc-*cis* et *trans*-C6-OMe dont les conformations sont très rigides, possèdent des activités biologiques moins bonnes que les dérivés cyclopentaniques. Les Boc-*cis* et *trans*-C5-OMe ont permis d'explorer un plus grand espace conformationnel grâce à des conformations légèrement moins rigides. Ces analogues, tous inhibiteurs compétitifs du substrats (Boc-Glu-OMe) dans la réaction de carboxylation, agissent sur le même site actif de la carboxylase que le substrat. Dans cette série, les analogues cycliques *trans* sont de meilleurs inhibiteurs que les dérivés *cis* et leur activité biologique différente et graduelle nous a incité à réaliser une étude conformationnelle par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) et Modélisation Moléculaire (MM). Celle-ci a permis de déterminer la nature des différentes conformations de ces analogues en solution. Ces résultats font partie de la **seconde publication**. Ce travail met en évidence les zones de l'espace balayées par le groupe  $\gamma\text{CO}_2^-$  pour les quatre analogues cycliques Boc-X-OMe.

La suite de mon travail s'est orientée vers les analogues linéaires Boc-X-OMe (X représente la chaîne latérale de l'acide glutamique avec un groupement méthyle en positions  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ). Ces analogues, dont les conformations sont moins bloquées que celles des cycles à six carbones, ont néanmoins un groupement méthyle relativement volumineux favorisant certaines conformations. Ces analogues sont:

**2M** [Ester méthylique de l'acide (2*S*) *tert*-Butyle-oxycarbonyl 2-Méthyl glutamique], **3E** [Ester méthylique de l'acide (2*S*-3*S*) *tert*-Butyle-oxycarbonyl 3-Méthyl glutamique], **3T** [Ester méthylique de l'acide (2*S*-3*R*) *tert*-Butyle-oxycarbonyl 3-Méthyl glutamique], **4E** [Ester méthylique de l'acide (2*S*-4*R*) *tert*-Butyle-oxycarbonyl 4-Méthyl glutamique] et **4T** [Ester méthylique de l'acide (2*S*-4*S*) *tert*-Butyle-oxycarbonyl 4-Méthyl glutamique].



Dans cette série, le composé **4T** est un excellent inhibiteur alors que le composé **3E** est un substrat. Les autres analogues ont des activités biologiques plus graduées. Le composé **4E** est un bon inhibiteur alors que composé **3T** et principalement le composé **2M** sont de mauvais inhibiteurs. Les conformations de ces analogues linéaires en solution et leur pourcentage ont été obtenues par une analyse conformationnelle utilisant les résultats de RMN et modélisation moléculaire. Comme pour les analogues cycliques, une corrélation structure-activité a pu être établie grâce aux différences d'activité biologique pour ces analogues. Ces derniers résultats font partie de la **troisième publication** présentée dans ce rapport.

On peut envisager que la conformation agissant au niveau du site actif de la carboxylase, fasse partie des conformations obtenues en solution. Cette conformation commune aux substrats et aux inhibiteurs imposerait, au groupement  $\gamma\text{CO}_2^-$ , un positionnement spécifique dans l'espace. Un classement par famille conformationnelle a permis de regrouper les conformations avec un critère de distance. Ce classement a mis en évidence les zones de l'espace balayées par les groupements NH-BOC,  $\text{CO}_2\text{Me}$  et  $\text{CO}_2^-$  en solution. La comparaison entre les conformations obtenues et l'activité biologique de tous ces analogues a donné les points d'ancrage favorables, pour une première reconnaissance, entre le  $\gamma\text{CO}_2^-$  et le site actif de l'enzyme.

## BIBLIOGRAPHIE – Partie biologique

- (1) Davie, E., W. & Ratnoff, O., D. (1964) *Science*. **145**, 1310.
- (2) McFarlane, R. G. (1964) **202**, 498.
- (3) Dam, H. (1935) *J. Biochem.* **29**, 1273.
- (4) Dam, H. (1935) *Nature*. **135**, 652.
- (5) Dam, H.; Geiger, A.; Glaving, J.; Karrer, P.; Karrer, W.; Rothschild, E. & Salomon, H. (1939) *Helv. Chim. Acta.* **22**, 310.
- (6) McCorquodale, D. W.; Cheney, L. C.; Binkley, S. B.; Holcomb, W. F.; McKee, R. W.; Thayer, S. H. & Doisy, E. A. (1939) *J. Biol. Chem.* **131**, 357.
- (7) Binkley, S. B.; McKee, R. W.; Thayer, S. A. & Doisy, E. A. (1940) *J. Biol. Chem.* **133**, 721.
- (8) Dam, H. & Schonheyder, F. (1934) *Biochemistry*. **28**, 1355.
- (9) Dam, H.; Schonheyder, F. & Tagahansen, C. (1936) *Biochemistry*. **30**, 1075.
- (10) Campbell, H. & Link, K. P. (1941) *J. Biol. Chem.* **138**, 21.
- (11) Hemker, H. C.; Veltkamp, J. J.; Hensen, A. & Loeliger, E. A. (1963) *Nature*. **20**, 589.
- (12) Shah, D. V. & Suttie, J. W. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. **68**, 1653.
- (13) Shah, D. V. & Suttie, J. W. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **150**, 91.
- (14) Nelsestuen, G. L. & Suttie, J. W. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 8176.
- (15) Stenflo, J. (1970) *Acta. Chem. Scand.* **24**, 3762.
- (16) Stenflo, J. & Ganrot, P. O. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 8160.
- (17) Stenflo, J.; Fernlund, P.; Egan, W. & Roepstorff, P. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 2730.
- (18) Nelsestuen, G. L.; Zytovicz, T. H. & Howard, J. B. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 6347.
- (19) Magnusson, S.; Sottrup-Jensen, L.; Petersen, T. E.; Morris, H. R. & Dell, A. (1974) *FEBS. Lett.* **44**, 189.
- (20) Fernlund, P.; Stenflo, J.; Roepstorff, P. & Thomsen, J. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 6125.
- (21) Zytovicz, T. H. & Nelsestuen, G. L. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 2968.
- (22) Enfield, D. L.; Ericson, L. H.; Walsh, K. A.; Neurath, H. & Titani, K. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 16.
- (23) Thogersen, H. C.; Petersen, T. E.; Strup-jensen, L.; Magnusson, S. & Morris, H. R. (1978) *J. Biochem.* **175**, 613.
- (24) Katayama, K.; Ericsson, L. H.; Enfield, D. L.; Walsh, K. A.; Neurath, H.; Davie, E. W. & Titani, K. (1979) *Proc. Natl. acad. Sci.* **76**, 4990.
- (25) Stenflo, J. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 355.
- (26) Di Scipio, R., G.; Hermodson, M., A.; Yates, S., G. & Davie, E., W. (1977) *Biochemistry*. **16**, 698.



- (27) Prowse, C. V. & Esnouf, M. P. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* **5**, 255.
- (28) Price, P. A.; Otsuka, A. S.; Poser, J. W.; Kritapolis, J. & Raman, N. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 1447.
- (29) Price, P. A.; Urist, M. R. & Otawara, Y. (1983) *Biochem. Biophys. Acta.* **117**, 765.
- (30) Linde, A.; Bhowan, H.; Cothran, W. C.; Hoflund, A. & Butler, N. T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* **704**, 235.
- (31) Di Muzio, M. T.; Bhowan, M. & Butler, W. T. (1983) *Biochemistry.* **216**, 249.
- (32) Finkelman, R., D. (1987) *Diss. Abstr. Int. B.* **47**, 3336.
- (33) Levy, R. J.; Lian, J. B. & Gallop, P. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 41.
- (34) Levy, R. J.; Howard, S. L. & Oshry, Z. J. (1986) *Atherosclerosis.* **59**, 115.
- (35) Hauschka, P. V.; Friedman, P. A.; Traverso, H. P. & Gallop, P. M. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 1207.
- (36) Lian, J. B.; Skinner, M.; Glimcher, M. J. & Gallop, P. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 1207.
- (37) Friedman, P. A.; Hauschka, P. V.; Shia, M. A. & Wallace, J. K. (1979) *Biochim. Biophys. Acta.* **583**, 261.
- (38) Buchthal, S. D. & Bell, R. G. (1980) *Vitamin K metabolism and vitamin K dependent proteins*, J. W. Suttie. ed, University Park Press, 311.
- (39) Traverso, H. P.; Hauschka, P. V. & Gallop, P. M. (1980) *Vitamin K metabolism and vitamin K dependent proteins*, J. W. Suttie. ed, University Park Press, 311.
- (40) Bell, R. G. (1980) *Vitamin K metabolism and vitamin K dependent proteins*, J. W. Suttie. ed, University Park Press, 286.
- (41) Soute, B. A. M.; Muller-Esterl, W.; De Boervanden Berg, M. A. G.; Ulrich, M. M. W. & Vermeer, C. (1985) *FEBS Lett.* **190**, 137.
- (42) Van Buskirk, J., J. & Kirsch, W. M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 1033.
- (43) Lee, S. H. & Brodie, A. F. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 499.
- (44) Van Buskirk, J., J. & Kirsch, W. M. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **82**, 1329.
- (45) Buchthal, S. D.; McAllister, C. G.; Laux, D. C. & Bell, R. G. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**, 55.
- (46) Huisse, M. G.; Leclercq, M.; Belghiti, J.; Flejou, J. F.; Suttie, J. W.; Bezeaud, A.; Stafford, D. W. & Guillin, M. C. (1994) *Cancer.* **74**, 1533.
- (47) Varnum, B. C.; Young, C.; Elliot, G.; Garcia, A.; Bartley, T. D.; Fridell, Y.-W.; Hunt, R. W.; Trail, G.; Clogston, C.; Toso, R. J.; Yanagihara, D.; Bennett, L.; Sylber, M.; Merewether, L. A.; Tseng, A.; Escobar, E.; Liu, E. T. & Yamane, H. K. (1995) *Nature.* **373**, 623.

- (48) Stitt, T. N.; Conn, G.; Gore, M.; Lai, C.; Bruno, J.; Radziejewski, C.; Mattsson, K.; Fisher, J.; Gies, D. R.; Jones, P. F.; Masiakowski, P.; Ryan, T. E.; Tobkes, N. J.; Chem, D. H.; Distefano, P. S.; Long, G. L.; Basilico, C.; Goldfarb, M. P.; Lemke, G.; Glass, D. J. & Yancopoulos, G. D. (1995) *Cell*. **80**, 661.
- (49) McIntosh, J. M.; Olivera, S. M.; Cruz, L. J. & Gray, W. R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 14343.
- (50) Magnusson, S.; Petersen, T. E.; Sottrup-Jensen, L. & Claves, H. (1975) *Proteases and Biological control*, D. B. R. E. Reich E. Shaw. ed, Cold Spring harbor Conf on Cell Proliferation, **2**, 123.
- (51) Mizuochi, T.; Fujikawa, K.; Kiesiel, W. & Kobata, A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 6419.
- (52) Lian, B. (1988) *Current advances in vitamin K reseach*, J. W. Suttie. ed, Elsevier, 245.
- (53) Van De Loo, P., G, F.; Soute., B. A. M.; Van Haarlen, L., J, M. & Vermeer, C. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142**, 113.
- (54) Märki, W.; Oppliger, M. & Schwyzer, X. (1977) *Helv. Chim. Acta.* **60**, 807.
- (55) Weber, W. J.; Pollock, S.; Pedersen, L. G. & Hiske, R. G. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 230.
- (56) Soriano-Garcia, M.; Park, C. H.; Tulinsky, A.; Ravichandran, K. & Skrzypczak-Jankun, E. (1989) *Biochemistry.* **28**, 6805.
- (57) Suttie, J. W. & Jackson, C. M. (1977) *Physiol. Rev.* **57**, 1.
- (58) Wallin, R.; Gehardt, O. & Prydz, M. (1978) *J. Biol. Chem.* **169**, 95.
- (59) Bell, R., G. (1978) *Fed. Proc.* **37**, 2599.
- (60) VanHaarlem, L. J. M.; Soute, B. A. M. & Vermeer, C. (1987) *FEBS Lett.* **222**, 353.
- (61) Fasco, M. J.; Hildebrandt, E. F. & Suttie, J. W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 11210.
- (62) Vermeer, C. & Soute, B. A. M. (1988) *Current Advances in Vitamin K Research*, ed, Elsevier, New York, 25.
- (63) Silverman, R. B. & Nandi, D. L. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 1248.
- (64) Silverman, R. B.; Mukharji, I. & Nandi, D. L. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 1248.
- (65) Thijssen, H. H. W.; baars, L. G. M. & Vervoot-Peters, H. T. M. (1988) *Br. J. Pharmacol.* **95**, 675.
- (66) Willingham, A. K. & Matschiner, J. T. (1974) *J. Biochem.* **140**, 435.
- (67) Suttie, J. W. (1980) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 191.
- (68) Egeberg, K. & Helgeland, L. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* **627**, 225.
- (69) Carlisle, T. L. & Suttie, J. W. (1980) *Biochemistry.* **19**, 1161.
- (70) Esmon, C. T. & Suttie, J. W. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 6238.
- (71) Marshall, F. N. (1972) *Proc. Soc. Exp. Med.* **139**, 806.
- (72) Friedman, P. A. & Griep, A. E. (1980) *Biochemistry.* **19**, 3381.
- (73) Larson, A. E.; Friedman, P. A. & Suttie, J. W. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11032.

- (74) Wilson, R. M. & Tharp, G. (1985) *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 4100.
- (75) Friedman, P. A. & Shia, M. A. (1971) *Biochemistry*. **161**, 39.
- (76) Tipton, P. A. & Cleland, W. W. (1988) *Biochemistry*. **27**, 4325.
- (77) Ogita, T. & Knowles, J. R. (1988) *Biochemistry*. **27**, 8028.
- (78) Suttie, J. W.; Larson, A. E.; Canfield, L. M. & Carlisle, T. L. (1978) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **37**, 2605.
- (79) De Metz, M.; Soute, B. A. M.; Hemker, C. H.; Fokkens, R.; Lughenberg, J. & Vermeer, C. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 5326.
- (80) Ham, S. W. & Dowd, P. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1660.
- (81) Dowd, P.; Ham, S. W. & Geib, S. J. (1991) *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 7734.
- (82) Sadowski, J. A.; Snoes, H. K. & Suttie, J. W. (1977) *Biochemistry*. **16**, 3856.
- (83) Dowd, P.; Ham, S. W. & Hershline, R. (1992) *J Am Chem Soc.* **114**, 7613.
- (84) Kuliopulos, A.; Hubbard, B. R.; Lam, Z.; Koski, I. J.; Furie, B.; Furie, B. C. & Walsh, C. T. (1992) *Biochemistry*. **31**, 7722.
- (85) Naganathan, S.; Hershline, R.; Ham, S. W. & Dowd, P. (1993) *J Am Chem Soc.* **115**, 5839.
- (86) Naganathan, S.; Hersline, R.; Ham, S. W. & Dowd, P. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9831.
- (87) Dubois, J.; Gaudry, M.; Bory, S.; Azerad, R. & Marquet , A. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 7897.
- (88) Decottignies-Le Marechal, P.; Ducrocq, C.; Marquet , A. & Azerad, R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 15010.
- (89) Ducrocq, C.; Righini-Tapie, A.; Azerad, R.; Green, J. F.; Friedman, P. A.; Beaucourt , J. P. & Rousseau, B. (1986) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1323.
- (90) Girardot, J. M.; Mack, D. O.; Floyd, R. A. & Johnson, B. C. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 655.
- (91) Esnouf, M. P.; Green, M. R.; Irvine, G. B. & Walter, S. J. (1978) *Biochem.* **174**, 345.
- (92) McTigue, J. J. & Suttie, J. W. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 12129.
- (93) Anton, D. L. & Friedman, P. A. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 14084.
- (94) Vidal-Cros, A.; Gaudry, M. & Marquet, A. (1989) *J. Org. Chem.* **54**, 498.
- (95) Vidal-Cros, A.; Gaudry, M. & Marquet, A. (1990) *J. Biochem.* **260**, 749.
- (96) Dowd, P.; Hershline, R.; Ham, S. W. & Naganathan, S. (1995) *Science*. **269**, 1684.
- (97) Dubois, J.; Dugave, C.; Foures, C.; Kaminski, M.; Tabet, J. C.; Bory, S.; Gaudry , M. & Marquet , A. (1991) *Biochemistry*. **30**, 10506.
- (98) Morris, D. P.; Soute, B. A. M.; Vermeer, C. & Stafford, D. W. (1993) *J Biol Chem.* **268**, 8735.
- (99) Maillet, M. (1995) *Paris 6*. p.60.
- (100) Helgeland, L. (1977) *Biochem. Biophys. Acta.* **499**, 181.

- (101) De Metz, M.; Vermeer, C.; Soute, B. A. M.; Van Schreunburg, G., J. M.; Slotboom, A. J. & Hemker, H. C. (1981) *FEBS Lett.* **123**, 215.
- (102) Hubbard, B. R.; Ulrich, M. M. W.; Jacobs, M.; Vermeer, C.; Walsh, C.; Furie, B. & Furie, B. C. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 6893.
- (103) Wu, S. M.; Morris, D. P. & Stafford, D. W. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 2236.
- (104) Wu, S. M.; Cheung, W. F.; Frazier, D. & Stafford, D. W. (1991) *Science.* **254**, 1634.
- (105) Berkner, K. L.; Harbeck, M.; Lingenfelter, S.; Bailey, C.; Sandershinck, C. M. & Suttie, J. W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 6242.
- (106) Singer, S. J. (1990) *Ann. Rev. Cell. Biol.* **6**, 247.
- (107) Jones, J. P.; Fausto, A.; Houser, R. M.; Gardner, E. J. & Olson, R. E. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **72**, 589.
- (108) Uotila, L. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 135.
- (109) Jones, J. P.; Gardner, E. J.; Cooper, T. G. & Olson, R. E. (1977) *J. Biol. Chem.* **251**, 7738.
- (110) Soute, B. A. M.; Acher, F.; Azerad, R. & Vermeer, C. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* **1034**, 11.
- (111) Mack, D. O.; Woffensberger, M.; Girardot, J. M.; Miller, J. A. & Johnson, B. C. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 2656.
- (112) Johnson, B. C.; Cheung, A. Y. & Suttie, J. W. (1988) *Biofactors.* **1**, 61.
- (113) Tomita, S.; Ohnishi, J.; Nakano, M. & Ichikawa, Y. (1991) *J. Ster. Biochem. Mol. Bio.* **39**, 479.
- (114) Thijssen, H. H. W. & Janssen, Y. P. G. (1994) *J Pharmacol Exp Ther.* **270**, 554.
- (115) Thijssen, H. H. W.; Hamulyak, K. & Willigers, M. (1988) *Thrombosis and hoemostasis.* **60**, 35.
- (116) Thijssen, H. H. W. & Baars, L. G. M. (1991) *Biochemical Pharmacology.* **42**, 2181.
- (117) Suttie, J. W. (1988) *BioFactors.* **1**, 55.
- (118) Davie, E. W. (1987) *The blood coagulation factors: their CDNAs, genes and expression.*, R. W. Colman, J. Hirsh, V. Mardar and E. W. Salzman. ed, Lippincott, Philadelphia, 242.
- (119) Suttie, J. W. (1993) *FASEB J.* **7**, 445.
- (120) Ulrich, M. M. W.; Furie, B.; Jacobs, M. R.; Vermeer, C. & Furie, B. C. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9697.
- (121) Huber, P.; Schmitz, T.; Griffin, J.; Jacobs, M.; Walsh, W.; Furie, B. & Furie, B. C. (1990) *Journal. Biological. Chemistry.* **265**, 12467.
- (122) Suttie, J. W. S.; Hageman, J. M.; Lehrman, S. R. & Rich, D. H. (1976) *J. Biol. Chem.* **251**, 5827.

- (123) Rich, D. H.; Leehrman, S. R.; Kawai, M.; Goodman, H. L. & Suttie, J. W. (1980) *in Vitamin K Metabolism and Vitamin K dependent Proteins*, J. W. Suttie. ed, University Park Press, Baltimore, **24**, 471.
- (124) Finnan, J. H.; Goodman, L. & Suttie, J. W. (1980) *In Vitamin K Metabolism and Vitamin K Dependent Proteins*, J. W. Suttie. ed, University Park Press, Baltimore, 480.
- (125) Rikong-Adie, H.; Decottignies-Le Marechal, P.; Azerad, R. & Marquet, A. (1980) *Vitamin K metabolism and vitamin K dependent protein*, J. W. Suttie. ed, University Park press, 518.
- (126) Romiti, S. & Kappel, W. K. (1985) *J. Biochem. Biophys. Met.* **11**, 59.
- (127) Pinpaneau, B.; Gaudry, M. & Marquet, A. (1986) résultats non publiés.
- (128) Dubois, J. (1987) *Thèse d'état. Paris 6*, p.64.
- (129) Rich, D. H.; Kawai, M.; Goodman, H. L.; Engelke, J. & Suttie, J. W. (1983) *FEBS Lett.* **155**, 79.
- (130) Vidal-Cros, A.; Bory, S.; Gaudry, M. & Marquet, A. (1989) *Tetrahedron Lett.* **30**, 1799.
- (131) Bory, S.; Gaudry, M. & Marquet, A. (1986) *Nouveau Journal de Chimie.* **10**, 709.
- (132) Gaudry, M.; Bory, S.; Dubois, J.; Azerad, R. & Marquet, A. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 454.
- (133) Bory, S.; Dubois, J.; Gaudry, M. & Marquet, A. (1984) *Int. J. Pept. & Protein Res.* **24**, 505.
- (134) Dugave, C. (1990) *Thèse d'état. Paris 6*, p 134.
- (135) Guibé, E.; Decottignies-Le Marechal, P.; Le Marechal, P. & Azerad, R. (1984) *FEBS Lett.* **177**, 265.
- (136) Decottignies-Le Marechal, P.; Rikong-Adié, P.; Azerad, R. & Gaudry, M. (1979) *Biochem. Biophys. Res.* **90**, 700.
- (137) Acher, F. & Azerad, R. (1991) *Int. J. Pept. Pro. Res.* **37**,

## **Chapitre II - RMN ET ANALYSE CONFORMATIONNELLE**

# 1. Principe de base de la Résonance Magnétique Nucléaire

## 1.1. Le phénomène quantique

La physique atomique et la mécanique quantique ont montré que certains noyaux dont fait partie le proton, possèdent un moment de spin  $\vec{I}$  et par suite également un moment magnétique  $\vec{\mu}$ . Les observations RMN se font sur les noyaux possédant un moment de spin  $\vec{I} \neq 0$ . Ces deux grandeurs  $I$  et  $\mu$  sont liées par l'équation (1) avec le rapport gyromagnétique  $\gamma$  constante caractéristique de chaque isotope et  $\hbar$ , la constante de Planck/ $2\pi$ .

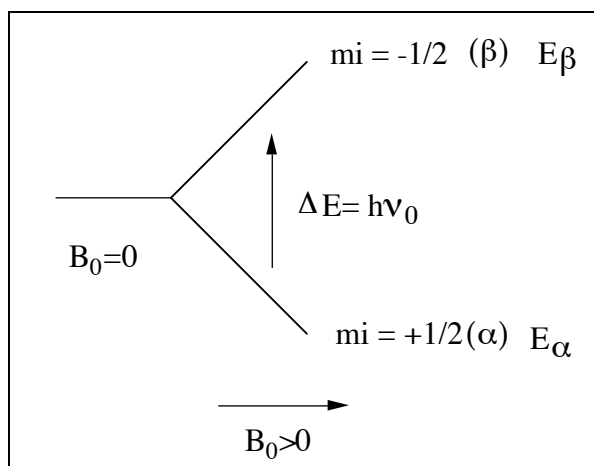
$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{I} \quad (1)$$

La mécanique quantique a permis de décrire un système atomique grâce à l'équation de Schrödinger  $H\varphi = E\varphi$  (où  $H$  est l'hamiltonien et  $\varphi$  la ou les fonctions propres associées). Les fonctions propres du proton ayant un spin  $1/2$  sont ici  $\alpha$  pour  $m_i = +1/2$  et  $\beta$  pour  $m_i = -1/2$ . Pour un noyau de spin  $1/2$  comme le proton, sous l'action d'une induction magnétique  $\vec{B}_0$ , le moment magnétique subit une levée de dégénérescence (effet Zeeman) qui conduit à deux niveaux séparés. La différence d'énergie entre ces niveaux est proportionnelle à l'intensité de l'induction magnétique  $\vec{B}_0$ . C'est la condition nécessaire pour observer une raie spectrale. Les populations des spins  $\alpha$  et  $\beta$  sont régies par la statistique de Boltzmann.

$$\begin{aligned} N_\alpha / N_\beta &= e^{(\Delta E) / kT} \\ &= e^{(h\nu_0) / kT} \end{aligned} \quad (2)$$

Pour induire une transition dans un état plus élevé, il faudra une énergie suffisante telle qu'elle réponde à l'équation (3).

$$h\nu_0 = \gamma \hbar B_0 \quad \text{comme } \omega_0 = 2\pi\nu_0 \quad \omega_0 = \gamma B_0 \quad (3)$$

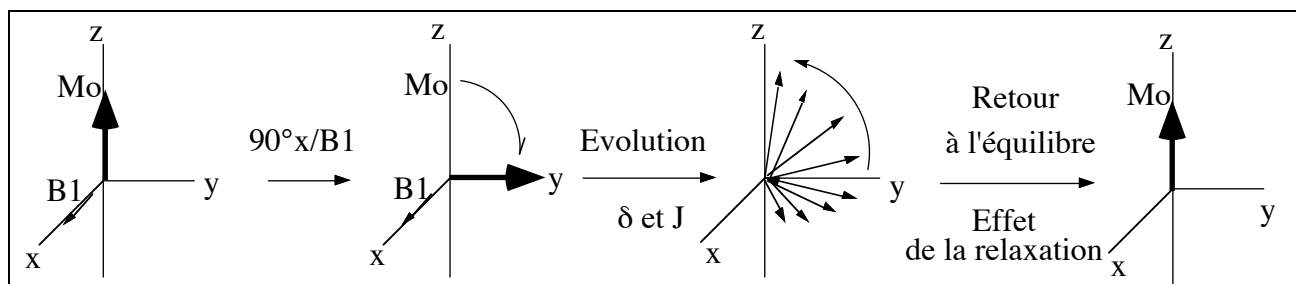


**Figure 1:** Energie des états de spin  $\alpha$  et  $\beta$  en corrélation avec le champ  $B_0$

L'action d'une induction magnétique supplémentaire  $\mathbf{B}_1$  perpendiculaire à  $\mathbf{B}_0$ , à la fréquence de Larmor  $\nu_0$ , va créer le phénomène de résonance par perturbation des populations des spins  $\alpha$  et  $\beta$ . On se trouve alors à la résonance, qui correspond à l'absorption d'une onde de fréquence  $\nu_0$ . L'énergie absorbée est éliminée par les phénomènes de relaxation.

## 1.2. Le principe vectoriel

Il résulte de l'effet Zeeman, une aimantation  $\vec{M}$  alignée selon  $\vec{B}_0$  proportionnelle à la différence de population entre les deux niveaux et dont les aimantations microscopiques font précession avec une pulsation  $\omega_0 = \gamma B_0$  (précession de Larmor). Cette aimantation peut être plus ou moins intense, car elle est proportionnelle à  $\gamma$  (rapport gyromagnétique du noyau), à la concentration de l'échantillon ainsi qu'à l'abondance naturelle du noyau observé. Lors d'une expérience de RMN, nous allons provoquer des transitions entre ces niveaux par une radiation électromagnétique de champ  $\vec{B}_1$  perpendiculaire à  $\vec{B}_0$ , d'énergie  $\Delta E = h\nu_0$ . Le champ  $\vec{B}_1$  crée une cohérence de phase et fait apparaître des résultantes de l'aimantation dans le plan x-y. Cette aimantation éphémère dans le plan x-y est à ce moment détectable et va revenir à sa position d'équilibre suivant la direction de z (direction de  $\vec{B}_0$ ) grâce aux phénomènes de relaxation longitudinale ( $T_1$ ).



**Figure 2:** Evolution de l'aimantation après une impulsion  $90^\circ_x$



### 1.3. Le déplacement chimique

Chaque noyau résonne à une fréquence caractéristique qui dépend de son environnement électronique (du type de liaisons et d'atomes voisins) et de l'induction magnétique  $\vec{B}_0$  utilisée. Pour plus de commodités, le déplacement chimique est exprimé en partie par million (ppm) (Equation 4) par rapport à la fréquence  $\nu_0$  du spectromètre et une fréquence de référence.

$$\delta_{\text{ppm}} = \frac{\nu_{\text{substance}} - \nu_{\text{référence}}}{\nu_0} * 10^6 \quad (4)$$

### 1.4. Le couplage spin-spin

L'énergie d'interaction spin-spin entre deux noyaux **A** et **X** est proportionnelle au produit scalaire des moments des deux noyaux **A** et **X** (Equation 5).

$$E = J_{AX} \cdot \mathbf{I}(A) \cdot \mathbf{I}(X) \quad (5)$$

$J_{AX}$  représente la constante de couplage scalaire entre les deux noyaux **A** et **X**. A l'opposé du déplacement chimique, la constante de couplage est indépendante du champ  $\vec{B}_0$  utilisé. Ces constantes sont exprimées alors en Hertz. Dans les spectres de RMN 1D du premier ordre, une analyse simple peut être réalisée.

Dans le cas où la relation  $\Delta\nu \gg J$  n'est pas observée, on se trouve alors dans des systèmes plus fortement couplés, la lecture directe des constantes de couplage est incorrecte. Pour des systèmes très fortement couplés, le calcul ou une simulation à l'aide des logiciels tel que PANIC (Parameter Adjustment in NMR by Iteration Calculation) ou NMR II permettent de résoudre la complexité du système de spins.

La mesure de ces constantes de couplages, qu'elles soient homo ou hétéronucléaires, apporte une information structurale précieuse sur la molécule étudiée (se reporter au chapitre sur l'analyse conformationnelle)

## 1.5. Les transitions et la relaxation

### 1.5.1. Les différentes transitions

Lors d'une impulsion de champ radiofréquence  $\vec{B}_1$ , on fait basculer l'aimantation d'un angle  $\theta$  de rotation suivant l'équation (8). Cet angle varie suivant le champ  $\vec{B}_1$  utilisé et suivant le temps de l'impulsion  $t$ .

$$\Delta\theta = \gamma B_1 \Delta t \quad (8)$$

Durant une séquence, une succession d'impulsions provoque les transitions nécessaires pour l'observation d'une raie spectrale. La notion de transition décrit toutes les possibilités d'échange de population de spin. Les cohérences qui découlent de ces transitions peuvent être des cohérences un quanta  $p=1$  observables et nécessaire pour l'obtention d'un signal en RMN alors que les cohérences à deux quanta  $p=2$ , zéro quanta  $p=0$  et multiples quanta ne peuvent être observées directement. Pour un système de deux spins faiblement couplés, le diagramme ci-dessous représente les différentes transitions possibles. Les populations de ces niveaux d'énergie sont régies par les divers phénomènes de relaxation.

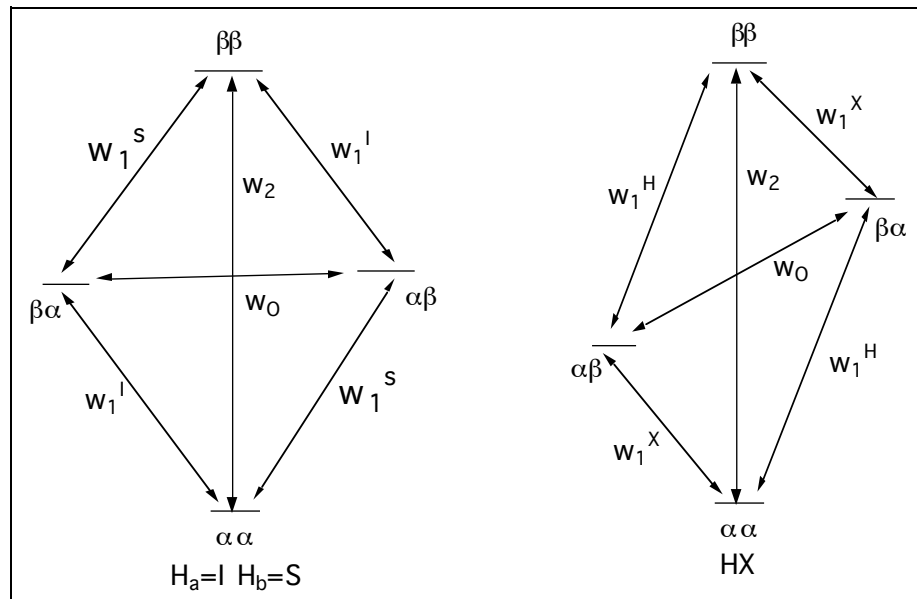


Diagramme d'énergie d'un système à deux spins faiblement couplé.

Si l'on considère deux protons I et S couplés, l'équation de Bloch nous donne pour le proton I:

$$\frac{dI_z}{dt} = -\frac{(I_z - I_0)}{T_1}$$

$$\frac{dI_z}{dt} = -(2W_1^I + W_2 + W_0) (I_z - I_0) - (W_2 - W_0) (S_z - S_0)$$

$$\frac{dI_z}{dt} = (\rho_{IS} + \rho_I^*) (I_z - I_0) - \sigma^{IS} (S_z - S_0) \quad (9)$$

L'aimantation du noyau I est alors fonction du temps et dépend de  $\rho_{IS}$  (la vitesse de relaxation de I sous la seule influence de S) et de  $\rho^*I$  (la vitesse de relaxation de I par n'importe quel autre noyau). La troisième vitesse  $\sigma^{IS}$  est la vitesse de relaxation croisée de S par I et de I par S. Cette dernière aura une grande importance dans les effets Overhauser (NOE).

### 1.5.2. Les interactions créant le phénomène de relaxation

#### a) La relaxation dipôle-dipôle ou dipolaire

C'est la plus importante dans les phénomènes de relaxation. Ce sont des interactions à travers l'espace entre noyaux qui produisent des champs fluctuants locaux. Ces champs locaux vont agir sur les noyaux voisins en agissant les uns sur les autres.

$$R^{DD} = \left(\frac{\mu^o}{4\pi}\right)^2 \frac{\gamma_H \gamma_X \hbar^2}{r^6} \tau_c$$

$\gamma_H$  = rapport gyromagnétique  
 $\tau_c$  = temps de corrélation = temps de persistance des champs fluctuants  
 $r^6$  = distance entre 2 noyaux

(10)

Cette relaxation jouera un rôle très important dans les effets Overhauser

#### b) Les autres processus de relaxation

##### -L'anisotropie de déplacement chimique

Ce processus apparaît lorsque la constante d'écran  $\sigma$  du nuage électronique n'a pas une symétrie sphérique. Le tenseur de déplacement chimique devient anisotrope ( $\sigma_{xx} \neq \sigma_{yy} \neq \sigma_{zz}$ ) ce qui produit un mécanisme de relaxation.

##### -La relaxation quadripolaire

Elle ne va concerner que les noyaux quadripolaires avec un spin supérieur à 1/2

##### - La relaxation spin-rotation

Ce phénomène de relaxation est due à l'interaction entre le moment magnétique nucléaire I et le moment magnétique moléculaire J. Cette relaxation intervient surtout pour les petites molécules.

-La relaxation scalaire

Cette relaxation est liée à l'existence du couplage scalaire (interactions qui s'établissent à travers les liaisons)

-La relaxation Electron-Noyau

Elle apparait de façon aléatoire lorsqu'il y a, présence d'électrons libres (électrons de O<sub>2</sub> par exemple) proche de la molécule. Cette relaxation perturbe les mesures. Il est alors préférable de dégazer et de sceller le tube avant toutes mesures des temps de relaxation longitudinale ou transversale (cas de O<sub>2</sub>).

**1.5.3. L'effet Overhauser (NOE)**

La condition pour qu'un effet Overhauser se produise est qu'il doit y avoir relaxation dipolaire entre les deux noyaux considérés. Considérons maintenant, l'évolution de l'aimantation d'un spin I en fonction du temps qui est donnée par l'équation de Solomon:

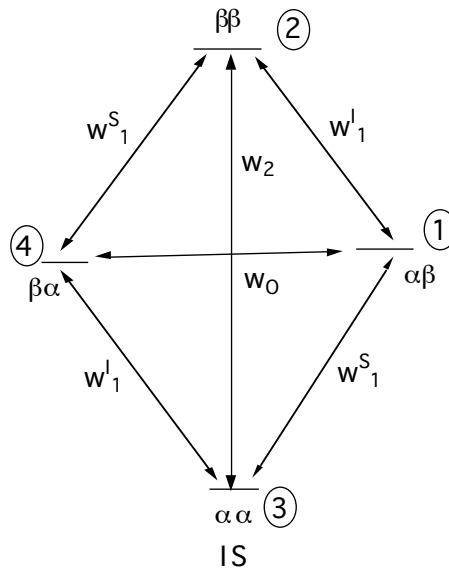
$$\frac{dI_z}{dt} = -(2W_1^I + W_2 + W_0) (I_z - I_0) - (W_2 - W_0) (S_z - S_0)$$

si l'on sature par irradiation,  $S_z = 0$  et à l'état stationnaire  $\frac{dI_z}{dt} = 0$

$$I_z - I_0 = \frac{W_2 - W_0}{(2W_1^I + W_2 + W_0)} S_0$$

$$\frac{I_z - I_0}{I_0} = \frac{W_2 - W_0}{(2W_1^I + W_2 + W_0)} \frac{S_0}{I_0} \tag{11}$$

Le principe de l'effet NOE (nuclear Overhauser Effet) correspond à l'application d'un champ B<sub>2</sub> de faible puissance à la fréquence d'un noyau S. On observe alors l'évolution de l'intensité du noyau voisin I. Cette augmentation ou cette diminution de l'intensité du noyau I sera d'autant plus importante que les deux noyaux seront proches dans l'espace. Utilisons le diagramme d'énergie d'un système à deux spins faiblement couplés (couplage dipolaire).



Si l'on sature par un champ B<sub>1</sub>, le noyau S c'est à dire les transitions W<sup>S</sup><sub>1</sub>, les populations de Boltzmann entre les états 3 et 1 ainsi que 4 et 2 seront perturbées. Les états 1 et 2 seront plus peuplés alors que les états 3 et 4 seront moins peuplés. Les états 2 et 1 vont alors se dépeupler sous l'effet de la relaxation croisée W<sub>2</sub> et W<sub>0</sub> ce qui entraînera une augmentation de l'intensité du signal au niveau du noyau I (transitions w<sup>I</sup><sub>1</sub>). Si W<sub>0</sub> << W<sub>2</sub>, on parlera alors de NOE positif. Cette condition est remplie pour des molécules mobiles dans des solutions à faible viscosité ou de molécules à faible poids moléculaire. Si W<sub>0</sub> >> W<sub>2</sub>, on observera alors une diminution d'intensité du signal et on parlera de NOE négatif. Ces conditions sont remplies lorsque par exemple on augmente le champ B<sub>0</sub> ou lorsque l'on passe à des macromolécules (peptides ou protéines).

Si on a S et I de même nature

$$S_0 = I_0$$

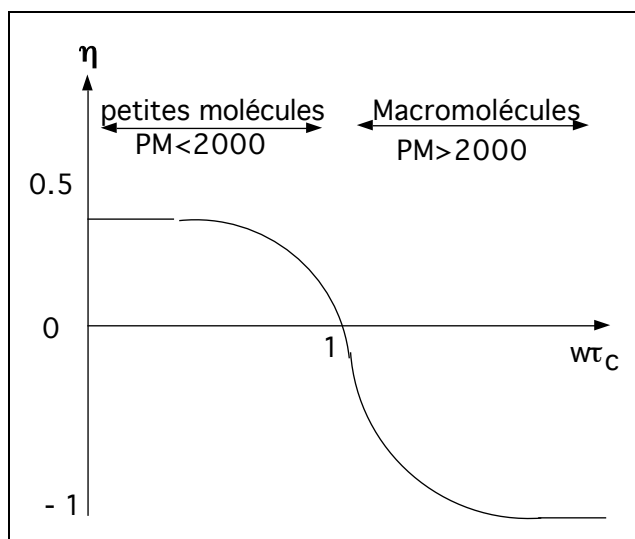
on a donc pour l'équation (11)

$$\frac{I_z - I_0}{I_0} = \frac{W_2 - W_0}{(2W_1^H + W_2 + W_0)} = \frac{\sigma^{IS}}{\rho_{IS} + \rho_I^*}$$

Dans le cas du rétrécissement extrême ( $\omega\tau_c = 1$ ) où les NOE sont positifs entre protons, on a **η max** qui est égal à:

$$\eta_{\max} = \frac{\sigma^{IS}}{\rho_{IS}} = \frac{1}{2} \quad \text{avec } \rho_I^* = 0 \quad \text{et } \gamma^S = \gamma^I = \gamma^H$$

Si on sort du rétrécissement extrême alors  $\rho_I^* \neq 0$  dans ce cas **η** évolue vers des valeurs nulles ou négatives.

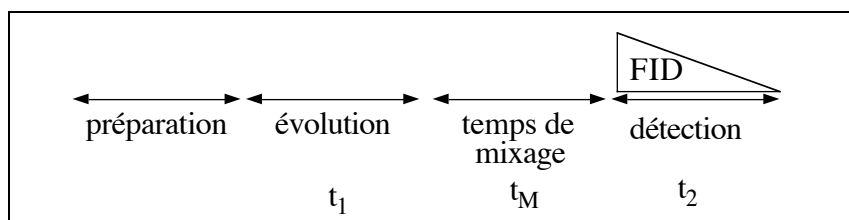


**Figure 3:** Evolution de  $\eta$  en fonction de  $\omega\tau_c$

## 2. La RMN à deux dimensions (2D)

### 2.1. Le principe de la RMN 2D

L'expérience de RMN à deux dimensions repose sur quatre intervalles de temps : la préparation, l'évolution, le mélange et la détection (Figure 4).



**Figure 4:** Les intervalles de temps pour les expériences 2D.

Durant le temps de préparation, on prépare le système de spin en créant une aimantation transversale à l'aide d'une impulsion  $90^\circ$ . Durant le temps d'évolution, le système évolue suivant divers facteurs, les deux plus importants étant le déplacement chimique et le couplage scalaire spin-spin. Dans certains cas et notamment dans les expériences NOESY, le temps de mixage est nécessaire pour que les spins échangent de l'aimantation grâce aux phénomènes de relaxation dipolaire déjà expliqué dans l'effet Overhauser. Dans d'autres cas le temps de mixage est nécessaire au transfert de polarisation ou de cohérence. Le dernier temps  $t_2$  est le temps de détection du signal. Durant cette période  $t_2$  (domaine de temps qui donnera lieu à la dimension  $F_2$  après transformée de Fourier), le système évolue en fonction du déplacement chimique et le couplage scalaire. Certains couplages sont éliminés lorsque il y a découplage durant l'acquisition.

## 2.2. Les Opérateurs-Produits

L'utilisation des opérateurs-produits introduit par Ernst et ses collaborateurs (1) permet de s'affranchir des calculs de mécanique quantique et qui passent inévitablement par la théorie de la matrice densité. Ce formalisme des opérateurs produits permet la compréhension des séquences d'impulsions aussi bien pour le calcul de l'aimantation observable que pour la compréhension de la physique des spins.

Dans le cas d'un système à deux spins I et S faiblement couplés ( $|v_I - v_S| \gg J$ ), 16 opérateurs-produits sont développés:

-Populations des spins I et S:

- $I_z, S_z$ .

-Cohérences à un quantum:  $p \pm 1$

- $I_x, I_y, S_x, S_y$ . Doublet en phase du spin I ou S selon les axes x ou y.
- $2I_xS_z, 2I_yS_z$ . Doublet en antiphase du spin I selon les axes x ou y.
- $2I_zS_x, 2I_zS_y$ . Doublet en antiphase du spin S selon les axes x ou y.

-Cohérences zéro et multi quanta:  $p0, p \pm 2, (p \pm 3 \dots p \pm n)$

•  $2I_xS_x, 2I_xS_y, 2I_yS_y, 2I_yS_x$ . États de cohérence à deux spins dans le plan transverse correspondant à la superposition de transitions zéro et deux quanta. Ces cohérences sont détectées indirectement en spectroscopie 2D. Les cohérences zéro quanta pures sont obtenues par combinaisons linéaires:  $2I_xS_x + 2I_yS_y$  ou  $2I_yS_x - 2I_xS_y$ . De même pour les cohérences double quanta pures:  $2I_xS_x - 2I_yS_y$  ou  $2I_xS_y + 2I_yS_x$ .

•  $2I_zS_z$ . État de cohérence longitudinale correspondant à une aimantation nulle (composantes selon +z et -z).

- $E/2$ . E étant l'opérateur unité.

**\*Evolution des opérateurs en fonction des impulsions** (sens trigonométrique)

Une impulsion  $90^\circ_x$  fera passer l'aimantation par exemple  $I_z$  en  $-I_y$

Une impulsion  $180^\circ_y$  fera passer l'aimantation par exemple  $S_x$  en  $-S_x$

**\*Evolution des opérateurs en fonction du déplacement chimique et des constantes de couplages.**

• Ces différents états de cohérence peuvent évoluer en  $\sin\omega t$  et  $\cos\omega t$  en fonction du déplacement chimique considéré et des constantes de couplage  $\cos\pi J\tau$  et  $\sin\pi J\tau$  ou  $\tau$  correspond aux délais laissés durant les séquences ( $t1, d_x, \Delta$ , et  $t2$ ) (Schéma 1 ci-dessous)

Impulsions	I ou S	Déplacement chimique
$90^\circ_x = \frac{\pi}{2} I_x$	$180^\circ_y = \pi I_y$	$I_z \longrightarrow I_z$
$I_x \longrightarrow I_x$	$I_x \longrightarrow -I_x$	$I_x \longrightarrow I_x \cos \omega t + I_y \sin \omega t$
$I_y \longrightarrow I_z$	$I_y \longrightarrow I_y$	$I_y \longrightarrow I_y \cos \omega t + I_x \sin \omega t$
$I_z \longrightarrow -I_y$	$I_z \longrightarrow -I_z$	
Couplage		
<u>Evolution des cohérences 1 quanta en phase</u>		<u>Evolution des cohérences 1 quanta en anti-phase</u>
$I_x^A \xrightarrow{J_{AM}} I_x^A \cos \pi J t + 2I_y^A S_z^M \sin \pi J t$	$2I_x^A S_z^M \xrightarrow{J_{AM}} 2I_x^A S_z^M \cos \pi J t + I_y^A \sin \pi J t$	
$I_y^A \xrightarrow{J_{AM}} I_y^A \cos \pi J t - 2I_x^A S_z^M \sin \pi J t$	$2I_y^A S_z^M \xrightarrow{J_{AM}} 2I_y^A S_z^M \cos \pi J t - I_x^A \sin \pi J t$	
$I_z \longrightarrow I_z$	$2S_x^A I_z^M \xrightarrow{J_{AM}} 2S_x^A I_z^M \cos \pi J t + S_y^A \sin \pi J t$	
	$2S_y^A I_z^M \xrightarrow{J_{AM}} 2S_y^A I_z^M \cos \pi J t - S_x^A \sin \pi J t$	
<u>Evolution des cohérences 2 et 0 quanta</u>		
	$2I_x^A S_x^M \xrightarrow{J_{AM}} 2I_x^A S_x^M$	
	$2I_y^A S_y^M \xrightarrow{J_{AM}} 2I_y^A S_y^M$	
	$2I_y^A S_x^M \xrightarrow{J_{AM}} 2I_y^A S_x^M$	
	$2I_x^A S_y^M \xrightarrow{J_{AM}} 2I_x^A S_y^M$	
	$2I_z^A S_z^M \xrightarrow{J_{AM}} 2I_z^A S_z^M$	

**Schéma 1:** Les principales opérations avec les opérateurs produits

**\*Les impulsions 180 et leur pouvoir de refocalisation (principe de l'écho de spin)  
la séquence écho de spin:  $\Delta$ -180°- $\Delta$ .**

Les impulsions 180° présentent des propriétés particulières quant à leur action sur les déplacements chimiques ou les constantes de couplage lorsque les diverses aimantations sont dans le plan x-y. Ces impulsions sont accompagnées de délais  $\Delta$  d'évolution placés de part et d'autre de l'impulsion 180°. Les différentes propriétés pour des systèmes homo et hétéronucléaires sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

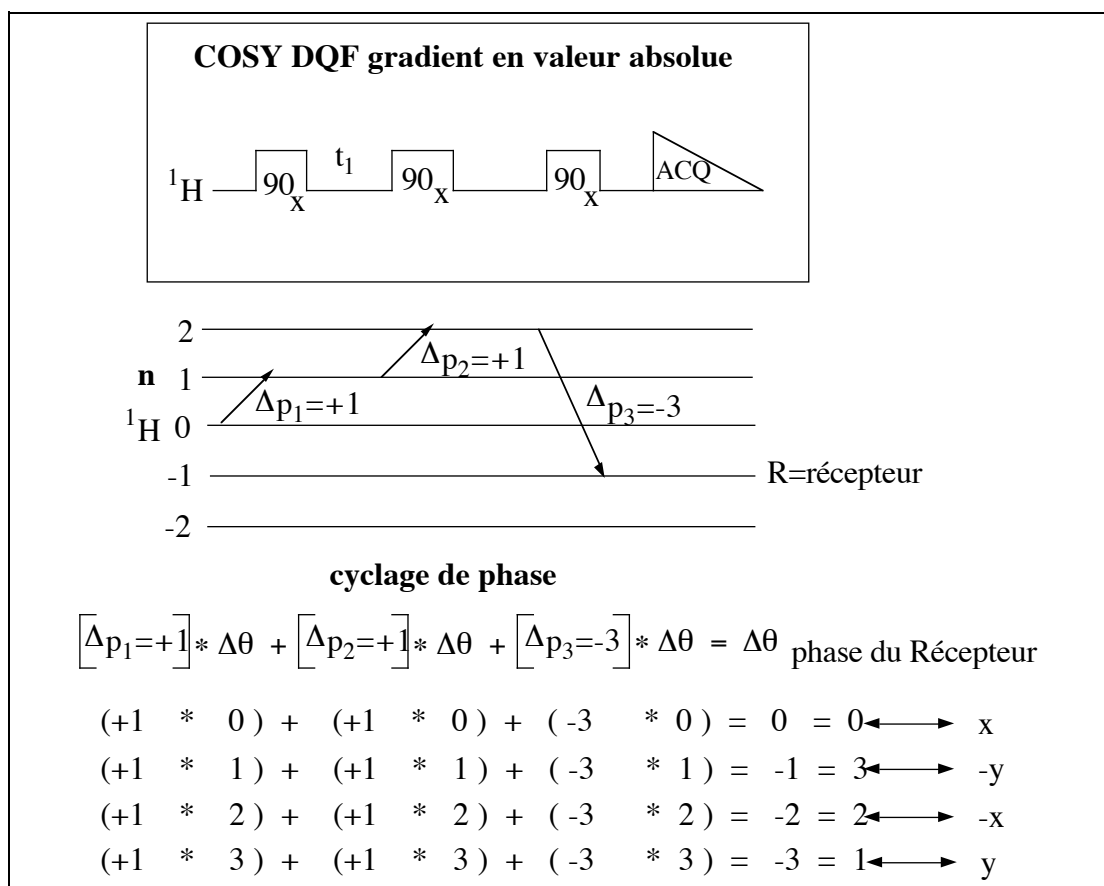
<i>Système homonucléaire</i>	JH-H	JX-H	déplacement chimique
$\Delta$ -180°- $\Delta$	évolution		refocalisation
<i>Système hétéronucléaire</i>	JH-H	JX-H	déplacement



			chimique
$\Delta-180^\circ_{\text{H}}-\Delta$ ou $\Delta-180^\circ_{\text{X}}-\Delta$	évolution	refocalisation	refocalisation
$\Delta-180^\circ_{\text{H}}-\Delta$ et $\Delta-180^\circ_{\text{X}}-\Delta$ $180^\circ_{\text{H}}$ sélectif et $180^\circ_{\text{X}}$ non sélectif	évolution refocalisation	évolution évolution	refocalisation refocalisation

### 2.3. Notion de cohérence

Les transitions simple quanta sont permises, selon la règle de sélection  $\Delta m = \pm 1$  et observables; elles seules sont à l'origine du signal observé et reçu comme une force électromotrice détectée par la sonde de l'aimant. L'évolution des cohérences simple quanta peut être décrite selon le modèle vectoriel et seules les cohérences simple quanta ( $p = \pm 1$ ) sont observables. A contrario, les cohérences multi quanta (zéro, double, triple... quanta) ( $p = 0, \pm 2, \pm n$ ) qui jouent néanmoins un rôle important, sont interdites et non observables. Elles peuvent cependant être observées de manière détournée lorsqu'elles sont retransformées en un signal détectable grâce à une impulsion appropriée.



**Figure 5:** Exemple de la séquence COSY

## 2.4. Le cyclage de phase

Le cyclage de phase<sup>(2)</sup> permet en modifiant la phase de l'émetteur sur plusieurs expériences de sélectionner les transitions désirées et d'éliminer beaucoup d'artefacts dus aux imprécisions dans les paramètres expérimentaux. Le cyclage de phase CYCLOPS est le plus utilisé, il permet sur quatre expériences où l'on déphase l'émetteur de 90°, d'additionner les signaux.

phase de l'émetteur	code utilisé
<b>x</b>	<b>0</b>
<b>y</b>	<b>1</b>
<b>-x</b>	<b>2</b>
<b>-y</b>	<b>3</b>

Une observation sélective des cohérences désirées peut donc être obtenue par un cyclage de phase sur les impulsions constituant la séquence en accord avec la phase du récepteur. Il sera possible en jouant sur la phase de ce dernier d'additionner ou de soustraire (sur plusieurs balayages) l'aimantation ayant suivie les chemins de cohérences que l'on souhaite respectivement observer ou éliminer. Ce qui importe ici, c'est le fait que chacune des impulsions modifient également, en plus du niveau de cohérence, la phase de la cohérence. Dans ce cas, la règle suivante permet de trouver le cyclage de phase approprié pour une séquence particulière.

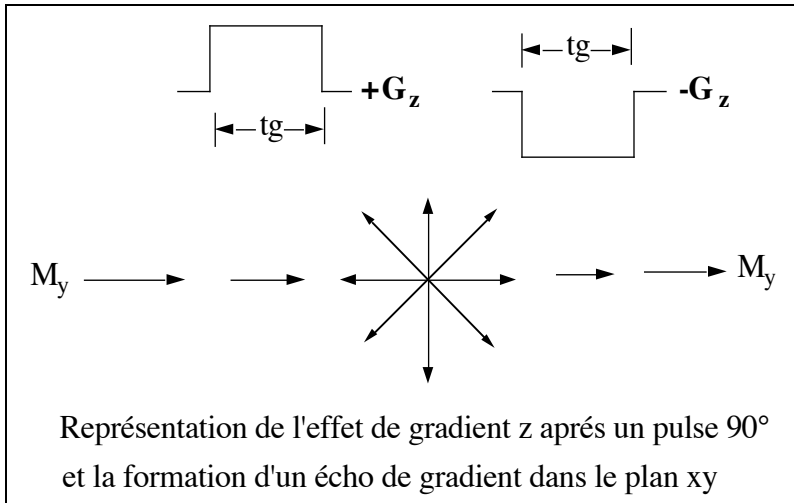
Si la phase de l'impulsion est modifiée d'un angle  $\Delta\theta$ , les cohérences pour lesquelles l'impulsion provoque un saut de niveau de cohérence  $\Delta\rho$ , modifient la phase  $\Phi$  d'une valeur  $\Delta\rho \times \Delta\theta$ .

$$\Delta\Phi = \Delta\rho \times \Delta\theta$$

La figure 5 montre une expérience COSY DQF non phasable avec ses ordres de cohérences ainsi que le cyclage de phase utilisé.

## 2.5. Les gradients de champ

Contrairement au cyclage de phase qui permet de sélectionner uniquement certains chemins et le signe qui en résulte sur plusieurs expériences, l'utilisation des gradients de champ<sup>(3)</sup> est un gain de temps puisque l'on peut sélectionner le même chemin en une expérience mais avec une perte de sensibilité. Son principe réside en une application pendant un temps relativement court (impulsion) d'une induction magnétique  $B(z)$  suivant l'axe z parallèle à  $B_0$  dont l'intensité varie linéairement suivant l'axe z du référentiel.

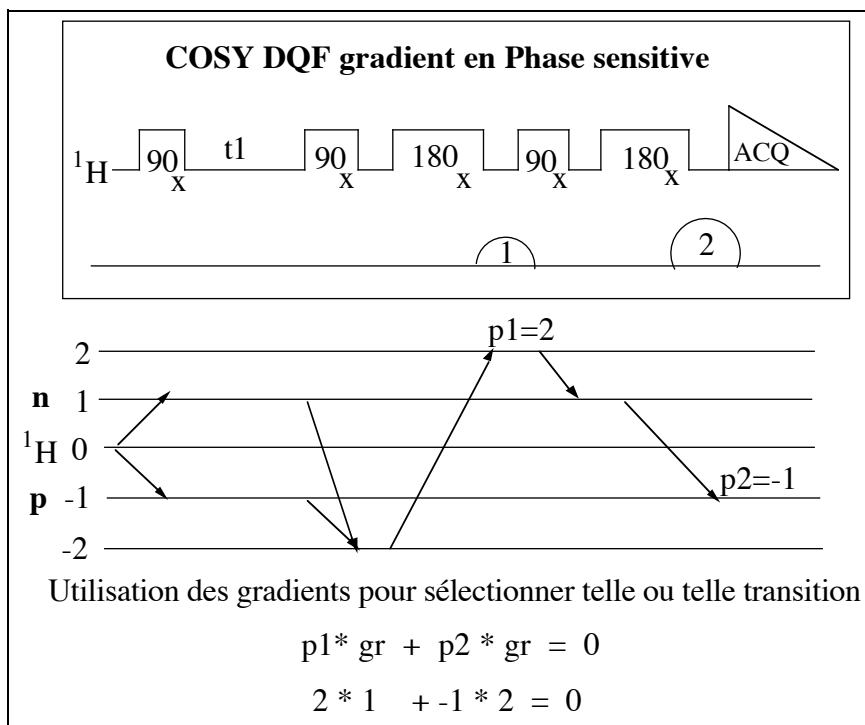


Les gradients de champ<sup>(4)</sup> ont la propriété de disperser les moments magnétiques (perte de cohérence de phase). Ils détruisent l'aimantation transversale et de manière générale les cohérences présentes. Mais cette destruction ne se fait pas de manière aléatoire, elle dépend de la durée du gradient, de son intensité, de l'ordre des cohérences présentes et du rapport gyromagnétique du noyau. Comme pour le cyclage de phase, une règle permet de retrouver dans une séquence, l'intensité des gradients à utiliser. Cette relation lie le rapport gyromagnétique du noyau  $\gamma$  avec l'ordre de cohérence  $p$  et la puissance du gradient  $Gz$ .

Dans une séquence, on aura:

$$\sum \gamma p Gz = 0$$

Un exemple est donné pour la séquence COSY Double Quanta Filtrée.



## **Figure 6:** La séquence COSY Double Quanta Filtrée avec deux gradients

Dans ces expériences utilisant les gradients de champ, l'aimantation résiduelle de l'eau est éliminée dès lors que l'on passe dans une séquence par des niveaux de cohérence +2 ou -2. L'aimantation de l'eau qui ne dérive que d'états simple quanta, est alors défocalisée par l'écho de gradient. L'aimantation résultante détectée se trouve alors bien moindre. C'est un autre avantage des gradients de champ

### **2.6. Les impulsions sélectives**

Les impulsions sélectives sont utilisées pour n'affecter qu'une région de la fenêtre spectrale, voir un système de spin isolé s'il ne présente pas de recouvrement. Il est nécessaire d'avoir une excitation uniforme et rectangulaire, sans distorsion de phase ni de ligne de base et qui ne doit pas exciter les résonances au voisinage. La durée de l'impulsion doit être relativement courte afin d'éviter l'évolution des aimantations sous l'influence du déplacement chimique et des constantes de couplage ainsi que de la relaxation.

L'intérêt de ce type d'impulsion est multiple dans les expériences multidimensionnelles. Elles permettent de sélectionner l'information, offre une meilleure résolution (la digitalisation s'effectue sur une région limitée de la carte) et les temps d'acquisition sont diminués.

#### **2.6.1. Les impulsions préformées**

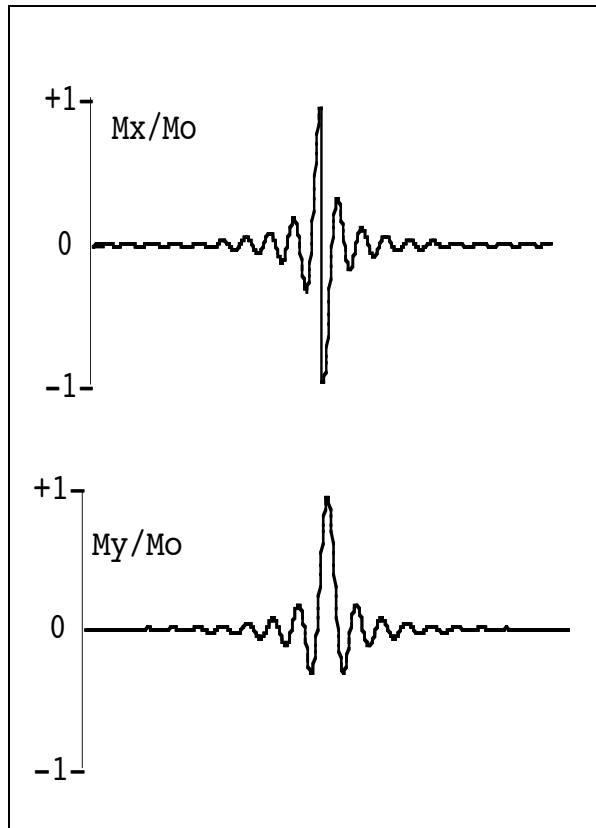
Alors que pour une excitation non sélective, les impulsions se font à forte puissance et sont rectangulaires, dans le cas d'impulsions préformées on utilise plutôt des impulsions à faible puissance ayant une enveloppe de type Gaussiennes<sup>(5)</sup>, semi-Gaussiennes<sup>(6)</sup>, ou par combinaison de fonction Sinus et Cosinus<sup>(7)</sup>.

L'impulsion Gaussienne est accompagnée en contrepartie d'un gradient de phase important dans la région excitée donnant lieu à une distorsion de la ligne de base lors d'excitations régio-sélectives. Ce problème peut être résolu en introduisant dans le cyclage de phase une correction de phase.

#### **2.6.2. Les impulsions sélectives de type DANTE**

Avec la séquence DANTE<sup>(8,9)</sup>, on obtient l'excitation sélective par une série de  $n$  impulsions ( $\theta$ ) rectangulaires (impulsions dures) mais à faible puissance où l'écart ( $t_r$ ) entre chaque impulsions est faible ( $t_r = 1/\Delta\nu$ ). Durant  $t_r$ , les fréquences de part et d'autre de la porteuse vont se défocaliser avec leur déplacement chimique, l'excitation restant efficace pour la fréquence porteuse. Seule la fréquence de la porteuse va subir les différentes nutations, les

composantes d'excitation en fréquence (centrées sur la porteuse) selon les axes x et y du repère tournant sont représentées pour une excitation de  $90^\circ_x$ .



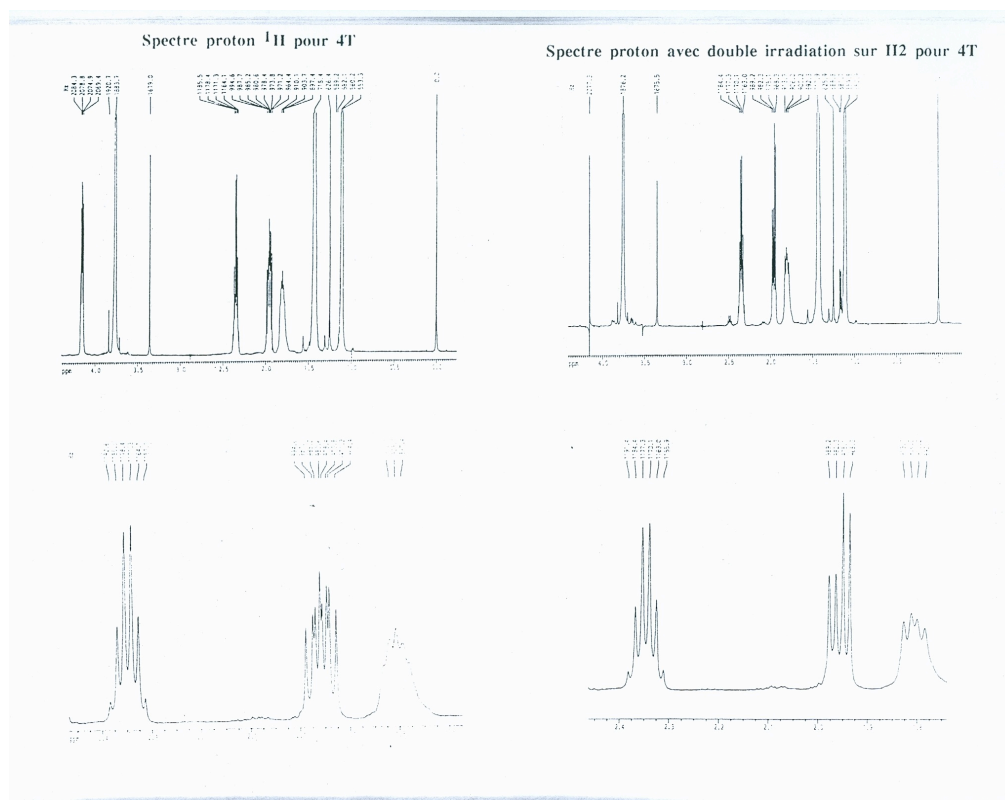
La séquence utilisée pour une impulsion DANTE est :  $(\theta_x - \tau_r - \theta_x - \tau_r)_n$

### 3. Les expériences de RMN utilisées

#### 3.1. Détermination des déplacements chimiques $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$

##### 3.1.1. Séquence simple détection $^1\text{H}$

Dans les expériences à une dimension, les plus utilisées sont les expériences 1D proton et carbone. Cette détection se fait à l'aide d'une impulsion  $\theta$  de champ  $B_1$  sur le proton ou sur le carbone de façon à amener l'aimantation dans le plan x-y où se trouvent les bobines réceptrices.

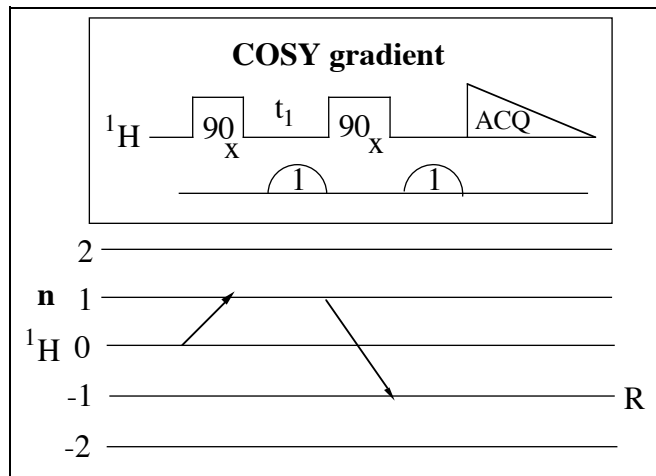


### 3.1.2. Séquence de suppression du solvant

Les expériences de présaturation de solvant à une dimension comme à deux dimensions font appel à des impulsions à basse puissance qui permettent une irradiation sélective du solvant (10). Une impulsion  $90^\circ$  non sélective fait basculer l'aimantation des protons du soluté dans le plan x-y.

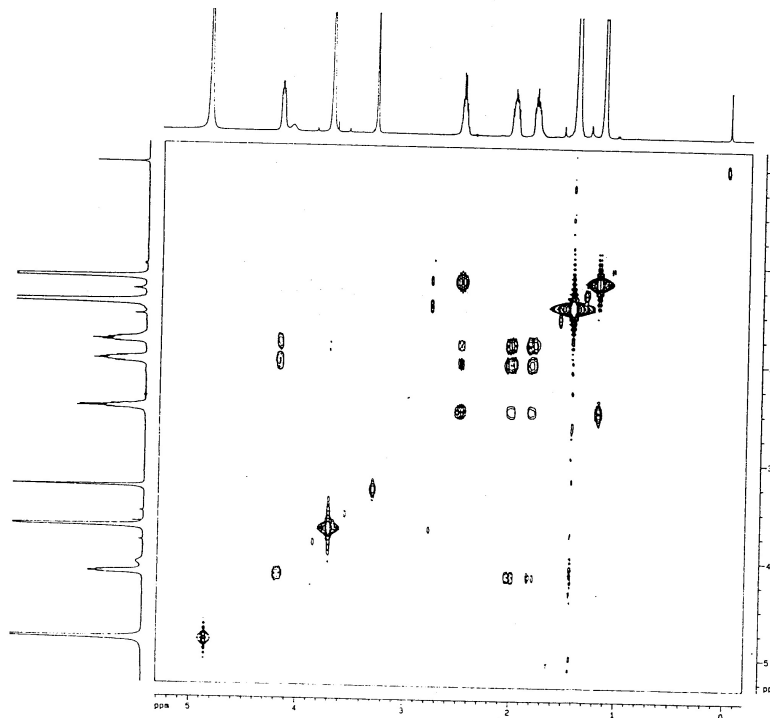
Dans la plupart des cas, le temps de relaxation  $T_1$  du solvant est plus important que celui du soluté. La méthode de suppression du signal de l'eau peut se faire au moyen d'une impulsion  $180^\circ$  non sélective (Méthode Weft)<sup>(11)</sup> qui amène l'aimantation du solvant sur l'axe -z alors que l'aimantation correspondant aux protons du soluté se retrouvent dans le plan de détection x-y. Un spectre avec une intensité moindre pour le signal de l'eau est obtenu. Une autre méthode appelée JUMP and RETURN<sup>(12)</sup> utilise deux impulsions  $90^\circ$  l'une +x, l'autre -x à la fréquence du solvant espacées d'un délai  $\tau = 1/SW$ . Le second  $90^\circ$ -x ramène l'aimantation de l'eau suivant z alors que les autres aimantations évoluent normalement dans le plan x-y. Plus récemment, la séquence Watergate<sup>(13)</sup>, utilisant un écho de spin avec deux gradients de champ  $B_0$  de même longueur et de même intensité de part et d'autre du  $180^\circ$ x, permet une bonne élimination de l'eau.

### 3.1.3. COSY gradient



**Figure 7:** La séquence COSY gradient

L'expérience de COSY permet d'obtenir des corrélations entre protons couplés scalairement entre eux<sup>(14)</sup>. Cette séquence PFG-COSY<sup>(15,16)</sup> utilisant deux gradients commence avec un premier  $90^\circ_x$  qui crée des cohérences à un quanta évoluant en fonction du déplacement chimique et des constantes de couplages homonucléaires. Le second  $90^\circ_x$  crée des cohérences zéro et double quanta qui ne sont pas détectées. Il permet de plus le transfert d'aimantation d'un proton sur son voisin s'ils sont tous les deux couplés scalairement. Durant le temps  $t_2$  de détection, les aimantations évoluent alors en fonction du déplacement chimique et des constantes de couplages homonucléaires.



Expérience 2D COSY gradient pour le 4T

La substitution de la seconde impulsion  $90^\circ_x$  par un  $60^\circ_x$  ou un  $45^\circ_x$  (COSY 45) permet de minimiser l'intensité des pics croisés entre les raies d'un même multiplet. Elle permettra de plus de distinguer les couplages selon leur signe relatif par le biais des pics croisés. On pourra ainsi différencier les couplages géminaux  $^2J_{H-H}$ , des couplages vicinaux  $^3J_{H-H}$ .

### 3.1.4. Séquence DEPT 135

La séquence DEPT permet contrairement à la séquence découplage large bande  $^{13}C$  (BB) de distinguer les  $CH_2$ , des  $CH$  ou  $CH_3$ .

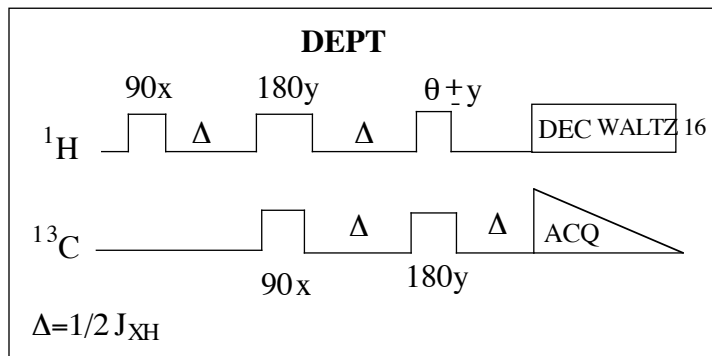
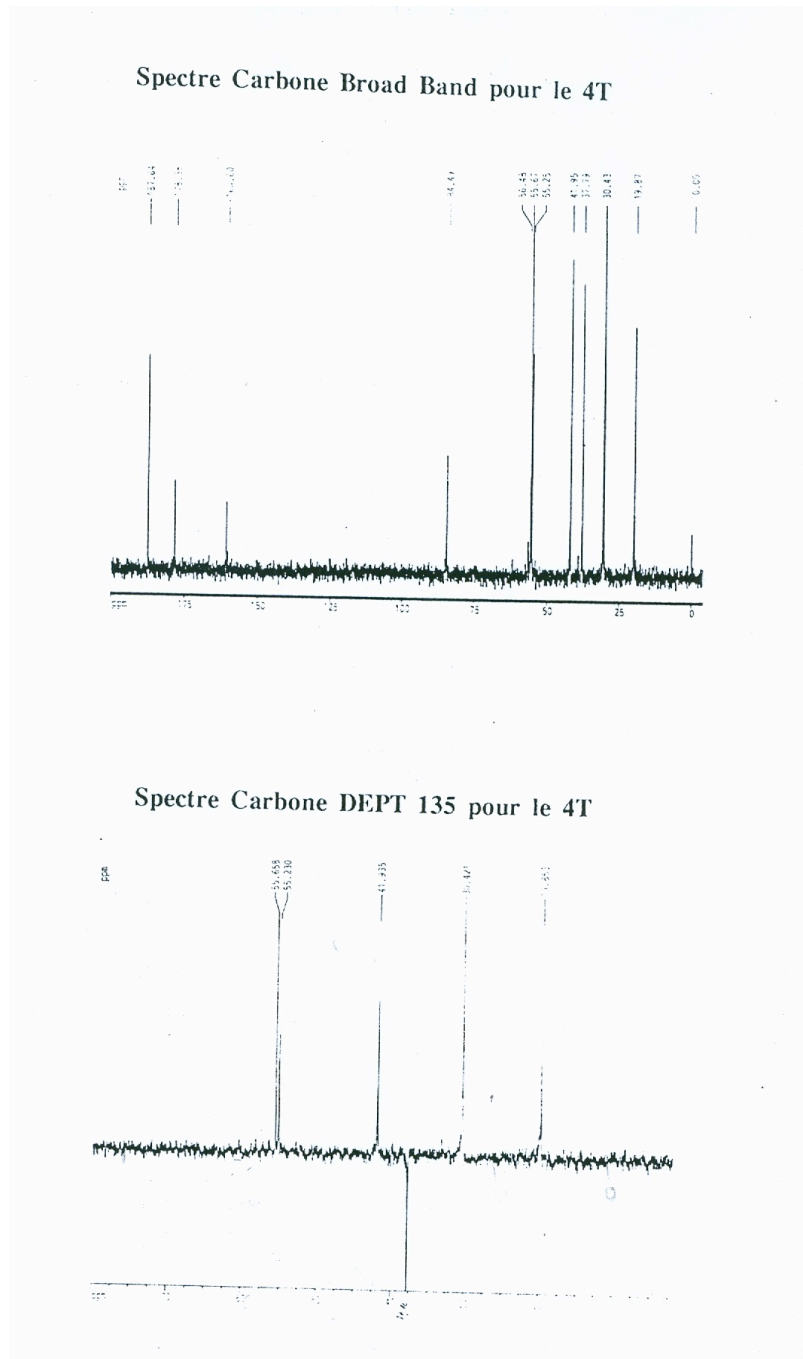


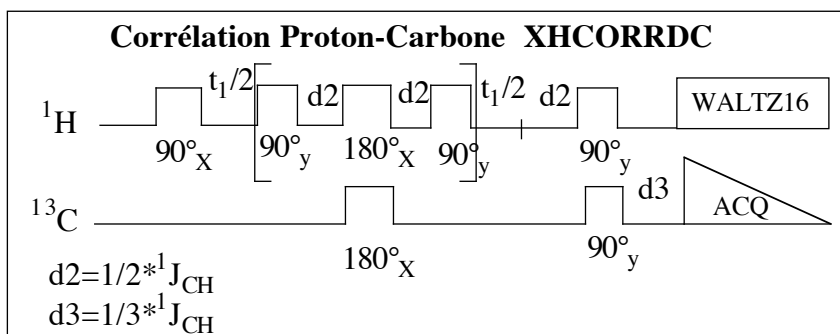
Figure 8: La séquence DEPT



Par rapport à l'expérience de J modulation<sup>(17)</sup>, qui elle aussi, permet une édition des résonances  $^{13}\text{C}$  en fonction de leur multiplicité, la séquence DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfert)<sup>(18)</sup> a une meilleure sensibilité grâce au transfert de polarisation du proton sur le carbone. Le gain en sensibilité est augmenté d'un facteur  $(\gamma_{\text{H}} / \gamma_{\text{C}})$  par rapport à l'aimantation initiale  $^{13}\text{C}$ .

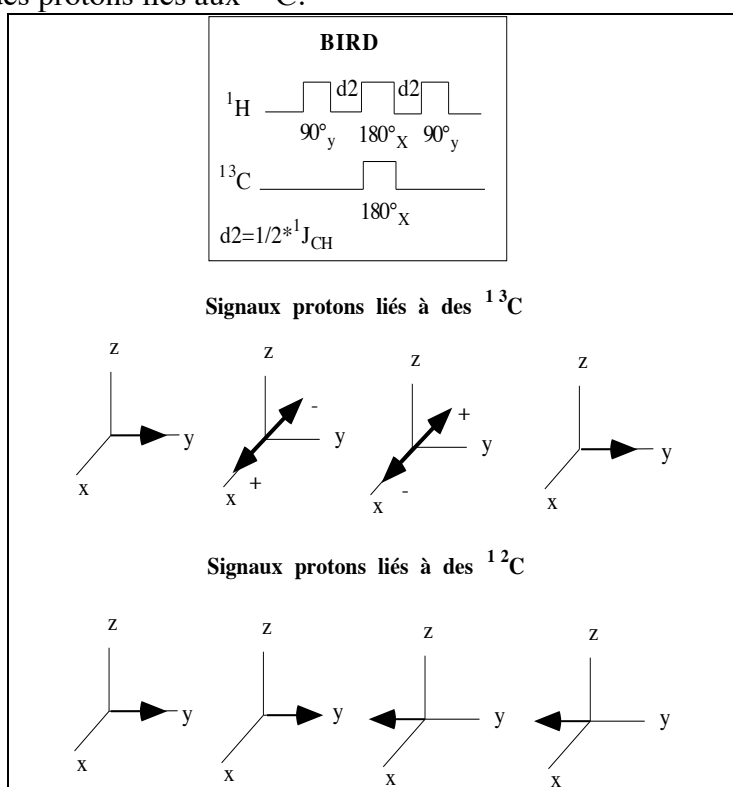


### 3.1.5. Corrélation Proton-Carbone 2D



**Figure 9:** Séquence HXCORRDC corrélation H-C

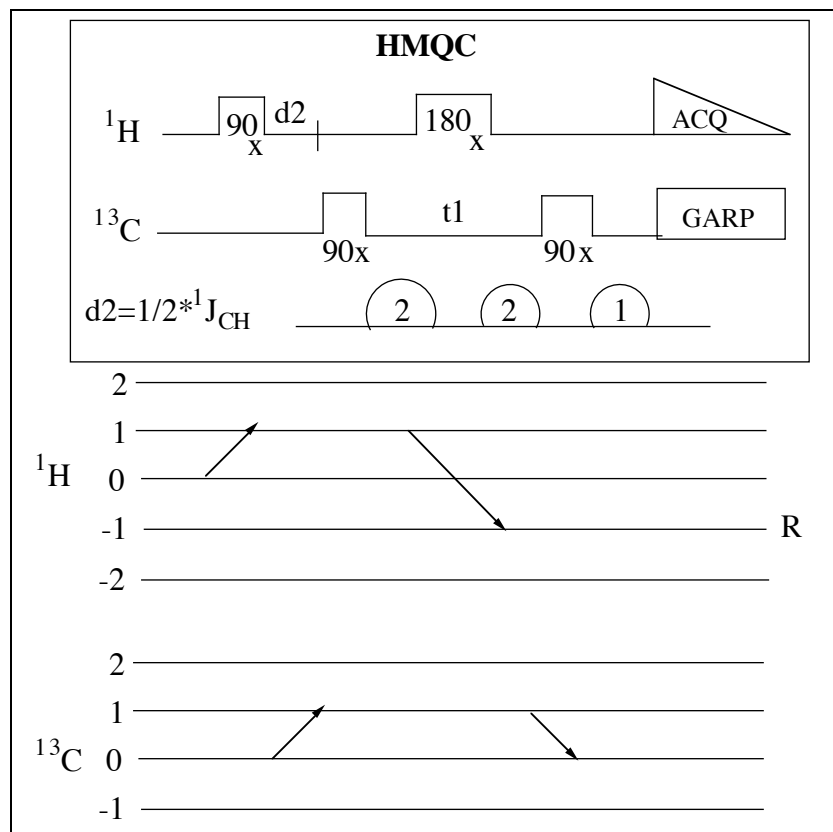
Cette expérience XHRCORRDC<sup>(19,20)</sup> permet d'accéder aux corrélations hétéronucléaires en détection normale sur le carbone. Cette expérience est une variante de la séquence HSC<sup>(21)</sup> (Heteronuclear Shift Correlation) où une séquence BIRD<sup>(22)</sup> (Bilinear Rotation Operator) est incorporée au milieu du délai d'évolution  $t_1$ . Le premier  $90^\circ$  proton crée des cohérences simple quanta qui évoluent en fonction des constantes hétéronucléaires et du déplacement chimique pendant  $t_1$ . Durant cette période, une séquence BIRD permet l'élimination des protons liés aux  $^{12}\text{C}$ .



**Figure 10:** Evolution des aimantations proton selon la séquence BIRD

Cette expérience permet d'observer des singulets pour les CH et CH<sub>3</sub> ainsi que des doublets pour les CH<sub>2</sub> dans le cas de protons non équivalents (diastéréotopiques). On obtient donc, dans la dimension F<sub>1</sub>, le domaine de fréquence proton dont les aimantations pendant t<sub>1</sub> ont évolué en fonction du déplacement chimique et des constantes de couplage proton. Dans la dimension F<sub>2</sub>, le domaine de fréquence carbone est modulé en fonction de  $\pi J^{1\text{H}-^{13}\text{C}}$  (d<sub>2</sub> et d<sub>3</sub>),  $\omega^{13}\text{C}t_2$ . Cette expérience dont l'accumulation se fait en carbone est peu sensible du fait de la faible abondance naturelle en carbone 13, d'autres expériences beaucoup plus sensibles par détection du proton (Méthode en détection inverse HMQC, HMBC)<sup>(23,24)</sup> permettent maintenant d'obtenir les mêmes informations avec un temps d'accumulation plus court.

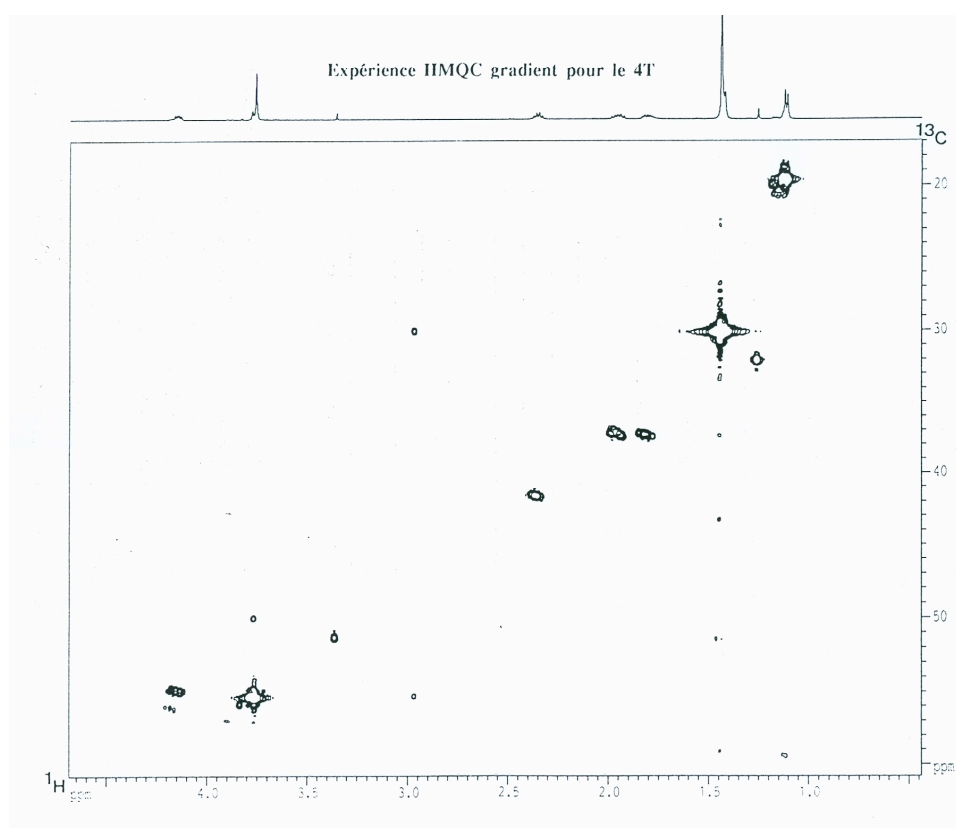
### 3.1.6. Expérience en détection inverse HMQC gradient



**Figure 11:** Schéma de la séquence hétéronucléaire multiple quanta corrélation

L'expérience en détection inverse HMQC gradient (Hétéronucléar Multiple Quanta Corrélation-PFG)<sup>(25,26)</sup> est une méthode basée sur un transfert de polarisation du proton sur

le carbone. C'est une méthode intéressante car très sensible qui permet de détecter les corrélations  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  en  $^1\text{J}$  par détection du signal proton. Les protons liés aux  $^{12}\text{C}$  sont éliminés car ils n'évoluent pas en fonction de la constante de couplage  $^1\text{J}^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . Le premier  $90^\circ_x$  proton crée les aimantations à un quanta  $\text{I}_y$  qui vont évoluer pendant  $d_2$  principalement en fonction de la constante  $^1\text{J}^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  ( $-2\text{I}_x\text{S}_z \sin\pi\text{J}d_2$ ), du déplacement chimique proton et des constantes de couplage  $\text{J}^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ . Le premier  $90^\circ_x(^{13}\text{C})$  fait basculer l'aimantation carbone dans le plan x-y. Des composantes de l'aimantation à 0 et 2 quanta ( $\pm 2\text{I}_{x,y}\text{S}_y$ ) évoluent pendant  $t_1$ .



Le déplacement chimique proton et les constantes de couplage hétéronucléaires sont refocalisés par l'impulsion  $180^\circ(\text{H})$  durant  $t_1$ . Dans cette expérience, les constantes de couplages  $\text{J}^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  évoluent quant à elles durant  $t_1+t_2+d_2$ , alors que le déplacement chimique carbone et les constantes de couplages homonucléaires  $\text{J}^{13}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  évoluent durant  $t_1$  (à prendre en compte si la molécule est enrichie en  $^{13}\text{C}$ ). Les constantes de couplages  $^1\text{J}^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  variant durant  $d_2$  uniquement, le dernier  $90^\circ_x(^{13}\text{C})$  transforme les aimantations double quanta ( $\pm 2\text{I}_{x,y}\text{S}_y$ ) en un quanta observables ( $\pm 2\text{I}_{x,y}\text{S}_z$ ) par un cyclage de phase en huit expériences (ou la phase des impulsions est inversée toutes les quatre expériences, pour les quatre premières  $90^\circ+\text{x}$  et pour les quatre dernières  $90^\circ-\text{x}$ ). Les composantes en antiphases seront éliminées par le découplage carbone large bande et seules les composantes en  $\pm\text{I}_y,\text{x}$  subiront le déplacement chimique proton et le couplage homonucléaire proton pendant  $t_2$ .

La séquence avec les opérateurs-produits peut s'expliquer comme suit: On ne considèrera pas dans ce schéma, les effets des constantes de couplage et du déplacement chimique proton ainsi que l'impulsion  $180^\circ_x (^1\text{H})$  qui n'a pour seul but que de refocaliser le déplacement chimique proton pendant  $t_1$ .

$$\begin{array}{l}
 I_z \xrightarrow{90^\circ \text{H}} I_y^{\text{H}} \xrightarrow{d2} -2I_x^{\text{H}} S_z^{\text{C}} \sin \pi J_{\text{C-H}} d2 \xrightarrow{90^\circ_x \text{ } ^{13}\text{C}} -2I_x^{\text{H}} S_y^{\text{C}} \sin \pi J_{\text{C-H}} d2 \\
 \xrightarrow{t1} \pm 2I_x^{\text{H}} S_y^{\text{C}} \cos \omega_{\text{C}} t1 \sin \pi J_{\text{C-H}} d2 \xrightarrow{90^\circ_x \text{ } ^{13}\text{C}} \pm 2I_x^{\text{H}} S_z^{\text{C}} \cos \omega_{\text{C}} t1 \sin \pi J_{\text{C-H}} d2 \\
 \xrightarrow{t2} \pm I_x^{\text{H}} \cos \omega_{\text{C}} t1 \sin \pi J_{\text{C-H}} d2 \text{ (évoluant en fonction de } J_{\text{HH}} \text{ et } \delta\text{H)}
 \end{array}$$

Dans cette séquence, un découplage hétéronucléaire est appliqué durant  $t_2$  de façon à augmenter la sensibilité. Dans cette expérience, les  $\text{C}_q$  ne sont pas détectés car le transfert d'aimantation ne se fait qu'à travers l'évolution en fonction du couplage hétéronucléaire en  $^1\text{J}_{\text{H}-^{13}\text{C}}$ . L'amplitude de transfert pour cette expérience peut être donné par la relation suivante:

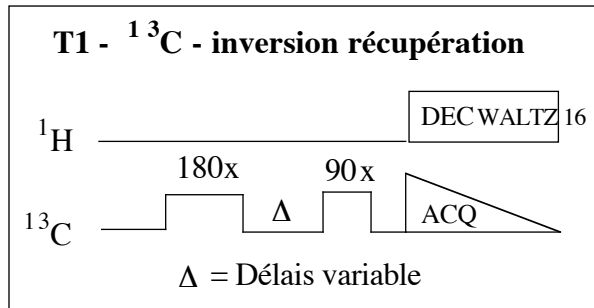
$$\sin(\pi J_{\text{CH}} d2) \prod_j \cos[(\pi J_{\text{HH}j}(t1+t2+d2))] \prod_k \cos(\Omega_{\text{C}} t1) \exp(i\Omega_{\text{H}} t2) \cos(\pi J_{\text{CC}k} t1)$$

$j$  et  $k$  représentent respectivement le spin du proton et du carbone "passif" en interaction avec le carbone observé "actif". La constante de couplages  $^1\text{J}_{^{13}\text{C}-^{13}\text{C}}$  peut être ignorée durant  $t_1$  alors qu'elle doit être prise en compte pour des molécules enrichies en  $^{13}\text{C}$ .

Cette expérience peut aussi être utilisée pour la détermination de corrélation H-X longue distance avec l'utilisation de constante de couplage  $^3\text{J}_{\text{H-X}}$ . Elle peut être aussi réalisée avec d'autres combinaisons de gradients par exemple **5 3 4**.

### 3.2. Détermination des temps de relaxation $T_1$ $^{13}\text{C}$

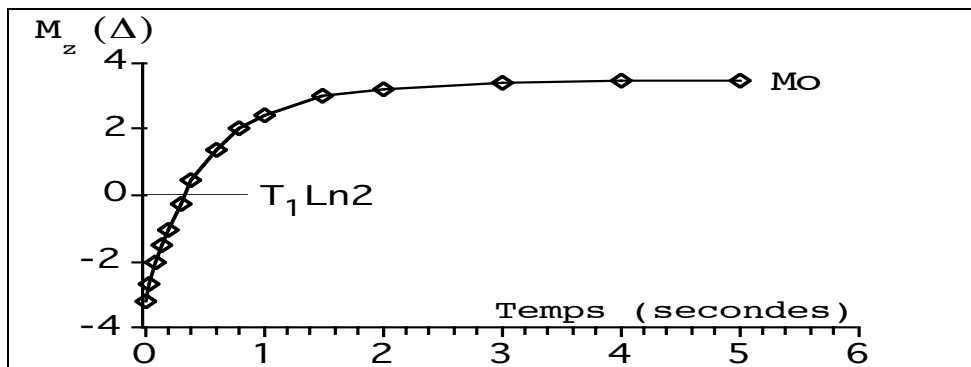
### 3.2.1. Séquence Inversion-Récupération pour le calcul des $T_1$



**Figure 12:** La séquence de calcul des  $T_1$ - $^{13}\text{C}$

Le calcul des temps de relaxation longitudinale ( $T_1$ ) des  $^{13}\text{C}$  permet d'avoir des informations sur la mobilité de la molécule. Cette séquence d'inversion-récupération permet d'obtenir l'aimantation  $M_z$  en fonction d'un délai variable  $\Delta$ . Alors que la première impulsion 180 fait passer l'aimantation sur l'axe -z, l'aimantation selon l'axe z est suivi en fonction du temps  $\Delta$  et lu dans le plan transverse à l'aide d'une impulsion  $90^\circ_x$ . Des calculs itératifs permettent d'accéder à la valeur de  $T_1$  à l'aide de la fonction déduite des équations de Bloch:

$M_z(\Delta) = M_0 [1 - 2\exp(-\Delta/T_1)]$  où  $M_0$  est l'intensité de l'aimantation à l'équilibre et  $M_z(\Delta)$ , l'intensité en fonction du temps  $\Delta$ . La valeur de  $T_1$  peut être obtenue par la valeur de  $\Delta$  pour laquelle le signal est nul ( $T_1 \cdot \ln 2$ ). Il est aussi possible de tracer  $\ln[M_\infty - M(\Delta)]$  en fonction de  $\Delta$  donnant une droite de pente égale à  $T_1$ .



**Courbe expérimentale de mesure de temps de relaxation carbone.**

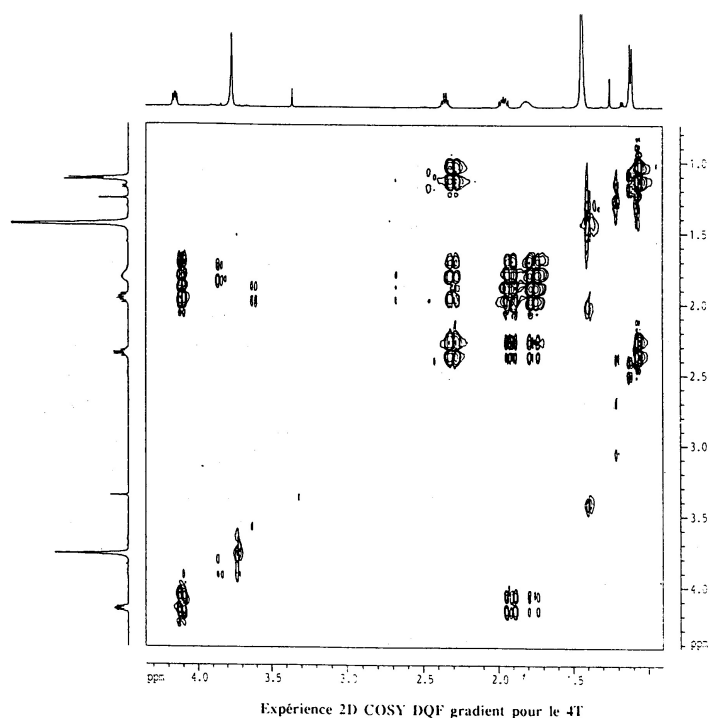
### 3.3. Détermination des constantes de couplage $^n\text{J}^1\text{H}-^1\text{H}$

Pour les systèmes de spin du premier ordre, les constantes de couplage sont déterminées par lecture sur le spectre ou par des expériences 1D homodécouplage. Ces dernières permettent

d'accéder, par l'intermédiaire de systèmes de spin simplifiés, aux constantes de couplage homonucléaires proton. Pour les système fortement couplés, une simulation sur le logiciel PANIC (BRUKER) a été indispensable.

### 3.3.1. COSY DQF gradient phasée

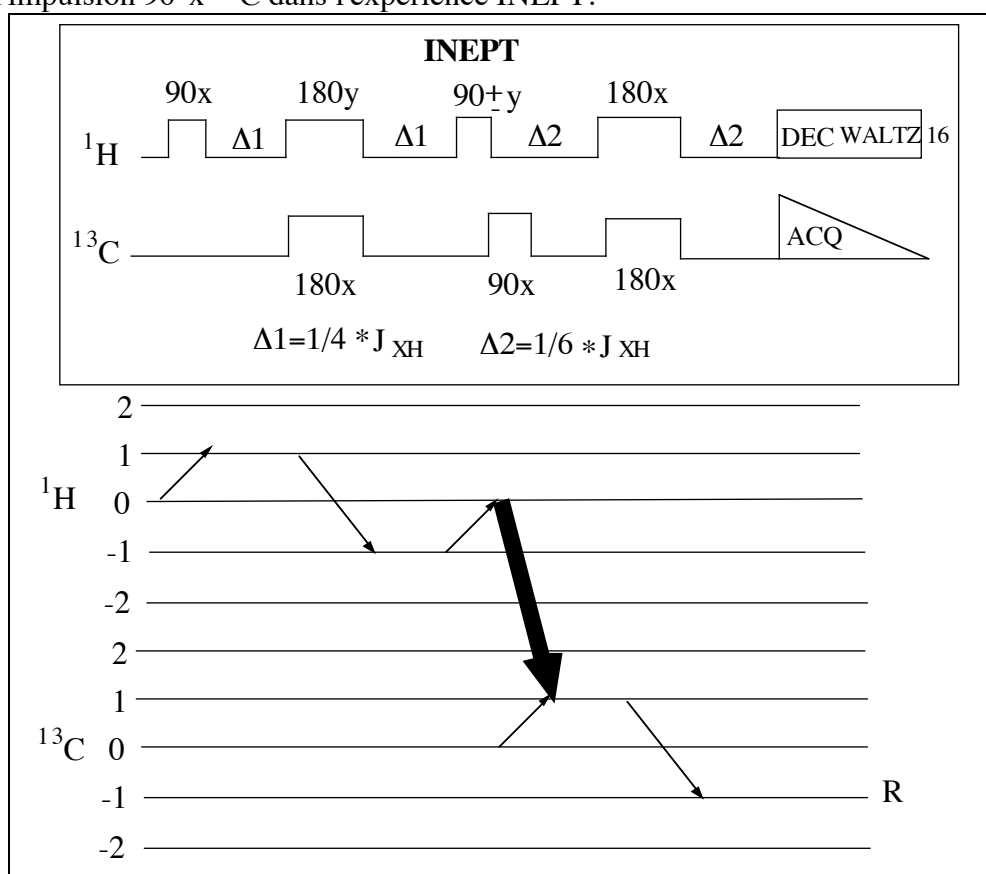
La séquence COSY DQF (Double Quanta Filtrée) en mode phasé présentée dans le chapitre sur les gradients (Figure 6) permet d'accéder par le biais de transitions double quanta à des valeurs de constantes de couplages protons-protons<sup>(27)</sup>. Durant  $t_1$  (entre les deux premiers  $90^\circ_x$ ), aucun gradient n'est appliqué de façon à laisser les cohérences évoluer suivant les ordres  $\mathbf{p}$  et  $\mathbf{n}$ . Le premier  $180^\circ_x$  crée un écho de spin qui permet ainsi la refocalisation des déplacements chimiques, les aimantations évoluant uniquement sous l'action des constantes de couplages JH-H. Le troisième  $90^\circ_x$  permet de convertir les cohérences doubles quanta en cohérences à un quanta observables. Le dernier  $180^\circ_x$  utilisé avant l'acquisition à le même effet que le premier  $180^\circ_x$ . Durant  $t_2$  une modulation supplémentaire se fera en fonction des déplacement chimiques et des constantes de couplages. Le premier gradient permet ici de sélectionner les cohérences double quanta, le second gradient appliqué avant l'acquisition permet d'accéder aux cohérences d'ordre -1. L'acquisition se fait en States-TPPI avec obtention d'un signal pour chaque type de modulation et pour chaque valeur de la période d'évolution mais avec changement de signe toutes les deux expériences. La carte 2D est phasable dans les deux dimensions et fait apparaître la structure des multiplets avec le couplage actif antiphase modulation en sinus et les couplages passifs en phase venant du troisième noyau avec une modulation en cosinus.



### 3.4. Détermination des constantes de couplage $^3J^{1H-13C}$

#### 3.4.1. Séquence INEPT

Dans la séquence d'INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfert) (28,29), la période de refocalisation  $\Delta 2$ , doit varier pour obtenir une détection optimale des signaux dans le cas des résonances CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>. Comme dans le DEPT, le gain en sensibilité sur l'aimantation  $^{13}C$  est augmenté d'un facteur  $(\gamma_H / \gamma_C)$ . Ce transfert de polarisation se produit lors de l'impulsion  $90^\circ$   $^{13}C$  dans l'expérience INEPT.



**Figure 13:** La séquence INEPT

Cette séquence INEPT pour un fragment CH,  $\Delta 1 = 1/4 J_{C-H}$  et  $\Delta 2 = 1/6 J_{C-H}$ , sans tenir compte des impulsions  $180^\circ$  (refocalisent les déplacements chimiques proton et carbone), se représente comme suit:



$$\begin{aligned}
 & I_z \xrightarrow{90^\circ_H} I_y^H \xrightarrow{\Delta_1} I_y^H \cos\pi J \Delta_1 - 2I_x^H S_z^C \sin\pi J \Delta_1 \xrightarrow{90^\circ_{H\pm y}} I_y^H \cos\pi J \Delta_1 \pm 2I_z^H S_z^C \sin\pi J \Delta_1 \\
 & \xrightarrow{90^\circ_{x^{13C}}} \pm 2I_z^H S_y^C \sin\pi J \Delta_1 \xrightarrow{\Delta_2} \left[ \pm 2I_z^H S_y^C \cos\pi J \Delta_2 \pm S_x^C \sin\pi J \Delta_2 \right] \sin\pi J \Delta_1 \\
 & \xrightarrow{t_2} \pm S_x^C \sin\pi J \Delta_2 \sin\pi J \Delta_1 \text{ évolution en fonction de } \delta C \text{ pendant } t_2
 \end{aligned}$$

Comme le montre la figure suivante, les maxima se situent à des valeurs de  $\Delta_2$  différentes selon le type de carbone CH, CH<sub>2</sub> ou CH<sub>3</sub>, ce qui peut servir à la sélection des signaux. C'est ainsi qu'il est possible de détecter l'aimantation des groupes CH avec une valeur  $\Delta_2$  de  $1/2J$  (<sup>13</sup>C,<sup>1</sup>H), alors que celle des groupes CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> est effacée. Par ailleurs, une valeur  $\Delta_2$  de  $3/4J$  (<sup>13</sup>C,<sup>1</sup>H) donne des signaux positifs pour les groupes CH et CH<sub>3</sub> et des signaux négatifs pour les groupes CH<sub>2</sub>.

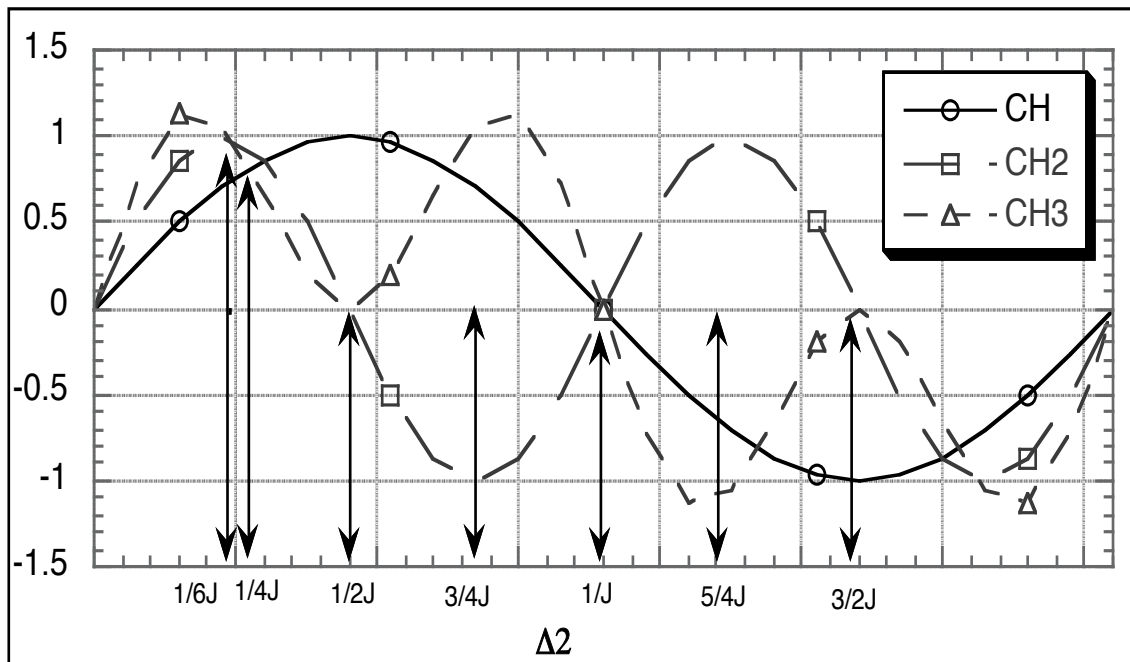
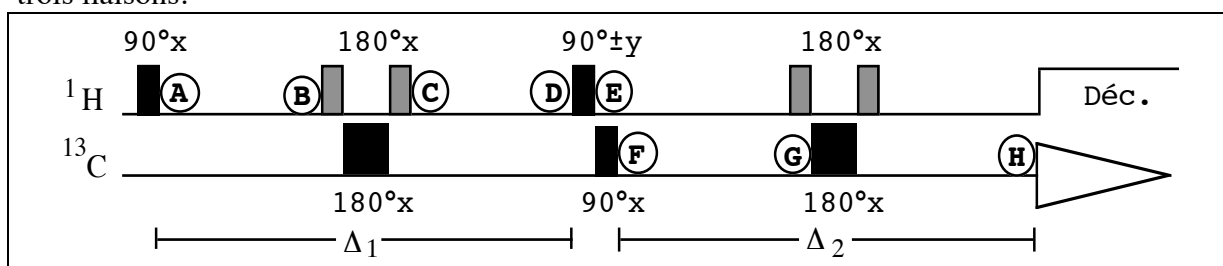


Schéma de la dépendance temporelle de l'aimantation <sup>13</sup>C modulé par le couplage <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H pendant la période de refocalisation  $\Delta_2$ .

Pour un transfert de polarisation optimum une valeur de  $\Delta_1=1/4J$  est requise alors que pour la valeur  $\Delta_2$ , c'est une valeur moyenne de  $1/6J$  qui est la meilleure pour la détection des CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>.

### 3.4.2. INEPT Sélectif 2D

L'expérience d'INEPT 2D sélective **J- $\delta$**  <sup>(30,31)</sup> est de type J-résolue dans laquelle la dimension d'acquisition ( $\omega_2$ ) correspond au déplacement chimique  $^{13}\text{C}$  et la dimension  $\omega_1$  permet la lecture du couplage hétéronucléaire. Une résonance proton est sélectionnée au moyen d'une impulsion sélective de type DANTE (cf paragraphe "Impulsions Sélectives de type DANTE") et la carte 2D obtenue après double transformée de Fourier nous permettra de lire la valeur du couplage de ce proton avec tous les carbones qui lui sont couplés à deux ou trois liaisons.

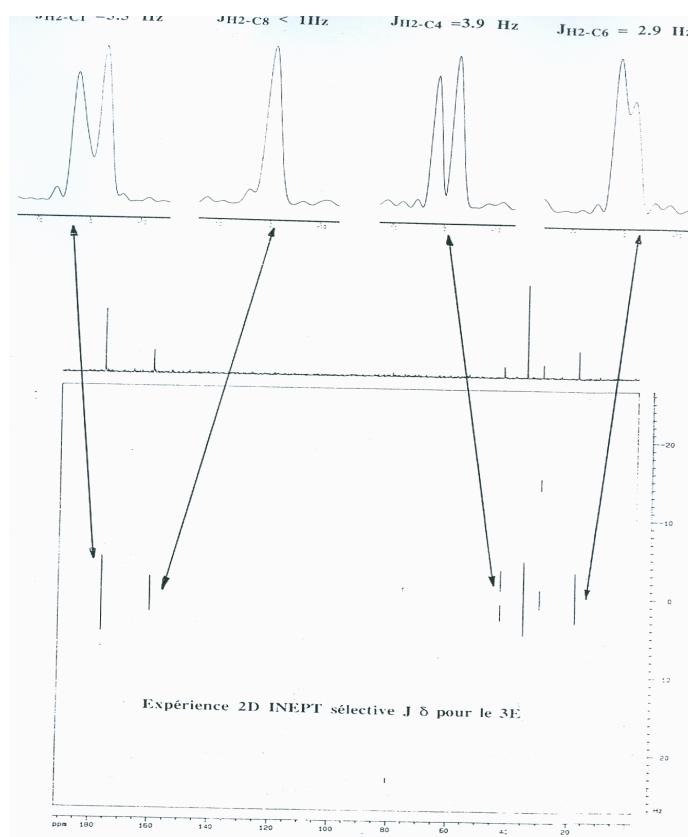


**Figure 14:** 2D INEPT sélective J- $\delta$

Trois périodes principales composent la séquence:

De **A** à **D**: Individualisation des composantes du couplage H-X. De **D** à **E**: Transfert de polarisation. De **F** à **H**: Refocalisation.

(Les impulsions sélectives sont en gris et les impulsions non-sélectives en noir).

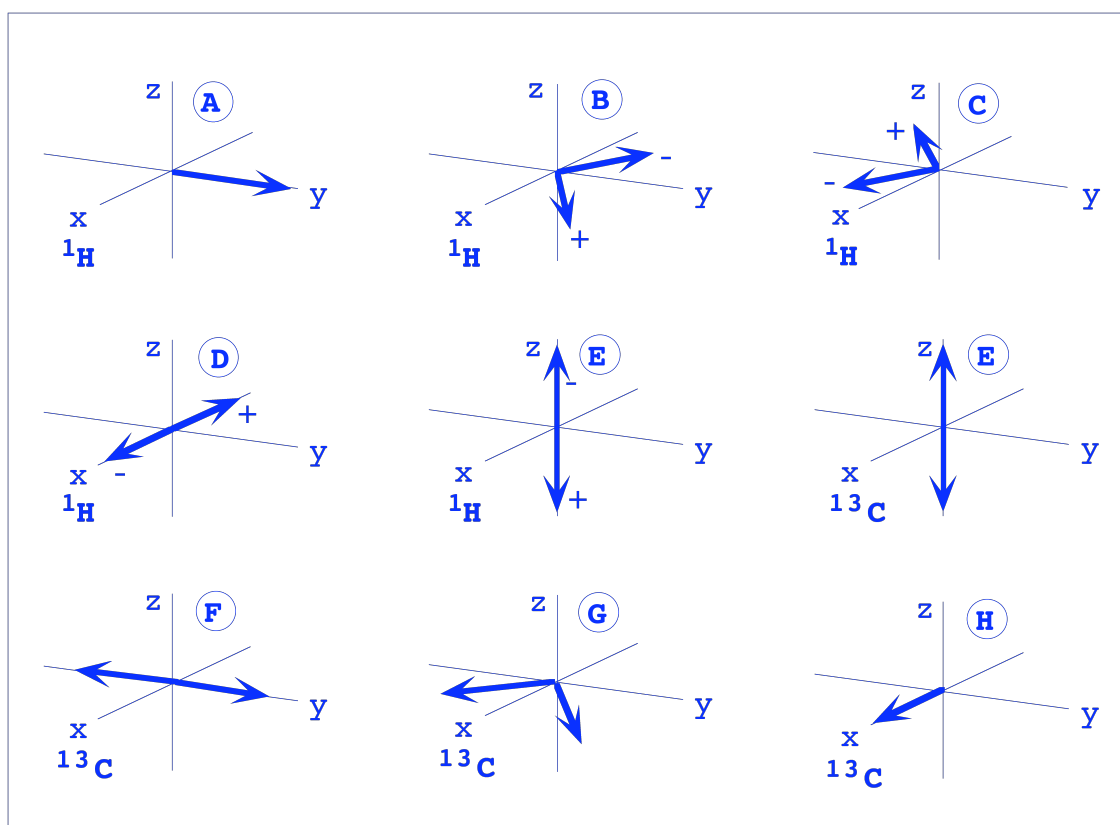


### a) Description à l'aide du Modèle Vectoriel

se référer à la figure ci-dessous

**(A)** Après la première impulsion  $90^\circ$  non sélective, l'aimantation des différents signaux proton initialement alignée selon l'axe z se trouve dans le plan transverse x, y.

**(B)** Durant la première demi-période d'évolution, l'aimantation proton évolue selon son déplacement chimique ainsi que ses couplages homonucléaires et hétéronucléaires qui contribuent à l'éclatement du signal en plusieurs composantes. Il n'est représenté ici que l'évolution d'une aimantation proton selon un couplage hétéronucléaire H-X à la fréquence porteuse  $\nu_0$  (composantes notées + et - ayant respectivement une fréquence de précession de + et -  $J_{X-H} / 2$  par rapport à  $\nu_0$ ). Nous verrons par la suite que la dépendance vis à vis du déplacement chimique et des couplages homonucléaires est de toute façon supprimée. Dans la version bidimensionnelle de cette séquence, les deux périodes A->B et C->D sont échantillonnées selon un incrément de temps régulier. La transformée de Fourier selon ce temps  $\Delta_1$  donnera lieu à la dimension  $\omega_1$  dans laquelle sera lu le couplage.



**Figure 15:** Evolution des composantes proton et carbone au cours de la séquence INEPT 2D sélective

- Ⓒ Après l'impulsion  $180^\circ_x$  proton sélective, les deux composantes se trouvent dans l'autre moitié du plan transverse. Une inversion du sens de rotation est réalisée par une impulsion simultanée  $180^\circ$   $^{13}\text{C}$  qui échange les composantes + et -. L'aimantation  $^{13}\text{C}$  est alors alignée selon -z.
- Ⓓ A la fin de la seconde période d'évolution, les composantes ont donc parcouru chacune un quart de révolution dans le plan transverse et sont en antiphase. Le fait que l'impulsion  $180^\circ$  proton soit sélective permet de refocaliser les couplages homonucléaires, ce qui n'est pas vrai pour une impulsion non sélective où les composantes des autres protons couplés scalairement au proton sélectionné sont aussi inversées. La porteuse étant placée au déplacement chimique d'un proton particulier, la dépendance vis à vis du déplacement chimique n'est pas à considérer.
- Ⓔ C'est l'étape de transfert de polarisation. Une impulsion  $90^\circ$  proton selon  $\pm y$  renvoie les deux composantes du doublet selon z et -z. L'aimantation  $^{13}\text{C}$  se retrouve alors dans la même configuration (selon z et -z) et bénéficie d'une augmentation d'intensité d'un facteur 4.
- Ⓕ L'impulsion  $90^\circ_x$   $^{13}\text{C}$  renvoie les composantes du doublet dans le plan de détection y.
- Ⓖ L'acquisition du signal est possible à ce stade mais la disposition en antiphase des composantes ne permet pas d'effectuer de découplage proton large bande afin de bénéficier d'une augmentation de sensibilité. On va donc refocaliser les deux composantes du doublet pour les amener en phase.
- Ⓗ Disposition en phase des composantes du couplage hétéronucléaire après un processus d'évolution similaire à celui décrit entre les points A et D.

### b) Description par les Opérateurs Produits

A l'équilibre thermique, les aimantations proton (I) et carbone (S) sont alignées selon z.

$$I_z + (\gamma_S / \gamma_I) S_z$$

De Ⓐ à Ⓓ: Pour la première impulsion  $90^\circ_x$   $^1\text{H}$ , l'opérateur d'évolution  $I_x$  n'agit que sur l'opérateur d'état de spin  $I_z$  et génère une composante transverse  $I_y$ .

$$I_z + (\gamma_S / \gamma_I) S_z \xrightarrow{\pi/2 I_x} -I_y + (\gamma_S / \gamma_I) S_z$$

Ⓓ Durant la période  $\Delta_1$ , les inversions sur I et S sont appliquées. L'évolution selon le déplacement chimique ( $I_z$  et  $S_z$ ) pour les deux noyaux n'est pas considérée compte tenu des propriétés refocalisantes de ces inversions. L'impulsion  $180^\circ$  proton étant sélective, il n'est pas nécessaire de considérer un terme d'évolution selon un couplage homonucléaire l'opérateur  $I_y$  n'agissant ici que sur le partenaire sélectionné. Le système évolue selon le couplage  $J_{IS}$  hétéronucléaire et l'on a:

$$-I_y + (\gamma_S / \gamma_I) S_z$$

$$\xrightarrow{\pi I_y} \xrightarrow{\pi S_y} \xrightarrow{\pi J_{IS} \Delta_1} -I_y \cos(\pi J_{IS} \Delta_1) - 2 I_x S_z \sin(\pi J_{IS} \Delta_1) - (\gamma_S / \gamma_I) S_z$$

Ⓔ La phase de la seconde impulsion  $90^\circ \pm y$   $^1\text{H}$  est inversée un balayage sur deux:  
 $\frac{\pi}{2} I_y \rightarrow -I_y \cos(\pi J_{IS} \Delta_1) \pm 2I_z S_z \sin(\pi J_{IS} \Delta_1) - (\gamma_S / \gamma_I) S_z$

Ⓕ Après l'impulsion  $90^\circ x$   $^{13}\text{C}$ , on a:

$$\frac{\pi}{2} S_x \rightarrow -I_y \cos(\pi J_{IS} \Delta_1) \pm 2I_z S_y \sin(\pi J_{IS} \Delta_1) + (\gamma_S / \gamma_I) S_y$$

Le terme en  $S_y$  représente la polarisation initiale  $^{13}\text{C}$  convertie en grandeur observable par l'impulsion  $90^\circ x$   $^{13}\text{C}$ . Ce terme, ainsi que celui en  $I_y$  (doublet en phase) sont annulés après collection de deux balayages soustrait l'un à l'autre par inversion de la phase du détecteur. Contrairement, l'inversion de phase de la seconde impulsion  $90^\circ \pm y$   $^1\text{H}$  permet d'additionner le terme en  $2I_z S_y$  correspondant à un doublet  $^{13}\text{C}$  en antiphase (modulation en sinus) aligné selon l'axe y du repère tournant. Il reste donc:

$$-2I_z S_y \sin(\pi J_{IS} \Delta_1)$$

On voit donc que le gain en sensibilité est augmenté d'un facteur  $(\gamma_I / \gamma_S)$  par rapport à l'aimantation initiale  $^{13}\text{C}$  grâce au transfert de polarisation réalisé lors de la seconde impulsion  $90^\circ$   $^1\text{H}$ .

De Ⓕ à Ⓖ: Les deux inversions refocalisent le signal selon le déplacement chimique carbone et l'évolution ne dépend donc que du couplage hétéronucléaire pendant la période  $\Delta_2$ .

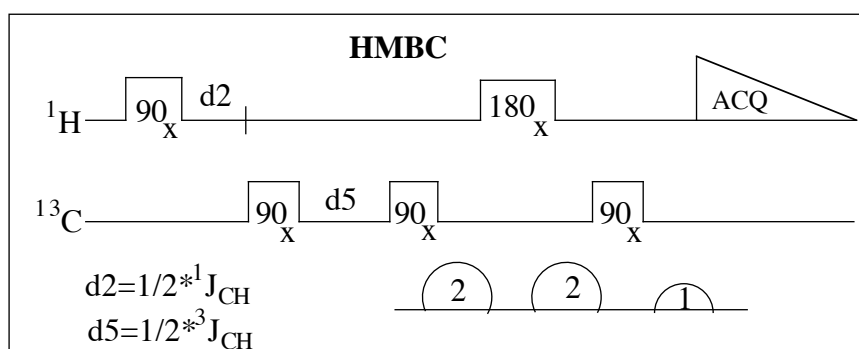
Il reste:

$$\frac{\pi}{2} I_x \rightarrow \frac{\pi}{2} S_x \rightarrow \pi J_{IS} \Delta_2 \rightarrow$$

$$-2I_z S_y \sin(\pi J_{IS} \Delta_1) \cos(\pi J_{IS} \Delta_2) + S_x \sin(\pi J_{IS} \Delta_1) \sin(\pi J_{IS} \Delta_2)$$

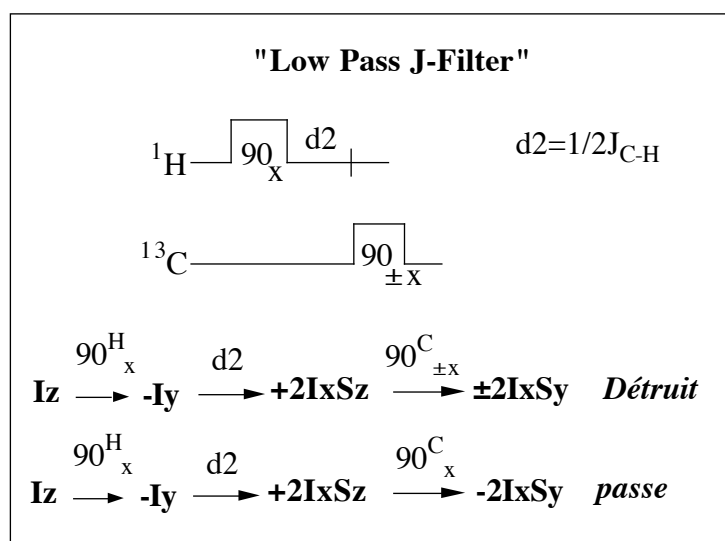
Le découplage proton large bande enlève le couplage hétéronucléaire durant  $t_2$  et fait disparaître le terme en  $2I_z S_y$  (doublet en antiphase). La grandeur observable finale est le terme en  $S_x$  qui sera d'intensité maximum pour un délai  $\Delta_2$  égal à  $1/4J_{IS}$ . L'incrémention de la période  $\Delta_1$  permet l'échantillonnage du couplage hétéronucléaire  $J_{IS}$  antiphase dans la dimension  $\omega_1$ . Durant l'acquisition, une modulation supplémentaire due au déplacement chimique  $^{13}\text{C}$  apparaît dans la dimension  $\omega_2$ . Lors de la transformée de Fourier, la carte obtenue est mise en puissance ( $x^2 + y^2$ , avec x partie réelle et y partie imaginaire du signal) afin d'obtenir des doublets en phase avec un meilleur rapport signal / bruit.

### 3.4.3. Expérience en détection inverse HMBC gradient



**Figure 16:** Séquence hétéronucléaire multiple bond corrélation

La séquence HMQC<sup>(32)</sup> peut être utilisée pour un transfert via la constante de couplage hétéronucléaire longue distance. Dans cette expérience plus souvent appelée HMBC (Hétéronucléaire Multiple Bond Correlation) aucun découplage n'est appliqué durant  $t_2$ <sup>(33)</sup>. Dans la séquence présentée figure 16, utilisant les gradients de champ  $B_0$  (PFG-HMBC)<sup>(26)</sup>, le premier  $90_x(^{13}\text{C})$  et le délai  $d_2$  de  $1/2J_{\text{C-H}}$  sert de "low pass J filter"<sup>(34)</sup>.

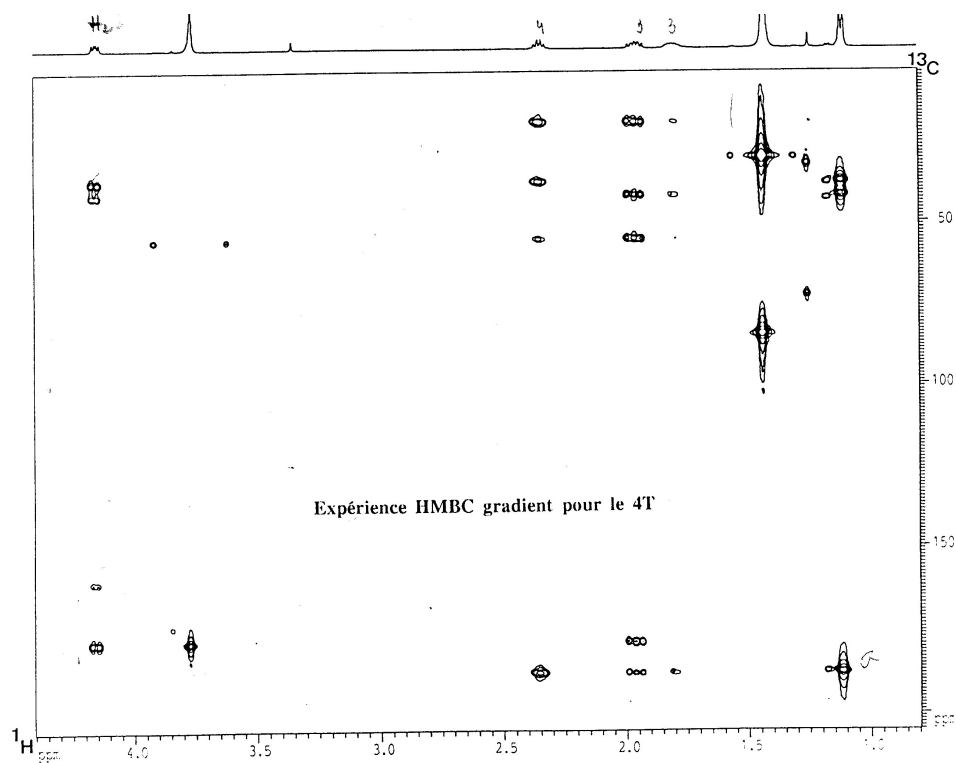


En effet suivant le cyclage de phase sur le premier  $90_x(^{13}\text{C})$  utilisé, les cohérences double quanta seront soit éliminées soit conservées. Cette technique permet de simplifier la carte 2D en éliminant les corrélations directes en  $^1J_{\text{H-}^{13}\text{C}}$  si on le désire. Durant  $d_5$ , les cohérences un quanta (en phase et en antiphase) apparaissent en fonction de la constante de couplage longue distance  $^3J_{\text{H-}^{13}\text{C}}$  ainsi que du déplacement chimique proton et carbone. Le second  $90_x(^{13}\text{C})$  transforme ces cohérences en zéro et double quanta qui varieront pendant  $t_1$  en fonction du couplage homonucléaire proton et du déplacement chimique carbone uniquement,

car ici aussi, le  $180^\circ(\text{H})$  refocalise le déplacement chimique proton et les constantes de couplage hétéronucléaires. Le dernier  $90^\circ_x(^{13}\text{C})$  génère des cohérences à un quanta proton en antiphase détectables à partir des doubles quanta. Ces cohérences à un quanta antiphase subiront durant l'acquisition une modulation supplémentaire en fonction de  $\pi J_{\text{HH}j}t_2$ ,  $\omega_{\text{H}}t_2$  et  $\pi J_{\text{H}-^{13}\text{C}}t_2$ . Comme la HMQC, cette expérience est calculée en valeur absolue et l'amplitude de transfert peut être donnée par la relation suivante:

$$\sin(\pi J_{\text{CH}}d_2)\sin(\pi J_{\text{CH}}d_5+t_2)\prod_j \cos[(\pi J_{\text{HH}j}(t_1+t_2+d_2+d_5))]$$

$$\prod_k \cos(\Omega_{\text{C}}t_1)\exp(i\Omega_{\text{H}}t_2)\exp(i\Omega_{\text{H}}d_5)\cos(\pi J_{\text{CC}k}t_1)$$



### L'intérêt des méthodes de détection inverse

L'intérêt de ces expériences réside dans le fait qu'elles permettent rapidement d'obtenir des corrélations entre proton et carbone (même entre le proton et des noyaux peu sensibles tel que  $^{15}\text{N}$ ) s'ils sont couplés scalairement. L'intensité des pics de corrélation permet d'avoir rapidement une idée de la constante de couplage  $^3J_{\text{H-X}}$ . En effet, dans la REVERSE HMBC, l'intensité des pics de corrélation est proportionnel aux transferts de polarisation qui est donné par l'équation suivante<sup>(35)</sup>:

$A \propto \sin(\pi J_{CH}\Delta) \cos(\pi J_{HH}\Delta) \cos(\pi J_{HH}t_1)$  où  $\Delta = d_5$  dans la HMBC

La faible intensité d'un pic de corrélation correspond alors à une faible constante de couplage  ${}^3J_{H-X}$ , inversement, une constante  ${}^3J_{H-X}$  relativement grande assure une tache intense.

Différentes expériences en détection inverse 1D ou 2D jumelées à des impulsions sélectives<sup>(36,37)</sup> permettent d'avoir accès aux valeurs des constantes de couplages  ${}^3J_{H-{}^{13}C}$ . Pour des systèmes de spin proton pas trop complexe (doublet par exemple), la constante de couplage  ${}^3J_{C-X}$  est accessible par l'utilisation de deux expériences, méthode de Titman et Keeler<sup>(38,39)</sup>. Une expérience HMBC et une référence 1D proton (écho de spin non refocalisé) équivalent à la HMBC pour  $t_1=0$ , permettent d'accéder aux constantes de couplages hétéronucléaires. Pour des systèmes de spins plus complexes, ces constantes sont difficiles à extraire car, dans ces expériences, la multiplicité proton reste toujours conservée.

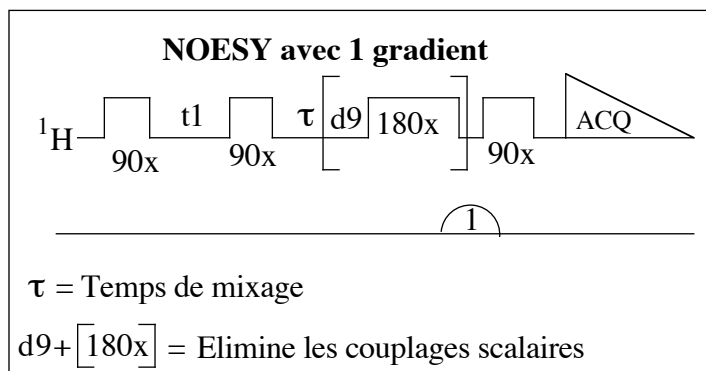
### 3.5. Mise en évidence de la proximité des protons

#### 3.5.1. Expérience NOE différence

On réalise l'enregistrement d'un spectre 1D proton avec saturation hors résonance (spectre de référence) alors que pour le second enregistrement, on sature un des protons du spectre. Une soustraction entre le spectre irradié et le spectre de référence permettra d'obtenir le spectre par NOE différence.

#### 3.5.2. Expérience NOESY

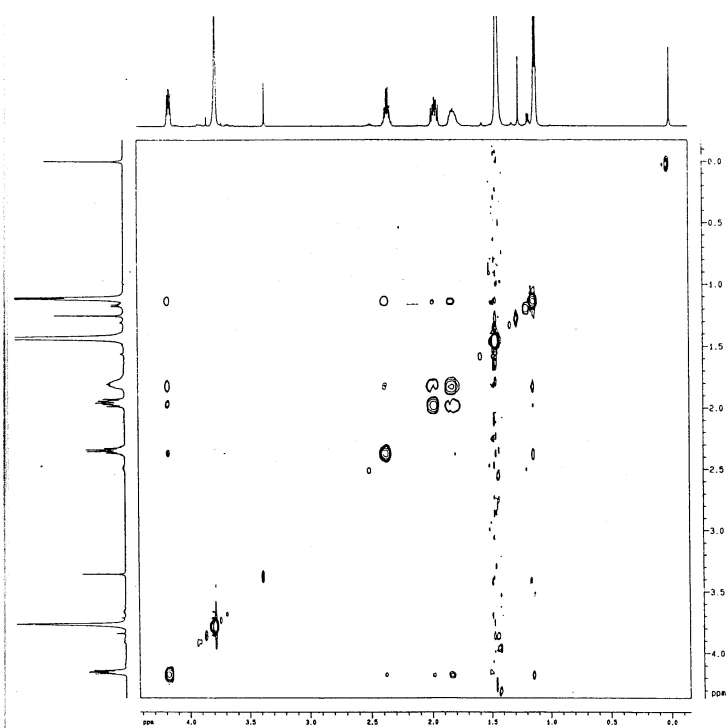
Des expériences NOESY<sup>(40,41)</sup> ont été réalisées après avoir dégazé et scellé les tubes de façon à éliminer l'oxygène de l'air qui perturberait les résultats. Cette expérience met en évidence par des taches hors diagonale sur la carte 2D, les protons proches dans l'espace (couplage dipolaire) et non pas les protons couplés scalairement.



**Figure 17:** Séquence NOESY



Cette expérience commence par une impulsion  $90^\circ$  qui permet à l'aimantation dans le plan x-y d'évoluer en fonction du déplacement chimique. La seconde impulsion  $90^\circ$  permet d'amener ces composantes sur l'axe -z. Durant la période  $\tau$ , les aimantations dirigées suivant z, évoluent en fonction uniquement de la relaxation croisée ( $W_2 - W_0$ ) (relaxation dipolaire) et non pas en fonction des constantes de couplage scalaire puisque le  $180^\circ$  "flottant" <sup>(42)</sup> avec un délai d $\theta$  moyenne à zéro les aimantations en fonction de ce couplage scalaire provenant de cohérences zéro quanta. L'utilisation d'un gradient de champ comme "homospoil" dirigé suivant z permet d'améliorer la carte 2D car les aimantations restantes sur l'axe x-y sont défocalisées.



Expérience NOESY pour le 4T

Pendant le temps de mixage  $\tau$ , la vitesse de relaxation croisée  $\sigma_{IS}$  entre deux protons est principalement due à la relaxation dipolaire. Le volume des taches hors diagonales observées dépend de la distance proton-proton et du temps de mixage <sup>(43,44)</sup>. Enfin, la dernière impulsion  $90^\circ$  ramène l'aimantation dans le plan de détection x-y. Le cyclage de phase en huit phases minimum permet d'éliminer les pics axiaux.

## 4. Le principe de l'analyse conformationnelle

Dans un premier temps, une analyse conformationnelle des composés cycliques analogues de l'acide glutamique (non bocqués), (1S, 3S)-*cis*-C5 et (1S, 3R)-*trans*-C5, a été réalisée par RMN et modélisation moléculaire.

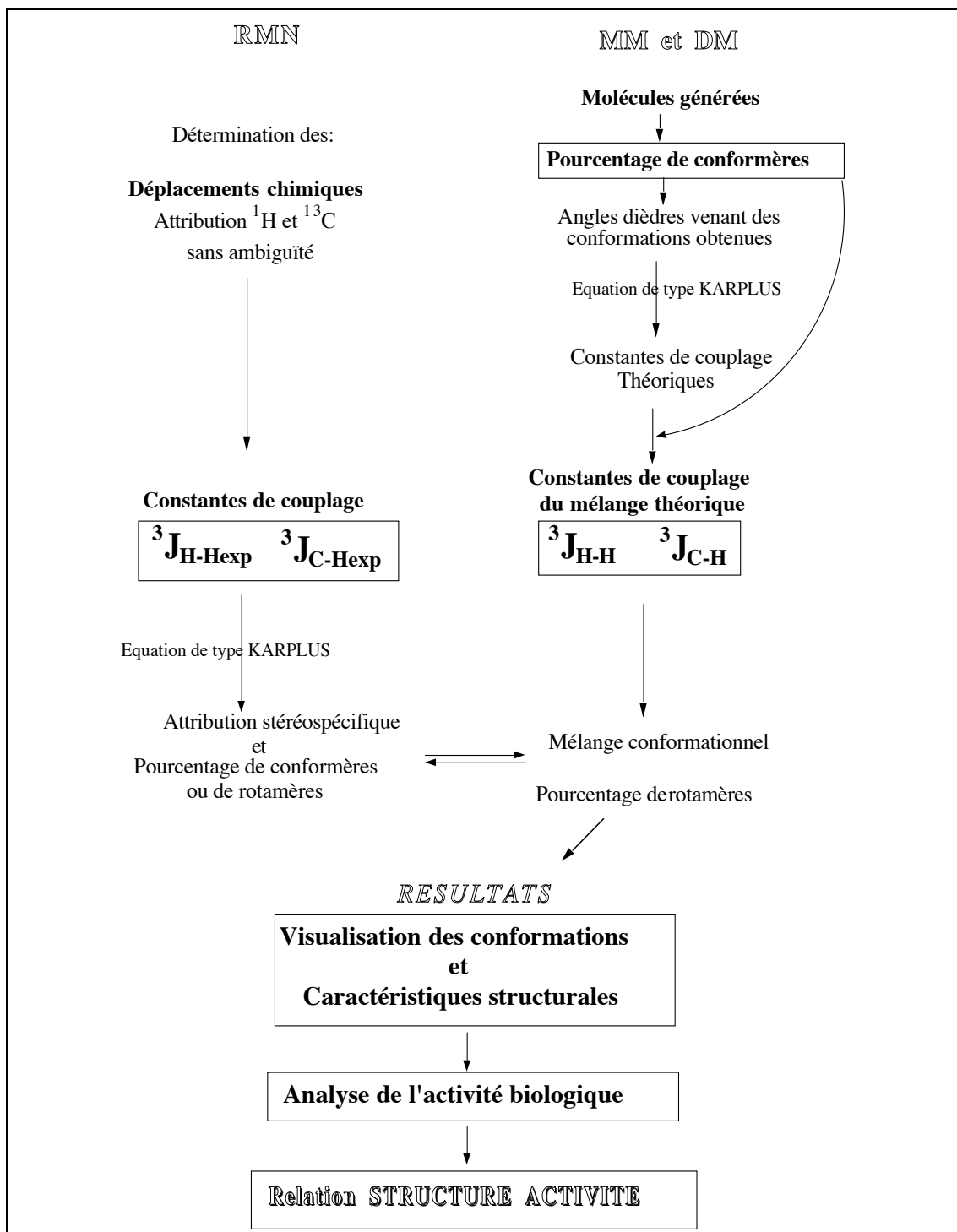
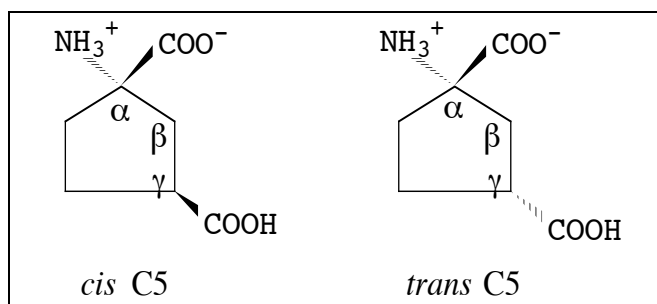
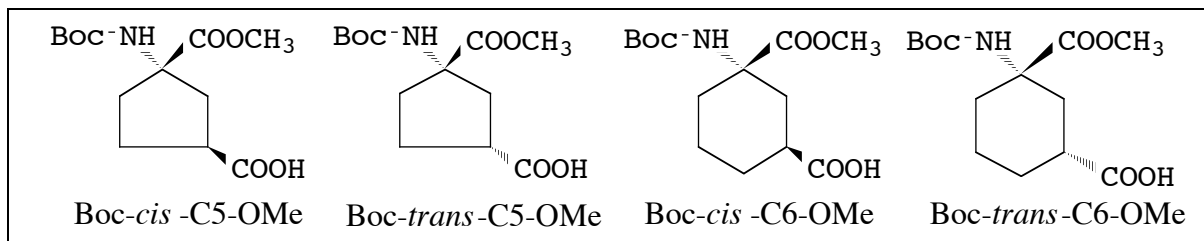


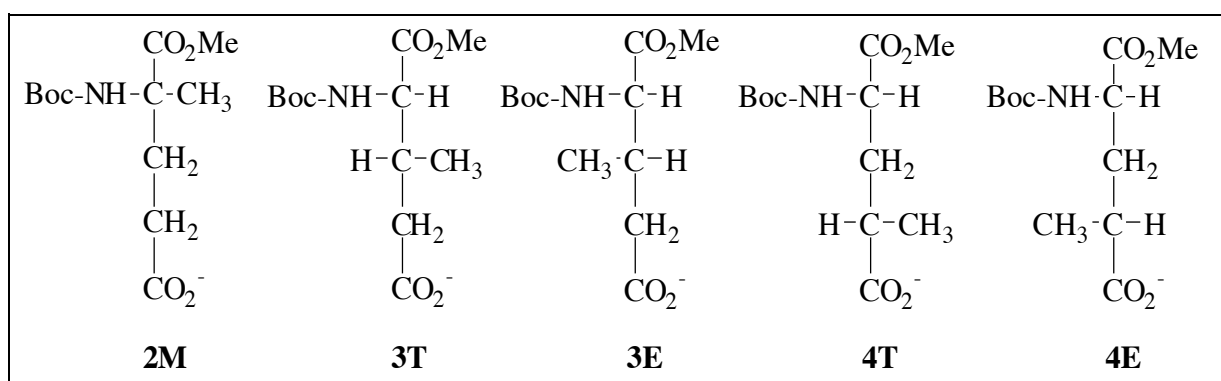
Schéma de la méthode utilisée



Puis, nous avons entrepris l'analyse conformationnelle en solution des composés *tert*-butyl-oxycarbonyle et ester méthylique correspondants. Les analogues cyclopentaniques (1*S*, 3*S*)-*cis*-C5 et (1*S*, 3*R*)-*trans*-C5 ainsi que les analogues cyclohexaniques (1*S*, 3*S*)-*cis*-C6 et (1*S*, 3*R*)-*trans*-C6 sont tous des inhibiteurs de la carboxylase.



La dernière partie du travail porte sur des analogues *tert*-butyl-oxycarbonyle et ester méthylique de l'acide glutamique, méthylés sur les positions  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  de la chaîne latérale. Il s'agit des composés **2M**, **3E**, **3T**, **4E** et **4T**.



Il est important dans une analyse conformationnelle d'utiliser les constantes de couplage  $^3\text{J}_{\text{H-H}}$  en association avec les constantes  $^3\text{J}_{\text{H-C}}$ . Les résultats expérimentaux de la RMN vont être comparés aux résultats de l'étude théorique de modélisation moléculaire (Mécanique Moléculaire ou MM et Dynamique Moléculaire ou DM). Les constantes de couplages expérimentales mesurées en RMN, seront corrélées aux constantes de couplage

calculées grâce aux équations de types Karplus à partir des angles dièdres théoriques provenant des conformations générées par modélisation.

La moyenne pondérée des constantes de couplage théoriques permettra de déterminer la composition du mélange conformationnel en solution. Pour  $i$  états de population  $P_i$ , on aura:

$$\langle J_{HH} \rangle = \sum^n P_i * J_{HH}$$

et

$$\langle J_{CH} \rangle = \sum^n P_i * J_{CH}$$

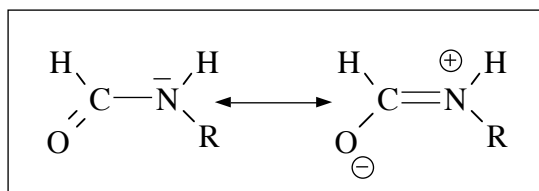
Le schéma ci-contre explique la méthode utilisée pour l'analyse conformationnelle.

#### 4.1. Conformation des chaînes polypeptidiques

La libre rotation autour des quatre angles  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\chi_1$  et  $\chi_2$  correspondant respectivement à la chaîne peptidique et à la chaîne latérale a été prise en compte dans les composés BOC-X-OMe [(où X représente un analogue de l'acide glutamique: C5 (cyclopentane), C6 (cyclohexane) ou linéaire méthylé (en position 2, 3 et 4)].

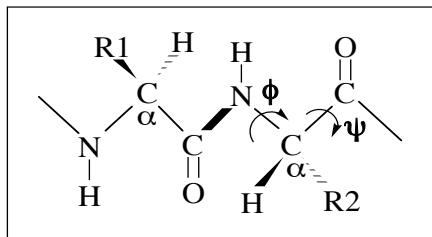
##### 4.1.2. Les angles $\phi$ et $\psi$

Les amides présentent un caractère de double liaison entre le carbone et l'azote du groupement fonctionnel, ce qui se traduit par deux formes de résonance représentées sur la figure 18.



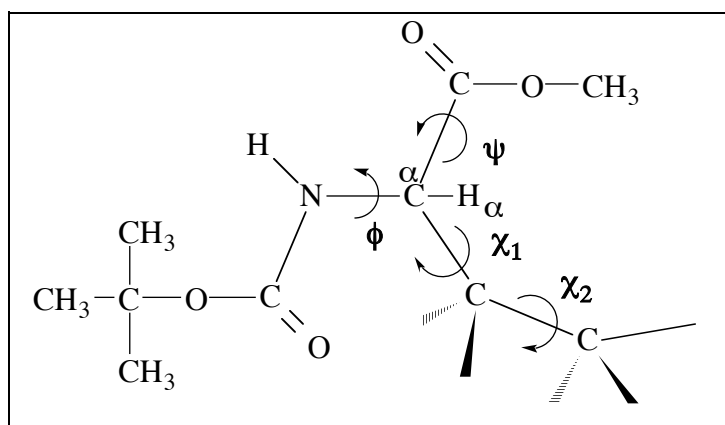
**Figure 18:** Les deux formes de résonance d'une liaison amide

Ce caractère de double liaison partielle des amides est importante et se retrouve dans la barrière de rotation de la liaison peptidique qui est relativement importante environ 88 KJ.mol<sup>-1</sup>. La conformation de la liaison peptidique est en général de type "s-trans" mais la conformation de type "s-cis" peut exister dans le cas où l'atome d'azote de la liaison peptidique est celui d'une proline ou d'une hydroxy-4 proline.



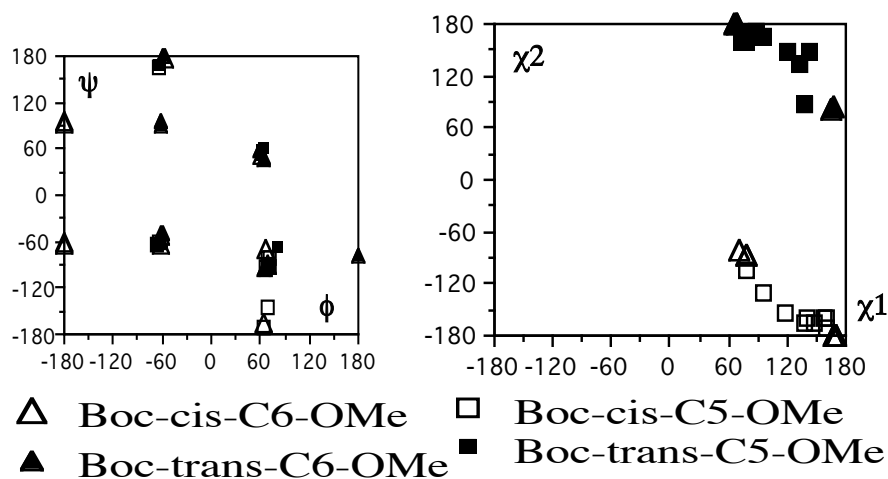
**Figure 19:** Conformation de la liaison peptidique de type "s-trans"

La conformation de la chaîne peptidique est décrite par les angles de rotation  $\phi$  et  $\psi$  bien connus dans les peptides et les protéines ce qui correspond à des rotations autour des liaisons NH-C $\alpha$  pour  $\phi$  et COOMe-C $\alpha$  pour  $\psi$  pour nos molécules (Figure 19).



**Figure 20:** Représentation des quatre angles dièdres

L'ensemble des valeurs possibles pour  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\chi_1$  et  $\chi_2$  est représenté ci-dessous par les diagrammes de Ramachandran<sup>(45)</sup> dans le cas des analogues cycliques.



Pour les peptides et les protéines, le diagramme de Ramachandran met en évidence leurs structures secondaires. Celles-ci peuvent être de trois types:

- **Les hélices** sont caractérisées par des valeurs pour  $\phi$  et  $\psi$  autour de  $(-60^\circ, -60^\circ)$ . L'hélice  $\alpha$  est la plus fréquente et correspond aux valeurs  $(-57^\circ, -47^\circ)$ . Celles-ci sont stabilisées par des liaisons hydrogène parallèles à l'axe de l'hélice, entre l'oxygène du résidu  $i$  et l'azote du résidu  $i+4$  ainsi que par des interactions dipôle-dipôle.
- **Les feuillets  $\beta$**  correspondent à la zone  $(-120^\circ, +120^\circ)$ . On peut, de plus, distinguer les feuillets parallèles  $(-119^\circ, +113^\circ)$  et antiparallèles  $(-139^\circ, +135^\circ)$ , les feuillets parallèles étant moins favorables énergétiquement.
- **Les coudes  $\beta$**  sont des éléments de structure non-répétitifs impliquant un petit nombre de résidus. Ils permettent à la chaîne polypeptidique de repartir dans une direction opposée. On distingue quatre types de plis  $\beta$  dont les valeurs sont définies pour les résidus 2 et 3 car cette structure est souvent stabilisée par liaison hydrogène entre l'oxygène du résidu 1 et l'azote du résidu 4.

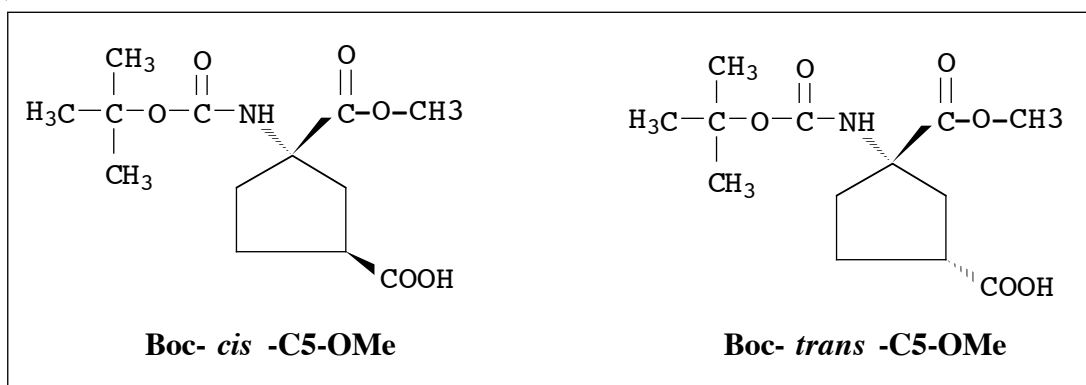
	Résidu 2	Résidu 3
<b>Type I</b>	<b><math>(-60^\circ, -30^\circ)</math></b>	<b><math>(-90^\circ, 0^\circ)</math></b>
<b>Type I'</b>	<b><math>(60^\circ, 30^\circ)</math></b>	<b><math>(90^\circ, 0^\circ)</math></b>
<b>Type II</b>	<b><math>(-60^\circ, 120^\circ)</math></b>	<b><math>(90^\circ, 0^\circ)</math></b>
<b>Type II'</b>	<b><math>(60^\circ, -120^\circ)</math></b>	<b><math>(-90^\circ, 0^\circ)</math></b>

Pour les analogues étudiés, l'orientation de la chaîne peptidique peut avoir, par son effet stérique, une importance sur la reconnaissance de certaines conformations au niveau du site actif de l'enzyme. Les différentes valeurs trouvées pour  $\phi$  et  $\psi$  correspondent à des conformations toutes de basse énergie. Pour les dérivés cyclohexaniques, les valeurs de  $\phi$  et  $\psi$   $(-60, -60)$  correspondraient à une "hélice  $\alpha$ " sauf pour une conformation chaise C2 (se reporter à la seconde publication) du Boc-*cis*-C6-OMe qui n'existait pas en solution et pour laquelle la valeur trouvée pour  $\phi$  est de  $+60^\circ$ . Pour les dérivés cyclopentaniques, la chaîne peptidique correspondrait à une "hélice  $\alpha$ " ou à un "coude  $\beta$ " avec des valeurs  $\pm 60^\circ$  pour  $\phi$  et des valeurs de  $\psi$  très variables (de  $\pm 60^\circ$  à  $\pm 180^\circ$ ). Dans les analogues linéaires, le composé **2M** est le seul pouvant présenter une conformation (Aa) avec une valeur de  $\phi = +60^\circ$  alors que les autres conformations du mélange ont un angle  $\phi = -60^\circ$ . Dans les autres composés **3E**, **3T**, **4E** et **4T**, les valeurs de  $\phi$  sont toujours comprises entre  $-60^\circ$  et  $-90^\circ$ . L'ester relativement mobile peut prendre diverses orientations (se reporter à la troisième publication). Peu d'études conformationnelles ont été réalisées sur des peptides intervenant dans la coagulation sanguine. Une étude structurale récente d'un peptide correspondant à une partie de la séquence du Facteur VIII montre une orientation semblable du Glu ( $\phi$  de  $\approx -70^\circ$ )<sup>(46)</sup>.

## 4.2. Conformation des analogues de l'acide glutamique

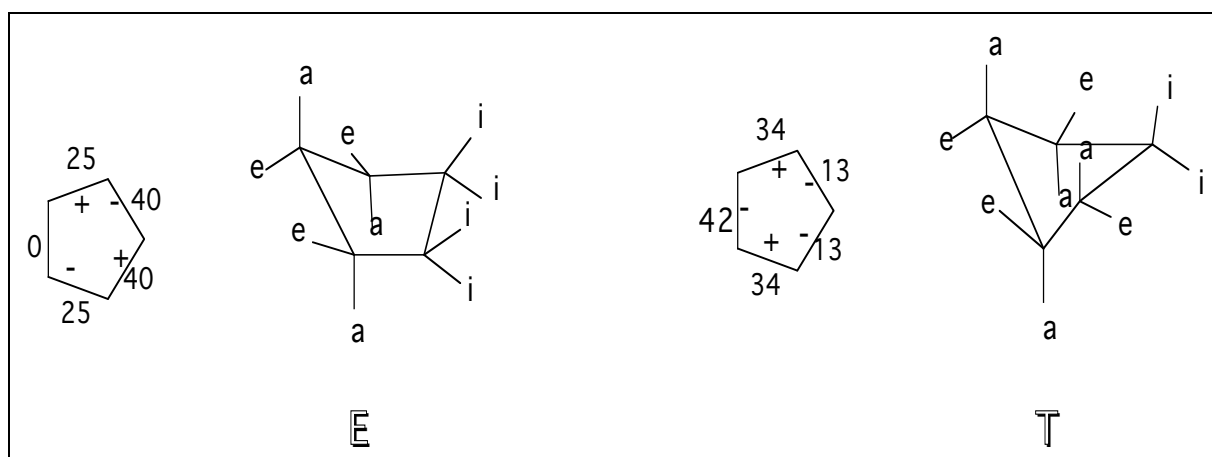
### 4.2.1. Les formes E ou T pour les analogues cyclopentaniques

Les analogues cyclopentaniques (Figure 21) peuvent adopter diverses conformations non planes. Les plus caractéristiques sont les conformations enveloppe **E** (quatre atomes coplanaires) et les conformations demi-chaise "twist ou half-chair" **T** (trois atomes dans le plan)<sup>(47)</sup>.



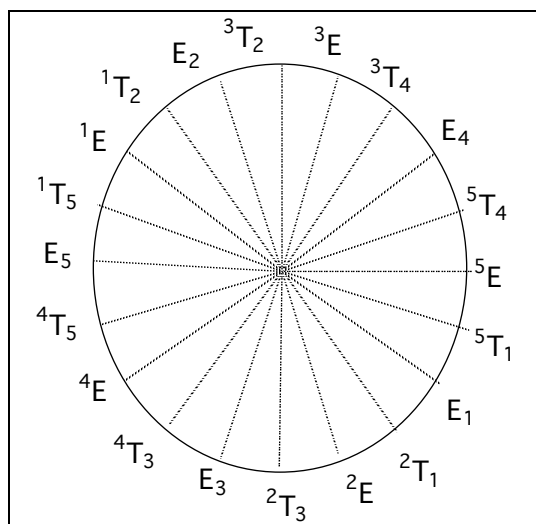
**Figure 21:** Analogues cyclopentaniques de l'acide glutamique

La conformation **E** ou **T** du cycle est déterminée grâce aux valeurs des angles dièdres endocycles ( $\tau_i$ ) de la molécule donnée dans la figure 22. Les différents substituants peuvent prendre des positions axiales ou équatoriales par rapport au cycle mais aussi isoclinales (positions intermédiaires).



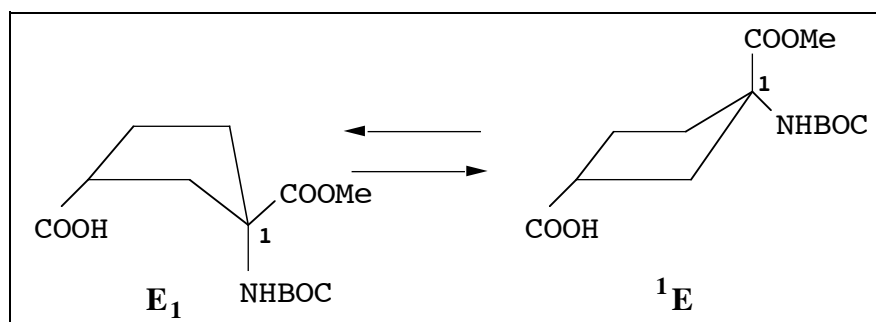
**Figure 22:** Conformation enveloppe et "twist" ou croisée pour un cyclopentane

Il n'y a pas de minimum énergétique marqué pour les conformations non planes du cyclopentane qui présente donc une grande flexibilité. Le terme de pseudo-rotation<sup>(48)</sup> est utilisé pour marquer ce déplacement incessant de l'enveloppe à la demi -chaise.



**Figure 23:** Cercle de pseudorotation

Une conformation enveloppe du cyclopentane peut être l'une ou l'autre des deux enveloppes  $E_1$  ou  ${}^1E$  (exemple pour le composé BOC-*trans*-C5-OMe représenté dans la figure 24).



**Figure 24:** Conformations enveloppes envisagées pour le BOC-*trans*-C5

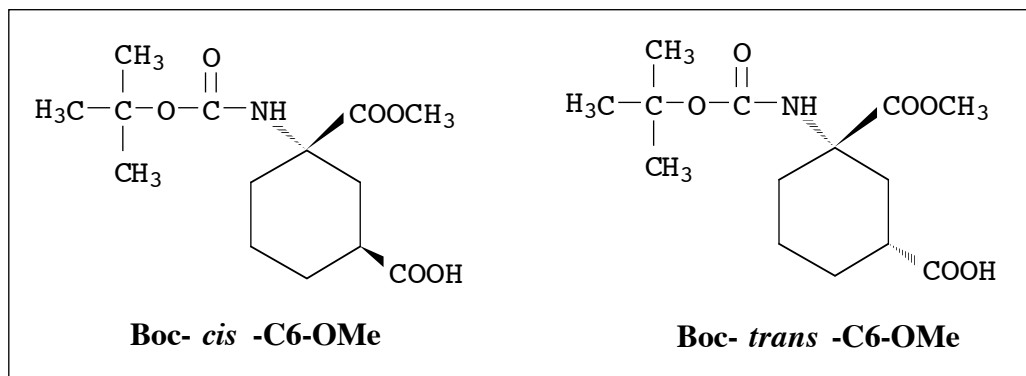
[Dans l'analyse conformationnelle des sucres (riboses ou desoxyribose), ces deux positions prennent le nom de conformation endo ou exo<sup>(49,50)</sup>.]

Le phénomène de pseudorotation a rendu difficile l'analyse conformationnelle des dérivés du cyclopentane. Selon la nature des substituants et de leurs charges, certaines conformations (enveloppe ou demi -chaise) seront plus stabilisées.



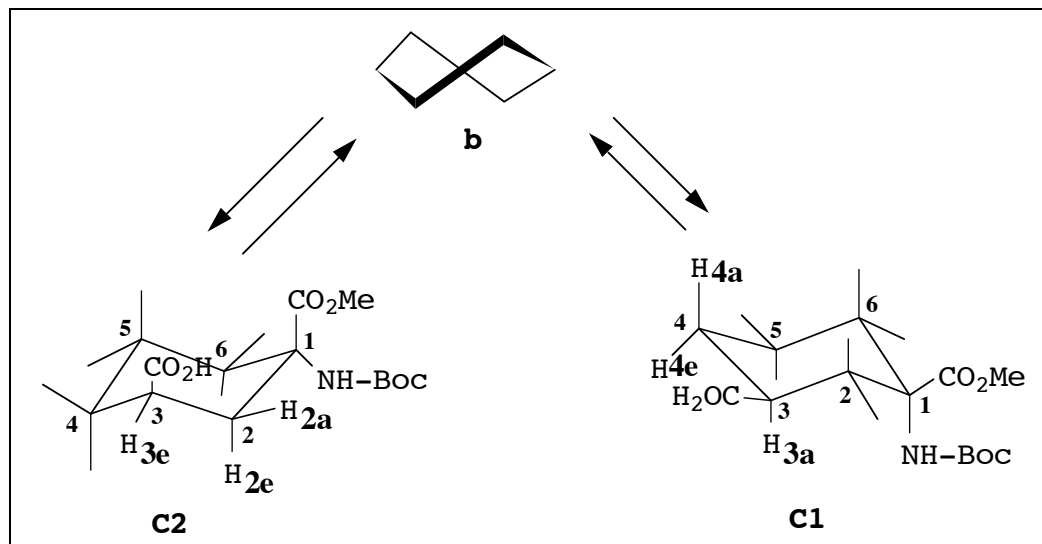
#### 4.2.2. Les formes chaises des analogues cyclohexaniques

Des molécules plus rigides, dérivées du cyclohexane, ont été utilisées comme analogues de l'acide glutamique: Les composés Boc-*cis*-C6-OMe et Boc-*trans*-C6-OMe (Figure 25)



**Figure 25:** Analogues cyclohexaniques de l'acide glutamique

Dans ces composés, on peut observer une interconversion entre une chaise **C1** et une chaise **C2** (Figure 26) en passant par des formes intermédiaires croisées "twist" de haute énergie<sup>(51)</sup>.

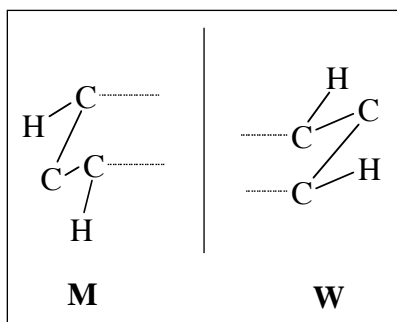


**Figure 26:** Conformations possibles pour le BOC-*cis*-C6

Les substituants NH-Boc, CO<sub>2</sub>Me et CO<sub>2</sub><sup>-</sup> ainsi que les neuf protons restants, se retrouvent dans des positions axiales **a** ou équatoriales **e**. Pour les formes "twist", on observe, en plus, une orientation isoclinale des substituants. Des interactions stériques ou des

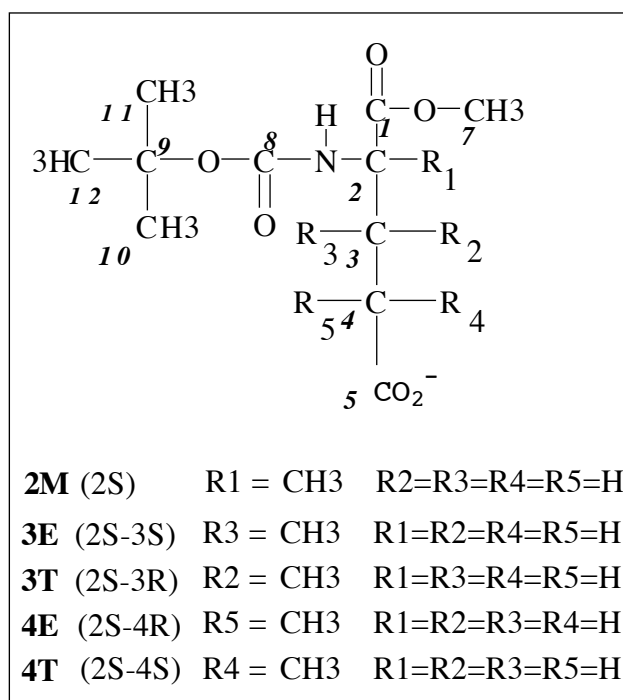
répulsions électrostatiques peuvent favoriser certaines orientations équatoriales alors que des attractions électrostatiques peuvent favoriser plutôt des positions 1-4 diaxiales.

Dans le cyclohexane, le couplage entre deux protons diaxiaux est plus grand que celui entre deux protons diéquatoriaux ou entre un proton axial et un proton équatorial ( $^3J_{aa} > ^3J_{ea} \sim ^3J_{ee}$ ). On peut trouver aussi des constantes de couplage  $^4J$  de 1 ou 2 Hz qui correspondent à un enchaînement en M ou en W.

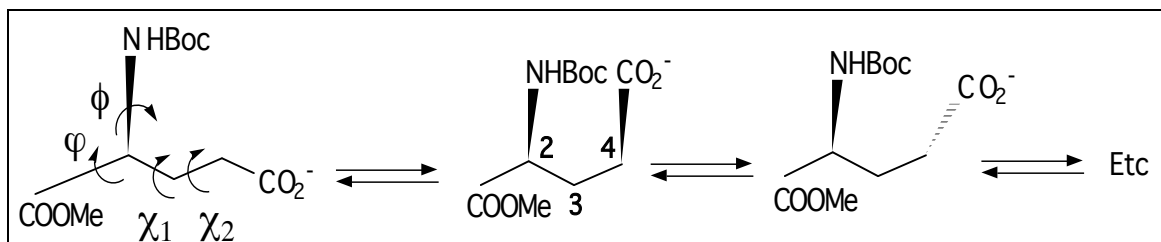


#### 4.2.3. Les formes décalées pour les analogues linéaires

L'étude conformationnelle dans les molécules linéaires (Figure 27) est rendue difficile par un haut degré de liberté de la chaîne latérale, comparable à celui de l'acide glutamique (Figure 28).

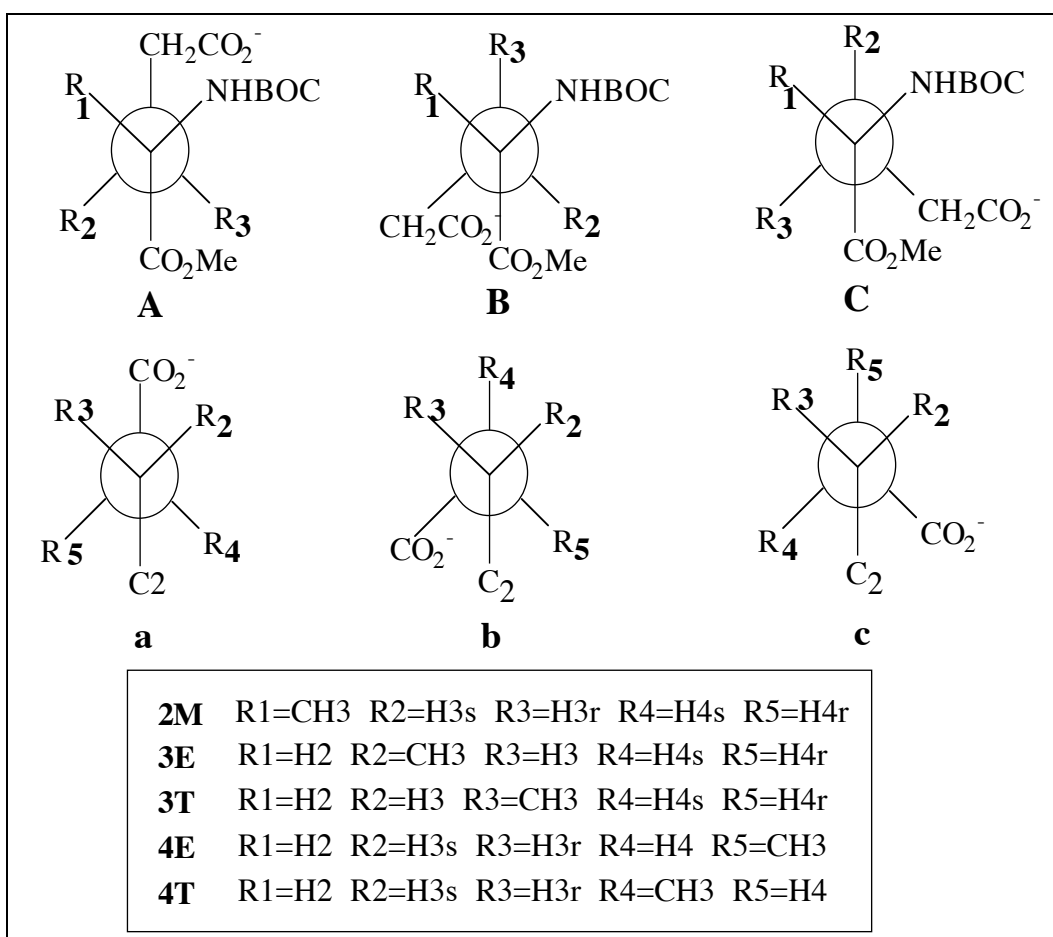


**Figure 27:** Analogues méthylés de l'acide glutamique



**Figure 28:** Angles  $\chi_1$  (rotation autour de la liaison C2-C3) et Angles  $\chi_2$  (rotation autour de la liaison C3-C4).

Dans les analogues méthylés, le squelette carboné adopte des conformations diverses résultant des rotations autour des liaisons C(2)-C(3) et C(3)-C(4) (Figure 29).



**Figure 29:** Projections de Newman présentant les trois rotamères décalés (A, B et C) autour de la liaison C(2)-C(3) (angle  $\chi_1$ ) et les trois rotamères (a, b et c) autour de la liaison C(3)-C(4) (angle  $\chi_2$ ).

Les conformations provenant de la rotation autour des angles  $\chi_1$  et  $\chi_2$  correspondent aux rotamères décalés (Figure 29): **A**, **B**, **C** relatifs à l'angle  $\chi_1$  et **a**, **b**, **c** correspondant à l'angle  $\chi_2$ . En négligeant les conformations éclipsées, la combinaison de ces six rotamères décalés conduit aux neuf conformations possibles pour la molécule (Aa, Ab, Ac, Ba...). La nomenclature utilisée pour les analogues linéaires méthylés est la suivante:

- Le premier chiffre indique la position du substituant méthyle sur la chaîne latérale. Le chiffre **2** correspond à la position  $\alpha$  (carbone 2), le chiffre 3 correspond à la position  $\beta$  (carbone 3) et le chiffre 4 correspond à la position  $\gamma$  (carbone 4).
- La lettre **E** ou **T** représente en projection de Fischer (Figure 27), la stéréochimie du substituant méthyle (Erythro du côté NH-Boc ou Thréo coté CO<sub>2</sub>Me).
- La lettre **A**, **B** ou **C** désigne un des trois rotamères correspondant à la rotation autour de l'angle  $\chi_1$  (Figure 29).
- La lettre **a**, **b** ou **c** désigne un des trois rotamères correspondant à la rotation autour de l'angle  $\chi_2$  (Figure 29).

La détermination des constantes de couplages  $^3J^{1H-1H}$  et  $^3J^{13C-1H}$  (obtenue par l'expérience 2D INEPT J  $\delta$  sélective) ont permis l'attribution stéréospécifique (**Pro R** ou **Pro S**) des protons diastéréotopiques ainsi que l'évaluation du pourcentage de rotamères en solution. Chaque composé peut théoriquement posséder neuf conformations notées **Aa**, **Ab**, **Ac**, **Ba**, **Bb**, **Bc**, **Ca**, **Cb** et **Cc**. Néanmoins, certaines de ces conformations seront plus favorisées (ou interdites), en raison des interactions électrostatiques ou stériques. Ces conformations auront donc un pourcentage plus important (ou négligeable) dans le mélange conformationnel. Les équations de type Karplus ont été utilisées pour le calcul des constantes de couplage  $^3J^{1H-1H}$  et  $^3J^{13C-1H}$  à partir des angles dièdres théoriques pour les conformations générées par la modélisation moléculaire.

### 4.3. Les équations de type Karplus

La valeur du couplage entre deux noyaux séparés par trois liaisons ( $^3J$ ) est reliée à l'angle dièdre  $\theta$  entre deux plans consécutifs, par une équation de type Karplus<sup>(52-54)</sup>.

$$^3J_{AX} = A \cos^2\theta + B \cos\theta + C$$

Les constantes **A**, **B** et **C** sont ajustées suivant l'orientation et la nature des substituants.

Ce type de relation peut être décliné sous différentes formes plus ou moins développées selon le nombre de paramètres pris en considération <sup>(55)</sup>. Certains auteurs proposent également des équations en  $\cos(2\theta)$  à la place du terme en  $\cos^2\theta$  <sup>(56,57)</sup>. La littérature est actuellement beaucoup plus riche en ce qui concerne les équations pour le calcul des constantes de couplage homonucléaires  $^3J_{H-H}$  que pour les constantes de couplage hétéronucléaires, ces dernières restant difficiles à mesurer.

#### 4.3.1. Cas des constantes de couplage homonucléaires

a) L'équation d'Altona <sup>(55,58)</sup>, développée pour des composés osidiques cycliques, a été utilisée pour les analogues cyclohexaniques et cyclopentaniques.

L'équation d'Altona considère la dépendance de la constante de couplage  $^3J_{H-H}$  en fonction de trois facteurs: L'angle dièdre H-C-C-H ( $\theta$ ), l'électronégativité ( $\Delta\chi_i$ ) de chaque substituant attaché au fragment H-C-C-H et l'orientation ( $\xi_i$ ) des substituants par rapport aux deux carbones du fragment H-C-C-H.

Cette valeur ( $\xi_i$ ) peut être de +1 ou de -1 suivant que les autres substituants considérés ont un angle de  $120^\circ$  ou  $240^\circ$  <sup>(49)</sup>.

Nous avons utilisé le logiciel Altona qui calcule automatiquement les paramètres en fonction des substituants choisis.

#### Equation d'Altona:

$$^3J_{H-H} = P1 \cdot \cos^2\theta + P2 \cdot \cos\theta + P3 + \sum \Delta\chi_i [P4 + P5 \cdot \cos^2(\xi_i\theta + P6 \cdot |\chi_i|)]$$

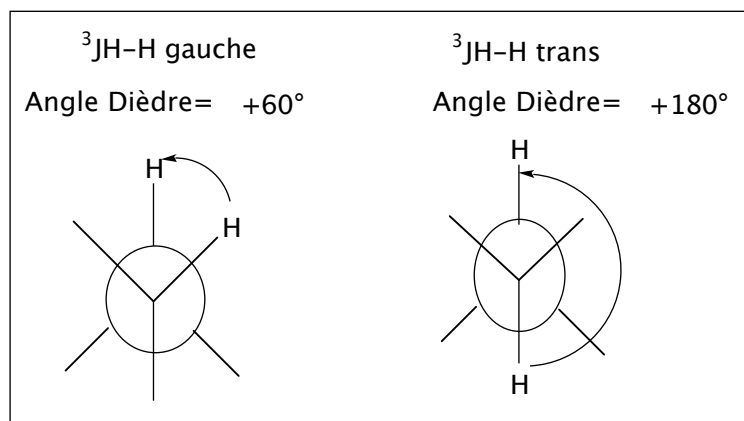
ou  $\Delta\chi_i = \Delta\chi_i(\alpha\text{-atomes}) - P7 \sum \Delta\chi_i(\beta\text{-atomes})$  et  $\Delta\chi(\alpha\text{ou } \beta\text{-atomes}) = \chi(\alpha\text{ou } \beta\text{-atomes}) - \chi_{\text{hydrogène}}$

Les valeurs de P1 à P7 sont des constantes qui varient en fonction du nombre de substituants.

b) L'équation de De-Marco <sup>(59)</sup>, développée dans le cas des acides aminés, a été utilisée pour les composés linéaires méthylés. Cette équation conduit aux valeurs calculées  $^3J_g = 3.3\text{Hz}$  et  $^3J_t = 12.4\text{Hz}$  où  $J_g$  et  $J_t$  désignent les constantes de couplage des conformations gauche et trans respectivement (Figure 30).

#### Equation de De-Marco:

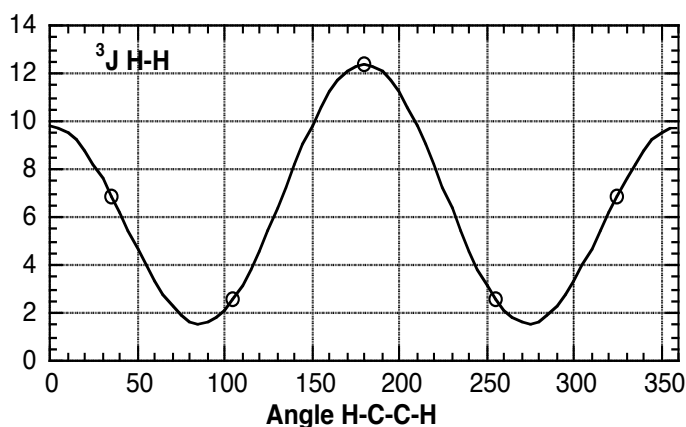
$$^3J_{H-H} = 9.5 \cdot \cos^2\theta - 1.4 \cdot \cos\theta + 1.9$$



**Figure 30:** Conformations décalées *gauche* et *trans* (ou *anti*)

Kopple et al<sup>(60)</sup> ont proposé une variante de l'équation de De-Marco avec les valeurs de constantes  $A = 9.4$ ,  $B = -1.4$  et  $C = 1.6$ . D'autres équations souvent utilisées dans la littérature (équation de Pachler<sup>(61)</sup>) conduisent aux valeurs de  $^3J_g=2.6\text{Hz}$  et  $^3J_t=13.6\text{Hz}$ .

Le faible écart entre les constantes de couplage *trans* ou gauches, déterminées avec l'équation de Pachler et de De-Marco, n'est pas suffisamment grand pour avoir un effet sur le calcul des populations des différents rotamères (variation de 1 à 3 %).



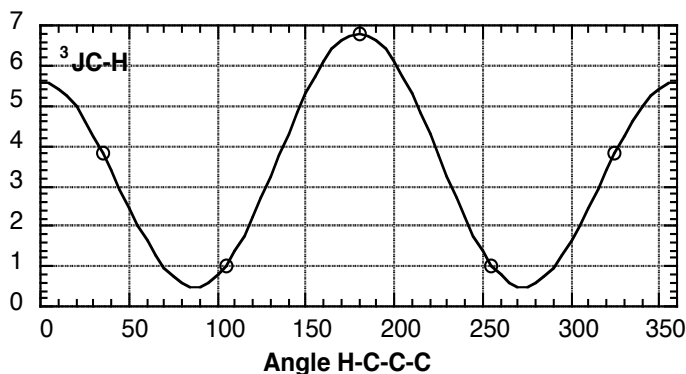
**Figure 31:** Equation de De-Marco:  $^3J_{H-H}=9.5*\cos^2\theta -1.4*\cos\theta+1.9$

#### 4.3.2. Cas des constantes de couplage hétéronucléaires

Du fait de la difficulté à mesurer de telles constantes, peu d'équations ont été élaborées. L'équation de HRICOVINI<sup>(62)</sup> sera utilisée pour le calcul des constantes de couplage  $^3J_{H-C}$  à partir des angles théoriques mesurés sur les conformations générées par modélisation

moléculaire. Cette équation a été mise au point avec des valeurs précises de constantes de couplage obtenues en RMN grâce à des expériences 2D J résolue et 2D INEPT sur des composés biologiques (oligosaccharides, polysaccharides et glucoconjugués).

Les valeurs  $^3J_{\text{H-C}}$  *trans* et *gauche* calculées avec cette équation (respectivement 6.8 Hz et 1.6 Hz) ont permis de déterminer le pourcentage des différents rotamères en solution.



**Figure 32:** Equation de HRICOVINI:  $^3J_{\text{C-H}} = 5.7\cos^2\theta - 0.6\cos\theta + 0.5$

#### 4.4. Pourcentage en solution des différentes conformations

##### 4.4.1. Cas des analogues cyclopentaniques

L'analyse du pourcentage de chaque conformation présente en solution est rendue difficile par le nombre de conformations théoriques importantes (dix enveloppes s'interconvertissent dans le cercle de pseudorotation). L'estimation statistique utilisant l'équation de Maxwell-Boltzmann ne peut se faire à partir des valeurs d'énergie venant de la Mécanique Moléculaire. Ces valeurs seront aléatoires puisqu'elles représentent l'énergie de systèmes complexes: soluté + n molécules d'eau (se reporter au chapitre de modélisation). Il est néanmoins possible d'obtenir ces pourcentages en utilisant les mélanges conformationnels générés par plusieurs expériences de dynamique moléculaire partant de différentes conformations de départ. Pour chaque mélange, on évaluera une valeur moyennée de chaque constante de couplage  $^3J_{\text{H-H}}$  et  $^3J_{\text{H-C}}$ . L'estimation statistique qui conduit à un ensemble de constantes de couplage présentant un minimum d'écart par rapport aux constantes expérimentales RMN, sera retenu comme mélange pour la solution.

$$^3J(\text{HH}) = \sum P_i * ^3J_i (\text{HH})$$

$$^3J(\text{HC}) = \sum P_i * ^3J_i (\text{HC})$$

BOC-*cis*-C5-OMe (25% **E**<sub>1</sub> + 25% **E**<sub>3</sub> + 20% **E**<sub>2</sub> + 15% **E**<sub>5</sub> + 5% **E**<sub>4</sub>)

BOC-*trans*-C5-OMe (50% **E**<sub>1</sub> + 20% **E**<sub>2</sub> + 15% **E**<sub>4</sub> + 10% **E**<sub>3</sub> + 5% **E**<sub>5</sub>)

Par exemple: [ $J_{2a,3a} = 0.5 * J_{2a,3a}(\mathbf{E}_1) + 0.2 * J_{2,3a}(\mathbf{E}_2) + 0.15 * J_{2,3a}(\mathbf{E}_4) + 0.1 * J_{2,3a}(\mathbf{E}_3) + 0.05 * J_{2,3a}(\mathbf{E}_5) = 6.1 \text{ Hz (Jobs = 7)}$ ]

Le calcul  $\Sigma \Delta(J_{\text{calc}} - J_{\text{exp}})$  évalué pour environ dix constantes de couplage ( $J_{\text{H,H}}$  et  $J_{\text{C,H}}$ ) dans le cas des deux composés ( $\langle \Delta J \rangle \pm 0.8$  Hz) montre que le mélange proposé pour la solution est en bon accord avec les résultats RMN.

#### 4.4.2. Cas des analogues cyclohexaniques

Dans le cas des dérivés cyclohexaniques, seules les conformations de types chaises sont prises en compte, les formes demi-chaises ou "twist" étant de haute énergie et proche de l'état de transition. Si l'équilibre entre les deux formes chaises C1 et C2 s'établit en solution, on pourra alors obtenir leur pourcentage X et Y par l'équation suivante<sup>(63)</sup>:

$$\text{Jobs(RMN)} = X\% \text{ de C1} * {}^3J_{\text{Hax,Hax}} + Y\% \text{ de C2} * {}^3J_{\text{Heq-Heq}}$$

sachant que  $X+Y=1$ , les valeurs théoriques étant  ${}^3J_{\text{Hax,Hax}}=12\text{Hz}$  et  ${}^3J_{\text{Heq-Heq}}=3\text{Hz}$

#### 4.4.3. Cas des analogues linéaires méthylés

L'utilisation des constantes de couplage expérimentales permettent en connaissant les valeurs théoriques des constantes  ${}^3J_{\text{gH-H}}$  (*gauche*) et  ${}^3J_{\text{tH-H}}$  (*trans*) (Figure 30) d'accéder aux pourcentages des rotamères en solution<sup>(64)</sup>. Mais la valeur des pourcentages des rotamères en solution n'est assurée que si les protons sont attribués de façon stéréospécifique. Cette attribution se fait en analysant les valeurs des constantes de couplage  ${}^3J_{\text{H-}^1\text{H}}$  et  ${}^3J_{\text{C-}^1\text{H}}$ . Cette détermination peut être, dans certain cas, confirmée par des expériences NOESY ou par l'observation des taches de corrélation dans l'expérience HMBC  $^{15}\text{N-}^1\text{H}$  par exemple.

Les différents pourcentages des rotamères **A**, **B**, **C** et **a**, **b**, **c** pour les angles dièdres respectifs  $\chi_1$  et  $\chi_2$  (Figure 29), ont été déterminés grâce à deux systèmes de trois équations à trois inconnues.

Les valeurs de constantes de couplage expérimentales  ${}^3J_{\text{H-}^1\text{H}}$  et  ${}^3J_{\text{C-}^1\text{H}}$  ainsi que les valeurs théoriques  $J_{\text{g}}$  (pour un angle de  $60^\circ$ ) et  $J_{\text{t}}$  (pour un angle de  $180^\circ$ ) ont permis d'accéder à ces résultats pour les différents composés linéaires méthylés (2M, 3E, 3T, 4E, 4T). Les valeurs de  $P_{\text{A}}$ ,  $P_{\text{B}}$  et  $P_{\text{C}}$  (ainsi que de  $P_{\text{a}}$ ,  $P_{\text{b}}$ ,  $P_{\text{c}}$ ) sont les moyennes obtenues à partir des calculs réalisés avec tous les couplages expérimentaux  ${}^3J_{\text{H-}^1\text{H}}_{\text{exp}}$  et  ${}^3J_{\text{C-}^1\text{H}}_{\text{exp}}$  en utilisant les équations ci-dessous.

$${}^3J_{\text{H1-H2 exp}} = P_{\text{A}} J_{\text{t}} + P_{\text{B}} J_{\text{g}} + P_{\text{C}} J_{\text{g}}$$

$${}^3J_{\text{H1-H2 exp}} = P_{\text{a}} J_{\text{g}} + P_{\text{b}} J_{\text{t}} + P_{\text{c}} J_{\text{g}}$$



$${}^3J_{\text{H1-H3}}^{\text{exp}} = P_a J_g + P_b J_t + P_c J_g \quad \text{ou} \quad {}^3J_{\text{H-C}}^{\text{exp}} = P_a J_g + P_b J_g + P_c J_t$$

$$1 = P_a + P_b + P_c \qquad \qquad \qquad 1 = P_a + P_b + P_c$$

Le travail en RMN a permis d'obtenir des valeurs expérimentales nécessaires à l'attribution stéréospécifique des protons et d'évaluer le pourcentage de rotamères pour les composés linéaires de l'acide glutamique (2M, 3E, 3T, 4E, 4T). Dans le cas des analogues cyclohexaniques (Boc-*cis* et *trans* -C6-OMe), ce travail a permis de déterminer le pourcentage de chaque conformation chaise. Les diverses données expérimentales confrontées aux résultats de la modélisation moléculaire vont nous permettre d'accepter ou de rejeter certaines conformations générées et d'identifier la composition du mélange en solution pour les analogues cyclopentaniques (Boc-*cis* et *trans* -C5-OMe) en limitant de manière conséquente le nombre de conformations (enveloppe ou "twist") provenant du cercle de pseudorotation.

## BIBLIOGRAPHIE – Partie RMN et analyse conformationnelle

- (1) Sorensen, O. W.; Eich, G. W.; Levitt, M. H.; Bodenhausen, G. & Ernst, R. R. (1983) *Prog. NMR Spectr.* **16**, 163.
- (2) Bodenhausen, G.; Freeman, R. & Turner, D. L. (1977) *J. Magn. Res.* **27**, 511.
- (3) Barker, P. & Freeman, R. (1985) *J. Magn. Res.* **64**, 334.
- (4) Doddrell, D. M. (1991) *J. Chin. Chem. Soc.* **38**, 107.
- (5) Ryan, L. M.; TAYlor, R. E.; Paff, A. J. & Gerstein, B. C. (1980) *J. Chem. Phys.* **72**, 508.
- (6) Friedrichs, M. S.; Metzler, W. J. & Mueller, L. (1991) *J. Magn. Res.* **95**, 178.
- (7) Geen, H. & Freeman, R. (1991) *J. Magn. Res.* **93**, 93.
- (8) Morris, G. A. & Freeman, R. (1978) *J. Magn. Res.* **29**, 433.
- (9) Ke, Y.; Schupp, D. G. & Garwood, M. (1992) *J. Magn. Res.* **96**, 663.
- (10) Hoult, D. I. (1976) *J. Magn. Res.* **21**, 337.
- (11) Patt, S. L. & Sykes, B. D. (1972) *J. Chem. Phys.* **56**, 3182.
- (12) Pateau, P. & Gueron, M. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7310.
- (13) Piotto, M.; Saudek, V. & Sklenar, V. (1992) *J. Biol. NMR.* **2**, 661.
- (14) Aue, W. P.; Bartholdi, E. & Ernst, R. R. (1975) *J. Chem. Phys.* **64**, 2229.
- (15) Brereton, I.; Crozier, S.; Field, J. & Doddrell, D. M. (1991) *J. Magn. Res.* **93**, 54.
- (16) Kienlin, M.; Moonen, C. W.; Toorn, A. & Zijl, P. M. (1991) *J. Magn. Res.* **93**, 423.
- (17) Freeman, R. & Hill, H. D. W. (1971) *J. Chem. Phys.* **54**, 301.
- (18) Doddrell, D. M.; Bendall, M. R. & Pegg, D. T. (1982) *J. Magn. Res.* **48**, 323.
- (19) Rutar, J. A. (1984) *J. Magn. Res.* **59**, 306.
- (20) Wilde, J. A. & Bolton, P. H. (1984) *J. Mag. Reson.* **59**, 343.
- (21) Bax, A. (1983) *J. Magn. Reson.* **53**, 517.
- (22) Garbow, J. R.; Weitekamp, D. P. & Pines, A. (1982) *Chem. Phys. Lett.* **93**, 504.
- (23) Müller, L. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 4481.
- (24) Bendall, M. R.; Pegg, D. T. & Doddrell, D. (1983) *J. Magn. Res.* **52**, 81.
- (25) Bax, A.; Griffey, R. H. & Hawkins, B. L. (1983) *J. Magn. Res.* **55**, 301.
- (26) Hurd, R. E. & Boban, K. J. (1991) *J. Magn. Res.* **91**, 648.
- (27) Keller, T. H. (1991) *J. Magn. Res.* **94**, 637.
- (28) Bax, A. (1984) *J. Magn. Res.* **57**, 314.
- (29) Bax, A.; Niu, C.-H. & D.Live. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 1150.
- (30) Bax, A. & Freeman, R. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 1099.
- (31) Ladam, P.; Gharbi-Benarous, J.; Pioto, M.; Delaforge, M. & Girault, J. P. (1994) *Magn. Res. Chem.* **32**, 1.
- (32) Rinaldi, P. L. & Keifer, P. A. (1994) *J. Magn. Res.* **108**, 259.
- (33) Bax, A. & Summers, M. F. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093.

- (34) Kogler, H.; Sorensen, O. W.; Bodenhausen, G. & Ernst, R. R. (1983) *J. Magn. Res.* **55**, 157.
- (35) Hofmann, M.; Gehrke, M.; Bermel, W. & Kessler, H. (1989) *J. Magn. Res.* **27**, 877.
- (36) Crouch, R. C. & Martin, G. E. (1991) *J. Magn. Res.* **92**, 189.
- (37) Poppe, L. & Van Halbeek, H. (1991) *J. Magn. Res.* **93**, 241.
- (38) Titman, J. J.; Neuhaus, D. & Keeler, J. (1989) *J. Magn. Res.* **85**, 111.
- (39) Richardson, J. M.; Titman, J. J. & Keeler, J. (1991) *J. Magn. Res.* **93**, 533.
- (40) Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, J. W. & Sons. ed, New York,
- (41) Jeener, J.; Meier, B. H.; Bachmann, P. & Ernst, R. R. (1979) *J. Chem. Phys.* **71**, 4546.
- (42) Delsuc, M. A., Thèse de docteur d'état ès-Sciences physiques Chimie, Orsay, N° d'ordre 2969, (1985).
- (43) Baleja, J. D.; Moulton, J. & Sykes, B. D. (1990) *J. Magn. Res.* **87**, 375.
- (44) Campbell, A. P. & Sykes, B. D. (1991) *J. Magn. Res.* **93**, 77.
- (45) Ramachandran, G. N. & Sasisekharan, V. (1968) *Adv. in Prot. Chem.* **23**, 283.
- (46) Gilbert, G. E. & Baleja, J. D. (1995) *Biochemistry.* **34**, 3022.
- (47) Hruska, F. E.; Grey, A. A. & Smith, I. C. P. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4088.
- (48) Smith, M. & Jardetzky, C. D. (1968) *J. Mol. Spectrosc.* **28**, 70.
- (49) Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. A. A. M.; De Leeuw, H. P. M. & Altona, C. (1981) *Biopolymers.* **20**, 1211.
- (50) Rinkel, L. J. & Altona, C. (1987) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 621.
- (51) Jackman, L. M. & Sternhell, S. (1969) *Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, ed, Pergamon Press, Oxford, 114.
- (52) Karplus, M. (1959) *J. Chem. Phys.* **30**, 11.
- (53) Karplus, M. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2870.
- (54) Bystrov, V. F. (1976) *Progress in NMR Spectroscopy.* **10**, 41.
- (55) Altona, C. & Sundaralingam, M. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2333.
- (56) Durette, L. P. & Horton, D. (1971) *Org. Magn. Reson.* **3**, 417.
- (57) Vorontsova, G. & Bochko, A. F. (1974) *Org. Magn. Reson.* **6**, 654.
- (58) Haasnoot, C. A. G.; De Leeuw, F. & Altona, C. (1980) *Tetrahedron.* **36**, 2783.
- (59) DeMarco, A.; Linas, M. & Wuthrich, K. (1978) *Biopolymers.* **17**, 617.
- (60) Kopple, K. D.; Wiley, G. R. & Neel, J. (1974) *Biopolymers.* **12**, 606.
- (61) Pachler, K. G. R. (1964) *Spectrochim. Acta.* **20**, 581.
- (62) Tvaroska, I.; Hricovini, M. & Petrakova, E. (1989) *Carbohydrate Research.* **189**, 359.
- (63) Morelle, N.; Gharbi-Benarous, J.; Acher, F.; Valle, G.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Azerad, R. & Girault, J. P. (1993) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 525.
- (64) Jardetzky, O. & Roberts, G. C. K. (1981) *NMR in molecular biology*, A. Press. ed, New York.

## **Chapitre III – Modélisation Moléculaire**

## 1. La modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire s'impose comme un outil indispensable dans le domaine de la biologie. En effet, elle permet de rechercher la conformation supposée bioactive d'une macromolécule ou de petites molécules. Dans ce contexte, il faut comprendre par macromolécules à la fois des protéines comme les enzymes, les récepteurs, les anticorps mais aussi des structures complexes comme l'ARN, l'ADN, ou les membranes. Les molécules de plus petites tailles peuvent être des fragments de macromolécules, des peptides de différentes tailles, des drogues interagissant avec des macromolécules. La modélisation moléculaire génère des structures tridimensionnelles. La connaissance de la structure 3D de macromolécules ou de drogues interagissant avec certaines autres macromolécules est essentielle pour l'élaboration de médicaments plus actifs. Or, la structure tridimensionnelle d'une macromolécule n'est accessible principalement que par cristallographie aux rayons X (RX) ou par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). La diversité des macromolécules existant dans le monde vivant fait que dans la plupart des cas leur structure tridimensionnelle n'a pas encore été déterminée. C'est le cas de la carboxylase vitamine K dépendante dont la structure primaire vient d'être connue récemment (voir partie biologique). Aucune donnée structurale précise par RX ou par RMN n'a été déterminée pour cette enzyme du fait peut-être du nombre important d'acides aminés enchaînés (758) et de son caractère transmembranaire. Pour la modélisation de molécules biologiques, la RMN permet d'obtenir des informations structurales précises sur la molécule en solution grâce à la mesure des constantes de couplage et des distances interatomiques à partir des effets NOE (voir partie RMN). Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux molécules qui interagissent avec la carboxylase, dans le but de trouver la conformation qui serait susceptible d'être active au niveau du site actif de cette enzyme. Nous avons donc effectué une étude de modélisation moléculaire sur les différents analogues de l'acide glutamique (BocC5 *cis* et *trans*, BocC6 *cis* et *trans*, Boc2Me, Boc3Me threo et Erythro ainsi Boc4Me threo et Erythro). Les informations structurales précises venant de la RMN sur ces analogues, ont permis de trier les conformations générées par la modélisation moléculaire. Pour effectuer ces calculs de modélisation moléculaire, nous avons utilisé le logiciel de Biosym (INSIGHT II / DISCOVER).

## 2. Les méthodes possibles

Selon le système à étudier, les intérêts, les propriétés recherchées et les ressources informatiques, différentes méthodologies peuvent être utilisées: la chimie quantique, la mécanique moléculaire et la dynamique moléculaire.

## 2.1. La chimie quantique

C'est une méthode basée sur la théorie des orbitales moléculaires. La théorie des orbitales moléculaires dérive d'approximations à la solution de l'équation de Schrödinger:

$$\mathbf{H}\Psi(\mathbf{R},\mathbf{r})= E\Psi(\mathbf{R},\mathbf{r}) \quad (1)$$

où  $\mathbf{H}$  est l'hamiltonien du système,  $\Psi$  la fonction d'onde et  $E$  l'énergie

Dans cette équation (1)  $\Psi$  est une fonction des coordonnées du noyau ( $\mathbf{R}$ ) et des électrons ( $\mathbf{r}$ ). En 1927, Born-Oppenheimer<sup>(1)</sup> propose la simplification de cette équation en deux autres équations.

$$\mathbf{H}\psi(\mathbf{R},\mathbf{r})= E\psi(\mathbf{R},\mathbf{r}) \quad (2)$$

$$\mathbf{H}\Phi(\mathbf{R})= E\Phi(\mathbf{R}) \quad (3)$$

La première équation (2) peut être résolue directement par des calculs de chimie quantique possible avec des champs de force ab-initio tels que Gaussian, Cadpac, Hondo. Les champs de force semi-empirique tels que MNDO<sup>(2)</sup>, MOPAC, AMPAC résolvent l'équation (2) mais en utilisant des approximations successives.

L'équation (3) décrit le mouvement des noyaux sur la surface d'énergie potentielle. Cette équation est utilisée dans des champs de force empiriques comme AMBER<sup>(3,4)</sup> ou CVFF<sup>(5)</sup>. Dans le cadre de cette étude structurale ou de l'évolution d'une structure au cours du temps (dynamique moléculaire), c'est cette équation qui sera prise en compte. Les noyaux sont alors assimilés à des particules relativement lourdes, aucun phénomène quantique n'est pris en compte et l'équation (3) peut être remplacée par l'équation (4)<sup>(6,7)</sup>.

$$-\frac{dE}{d\mathbf{R}} = m \frac{d^2\mathbf{R}}{dt^2} \quad (4)$$

Dans l'équation (4)  $E$  est l'énergie,  $m$  la masse du noyau et  $\mathbf{R}$  la position atomique.

## 2.2. La mécanique moléculaire

C'est une méthode empirique qui s'adresse à priori à tous les types de molécules de façon à accéder aux conformations et aux énergies associées. Une molécule est examinée comme une somme de boules (atomes) reliées entre elles par des ressorts (liaisons) plus ou moins élastiques (constantes de force). Cette méthode permet d'établir des relations entre structures (conformations) et activité pour différentes molécules, de déterminer la structure secondaire d'une macromolécule à partir de sa structure primaire, par exemple. Cette méthode repose sur un modèle mathématique, le champ de forces. Celui-ci est la combinaison de différentes fonctions d'énergies potentielles. Il résulte de ces différentes fonctions, des forces qui permettent de maintenir les atomes ensemble. Ces forces agissent sur la longueur des liaisons, les angles de valence et dièdres, les distances et sur le potentiel entre atomes non liés. La mécanique moléculaire ignore le temps d'évolution du système. Elle ne se focalise que sur une géométrie particulière et sur son énergie associée ainsi que sur certaines

propriétés statiques (structure à l'équilibre, d'un état de transition ou d'une énergie relative). Cette méthode sera décrite ultérieurement en détail.

### 2.3. La dynamique moléculaire

La trajectoire des atomes et leur évolution au cours du temps sont examinées en fonction des principes de la mécanique Newtonienne<sup>(8)</sup>. Une molécule est considérée comme un ensemble dynamique où chaque atome verra ses coordonnées évoluer en fonction de l'énergie cinétique qui lui est associée et des forces exercées par les atomes voisins. Le champ de forces utilisé pour déterminer l'énergie du système est identique à celui employé en mécanique moléculaire. Chaque atome **i** aura une masse **m<sub>i</sub>**, une position exprimée par **r<sub>i</sub>** et une accélération (**a**) à un temps **t**:

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \mathbf{a}_i = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i} \quad \text{où} \quad \mathbf{F}_i = -\frac{\partial V}{\partial \mathbf{r}_i}$$

la force **F<sub>i</sub>** sur un atome **i** sera calculée directement par la dérivée du potentiel **V** en fonction des coordonnées atomiques **r<sub>i</sub>**. Le choix de l'intervalle de temps  $\Delta t$  pour apprécier la dynamique de la molécule sera très important et devra être inférieur à certaines fréquences associées ou à certaines modifications structurales. Ces différents points seront décrit ultérieurement en détail.

**3. Le champ de forces** Le champ de forces est l'expression de tous les paramètres nécessaires pour accéder à l'énergie potentielle d'une conformation donnée. Cette expression regroupe les différentes forces nécessaires pour la minimisation d'une structure et lors de simulations de dynamique moléculaire. Ce terme renferme:

- Les formes mathématiques des équations mettant en jeu les coordonnées atomiques ou internes (longueur de liaison, angles de valence, angles dièdres)
- Les formes mathématiques des équations mettant en jeu des atomes non liés (termes de van der Waals, et électrostatiques)
- Les atomes accompagnés de leur masse et de leur charge (variant suivant la nature des atomes voisins). Les charges sont alors définies par de petits groupes d'atomes proches les uns des autres et qui ont une charge nette de zéro. Un groupement carbonyle aura donc une charge +1 sur le carbone et -1 sur l'oxygène. La délocalisation de la charge négative pour un carboxylate se fera en accordant une charge négative de -1,5 sur les deux oxygènes alors que le carbone gardera une charge positive de +1.
- Les différentes constantes mettent en jeu les différents types d'atomes, de liaisons et de torsions. L'hybridation des atomes sera pris en compte suivant qu'ils se trouvent avec la configuration sp, sp<sup>2</sup> ou sp<sup>3</sup> pour un carbone par exemple.

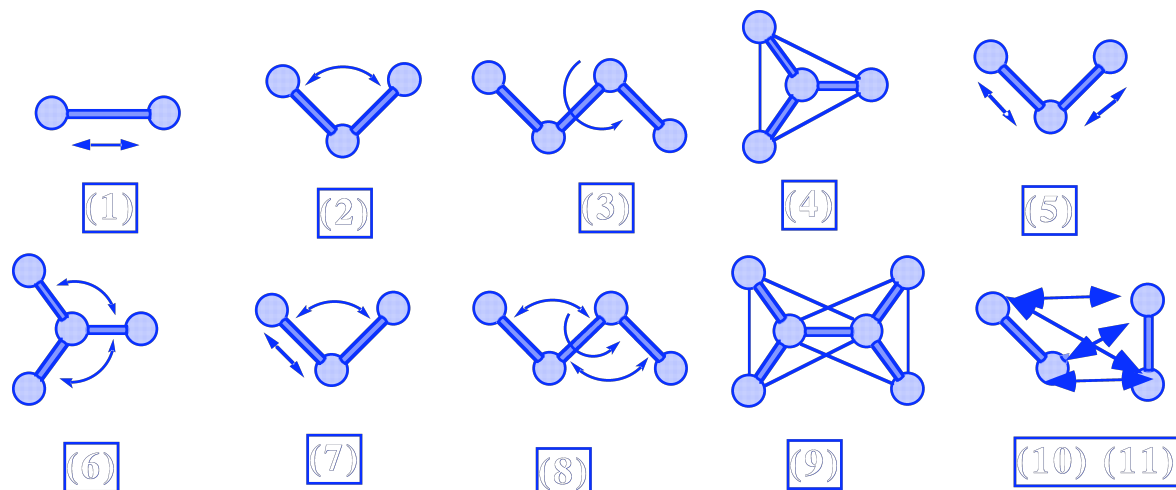
### 3.1. Expression de l'énergie

Le champ de forces qui a été utilisé pour notre étude est le champ de forces CVFF (consistent valence Forcefield)<sup>(5)</sup>.

$$\begin{aligned}
 \text{Epot} &= \sum_b D_b [1 - e^{-\alpha(b-b_0)^2}] + 1/2 \sum_{\theta} H_{\theta} (\theta - \theta_0)^2 + \\
 \text{ou } V(\mathbf{r}) &= 1/2 \sum_{\phi} H_{\phi} [1 + \cos(n\phi - \tau)] + 1/2 \sum_{\chi} H_{\chi} \chi^2 + \\
 & \left[ \sum_b \sum_{b'} F_{bb'} (b-b_0)(b'-b_0') + \sum_{\theta} \sum_{\theta'} F_{\theta\theta'} (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta_0') + \right. \\
 \text{termes} & \left. \sum_b \sum_{\theta} F_{b\theta} (b-b_0)(\theta - \theta_0) + \sum_{\theta} \sum_{\theta'} F_{\theta\theta'\phi} \cos \phi (\theta - \theta_0)(\theta' - \theta_0') + \right. \\
 \text{croisés} & \left. 1/2 \sum_{\chi} \sum_{\chi'} F_{\chi\chi'} \chi\chi' + \right. \\
 & \left. \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2(r^*/r)^6] + \sum \frac{q_i q_j}{\varepsilon r_{ij}} \right]
 \end{aligned}$$

Une illustration de ces termes d'énergie est donnée dans la figure suivante:





**Figure 1:** Représentation des différents termes

### 3.1.1. Les termes communs du champ de forces

Les quatre premiers termes (1 à 4) sont relatifs à l'expression de l'énergie de liaison: le terme 1 correspond à l'énergie de vibration autour d'une longueur de liaison à l'équilibre  $b_0$ . Cette expression utilise une fonction de Morse pour l'expression de son potentiel. Dans certains champs de forces, c'est une fonction harmonique qui est utilisée lorsque les déformations sont faibles, ce qui n'est pas le cas à haute température. L'expression du terme 1 en fonction d'une fonction harmonique est:  $\sum 1/2 K_b(b-b_0)^2$

Le terme 2 correspond à l'énergie de déformation des angles de valence ( $\theta$ ). Le terme 3 est l'énergie de rotation autour d'un angle dièdre ( $\phi$ ) alors que le terme 4 correspond à l'énergie de déformation [distorsion ( $\chi$ )] en dehors du plan pour les atomes de type  $sp^2$ . Dans les différents champs de force existant tels que AMBER<sup>(9)</sup>, CHARM<sup>(10)</sup>, SYBYL<sup>(11)</sup>, les termes 1 à 4 et 10, 11 sont des termes communs.

Les expressions 10 et 11 représentant les interactions de Van der Waals et électrostatiques respectivement, seront décrites plus loin.

Les expressions 5 à 9 représentent les termes croisés qui sont nécessaires pour reproduire certains paramètres expérimentaux tels que les fréquences de vibration (IR) qui jouent un rôle très important dans les propriétés dynamiques des molécules. Ces termes croisés sont des termes de raffinement spécifiques au champ de forces CVFF utilisé.

Le terme 5 décrit l'énergie d'élongation de deux liaisons adjacentes. Le terme 6, l'énergie de déformation de deux angles de valence pour un même atome. L'expression 7 est l'énergie de déformation d'un angle couplé à l'élongation d'une des liaisons alors que le terme 8 représente l'énergie de déformation de deux angles de valence adjacents, couplés à la rotation de l'angle dièdre. Enfin, le dernier terme croisé 9 est l'énergie de sortie hors du plan de deux atomes  $sp^2$  adjacents.

### 3.1.2. Déformation des angles dièdres

L'énergie de torsion est décrite par la fonction suivante:

$$E_{\phi} = 1/2 \sum_{\phi} H_{\phi} [1 + \cos(n\phi - \tau)]$$

C'est une fonction périodique de l'angle  $\phi$  où la constante  $H_{\phi}$  représente la hauteur de la barrière d'énergie,  $n$  la périodicité ( $n=3$  par exemple pour une liaison entre deux atomes  $sp^3$  pour les trois configurations décalées) et  $\tau$  la phase qui permet de déplacer le minimum de la fonction. Cette fonction sera prise en compte lors de l'application de contrainte de force sur un angle dièdre,  $H_{\phi}$  sera la force de contrainte et  $\tau$  deviendra l'angle de phase  $\phi_0$ .

### 3.1.3. Interaction entre atomes non liés

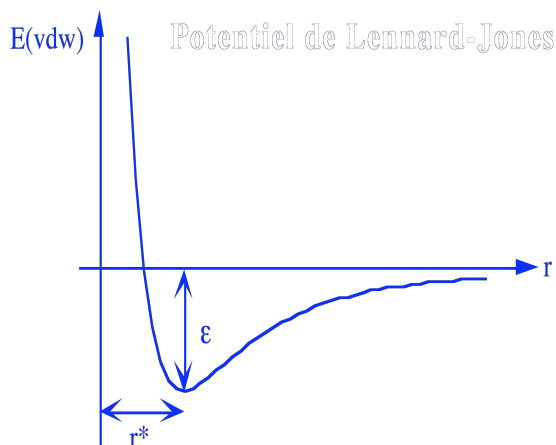
Deux forces (van der Waals et électrostatique) sont utilisées pour les interactions entre atomes non liés:

L'énergie de van der Waals (terme **10**), l'énergie électrostatique (terme **11**) et l'énergie des liaisons hydrogène. Cette dernière est prise en compte par les effets combinés des termes **10** et **11** dans le champ de forces CVFF<sup>(12,13)</sup>. En effet, le rayon de van der Waals de l'hydrogène d'un groupement donneur et de l'atome accepteur sont multipliés par un facteur  $<1$ , la distance entre atomes étant inférieure à la somme des rayons de van der Waals pour des atomes engagés dans une liaison hydrogène. Dans certain champ de forces (AMBER), un terme énergétique apparaît, correspondant à un potentiel de Lennard-Jones où le terme attractif en  $1/r^6$  est remplacé par un terme en  $1/r^{10}$  (3,6,14).

$$E_{vdw} = \sum \varepsilon [(r^*/r)^{12} - 2(r^*/r)^6]$$

#### 3.1.3. a-Interaction de van der Waals

Le terme répulsif (en  $1/r^{12}$ ) dominant à courte distance empêche deux atomes de se heurter par répulsion électronique, tandis qu'à longue distance, les forces attractives (en  $1/r^6$ ) de London<sup>(15)</sup> l'emportent.  $\varepsilon$  représente la profondeur du puit de potentiel à la distance d'équilibre  $r^*$ . L'énergie de van der Waals est donnée par la représentation de Lennard-Jones.



**Figure 2:** Représentation de l'énergie de van der Waals en fonction de  $r$

### 3.1.3. b. Energie électrostatique

Le potentiel utilisé est de type Coulombien et rend compte des interactions entre charges<sup>(16)</sup>.

$$E_{\text{elect}} = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

$q_i$ ,  $q_j$  sont les charges partielles atomiques,  $\epsilon$  est la constante diélectrique qui sert à rendre compte des effets d'écran et  $r_{ij}$  les distances interatomiques. Les calculs réalisés par les champs de force empiriques simulent la distribution de charge par des charges ponctuelles sur chaque atome. En considérant, l'ordre de grandeur de ces différents types d'interaction telles que charge-dipôle et dipôle-dipôle, les calculs se limitent aux interactions entre charges qui sont prédominantes. Les groupements polaires, souvent des groupes chimiques fonctionnels (carbonyle), sont alors considérés dans leur ensemble, comme une charge moyenne assignée au barycentre des atomes constituant le groupe polaire. Il existe une multitude de méthodes pour calculer la distribution des charges électroniques, celles-ci font appel à des champs de force semi-empiriques (MNDO, AM1, PM3), ab-initio (GAUSSIAN), ou par calculs d'orbitales moléculaires (Del Re<sup>(17)</sup>, Gasteiger<sup>(18)</sup>), qui prennent plus ou moins en compte les interactions électrons-noyau et électrons-électrons.

### 3.2. La constante diélectrique

Dans les systèmes biologiques, le solvant joue un rôle important sur les conformations du soluté par ses interactions électrostatiques et ses liaisons hydrogène. Le système modélisé prend en compte cet effet d'écran par l'utilisation d'une constante diélectrique  $\epsilon$ . Le choix de la constante diélectrique est souvent matière à discussion. Des valeurs de  $\epsilon = 1$ <sup>(19)</sup> jusqu'à  $\epsilon = 78$ <sup>(20)</sup> sont utilisées. L'utilisation d'une constante diélectrique de 1<sup>(8)</sup>, néglige complètement les interactions diélectriques entre groupements chargés et la molécule évolue

alors dans le vide. Certains auteurs utilisent  $\epsilon$  proportionnel à une distance  $r_{ij}$  <sup>(3,10,21)</sup> (soit  $\epsilon = r_{ij}$  soit  $\epsilon = 4r_{ij}$ , pour de grosses molécules, protéines ou acides nucléiques) et parfois même, le terme coulombien est complètement ignoré<sup>(22)</sup>. Le tableau suivant donne, à titre indicatif, les constantes diélectriques ainsi que le caractère protique ou aprotique pour certains solvants. Un solvant sera d'autant plus polaire que sa constante diélectrique et son caractère à séparer les charges (solvatation) seront forts.

Solvants aprotiques				Solvants protiques		
Solvant polaire	non-	$\epsilon$	Solvant polaire	$\epsilon$	Solvant polaire	$\epsilon$
Hexane		1.9	Pyridine	12	Acide Acétique	6.1
tétrachlorure de Carbone	de	2.2	Acétone	21	Acide	
Dioxane		2.2	Héxaméthyle Phosphoramide	30	Trifluoroacétique	8.6
Benzène		2.3	Nitrométhane	36	Alcool-tert-	12.5
Diéthyle Ether		4.3	Diméthyleformamide	37	Butylique Ethanol	24.5
Tétrahydrofurane		7.6	Acétonitrile	38	Méthanol	32.7
			Diméthyl sulfoxyde	47	Eau	78
			Chloroforme	4.8		

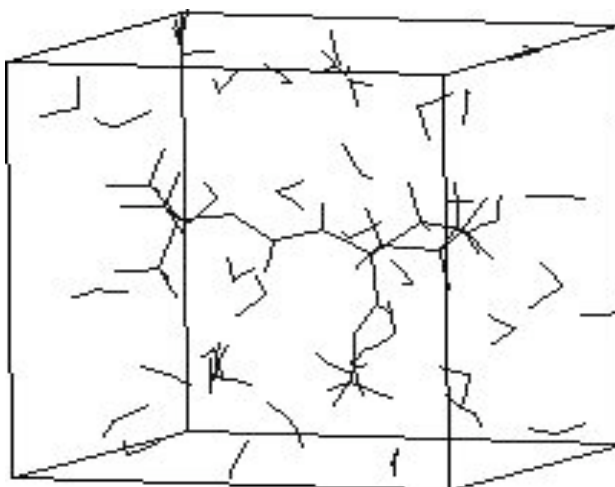
### 3.2.1. Simulation avec la constante diélectrique

Le temps de calcul augmentant avec le carré du nombre d'atomes, il est alors souvent préférable d'effectuer les calculs sans une modélisation explicite du solvant. La valeur donnée à la constante diélectrique aura une importance considérable pour la modélisation de molécules fortement chargées (acides aminés). Une constante diélectrique de 5 a été obtenue par comparaison aux résultats de RMN avec des molécules cyclohexaniques chargées pour le champ de forces CVFF <sup>(23)</sup>. Pour les analogues cyclopentaniques *cis* et *trans* C5, nous avons donc utilisé cette constante dans les calculs de mécanique et de dynamique moléculaire. Pour les molécules BOC-X-OMe [où X représente l'analogue cyclique (C5 ou C6) et linéaire (2M, 3E, 3T, 4E, 4T) de l'acide glutamique], nous avons testé différentes constantes diélectriques  $\epsilon=5$ ,  $\epsilon=4r$ ,  $\epsilon=78$ ,  $\epsilon=32.7$  en mécanique moléculaire. Les constantes de  $\epsilon=5$  ou de  $\epsilon=78$ , ont permis d'obtenir des résultats se rapprochant de la RMN. Par contre, dans le cas des analogues cyclopentaniques, les faibles barrières énergétiques entre les conformations de type enveloppe ou "twist", nous ont incité à réaliser des dynamiques en présence de solvant dans des boîtes d'eau.

### 3.2.2. Simulation en présence de solvant

Depuis quelques années, l'arrivée d'ordinateurs puissants a permis de modéliser le soluté et le solvant. Ces expériences restent relativement longues, coûteuses en temps et en espace disque par comparaison aux simulations utilisant que la constante diélectrique. Les atomes du système sont introduits dans une boîte où le soluté est entouré des diverses couches de solvant

suivant la dimension de la boîte utilisée. On utilise les conditions de bornes périodiques (Periodic Boundary Condition) où l'image de la boîte centrale est répétée dans les trois dimensions de l'espace. Seule, la boîte centrale est prise en compte dans la simulation. Lorsqu'un atome de solvant quitte la boîte, un autre atome (son image) apparaît à la même vitesse et suit la même trajectoire mais du côté opposé. La densité volumique du solvant est ainsi maintenue constante. Une constante diélectrique égale à 1 est alors utilisée. Afin de minimiser certaines forces ou interactions à longues distances présentes entre les atomes du soluté ou du solvant après la construction, il est recommandé de minimiser correctement l'ensemble soluté-solvant avant de commencer toute dynamique moléculaire.



**Figure 3:** Représentation d'une boîte d'eau avec son soluté

### 3.3. L'importance de l'énergie et de la température

#### 3.3.1. L'énergie en mécanique moléculaire

En mécanique moléculaire, le poids relatif des différentes conformations dans l'ensemble des conformations représentant la molécule à une température  $T$  est donné par l'équation de Boltzmann.

$$e^{-V(r) / kT} \quad \text{ou } k \text{ est la constante de Boltzmann}$$

Le calcul des populations des différentes conformations peut être réalisé, en se plaçant dans un système canonique, c'est à dire que le système (1 mole de produit) est en contact avec un thermostat à 300 K et le nombre de molécules  $N$  est fixé, ici  $N$  est le nombre d'Avogadro puisque l'on considère une mole de soluté. La probabilité d'avoir une conformation donnée d'énergie  $E_i$  (exprimée en joule) par molécule est représentée par l'expression :

$P = e^{(-E_i/kT)} * 1/Z$  où Z est la fonction de partition du système:  $Z = \sum e^{(-E_i/kT)}$

L'énergie dont on dispose est exprimée en Kcal/mol, l'expression de P pour obtenir l'énergie en joule peut être transformée de la façon suivante :

$$P = e^{(-V(r_i) * 4.18 * 10^3 / NkT)} * 1/Z$$

$R = Nk$        $V(r_i)$  en Kcal/mol      et       $R = 8.32 \text{ J.K}^{-1}.\text{Mol}^{-1}$

Les populations des différentes conformations à partir de la statistique de **Maxwell-Boltzmann** ont pu être calculées. Le rapport des populations  $P_{(i+1)}/P_{(i)}$  étant égal à:

$$P_{(i+1)}/P_{(i)} = e^{-(E_{(i+1)} - E_i) / kT} \quad \text{avec} \quad \sum P_i = 1.$$

Les conformations de plus basses énergies auront donc les poids les plus importants dans le mélange conformationnel.

### 3.3.1. La température en dynamique moléculaire

Dans le cadre de la dynamique moléculaire, l'énergie thermique d'une particule peut être assimilée à son énergie cinétique:  $1/2 kT = 1/2 mv^2$ , ce qui nous permet d'exprimer la température en fonction des vitesses:  $T = mv^2/k$ .

En augmentant la température, une large partie de l'espace conformationnel peut être exploré. Comme il a été montré par DiNola et ses collaborateurs des dynamiques à 500K, 600K ou 1200K peuvent être réalisées<sup>(24,25)</sup>. Ces expériences permettent d'accéder aux différentes conformations possibles pour une molécule mais cette technique à température élevée semble favoriser la sélection des conformations de forte entropie<sup>(8,26)</sup>. De plus, si les molécules explorent plus d'états conformationnels à haute température, le temps passé dans des conformations de plus basses énergies est plus faible. Une statistique sur les différentes conformations générées par ces expériences est alors peu correcte. Le choix du temps d'échantillonnage (toutes les 0,5 ou 1ps) et de la température, dépendra du système étudié<sup>(25)</sup>.

## 4. La mécanique moléculaire

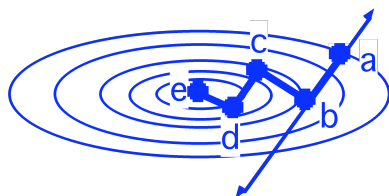
Un calcul de mécanique moléculaire vise à minimiser la valeur des forces qui agissent sur les atomes du système. Une structure sera donc optimisée lorsqu'elle se trouvera dans un minimum local d'énergie potentielle qui correspond alors à une valeur nulle de la dérivée de l'énergie potentielle.

#### 4.1. Les algorithmes de minimisation

Deux algorithmes de minimisations "Steepest Descent" et "Conjugate Gradients" ont été utilisés dans cette étude.

##### 4.1.1. L'algorithme "Steepest Descent"

La dérivée de la fonction d'énergie est calculée au point où l'on se trouve et donne la direction de déplacement sur la surface. Les nouvelles coordonnées atomiques correspondent au point d'énergie minimum selon cette direction. Lors de l'itération suivante, l'ancienne direction est remplacée par le gradient en ce nouveau point, imposant une direction perpendiculaire à la précédente.

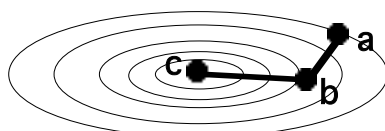


Algorithme de plus grande pente

Cet algorithme est efficace dans les cas d'un fort gradient d'énergie potentielle, mais peu apte à obtenir une bonne convergence lorsque ce gradient devient faible. Typiquement, il est utilisé pendant quelques dizaines d'itérations pour "relaxer" des structures de départ peu raffinées.

##### 4.1.2. L'algorithme "Conjugate Gradients"

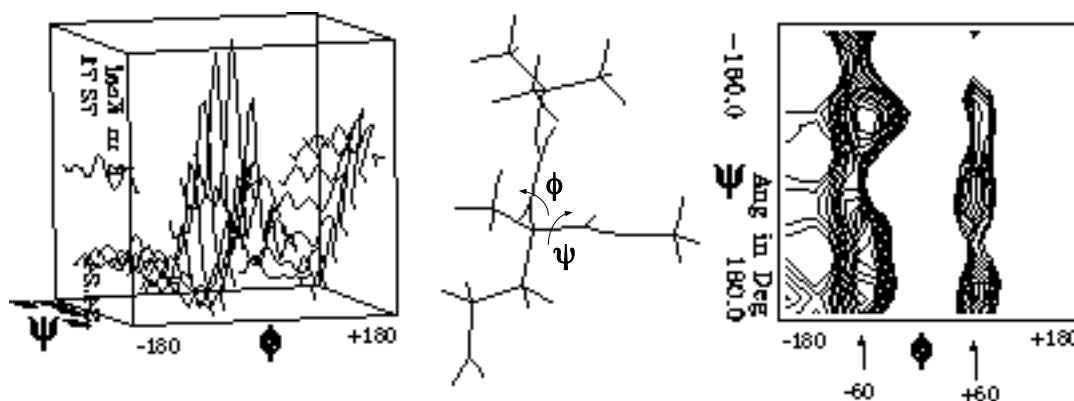
Cet algorithme fonctionne sur le même principe que la méthode de plus grande pente mais avec l'avantage de ne pas imposer l'orthogonalité d'une direction à la suivante. Les directions sont ici conjuguées en définissant la nouvelle direction comme une combinaison du gradient au point présent et de la direction précédente. Les gradients conjugués offrent une convergence plus rapide en un nombre d'itérations plus faible<sup>(27)</sup>.



Algorithme des Gradients Conjugués

## 5. La recherche systématique

Cette technique basée sur de la mécanique classique permet d'explorer l'espace conformationnel d'une molécule si son degré de liberté n'est pas trop important<sup>(28,29)</sup>. Pour deux angles  $\phi$  et  $\psi$  de la liaison peptidique ou pour les deux angles  $\chi_1$  et  $\chi_2$  de la chaîne latérale des analogues de l'acide glutamique, une recherche systématique a été réalisée. Elle consiste à faire tourner le premier angle de  $360^\circ$  par pas de  $5$  à  $10^\circ$  puis le second. A chaque fois que le premier angle fait  $360^\circ$ , le second augmente son angle de  $5$  à  $10^\circ$  jusqu'à rotation complète de  $360^\circ$ . A chaque pas, les conformations ainsi générées sont minimisées et stockées. Une carte 3D est ensuite obtenue en portant les deux angles sur les axes x et y alors que l'énergie se trouve sur l'axe z. Une autre représentation peut être utilisée, c'est la carte 2D d'isocontours où l'axe x et y représentent les deux angles. Dans cette représentation, les contours assimilés à des courbes de niveaux espacés de  $0,5 \text{ Kcalmol}^{-1}$  permettent d'observer la ou les conformations de plus basse énergie pour les deux angles pris en compte.



**Figure 4:** Recherche systématique pour  $\phi$ ,  $\psi$  et courbe isopotential pour la conformation Aa du Boc2Me:

Dans l'étude des composés linéaires (2M, 3E, 3T, 4E, 4T), la recherche de la constante diélectrique et des conformations probables ont été le premier objectif. Mais la recherche conformationnelle passe inévitablement par la prise en compte des quatre angles ( $\phi, \psi, \chi_1$  et  $\chi_2$ ) pour chaque analogue. Une recherche systématique a été réalisée sur ces quatre angles pris deux à deux de façon à connaître l'orientation de la chaîne peptidique des groupements Boc et ester pour chaque conformation décalée de chaque analogue. Cette recherche systématique a été réalisée avec différentes constantes diélectrique  $\epsilon=5$ ,  $\epsilon=78$  et  $\epsilon=37,2$ . Cette première étape a permis de sélectionner la constante diélectrique et les conformations les plus favorables en comparaison aux rotamères obtenus en RMN. Ces conformations sélectionnées ont été ensuite prises comme conformations de départ pour les expériences de dynamique moléculaire, méthode moins lourde que la recherche systématique.



## 6. La dynamique moléculaire

Le but des études de dynamique moléculaire est d'examiner le comportement structural et dynamique d'un système moléculaire dans le temps et de le relier à des fonctions d'énergie correspondantes. Pour cela, les mouvements aléatoires des molécules sont reproduits par des simulations de trajectoire de dynamique qui consistent à laisser un système moléculaire évoluer dans un espace conformationnel et à calculer la fonction d'énergie pour chaque position des particules. A chaque étape de la trajectoire, la molécule est représentée par un jeu de coordonnées atomiques et de vitesses qui définissent des équations de mouvements classiques. La résolution par intégration numérique des équations de Newton en fonction du temps est la base de la dynamique moléculaire

### 6.1. Les algorithmes de dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire résout l'équation de Newton pour chaque atome  $i$  du système:

$$\mathbf{F}_i = m_i \mathbf{a}_i$$

avec  $\mathbf{F}_i$ , la force exercée sur  $i$ ;  $m_i$ , la masse et  $\mathbf{a}_i$  l'accélération de l'atome  $i$

La force peut être directement calculée par la dérivée du potentiel en fonction des coordonnées atomiques  $r_i$ :

$$-\frac{\partial V}{\partial r_i} = m_i \frac{\partial^2 r_i}{\partial t_i^2} \quad (1)$$

Cette équation différentielle peut être résolue pour une ou deux particules mais pas pour des systèmes plus complexes.

La dynamique moléculaire utilise alors une méthode numérique pour résoudre l'équation du mouvement à l'aide d'un développement en série de Taylor dans lequel sont exprimées les positions atomiques entre un temps  $t$  et  $t+\Delta t$ :

$$\mathbf{r}(t+\Delta t) = \mathbf{r}(t) + \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} \Delta t + \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial t^2} \frac{\Delta t^2}{2} + \dots \quad (2)$$

Pour la première itération, les vitesses atomiques initiales sont attribuées aléatoirement à partir d'une distribution de Maxwell-Boltzmann à la température choisie et l'accélération est calculée par la résolution de l'équation (1). Les itérations suivantes utilisent la résolution de l'équation (2) (les termes de plus grand ordre sont alors minorés) qui fournit les nouvelles coordonnées. La vitesse est recalculée en divisant la différence des positions atomiques par le

temps  $\Delta t$  et l'accélération est obtenue par calcul du gradient avec les nouvelles coordonnées.  $\Delta t$  est le facteur limitant d'une dynamique, il doit être suffisamment petit afin que les forces ne varient pas trop durant cette période. Le choix d'une valeur aussi petite que celle de la femtoseconde peut se comprendre aisément. Pendant  $\Delta t$ , un atome ayant une vitesse  $v$  se déplace de  $\Delta r = v * \Delta t$ . Or, à 300K, la vitesse maximum d'un atome d'hydrogène est de quelques kms/ sec. De ce fait, après une femtoseconde, le déplacement d'un atome d'hydrogène peut être de 0.001Å qui est l'ordre de grandeur pour le déplacement d'un atome dans un cristal. En pratique, le choix de la valeur du pas temporel  $\Delta t$  dépend surtout de la valeur de la période du mouvement de l'oscillateur le plus rapide parmi ceux présents dans le système. Le  $\Delta t$  doit donc être inférieur aux mouvements les plus rapides de la molécule ( $10^{-14}$  s pour les plus rapides vibrations d'élongations des liaisons covalentes des C-H, N-H et O-H). Un pas d'intégration d'une femtoseconde ( $10^{-15}$  s) est alors le plus souvent utilisé. Le cycle de calcul est alors complet et le processus peut être répété mille ou un million de fois ce qui correspond à des échantillonnages toutes les picosecondes ( $10^{-12}$  s) ou les nanosecondes ( $10^{-9}$  s) respectivement. Dans ce contexte, les mouvements lents  $>$  à  $10^{-9}$ s sont difficiles à appréhender, du fait du temps important de calcul et du stockage sur l'ordinateur.

L'algorithme d'intégration utilisé par le programme DISCOVER résout l'équation de Verlet<sup>(30)</sup> de façon à obtenir, si on considère que durant  $\Delta t$  la vitesse et l'accélération varient linéairement, une expression de vitesse (Equation 3) et une équation en fonction des coordonnées (Equation 4)

$$v(t+\Delta t / 2) = v (t-\Delta t / 2) + a(t) \Delta t \quad (3)$$

$$r(t+\Delta t) = r(t) + v (t-\Delta t / 2) \Delta t \quad (4)$$

A chaque itération, les calculs de l'accélération, de la nouvelle vitesse et des coordonnées sont alors réalisés:

- 1) le calcul de l'accélération  $(- 1/m) dV/ dr$  au temps  $t$  avec l'équation (1).
- 2) la vitesse au temps  $(t + \Delta t / 2)$  à partir de  $(t - \Delta t / 2)$  grâce à l'équation (3).
- 3) les calculs de coordonnées au temps  $(t+ \Delta t)$  à partir des valeurs du temps  $t$  en utilisant l'équation (4).

### 6.3. Le contrôle de la dynamique moléculaire

Le contrôle de la dynamique moléculaire peut s'exercer sur deux points:

- sur le nombre d'atomes pris en compte dans la dynamique
- sur le temps d'échantillonnage

Ces deux facteurs agissent sur la durée de l'expérience et sur la capacité de stockage de l'ordinateur (espace disque).

### 6.3.1. Le contrôle du nombre d'atomes

Pour des systèmes moléculaires importants, afin de gagner du temps de calcul, il est souvent préférable de négliger les interactions à longue distance entre atomes non liés à partir d'une certaine distance. Pour cela, seules les interactions atomiques définies par un cercle ("cutoff") autour de chaque atome de la molécule ou de l'entité solvant-soluté lors de dynamique en présence de solvant sont alors calculées. Au-delà de cette valeur aucune interaction n'est prise en compte dans les calculs. A partir d'une distance de 10Å, les énergies de van der Waals qui s'expriment en  $1/r^6$  et  $1/r^{12}$  sont négligeables, en revanche les interactions électrostatiques en  $1/r$  persistent. Une coupure brutale des calculs à une certaine valeur  $r$  peut entraîner des erreurs d'estimation de la fonction d'énergie totale. Afin de limiter ce phénomène, les termes énergétiques sont progressivement annulés par une fonction additionnelle d'extinction (SR) ou "switch fonction".

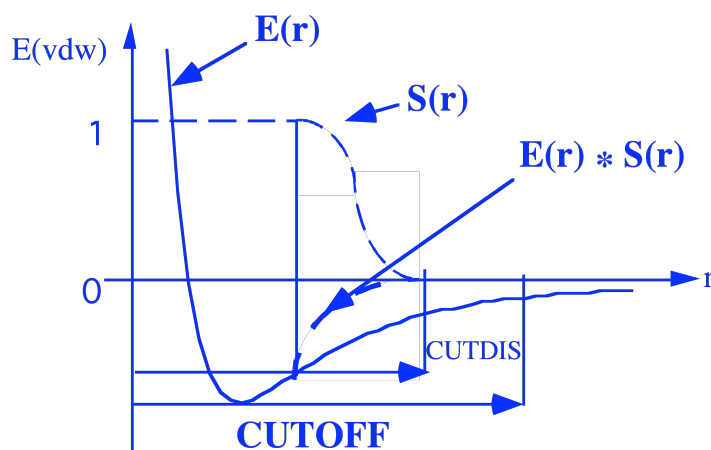


Figure 5: Application d'une fonction d'extinction

### 6.3.2. Le contrôle de l'échantillonnage

Pour obtenir une vision correcte du comportement dynamique naturel d'une molécule, les trajectoires doivent être suffisamment étendues, de l'ordre de plusieurs nanosecondes afin de recouper l'échelle de temps de la RMN. Or, la durée de simulation représenterait des temps de calculs extrêmement longs. En effet, une trajectoire de 10ns nécessite 10million de pas de simulation pour un  $\Delta t$  de 1 fs. Le temps réel de simulation dépend aussi de la puissance de l'ordinateur et du nombre d'atomes pris en compte. Il est alors préférable d'effectuer plusieurs simulations moins longues de l'ordre de 100ps (100 mille fois 1fs) sur différentes conformations possibles de la molécule étudiée (cas des analogues linéaires méthylés 2M, 3E,

3T, 4E, 4T). Dans cette étude sur les analogues méthylés de l'acide glutamique, les simulations dans les boîtes d'eau ont été réalisées sur une trajectoire de 48 ps en partant, à chaque fois, des neuf conformations décalées possibles pour les analogues méthylés. Ces expériences à saut de température ont permis d'observer à la fois le comportement de la chaîne peptidique et de la chaîne latérale. Au total, c'est un échantillonnage sur 432 ps pour chaque analogue qui a été réalisé (soit 432 structures générées). Pour les analogues cyclopentanes et linéaires méthylés, il fut nécessaire de réaliser un échantillonnage plus important afin d'obtenir une statistique convenable vis à vis de la RMN. Les dynamiques moléculaires ont nécessité des temps de calcul plus longs sur 100 et 200 ps dans des boîtes d'eau (analogues cyclopentaniques) ou avec une constante diélectrique (analogues méthylés) afin d'observer le comportement de la chaîne latérale. Ces expériences ont permis de recouper en partie l'échelle de temps de la RMN (la nanoseconde) ce qui correspond à un échantillonnage sur 900 ( $\approx 1$  ns) et 1800 ps ( $\approx 1.8$  ns) pour chaque analogue. Cet échantillonnage statistique a permis d'obtenir 900 ou 1800 conformations. L'échantillonnage a été considéré comme satisfaisant lorsque les résultats de dynamique moléculaire étaient en bon accord avec les résultats expérimentaux venant de la RMN. Le contrôle des résultats est alors réalisé par comparaison des constantes de couplage ( $^3J_{H-H}$ ,  $^3J_{C-H}$ ) expérimentales avec les constantes de couplage théoriques du mélange obtenu par la dynamique moléculaire (voir ci-après).

## 7. Les expériences de dynamique moléculaire

### 7.1. Les étapes de la dynamique moléculaire

#### - Minimisation de la structure de départ

Les coordonnées atomiques nécessaires à l'établissement des équations de mouvement sont issues d'une géométrie construite par mécanique moléculaire ou issues de données expérimentales (RX). Des contraintes peuvent subsister au niveau des constantes de force de la fonction d'énergie potentielle et provoquer des interactions lors de la simulation principalement en présence de solvant. La structure ou l'ensemble soluté-solvant est alors minimisé suivant les deux algorithmes "steepest descent" et "conjugate gradient".

#### - La montée en température et l'équilibration

Les dynamiques moléculaires sont réalisées à température constante ou à haute température. Pour se faire, une période de montée en température est nécessaire de façon à amener la température voisine de 0K à la température désirée 300K (ou 500K pour des simulations à température constante élevée). Ceci est réalisé par le programme DISCOVER, en augmentant progressivement de 10K, l'énergie cinétique de chaque atome [ $V = (2kT/m)^{1/2}$ ]. Après cette

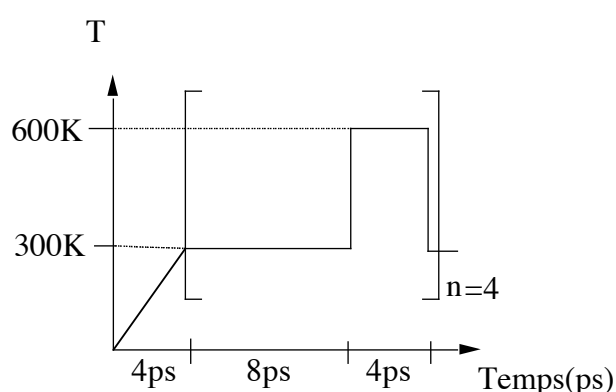
montée en température, la vitesse des atomes est surveillée par l'algorithme de Berendsen<sup>(31)</sup> dans lequel chaque vitesse est multipliée par un facteur  $\lambda$  donné par la relation:

$$\lambda = 1 + \frac{\Delta t}{2\tau} \left( \frac{T_0}{T} - 1 \right)$$

où  $\Delta t$  est le pas d'intégration,  $\tau$  caractérise la relaxation,  $T_0$  la température désirée et  $T$  la température effective. Le contrôle de l'énergie cinétique est réalisé en agissant sur le temps de relaxation de façon à ce que l'énergie cinétique et potentielle soient égales avant le départ de la dynamique. Le temps d'équilibration devra être supérieure ou égal à 4ps suivant la taille du système, de la température désirée. Des expériences avec un temps d'équilibration (8ps) plus long ont été réalisées. Les résultats montrent aucune d'influence du temps d'équilibration sur le pourcentage et les conformations des molécules générées à température constante.

## 7.2. Dynamique moléculaire à température variable

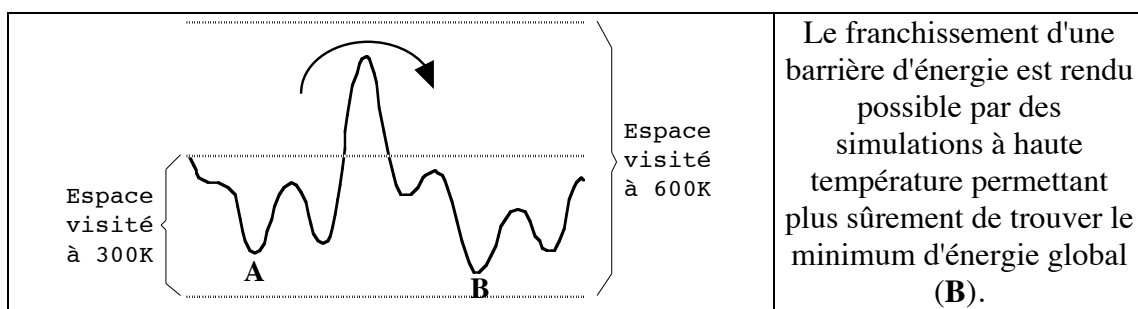
Ce protocole a été utilisé lors de l'étude des composés linéaires méthylés, il a pour but de visiter le plus grand espace conformationnel possible et ainsi de s'affranchir de la dépendance vis à vis de la structure de départ. Le pas d'intégration de la trajectoire a été choisi égal à 1 fs. La période de montée en température à 300K, suffisante pour atteindre un équilibre thermodynamique stable durant la simulation, est égale à 4 ps. La période suivant l'équilibration comporte des passages répétés de 300 à 600K. Les périodes à 300K s'étendent sur 8 ps et les périodes à 600K sur 4 ps. La durée totale de simulation est de 48 ps.



**Figure 6:** Schéma avec saut de température

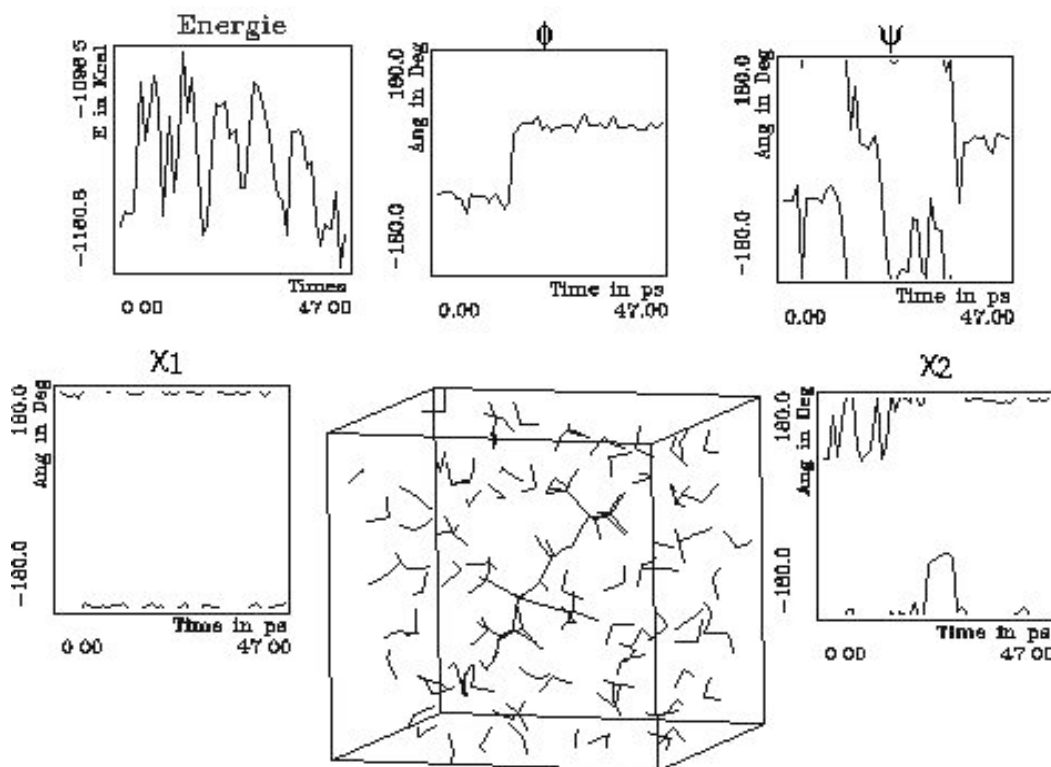
Une structure est "prélevée" toutes les picosecondes et soumise à une minimisation selon le protocole décrit plus avant. Cet échantillonnage toutes les 1 ps est supposé suffisamment long

pour un déplacement significatif des atomes et suffisamment court pour un échantillonnage correcte de l'espace conformationnel.



**Figure 7:** Espace conformationnel théorique pour deux conformations A et B

Ce protocole a été utilisé avec des boîtes d'eau pour les analogues méthylés de l'acide glutamique. Toutes les picosecondes une structure est alors refroidie à 300K et minimisée avec les deux algorithmes précédemment décrits de façon à ce que les conformations instables (éclipsées pour ces analogues) tombent dans des puits de plus basse énergie (conformations décalées). Ce protocole a permis de confirmer la recherche systématique dans l'orientation prédominantes de  $-80 \pm 20^\circ$  pour  $\varphi$  et  $\pm 60^\circ$  ou  $\pm 130$  pour l'angles dièdre  $\psi$  de la chaîne peptidique.



**Figure**

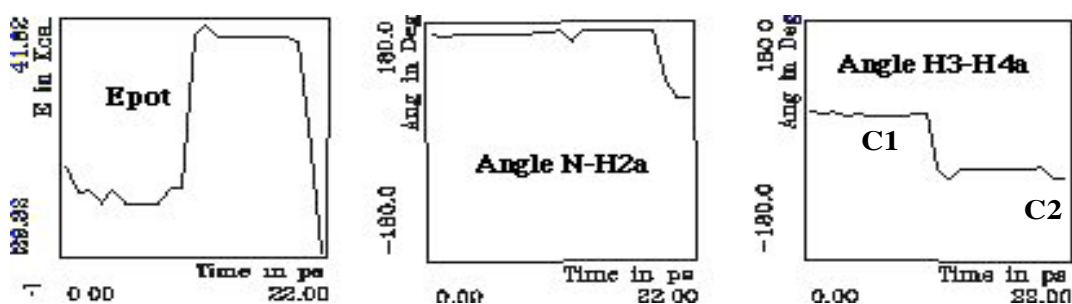
**8:** Orientation des angles  $\varphi$ ,  $\psi$ ,  $\chi_1$  et  $\chi_2$  durant une dynamique à saut de température.

Ces simulations ont confirmé les résultats pour les angles  $\phi$  et  $\psi$  et montrent une nette préférence de la chaîne du Boc ( $\phi$ ) pour un angle de  $-60^\circ$  à  $-130^\circ$  ( $g^-$  ou intermédiaire entre  $g^-$  et  $t$ ) pour les analogues 3E, 3T, 4E et 4T. L'analogue 2M a une chaîne plus figée pour toutes les conformations sauf pour la conformation Aa dans laquelle l'angle  $\phi$  peut passer de  $-60$  ( $g^-$ ) à  $+60$  ( $g^+$ ). L'angle  $\psi$  garde une relative mobilité qui correspond à une rotation importante du groupe ester. L'écart d'énergie entre deux conformations est faible lorsque, seulement, l'angle  $\psi$  bouge.

Les conformations décalées de la chaîne latérale (angles  $\chi_1$  et  $\chi_2$ ) pour les différents analogues méthylés ont été prises en compte dans la statistique des conformations générées (Figure 8). Il faut noter que si ces expériences à saut de température permettent de franchir des barrières énergétiques importantes ( $\approx 5$  à  $7$  Kcal mol $^{-1}$ ), le temps passé sur les conformations de plus basses énergies est plus faible. Un autre point important est que le temps nécessaire pour qu'une conformation passe à une autre, toutes deux de basse énergie, peut être beaucoup plus long (mouvement lent) pour être appréhendé par des simulations de dynamique moléculaire sur des trajectoires de 10 à 100ps<sup>(8)</sup>.

#### - Expérience à plus haute température

Une autre série d'expériences a été réalisée pour le passage d'une conformation chaise à une autre avec les analogues cyclohexanes (Boc-*cis* et *trans*-C6). L'interconversion a pu être observée grâce à des sauts de température 300-800 ou 1000K, ce qui correspond à des fortes barrières énergétiques d'environ 10 Kcalmol $^{-1}$  bien connues des analogues cyclohexaniques (conf. analyse conformationnelle). Au bout de 22 ps, la dynamique s'arrête du fait d'une trop grande barrière énergétique à passer pour la dernière conformation générée qui subit alors des distortions trop importantes pour que les minimiseurs puissent accepter la conformation suivante.



**Figure 9:** Passage visualisé d'une forme chaise (C1) à l'autre de plus basse énergie (C2) sur deux angles de la molécule Boc-*trans*-C6 (se reporter à la publication 2 pour les conformations C1 et C2).

Ces expériences ont permis de visualiser des conformations croisées de hautes energies pour le Boc-*cis*-C6-OMe (a) et le Boc-*trans*-C6-OMe (b) (Figure 10 ci-dessous).

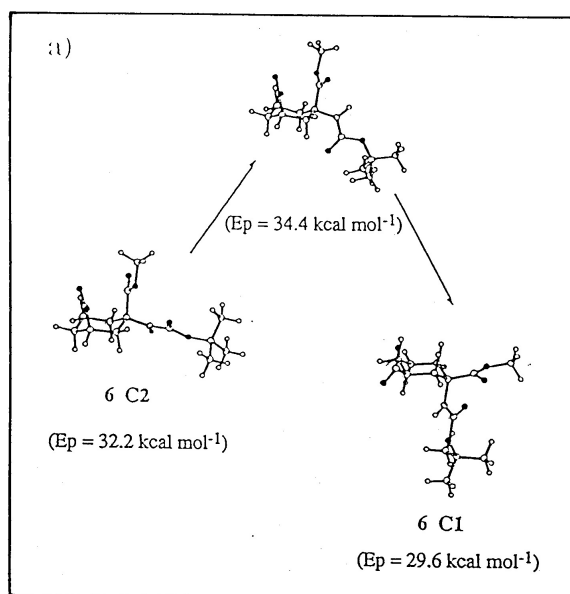
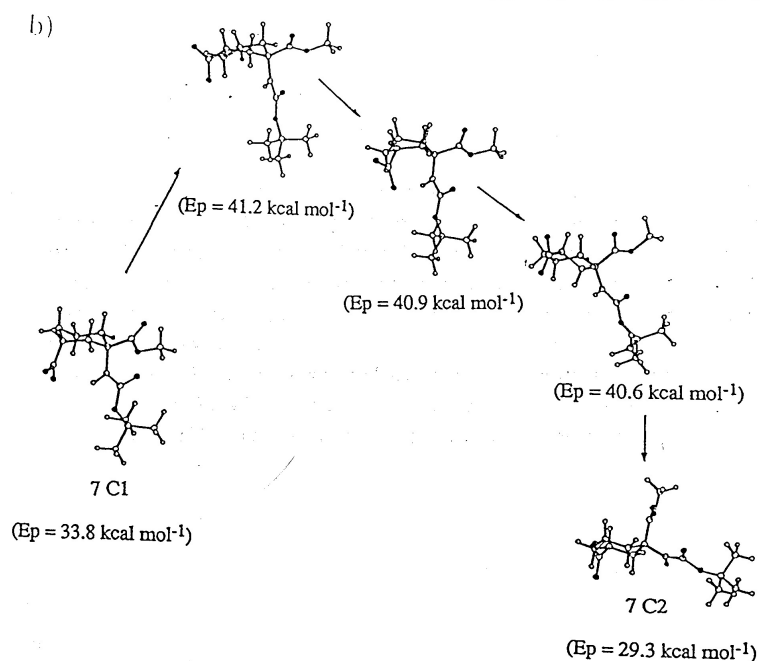


Figure 10

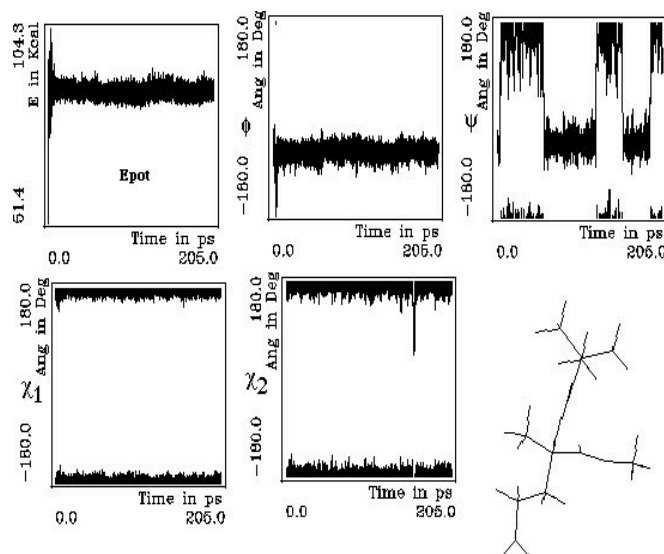


### 7.3. Dynamique moléculaire à température constante

Des dynamiques moléculaires à température constante de 300K ont été effectuées avec les mêmes paramètres de calculs que pour les simulations à saut de température mais sur des périodes plus longues de 100 à 200ps, soit dans des boites d'eau, soit en utilisant les meilleures constantes diélectriques trouvées en mécanique pour chaque analogue. Ce protocole a été



utilisé pour les analogues cyclopentaniques (BocC5 *cis* et *trans*) qui ne possèdent pas de barrières trop élevées entre les principales conformations du cercle de pseudorotation. Pour les composés linéaires de l'acide glutamique, les dynamiques moléculaires sur le 2M, 3E, 3T, 4E et 4T ont été réalisées avec la meilleure constante diélectrique trouvée en mécanique (Figure 11).



**Figure 11:** Evolution des angles  $\phi$  et  $\psi$  ainsi que  $\chi_1$  et  $\chi_2$  toutes les 10fs pour le Boc2Me.

Ces expériences ont été menées pour les neuf conformations possibles pour chaque analogue sur un temps relativement long (200ps). Cet échantillonnage de l'ordre de la nanoseconde a permis de tester la stabilité de chaque conformation et d'accéder à des résultats statistiques.

## 8. Validité des résultats de modélisation

### 8.1. Les analogues cyclopentaniques

Dans le cas des analogues cyclopentaniques, les conformations obtenues par la modélisation sont contrôlées grâce aux constantes de couplage  $^3J_{H-H}$  théorique et surtout  $^3J_{C-H}$  théorique obtenues avec les équations d'Altona<sup>(32)</sup> ou de Hricovini<sup>(33)</sup> sur les angles dièdres de modélisation. Ces constantes de couplages théoriques sont alors comparées aux constantes de couplages expérimentales de la RMN. Les structures minimisées acceptées sont classées suivant les angles dièdres H-C-C-H et H-C-C-C endocycles pour les conformations E ou T et un classement énergétique est réalisé pour les différentes conformations générées.

## 8.2. Les analogues cyclohexaniques

Pour les analogues cyclohexaniques, le classement par ordre énergétique a été réalisé pour les deux formes chaises ( $C_1$  et  $C_2$ ) des deux analogues. Les deux conformations possibles pour chaque isomère a permis grâce à l'équation de Maxwell-Boltzmann de retrouver les pourcentages de formes chaises obtenues en RMN. Les expériences de dynamique à haute température ont permis d'observer le passage de la chaise  $C_1$  vers la chaise  $C_2$  dans le cas du BOC-C6T alors que l'interconversion a été plus difficile pour le BOC-C6C qui restait dans une conformation chaise  $C_1$  très stable. De plus, l'équation suivante a permis de déterminer les constantes de couplage  $^3J_{H-H}$  théorique du mélange de modélisation.

$$^3J_{H-H} \text{ mélange théorique} = X\% * ^3J_{H-H} \text{ de } C_1 + Y\% * ^3J_{H-H} \text{ de } C_2$$

avec  $X$  et  $Y$  comme pourcentage obtenu en modélisation.

Ces constantes  $^3J_{H-H}$  mélange théorique ont alors été comparées aux constantes de couplage expérimentales venant de la solution de RMN.

## 8.3. Les analogues linéaires méthylés

L'utilisation de l'équation suivante permet de comparer les constantes de couplage expérimentales venant de la RMN aux constantes de couplages du "mélange théorique" venant de la dynamique ou de la mécanique moléculaire. Chaque angle dièdre des différentes conformations générées par la dynamique ou la mécanique moléculaire est déterminé. Les constantes de couplage  $^3J_{H-H}$  théorique ou  $^3J_{C-H}$  théorique associées sont calculées avec les équations de De-Marco<sup>(34)</sup> et de Hricovini. La constante de couplage du mélange théorique correspondant à un des angles dièdres pour un analogue (2M, 3E, 3T, 4E, 4T) est obtenue avec l'équation suivante.

$$^3J_{H-H} \text{ mélange théorique (DM ou MM)} = \sum ^3J_{H-H} (X_i \text{ Théorique}) * \% X_i \text{ (DM ou MM)}$$

ou

$$^3J_{C-H} \text{ mélange théorique (DM ou MM)} = \sum ^3J_{C-H} (X_i \text{ Théorique}) * \% X_i \text{ (DM ou MM)}$$

avec  $X_i = Aa, Ab, Ac, Ba, Bb, Bc, Ca, Cb$  et  $Cc$

Cette équation est reprise pour tous les angles dièdres de chaque analogue et sera utilisée aussi bien pour les  $^3J_{H-H}$  que pour les  $^3J_{C-H}$ . Les comparaisons des différentes constantes de couplages  $^3J_{H-H}$  et  $^3J_{C-H}$  en RMN avec celles trouvées grâce à cette équation vont nous

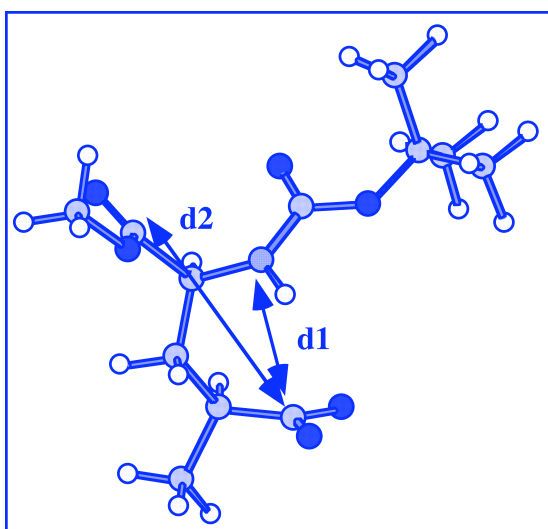
permettre de déterminer le **pourcentage réel des conformations en solution** pour chaque analogue.

L'ensemble des différentes conformations obtenues sont superposées et la représentation proposée présente alors le comportement de chaque analogue en solution en accord avec les résultats RMN. Chaque conformation sera ensuite classée en famille suivant les distances ( $d_1$  et  $d_2$ ) et les angles caractéristiques ( $\chi_1$ ,  $\chi_2$ ,  $\psi$  et  $\varphi$ ).

## 9. Analyse des structures

### 9.1. Classement par familles

Dans un premier temps, on mesure les angles  $\chi_1$  et  $\chi_2$  des conformations obtenues pour le BOC-*cis et trans*-C5 mais aussi BOC-*cis et trans*-C6. Un classement suivant les conformations Aa, Ab, Ac, Ba, ...est réalisé par comparaison avec les analogues linéaires méthylés. La position du carboxylate par rapport aux deux chaînes peptidiques est, ensuite, déduite grâce aux distances  $d_1$  et  $d_2$ . Ces distances correspondent à  $d(\gamma\text{COO}^-, \alpha\text{NH-BOC})$  pour  $d_1$  et à  $d(\gamma\text{COO}^-, \alpha\text{COOMe})$  pour  $d_2$  (Figure 12).



**Figure 12:** Représentation de deux distances  $d_1$  et  $d_2$

Ces deux valeurs permettent d'observer l'espace balayé par le carboxylate pour chaque conformation. Un classement par famille est réalisé suivant les valeurs de  $d_1$  et de  $d_2$  présentées dans le tableau suivant.

$\chi_1 > 0$	distance	$\chi_1 < 0$
Famille		Famille
I	$d_1 \lll d_2$	I
II	$d_1 < d_2$	II
III	$d_1 > d_2$	III
IV	$d_1 \ggg d_2$	IV

## 9.2. Les superpositions

Un programme d'ajustement par la méthode des moindres carrés entre deux molécules permet la superposition. C'est une superposition fixe qui donne la racine carrée moyenne (RMS ou "Root-mean-square") de la distance entre les atomes de deux molécules  $[(\Delta r)^2]^{1/2}$ , l'une étant prise comme référence. Cette superposition peut se faire sur la totalité des atomes de la molécule, dans ce cas, une valeur de RMS proche de zéro nous révèle une très bonne superposition des atomes de la molécule. Dans d'autres cas, l'utilisateur peut choisir le nombre d'atomes à superposer. Cette dernière méthode a été utilisée pour la superposition des différentes conformations des analogues de l'acide glutamique. Les conformations dont le pourcentage dans le mélange théorique est supérieur à 10% et qui sont conformes aux résultats de RMN, sont superposées. Nous avons considéré les trois atomes  $N\alpha$ ,  $C_1$  et  $C\alpha$  comme points communs à toutes les conformations. Ces trois atomes pour chaque conformation ont été superposés de façon à visualiser le reste de la molécule et principalement l'orientation du carboxylate et de la chaîne peptidique (groupe Boc et ester). Ces superpositions permettent de visualiser le mélange conformationnel obtenu en RMN.

## BIBLIOGRAPHIE – Partie Modélisation Moléculaire

- (1) Born, M. & Oppenheimer., J. R. (1927) *Ann. Physik.* **84**, 457.
- (2) Dewar, M. J. S. & Thiel, W. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 4899.
- (3) Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T. & Case, D. A. (1986) *J. Comp. Chem.* **7**, 230.
- (4) Singh, U. C.; Weiner, P.; Caldwell, J. C. & Kollman, P. A. (1986), *Amber 3.0*, San Francisco, University of California.
- (5) Dauber-Osguthorpe, P.; Roberts, V. A.; Osguthorpe, D. J.; Wolff, J.; Genest, M. & Hagler, A. T. (1988) *Proteins: Structure, Function and Genetics.* **4**, 31.
- (6) Weiner, S. J.; Weiner, P.; Kollman, P. A.; Case, D. A.; Singh, U. C.; Ghio, C.; Alagona, G.; Profeta, J. S. & Weiner, P. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765.
- (7) Burkert, U. & Allinger, N. L. (1982) *Am. Chem. Soc. Washington D. C.*
- (8) van Gunsteren, F. W. & Berendsen, H. J. C. (1990) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 992.
- (9) Weiner, P. & Kollman, P. A. (1981) *J. Comp. Chem.* **2(3)**, 287.
- (10) Brooks, B. R.; Brucoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983) *J. Comput. Chem.* **4**, 187.
- (11) Clarck, R.; Cramer, D. R. I. & Van Opdenbosch, N. (1989) *J. Comput. Chem.* **10**, 982.
- (12) Hagler, A. T.; Lifson, S. & Dauber, P. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 5122.
- (13) Hagler, A. T.; Dauber, P. & Lifson, S. (1979) *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 5131.
- (14) Weiner, P. K. & Kollman, P. A. (1981) *J. Comp.Chem.* **2**, 287.
- (15) London, F. (1937) *Trans. Faraday Soc.* **33**, 8.
- (16) Cox, S. R. & Williams, D. E. (1981) *J. Comput. Chem.* **2**, 304.
- (17) Del\_Re, G. (1958) *J. Chem. Soc.* 4031.
- (18) Gasteiger, J. & Marsili, M. (1980) *Tetrahedron.* **36**, 3219.
- (19) Jorgensen, W. J. & Tirado-Rives, J. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 1657.
- (20) Hodes, Z. I.; Nemethy, G. & Scheraga, H. A. (1979) *Biopolymers.* **18**, 1565.
- (21) McCammon, J. A.; Gelin, B. R. & Karplus, M. (1977) *Nature (London).* **267**, 585.
- (22) Levitt, M. (1983) *J. Mol. Biol.* **168**, 595.
- (23) Morelle, N.; Gharbi-Benarous, J.; Acher, F.; Valle, G.; Crisma, M.; Toniolo, C.; Azerad, R. & Girault, J. P. (1993) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 525.
- (24) DiNola, A.; Berendsen, H. J. C. & Edholm, O. (1984) *Macromol.* **17**, 2044.
- (25) Sun, Y. & Kollman, P. A. (1992) *J. Comp. Chem.* **13**, 33.
- (26) van Gunsteren, W. F. (1990) *Methods for calculation of free energies and binding constants: Successes and problems*, ed, 27.

- (27) Fletcher, R. & Reeves, C. M. (1964) *Comput. J.* **7**, 149.
- (28) Lipton, M. & Still, W. C. (1988) *J. Comput. Chem.* **9**, 343.
- (29) Wiberg, K. B. & Boyd, R. H. (1972) *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 8426.
- (30) Verlet, L. (1967) *Phys. Rev.* **159**, 98.
- (31) Berendsen, H. C. J.; Postma, J. P. M.; van Gunsteren, W. F.; DiNola, A. & Haak, J. R. (1984) *J. Chem. Phys.* **81**, 3684.
- (32) Altona, C. & Sundaralingam, M. (1973) *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2333.
- (33) Tvaroska, I.; Hricovini, M. & Petrakova, E. (1989) *Carbohydrate Research.* **189**, 359.
- (34) DeMarco., A.; Linas., M. & Wuthrich., K. (1978) *Biopolymers.* **17**, 617.

## **Chapitre IV – Trois Publications**

(1) - Conformational Analysis by NMR Spectroscopy, Molecular Dynamics Simulation in Water and X-Ray Crystallography of Glutamic Acid Analogues: Isomers of 1-Amino -1,3 Cyclopentane Dicarboxylic Acid (ACPD).

**V. Larue**, J. Gharbi Benarous, F. Acher, G. Valle, M. Crisma, C. Toniolo, R. Azerad, J.P. Girault. **Journal of Chemical Society**, *Perkin Trans 2*, 1995, 1111-1126.

(2) - ACPD ligands for glutamic receptors: Conformational Analysis by NMR Spectroscopy and Molecular Dynamics Simulation in Water of Glutamic Acid Analogues containing a cyclopentane ring.

**V. Larue**, J. Gharbi-Benarous, N. Todeschi, F. Acher, R. Azerad, J.-P. Girault. **Journal de Chimie Physique**, 1995, 92, 1809-1812.

(3) - Conformational Study in water by NMR and Molecular Modelling of Cyclic Glutamic Acid Analogues as probes of Vitamin K Dependent Carboxylase.

**V. Larue**, J. Gharbi-Benarous, F. Acher, R. Azerad, J.-P. Girault. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, 1996, 36 (4), 717-725.

(4) - Vitamin K Dependent Carboxylase - *In Vitro* Inhibitory Activity of Cyclopentane and Cyclohexane-derived Analogues of Glutamic Acid and their Conformational Study by NMR and Molecular Dynamics in Aqueous Solution.

**V. Larue**, J. Gharbi-Benarous, F. Acher, R. Azerad, J.-P. Girault. **Journal of Peptide Research**, 1997, 49 (1) 28-45.



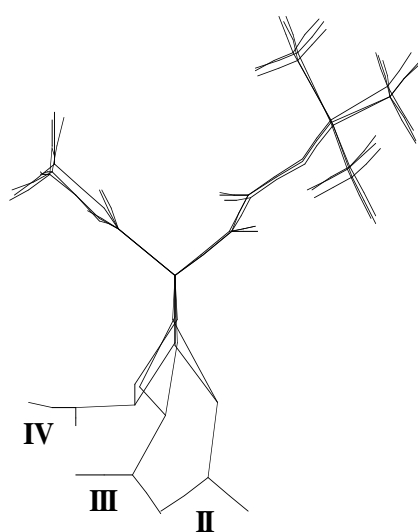
## **Chapitre V – Conclusion**

## Conclusion

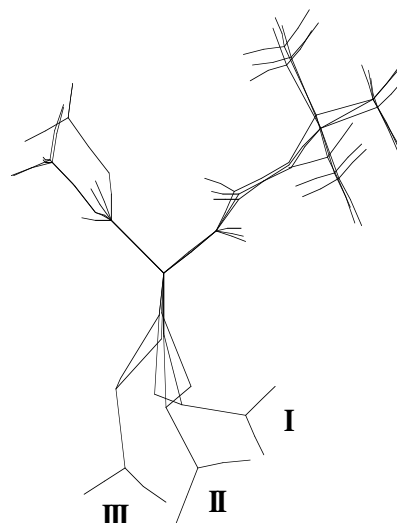
L'utilisation des analogues de l'acide glutamique (substrats ou inhibiteurs compétitifs) avait pour but, de limiter le nombre de conformations de l'acide glutamique et de favoriser certaines d'entre elles par des effets stériques ou des interactions électrostatiques (analogues cyclopentaniques, cyclohexaniques et linéaires méthylés). Cette étude a établie la nature des conformations en solution pour ces analogues de l'acide glutamique grâce à des méthodes de RMN et de modélisation moléculaire.

Les constantes de couplage  $^3J^{1H-1H}$  et  $^3J^{13C-1H}$  déterminées par RMN ont permis d'accéder aux pourcentages des conformères en solution. Les données expérimentales de RMN confrontées aux résultats théoriques de modélisation moléculaire ont établi l'état du mélange conformationnel en solution. Les conformations en solution ont été corrélées à l'activité biologique de ces dérivés. Le tri des conformations, suivant quatre familles, a permis d'identifier la zone de l'espace explorée par les groupements NH-BOC, CO<sub>2</sub>Me and  $\gamma$ -CO<sub>2</sub><sup>-</sup> susceptibles de jouer un rôle dans les phénomènes de reconnaissance avec la carboxylase.

L'étude topologique réalisée sur les analogues rigides cyclopentaniques et cyclohexaniques de l'acide glutamique (**Boc-cis et trans-C6-OMe**, **Boc-cis et trans-C5-OMe**) montre que le site de fixation est sensible à l'encombrement stérique. Ces analogues possèdent, néanmoins, des activités intéressantes car différentes vis à vis de la carboxylase. L'analyse conformationnelle montre que la substitution en  $\alpha$  limite la mobilité de la chaîne peptidique ( $\phi$  de  $\pm 60$ ). Dans cette série, les analogues *cis* sont les moins bons inhibiteurs. Le **BOC-cis-C6-OMe**, le plus rigide, adopte une seule conformation en solution qui correspond à la famille **II**. L'orientation du carboxylate dans les dérivés *cis* est du côté  $\alpha$ -CO<sub>2</sub>Me (côté gauche de la figure ci-dessous).



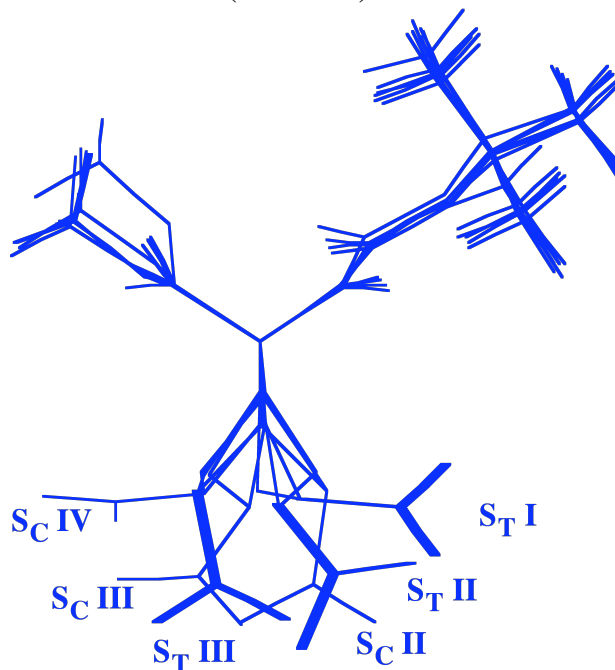
Familles **S<sub>C</sub>** (*cis*-isomères)



Familles **S<sub>T</sub>** (*trans*-isomères)

Le **BOC-trans-C5-OMe** est le meilleur inhibiteur des quatre analogues cycliques et il adopte des conformations qui appartiennent aux familles **I**, **II** et **III**. Le **BOC-trans-C6-OMe**, légèrement moins rigide, présente deux conformations en solution qui correspondent à la famille **III** majoritaire (80%) et la famille **I** minoritaire (20%). L'orientation du carboxylate dans les dérivés *trans* correspond au côté  $\alpha$ -NH-BOC (côté droit).

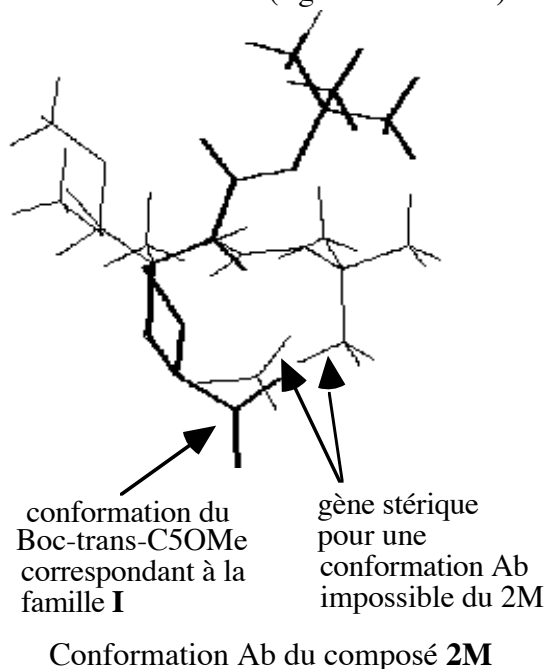
La famille **I** qui est uniquement présente dans les composés *trans*, n'est pas accessible aux analogues *cis* qui sont de moins bon inhibiteurs. Les conformations possibles pour les analogues *cis* ne peuvent aller que jusqu'à une limite extrême (famille **II**) correspondant au côté  $\alpha$ -NH-BOC (côté droit).



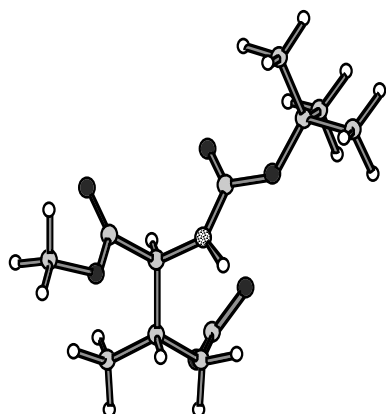
Nous avons ensuite établi la nature des conformations en solution pour les analogues linéaires **2M**, **3E**, **3T**, **4E** et **4T**. L'orientation de la chaîne peptidique (angle  $\phi$  et  $\psi$ ) montre une mobilité un peu plus importante pour les différents analogues linéaires (**3E**, **3T**, **4E** et **4T**) par rapport aux composés  $\alpha$  substitués (composés cycliques et **2M**).

L'analogue **4T** s'est avéré être le meilleur inhibiteur alors que le composé **3T** est le moins bon. Le composé **3E** est substrat de la carboxylase alors que son analogue **4E** est inhibiteur. Enfin le composé **2M** apparaît totalement inactif.

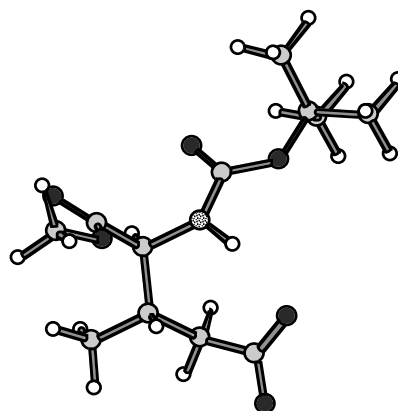
Nos résultats montrent que la participation de la famille conformationnelle **I** décroît pour les analogues **3T** et **2M**. Ces analogues (**2M** et **3T**) possèdent des conformations avec une orientation "étendue" du  $\gamma$  carboxylate ce qui correspond principalement à la famille **II** ou **III**. La substitution en  $\alpha$ , impose une rigidité à la chaîne peptidique (dans le cas du **2M**). L'orientation différente de la chaîne ( $\pm 60$ ) induit une gêne stérique sur la conformation **Ab** (famille **I**) qui sera absente en solution (figure ci-dessous).



Le composé **3E** présente deux conformations Ab et Ac appartenant à la famille **I** (mais dans de faibles proportions). On observe dans ces conformations que l'orientation du  $\gamma$  carboxylate correspond au côté  $\alpha$ -NH-BOC (côté droit) alors que le méthyle est situé à son opposé du côté  $\alpha$ -CO<sub>2</sub>Me (côté gauche). Il ne peut gêner ainsi le point d'ancrage du  $\gamma$  carboxylate dans l'étape de reconnaissance avec l'enzyme.

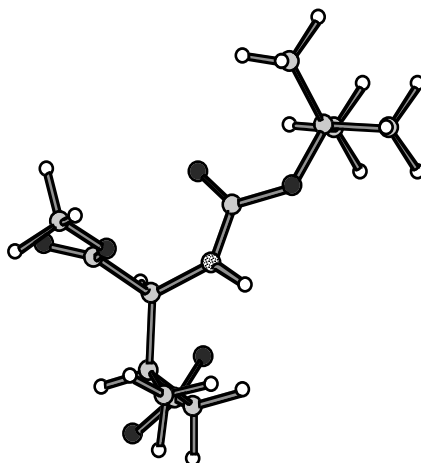


Conformation Ac du composé **3E**



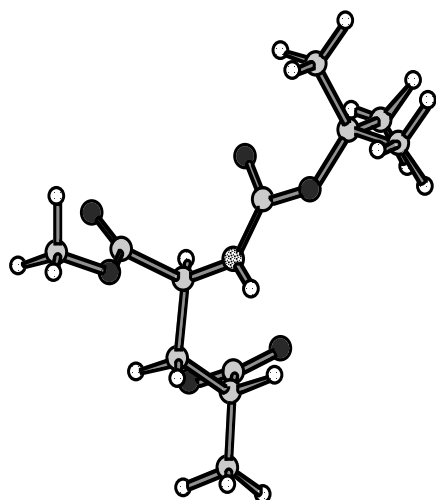
Conformation Ab du composé **3E**

Pour l'analogue **3T**, le  $\gamma$  carboxylate a la même disposition et s'oriente du côté  $\alpha$ -NH-BOC (côté droit) dans la conformation Ac (famille **I**) mais le groupement méthyle se retrouve, cette fois, parallèle au  $\gamma$  carboxylate et peut induire une gêne stérique dans le phénomène de reconnaissance.

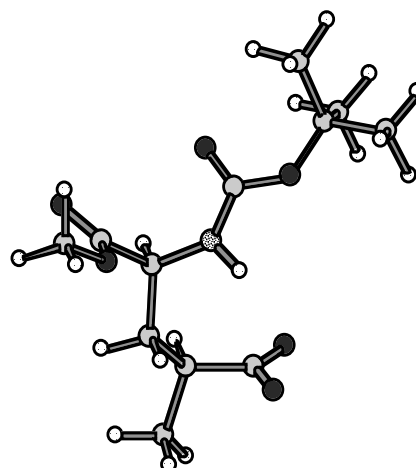


Conformation Ac du composé **3T**

Les composés **4E** et **4T** présentent des conformations **Ab** ou **Ac** qui correspondent à la famille **I** dans des proportions plus importantes que pour les autres analogues. Nos résultats montrent que les composés **4T** et **4E**, ont des groupements carboxylates susceptibles d'interagir avec la carboxylase du côté  $\alpha$ -NH-BOC (côté droit), en arrière pour le **4E** et dans le plan pour le **4T** alors que la position du méthyle dirigée verticalement ne peut, en aucune façon, gêner la reconnaissance avec l'enzyme (figure ci-dessous).

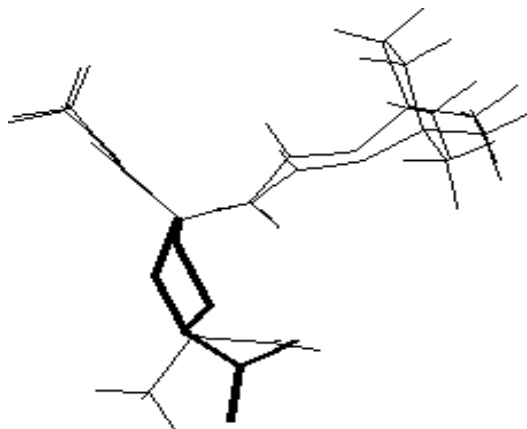
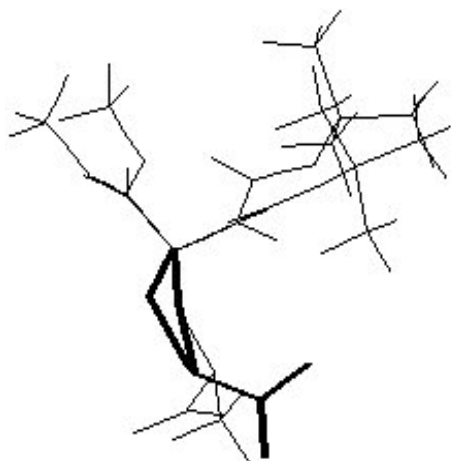


Conformation Ac du composé **4E**



Conformation Ab du composé **4T**

Cette étude a permis d'établir une banque de données structurales précises en solution pour ces différents analogues. Il semble qu'une certaine mobilité de la chaîne latérale soit, malgré tout, nécessaire pour une bonne reconnaissance de ces analogues avec le site actif de la carboxylase. Une hypothèse peut être avancée quand à la disposition dans l'espace du  $\gamma$  carboxylate au niveau du site actif. Celle-ci semble être du côté  $\alpha$ -NH-BOC (côté droit) ce qui correspond à la famille **I** (conformations Ab, Ac et Cc) mais les familles **II** et **III**, qui présentent des conformations "étendues", ne peuvent être complètement exclues. Les superpositions suivantes montrent une bonne corrélation entre les conformations de la famille **I** "supposées" bioactives pour deux analogues très différents **4E**, **4T** et le **BOC-trans-C5-OMe**.



**4E** (Ac) et **BOC-trans-C5-OMe** (famille **I**) **4T** (Ab) et **BOC-trans-C5-OMe** (famille **I**)

## Perspectives

L'hypothèse avancée pour la disposition dans l'espace du  $\gamma$  carboxylate au niveau du site actif devrait pouvoir être vérifiée grâce à des expériences de RMN dites de nOé-transféré. La carboxylase récemment purifiée permettrait d'accéder à la conformation bioactive grâce à ces expériences de RMN mettant en évidence la conformation adoptée par le substrat ou l'inhibiteur à l'intérieur du site actif de l'enzyme. Un mélange substrat-enzyme est soumis à une expérience NOESY dans laquelle n'apparaît que le signal du substrat ou de l'inhibiteur. Le signal de la macromolécule n'est pas détecté à cause de son long temps de corrélation (élargissement maximum des raies) et de sa très faible concentration. Seules les taches de corrélations TRNOE du substrat ou de l'inhibiteur sont observées et changent de signe en présence du complexe.

Ce genre d'expérience a déjà été réalisée pour des interactions érythromycine-ribosomes au laboratoire. L'étude RMN par nOe-transférés sera indispensable pour confirmer la nature de la conformation active au niveau du site actif de la carboxylase. Le succès de ces expériences nécessite tout d'abord que certaines conditions soient remplies (concentration en substrat, constante de dissociation  $K_d$  comprise entre  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$  M et rapport substrat / macromolécule supérieur à 10) et une mise au point des conditions expérimentales.