

2m11.2909.1

Université de Montréal

Études conformationnelles de la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain δ -
opioïde et son interaction avec son ligand endogène, la deltorphine-II.

Par

Ibtihal Fadhil

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en pharmacologie

Avril, 2001

©Ibtihal Fadhil, 2001



W
4
J58
2001
N. 117

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Études conformationnelles de la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain δ -
opioïde et son interaction avec son ligand endogène, la deltorphine-II.

Présenté par
Ibtihal Fadhil

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. André de Léan, président du jury du mémoire

Dr. Alain Fournier, membre du jury

Dr Katharine Carpenter, directeur de recherche

Mémoire accepté le ~~12 juillet 2001~~

19 septembre 2001
fi FES

Sommaire

Les récepteurs opioïdes sont impliqués dans le contrôle de la douleur. En effet, le récepteur δ -opioïde, contrairement aux μ et κ opioïdes, ne présente pas des effets secondaires importants tels que la dépression respiratoire, la dépendance et la tolérance. Beaucoup d'efforts ont été mis visant à élaborer des agents thérapeutiques présentant une très grande efficacité analgésique sans avoir les effets secondaires indésirables. En effet, des études structure-fonction sur les récepteurs aux opiacés ont été effectués dans le but d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans les différentes étapes de la voie de signalisation de ces récepteurs. Un aspect abordé dans le cadre des études structure-fonction est l'identification des sites d'interaction ligand-récepteur et la compréhension de la nature des interactions chimiques entre les récepteurs aux opiacés et leur ligands naturels ou artificiels. Ces connaissances devraient permettre un développement plus rationnel de nouveaux médicaments analgésiques efficaces et spécifiques.

Des études antérieures ont montré que la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain delta-opioïde joue un rôle important dans la liaison des composés sélectifs au récepteur δ qui ne se lient pas ou faiblement aux récepteurs κ et μ . Par des études de mutagenèse dirigée, un groupe de chercheurs a montré l'implication spécifique de trois acides aminés (Trp-284, Val-296 et Val-297) dans la sélectivité de cette liaison (Réf.3). Le but de la présente recherche est de déterminer la conformation adoptée par cette boucle seule et en présence de son ligand endogène, deltorphine-II, par des techniques de spectrométries telles le dichroïsme circulaire (CD), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la modélisation moléculaire. Quatre peptides (LB, M2, M1 et PB) de longueur différente, contenant tous la séquence d'acides aminés composant la troisième boucle extracellulaire et quelques acides aminés des domaines transmembranaires VI et VII, furent préparés par synthèse chimique pour déterminer la conformation de la boucle ainsi que le rôle des acides aminés transmembranaires sur la stabilisation de cette conformation. La troisième boucle extracellulaire a une

conformation hélicoïdale partielle qui est stabilisée par une interaction aromatique-aromatique entre les chaînes latérales des résidus Trp-284 et Phe-280. La présence d'un motif Ala-Ala du côté C-terminal du peptide perturbe une structure β qui est probablement due à un coude impliquant le résidu Pro-294. L'interaction de la deltorphine-II avec la troisième boucle extracellulaire déstabilise la conformation en hélice du côté N-terminal tandis qu'elle stabilise l'extrémité C-terminale, ce qui se traduit par la formation d'une structure β . De plus, le déplacement chimique des protons alpha de certains acides aminés (Trp-284, Val-296 et Val-297) est changé de façon marquée ce qui suggère qu'il y a probablement une interaction qui se passe à ce niveau. Le proton amide du résidu Glu-4 de la deltorphine-II semble être impliqué dans un pont hydrogène, où il est inaccessible au solvant, et l'interaction de la deltorphine-II avec la boucle brise ce pont ou change la conformation du peptide, rendant le proton amide accessible au solvant. Par une étude de CD, il semble que l'interaction des endomorphines (ligands endogènes du récepteur Mu-opioïde) affecte la conformation de la troisième boucle extracellulaire de façon similaire à la deltorphine-II car tous ces peptides possèdent deux groupements aromatiques dans leur séquence. Par contre, l'agoniste Kappa sélectif (U50,488), qui n'a qu'un groupement aromatique, n'a aucun effet sur la conformation de la boucle. Il est possible que la présence de deux groupements aromatiques dans les ligands soit importante pour interagir avec la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain Delta-opioïde.

Mots clés :

Deltorphine-II, Dichroïsme circulaire (CD), Modélisation moléculaire, Récepteur Delta-opioïde, Résonance magnétique nucléaire (RMN), structure secondaire, Troisième boucle extracellulaire.

Table de Matières

Sommaire	i
Table de Matières	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des tableaux.....	x
Liste d'abréviations.....	xi
Remerciements.....	xii
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Historique des récepteurs opioïdes.....	2
1.2 Distribution et fonction	3
1.3 Récepteur δ -opioïde.....	4
1.4 Troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde.	7
1.5 Caractéristiques des ligands endogènes du récepteur δ -opioïde	10
1.6 Endomorphine 1 et 2	14
1.7 U50,488	15
CHAPITRE II DICHROÏSME CIRCULAIRE.....	16
2.1 Théorie de base du dichroïsme circulaire (CD).....	17
2.1.1 Lumière circulairement polarisée	18
2.1.2 Mesure du dichroïsme circulaire.....	19
2.1.3 Dichroïsme circulaire des protéines et peptides	22
2.2 Partie expérimentale	24
2.2.1 Provenance des produits	24
2.2.2 Préparation des échantillons	26

2.3	Résultats et discussion.....	27
CHAPITRE III RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE.....		37
3.1	Historique	38
3.2	Magnétisme nucléaire.....	40
3.2.1	Phénomène de résonance magnétique.	41
3.2.4	Mesure du signal RMN.....	43
3.2.4a	Le déplacement chimique.....	45
3.2.4b	Interaction dipolaire	45
3.2.4c	Interaction scalaire spin-spin.....	45
3.3	Principe de la spectroscopie de RMN à deux dimensions.....	46
3.3.1	Définition.....	46
3.3.1a	Le temps de préparation :	47
3.3.1b	Le temps d'évolution t_1 :	47
3.3.1c	Le temps de mixage :	47
3.3.1d	Le temps de détection :	47
3.3.2	La RMN 2D	48
3.3.2a	L'idée de JEENER :	48
3.3.2b	TOCSY (Total Correlation Spectroscopy):.....	51
3.3.2c	Spectroscopie de l'effet nucléaire Overhauser bidimensionnelle (NOESY) :.....	52
3.4	RMN des acides aminés et peptides	53
3.4.1	Structure et systèmes de spins des acides aminés.....	53
3.4.2	Réseaux de connectivités TOCSY des acides aminés	55
3.4.3	Déplacements chimiques des acides aminés libres ou dans la chaîne protéique.	57
3.4.4	Distances interprotoniques caractéristiques de structures secondaires régulières dans les polypeptides.	59
3.4.5	Types d'interaction dans les protéines.....	60
3.4.6	La vitesse d'échange des protons des groupements amides.	62
3.4.7	Déplacements chimiques des protons α	62

3.5	Modélisation moléculaire	64
3.6	Partie expérimentale	67
3.6.1	Provenance des produits	67
3.5.2	Préparation des échantillons et procédures expérimentales RMN.....	67
3.6.3	Procédure expérimentale de modélisation moléculaire	68
3.7	Résultats et discussion.....	68
3.7.1	Partie RMN	68
3.7.2	Modélisation moléculaire	83
CHAPITRE IV DISCUSSION ET CONCLUSION.....		86
RÉFÉRENCES.....		96

Liste des figures

Figure 1.1 : Représentation schématique d'un récepteur à sept passages trans-membranaires.....	5
Figure 1.2 : Représentation schématique du récepteur chimérique δ/μ 291-300.....	6
Figure 1.3 : Séquences en acides aminés du DPDPE et de la deltorphine-II ainsi que la structure chimique de la bremazocine, du SNC-80 et du naltrindole.....	8
Figure 1.4 : Région de la troisième boucle extracellulaire du récepteur sauvage δ -opioïde soumis aux mutations par des alanines.	9
Figure 1.5 : Séquence en acides aminés des deltorphines.....	11
Figure 1.6 : Conformation de basse énergie de la deltorphine-II.....	13
Figure 1.7 : Séquence en acides aminés des endomorphines 1 et 2.....	14
Figure 1.8 : Structure chimique du U50,488.....	15
Figure 2.1: Représentation schématique de l'obtention du signal de CD.....	18
Figure 2.2 : Diagramme schématique montrant la composante électrique de la lumière linéairement polarisée (gauche) et circulairement polarisée (droite). Au-dessous de chacun les vecteurs de la composante électrique sont visualisés le long de l'axe de propagation de la gauche du diagramme ci-dessus.	19
Figure 2.3 : a) la lumière linéairement polarisée peut être visualisée comme la résultante de la superposition de lumières circulairement polarisées d'amplitude et de phase égales; (b) l'absorption différente de la lumière polarisée de gauche et de droite mène à l'elliplicité (CD).	20
Figure 2.4 : a) Représentation schématique de la structure d'un acide aminé montrant la rotation des angles ψ et ϕ de la chaîne principale d'un peptide; b) spectre de CD correspondant aux structures secondaires hélice α , feuillets plissés et arrangement aléatoire.....	23
Figure 2.5 : Présentation schématique de la troisième boucle extracellulaire du récepteur Delta-opioïde humain.	25
Figure 2.6 : Spectre de dichroïsme circulaire de LB dans des mélanges aqueux SDS, TFE et HFIP.....	28

Figure 2.7 : Spectre de CD de LB a) à différentes concentrations (2 mM, 1mM, 0.5 mM et 0.1 mM); b) à différents pH (1.8 et 5) dans le cosolvant HFIP/H ₂ O.	29
Figure 2.8 : Spectre de CD de LB, M2, M1 et PB dans un mélange HFIP/H ₂ O à une concentration de 2 mM.	31
Figure 2.9 : Spectre de CD de LB seul ou en présence de deltorphine-II dans un mélange HFIP/H ₂ O à une concentration de 2 mM.	32
Figure 2.10 : Spectre de CD de M2 seule ou en présence de deltorphine-II dans un mélange HFIP/H ₂ O à une concentration de 2 mM.	33
Figure 2.11 : Spectre de CD de M1 seule ou en présence de deltorphine-II dans un mélange HFIP/H ₂ O à une concentration de 2 mM.	34
Figure 2.12 : Spectre de CD de LB seule ou en présence de a) endomorphine-1; b) endomorphine-2 dans HFIP/H ₂ O à une concentration de 2 mM.	35
Figure 2.13 : Spectre de CD de LB seule ou en présence de U50,488 dans un mélange HFIP/H ₂ O à une concentration de 2 mM.	36
Figure 3.1 : Énergie des états des noyaux.	40
Figure 3.2 : Mouvement de précession.	41
Figure 3.3 : a) Précession fixe de M autour de B ₀ ; b) Précession tournant de M; c) double précession de M.	42
Figure 3.4 : a) Impulsion de 90°, b) Impulsion de 180°.	43
Figure 3.5 : Principe d'une mesure RMN : l'échantillon placé dans le champ magnétique B ₀ acquiert une aimantation M ₀ dans l'axe du champ B ₀ . Une excitation B ₁ à la fréquence de résonance du noyau étudié modifie cet équilibre. À l'arrêt de l'excitation, le retour de l'aimantation à sa valeur d'équilibre induit dans cette même bobine un signal à la fréquence de résonance : c'est le signal FID (Free Induction Decay). La transformée de Fourier de ce signal fournit le spectre de RMN.	44
Figure 3.6 : Schématisation des intervalles de temps pour une expérience de RMN à deux dimensions.	46
Figure 3.7 : Collection de signaux de précession libre du type s(t ₂).	48
Figure 3.8 : Interférogramme de la forme s(t ₂ , ω ₁).	49

- Figure 3.9 : Spectre de RMN à deux dimensions après la deuxième Transformée de Fourier..... 49
- Figure 3.10 : a) Spectre de COSY d'un système AMX; b) représentation schématique d'une molécule possédant trois atomes de carbones et les couplages selon une expérience de COSY entre ces atomes. 50
- Figure 3.11 : Représentation schématique d'un acide aminé valine en position i entre deux autres acides aminés $i-1$ et $i+1$. Dans le TOCSY, le transfert de magnétisation ne peut pas traverser les fonctions carbonyles. 51
- Figure 3.12 : Segment d'une chaîne polypeptide avec indication des connectivités séquentielles de NOE des acides aminés. 52
- Figure 3.13 : Chaînes latérales R, symboles à trois lettres et à une lettre pour les 20 acides aminés communs, et systèmes de spins des protons non-labiles dans les fragments moléculaires H- α C-R. 54
- Figure 3.14 : Réseaux de connectivités pour les systèmes de spin des protons non-labiles des acides aminés communs. Les déplacements chimiques sont arbitraires (Réf.35). 56
- Figure 3.15 : Résumé des NOE 1H-1H séquentiels et à distance moyenne dans les structures secondaires suivantes : feuillet β parallèle ou antiparallèle, hélice α , hélice 3_{10} , coude β de type I. Les distances 1H-1H courtes sont indiquées par des lignes reliant les résidus contenant les protons connectés; la largeur de la ligne est proportionnelle à l'intensité des signaux NOESY théoriques. 60
- Figure 3.16 : Représentation de la différence entre les valeurs de déplacements chimiques des protons alpha observés et celle de conformation aléatoire. 63
- Figure 3.17 : L'indice des déplacements chimiques des protons alpha de LB dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 69
- Figure 3.18 : L'indice des déplacements chimiques des protons alpha de M2 dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 70
- Figure 3.19 : L'indice des déplacements chimiques des protons alpha de M1 dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 71
- Figure 3.20 : L'indice des déplacements chimiques des protons alpha de PB dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 72
- Figure 3.21 : Représentation schématique des NOE inter-résidus observés dans M2 pour un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 73

- Figure 3.22 : Représentation schématique des NOE inter-résidus observés pour M1 dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 73
- Figure 3.23 : Représentation schématique des NOE inter-résidus observés pour le PB dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 74
- Figure 3.24 : Indice des déplacements chimiques des protons alpha de LB en présence de deltorphine-II dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 75
- Figure 3.25 : Indice des déplacements chimiques des protons alpha de M2 en présence de deltorphine-II dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 76
- Figure 3.26 : Indice des déplacements chimiques des protons alpha de M1 en présence de deltorphine-II dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C. 77
- Figure 3.27 : Représentation schématique des NOE inter-résidus observés dans la deltorphine-II dans un mélange de HFIP/H₂O à 10 °C. 78
- Figure 3.28 : Échange des protons amides de la deltorphine-II a) après 15 minutes d'incubation; b) après 3 heures d'incubation. 79
- Figure 3.29 : Spectre de TOCSY montrant l'implication de Glu4 de la deltorphine-II dans l'interaction récepteur-peptide; a) deltorphine-II seule; b) deltorphine-II en présence de LB. 81
- Figure 3.30 : Spectre de TOCSY montrant l'échange de protons amides (α H-NH) de M2 dans un mélange de HFIP/D₂O après 1h30. 82
- Figure 3.31 : Spectre de TOCSY montrant l'échange de proton amide (α H-NH) de M2 et de la deltorphine-II dans un mélange de HFIP/D₂O après 1h30. 83
- Figure 3.32 : Structure de LB et de la deltorphine-II par modélisation moléculaire. 84

Liste des tableaux

Tableau I.I : Affinité des ligands pour le récepteur δ -opioïde sauvage et mutants.....	8
Tableau II.I: Séquence d'acides aminés des quatre peptides utilisés pour l'expérimentation.....	25
Tableau III.I : Déplacements chimiques du ^1H dans les structures aléatoires pour les vingt acides aminés communs.....	58
Tableau III.II : Valeurs des déplacements chimiques des protons alpha dans une conformation aléatoire.....	63

Liste d'abréviations

- CD : Dichroïsme circulaire
- COSY : Spectroscopie de corrélation de déplacements chimiques par couplage scalaire homonucléaire.
- Delto-II : Deltorphine-II
- Endo1 ou 2 : Endomorphine-1 ou -2
- HFIP : Hexafluoroisopropanol
- LB : Longue boucle
- M1 : Moyenne 1 boucle
- M2 : Moyenne 2 boucle
- NOE : Effet nucléaire Overhauser
- NOESY : Spectroscopie de l'effet nucléaire Overhauser à deux dimensions
- ORL : Opioid receptor-like
- PB : Petit boucle
- RF : Radiofréquence
- RMN : Résonance magnétique nucléaire
- SDS : Dodécylsulfate de sodium
- SNC : Système nerveux central
- TFE : Trifluoroéthanol
- TM : Transmembranaire
- TOCSY : Total correlation spectroscopy

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier la Dr Katharine Carpenter, ma directrice de mémoire, de m'avoir acceptée dans son groupe de recherche et d'avoir dirigé ce travail avec un enthousiasme communicatif. J'ai beaucoup apprécié sa rigueur scientifique et ses qualités humaines tout au long de ce travail. Je la remercie également de m'avoir donné les moyens nécessaires pour mener à bien ce travail de recherche.

Ma grande reconnaissance est adressée au Dr Ralf Schmidt d'AstraZeneca pour la synthèse des peptides nécessaires pour mon projet. Un grand merci à Luc Boisvert pour les heures passées à corriger les fautes de français et pour ses critiques sur le présent mémoire. Je remercie également Maxime Tremblay d'avoir accepté de lire mon mémoire et d'en faire la critique.

Enfin, peu de mots peuvent exprimer ma reconnaissance envers la patience, le soutien et l'affection que m'a apportés mon mari, Haydar Saaied, pendant la réalisation de ce travail. Je n'oublie pas de témoigner ma profonde gratitude envers mes parents qui m'ont permis d'être ce que je suis à présent. Également j'aimerais remercier mes sœurs pour leurs encouragements.

*A la mémoire de mon frère
Moukdad*

CHAPITRE I.

INTRODUCTION

Le développement d'un médicament nécessite un travail d'équipe impliquant diverses compétences (biologie moléculaire, pharmacologie et chimie) et technologies. Au moyen d'études de récepteur chimérique et de mutagenèse dirigée, les biologistes moléculaires ont montré que la troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde est essentiel dans la liaison du récepteur aux ligands. Par conséquent, le sujet de ce mémoire est la détermination de la structure secondaire de la troisième boucle extracellulaire du récepteur δ -opioïde. Les changements de conformation de la boucle dus au ligand endogène du récepteur, la deltorphine-II, ont également été étudiés. En guise d'introduction, les récepteurs opioïdes sont présentés de façon générale puis le récepteur δ -opioïde sera examiné plus attentivement. Il sera question de plusieurs études de mutagenèse dirigée et des récepteurs chimériques ayant pour but de définir les régions du récepteur ainsi que les acides aminés jouant un rôle important dans la liaison du récepteur à son ligand endogène. Il y aura ensuite un survol de la littérature au sujet de la deltorphine-II, en mettant l'accent sur la fonction ou l'implication de chaque acide aminé dans la liaison au récepteur δ -opioïde. Finalement, nous aborderons les ligands endogènes des récepteurs μ - (endomorphine 1 et endomorphine 2) et κ - (U50,488) opioïdes.

1.1 Historique des récepteurs opioïdes

Depuis des milliers d'années, les hommes font usage du suc sécrété par la capsule du pavot comme agent euphorisant, antitussif ou antidiarrhéique. Toutefois, ce n'est qu'au XIX^{ème} siècle que Serturmer en a isolé le principal composant actif, la morphine. Depuis, cet alcaloïde, qui est surtout utilisé pour ses propriétés antinociceptives, s'est également révélé être une drogue dont l'usage chronique peut engendrer la tolérance et la dépendance. Les chimistes comme les pharmacologues se sont alors appliqués à trouver des molécules analogues qui ne possèdent pas les inconvénients de la morphine, tandis que les biologistes se sont attardés à la

compréhension de ses mécanismes d'action. La synthèse de nouveaux dérivés opiacés et l'étude des relations structure-activité ont suggéré l'existence d'une cible spécifique pouvant s'apparenter à un récepteur des opiacés. Parmi les quelques récepteurs spécifiques, trois sont classiques, clonés et séquencés : les récepteurs μ (Mu), δ (Delta) et κ (Kappa) (Réf.1 et 2).

Ces récepteurs, couplés aux protéines G sensibles à la toxine pertussis, partagent une même structure générale : une région extracellulaire possédant une extrémité peptidique N-terminale, sept domaines transmembranaires (TM) et une région intracellulaire possédant une extrémité peptidique C-terminale. Pour chacun de ces trois types de récepteurs, l'existence de plusieurs sous-types a été démontrée. Plus récemment, un nouveau type de récepteur a été identifié et appelé récepteur-orphelin aux opiacés, ORL₁ (« opioid receptor-like »). D'autres récepteurs, caractérisés seulement pharmacologiquement, sont également connus : ϵ (Epsilon), λ (Lambda), ι (Iota) et ζ (Zêta) (Réf.2).

1.2 Distribution et fonction

Les récepteurs opioïdes sont largement distribués dans le corps humain. En effet, ils sont présents non seulement dans le système nerveux central (SNC) mais aussi à la périphérie. On peut les retrouver, entre autres, dans le tronc cérébral, la substance grise, la corne dorsale, l'hypothalamus, le thalamus, l'amygdale, le striatum, le noyau caudé et du putamen, le bulbe olfactif, le néocortex, et le noyau accumbens (Réf.1). Ils sont impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques comme la respiration, la régulation thermique, les fonctions cardio-vasculaires, l'analgésie, l'intégration motrice, la motilité intestinale, l'olfaction, les fonctions cognitives, la diurèse, la prise alimentaire et les sécrétions neuroendocrines (Réf.1).

Il est largement admis que l'administration chronique d'opioïdes conduit au développement d'une tolérance à certains de leurs effets pharmacologiques ainsi qu'à un

état de dépendance. En effet, tous les analgésiques opioïdiques utilisés présentement en clinique interagissent avec le récepteur de type μ qui est connu pour induire de sévères effets secondaires ainsi que l'accoutumance (Réf.3). Ces principaux inconvénients peuvent être diminués par l'utilisation de certains agonistes sélectifs pour le récepteur κ -opioïde qui affiche également des propriétés analgésiques. Cela suggère la possibilité de développer certaines drogues qui, interagissant sélectivement avec un seul des trois types de récepteurs des opioïdes, exhiberaient de puissants effets analgésiques et des effets secondaires moindres. Le récepteur δ -opioïde, qui lie avec une haute affinité les peptides enképhaliniques, a été proposé comme étant capable d'induire un effet analgésique tout en entraînant une faible dépendance physique aux opiacés, ce qui fait de lui une cible intéressante pour la conception de médicaments (Réf.3).

1.3 Récepteur δ -opioïde

La séquence et la structure du récepteur δ -opioïde sont importantes dans le développement de nouveaux analogues opioïdiques. La géométrie de leurs chaînes latérales et de ses substituants sont déterminants pour l'interaction avec le milieu de la poche du récepteur (Réf.4).

Le clonage du récepteur δ -opioïde et les modèles théoriques développés à partir de nombreuses études de mutagenèse dirigée et de récepteurs chimériques ont été très utiles pour comprendre quels acides aminés dans le récepteur s'associent aux ligands δ -sélectifs. Les ADN des récepteurs δ -, μ - et κ -opioïdes ont montré que ces derniers appartiennent à la famille des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés à la protéine G. Les principales caractéristiques associées à cette famille sont la présence de sites de glycosylation dans la séquence N-terminale, d'un pont disulfure entre la première et la deuxième boucle extracellulaire et de sites de phosphorylation spécifiques dans la région C-terminale, première et troisième boucle intracellulaire et un site de palmitoylation (Fig 1.1) (Réf.4).

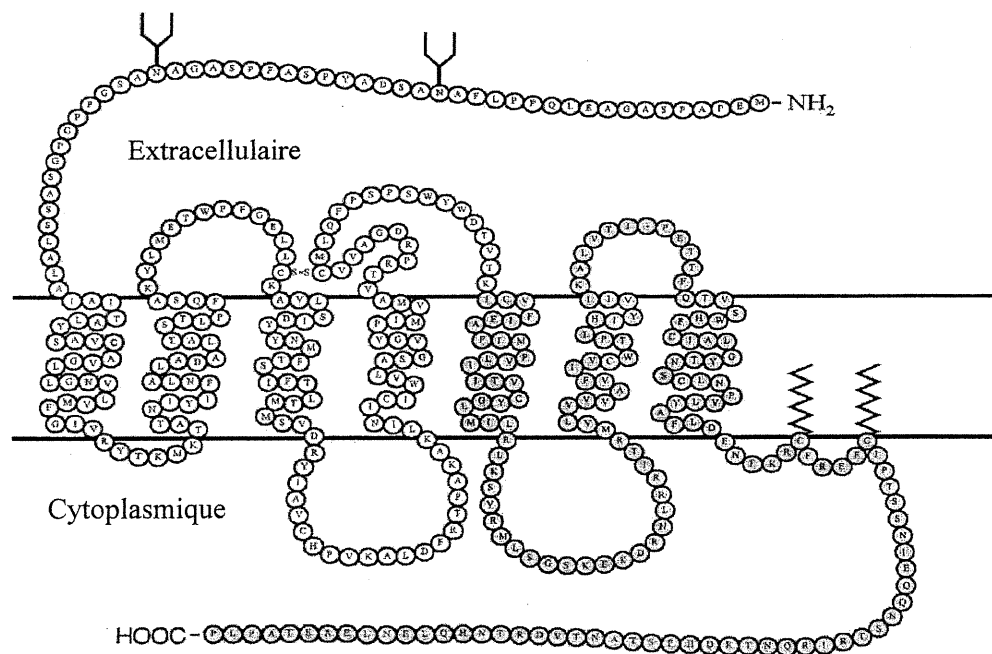


Figure 1.1 : Représentation schématique d'un récepteur à sept passages transmembranaires.

Il existe entre 55 et 65% de similarité entre la séquence des acides aminés des différents récepteurs opioïdes. La plus grande homologie entre ces récepteurs réside dans les domaines transmembranaires et les boucles intracellulaires alors que les déviations résident principalement dans les régions N- et C-terminales, le quatrième domaine TM et dans les deuxième et troisième boucles extracellulaires. Il est probable que certains de ces régions divergentes contiennent certains des éléments responsables de la sélectivité démontrée par certains ligands envers les différents récepteurs (Réf.5). En effet, plusieurs études récentes ont démontré que la troisième boucle extracellulaire joue un rôle primordial dans la sélectivité de la liaison du ligand au récepteur δ -opioïde (Réf.3 et 5).

À l'aide des outils de biologie moléculaire, certains chercheurs ont démontré que la liaison spécifique au récepteur δ requiert la présence de la séquence entre les acides aminés 291 et 300, qui représente l'extrémité C-terminale de la troisième boucle

extracellulaire et l'extrémité N-terminale du septième domaine TM (Réf.4). Ils ont montré que le remplacement de séquence d'acides aminés entre 291 et 300 du récepteur delta par celle correspondant au récepteur μ , δ/μ 291-300 (Fig 1.2), abolit la liaison δ -sélective tout en maintenant la liaison aux ligands non-sélectifs. Cela suggère que la structure globale de la chimère est préservée tandis que les acides aminés entre 291 et 300 contribuent à la sélectivité du récepteur delta en faisant des contacts spécifiques avec les ligands delta ou en induisant des changements conformationnels dans le récepteur qui favorisent la migration des ligands delta vers la poche localisée plus en profondeur dans le récepteur (Réf.5).

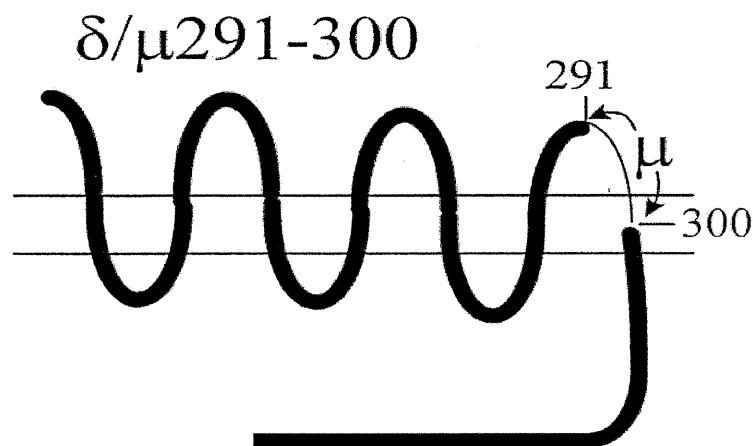


Figure 1. 2 : Représentation schématique du récepteur chimérique δ/μ 291-300.

Une autre hypothèse développée par Metzger et Ferguson peut être appliquée dans ce modèle (Réf.6). Ces auteurs proposent que les ligands opioïdiques se lieraient à leurs récepteurs dans une poche constituée par les hélices transmembranaires et que cette poche serait commune à tous les sous-types de récepteurs d'opioïdes. Ainsi, la sélectivité serait conférée par les boucles extracellulaires qui agiraient comme une barrière, permettant le passage de certains ligands tout en excluant certains autres. Dans ce modèle, les résidus du récepteur μ situés aux positions 291-300 de la chimère empêcheraient le passage du ligand delta-sélectif à la poche transmembranaire.

Pepin et al. mettaient l'emphase sur les résidus Leu-300, Arg-291 et la région hydrophobe entre 295 et 300 (Réf.5). Wang et al. pensaient que le résidu Arg-292 pouvait activement participer dans la formation de sels avec des résidus anioniques et que le groupe hydroxyle d'un résidu tyrosine pouvait former une liaison hydrogène avec un résidu d'acide aspartique dans le deuxième ou troisième domaine TM (Réf.4 et 7). Les résidus hydrophobes comme Trp-284, Val-296 et Val-297 ou les cycles aromatiques d'autres résidus comme tyrosine ou phénylalanine seraient également importants dans la liaison des agonistes δ -opioïdes car ils compléteraient les résidus critiques dans les deltorphines (ligands endogènes du récepteurs delta-opioïde). Les résidus nécessaires pour la spécificité des récepteurs d'opioïdes (δ , μ et κ) étant largement associés à la région de la troisième boucle extracellulaire, il serait donc logique de supposer que les changements sélectifs (ou par mutations) dans des résidus spécifiques modifieraient l'efficacité de l'interaction des ligands (Réf.4).

1.4 Troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde.

Il y a unanimité dans la littérature concernant l'importance de la troisième boucle extracellulaire dans le site de liaison et plusieurs études à ce sujet ont été mentionnées plus haut. Dans la présente section, l'implication des résidus Trp-284, Val-296 et Val-297 dans la liaison des ligands delta-sélectifs au récepteur sera traitée.

Des études de mutagenèse dirigée de chacun des acides aminés à l'intérieur et à la périphérie de la troisième boucle extracellulaire ont permis d'identifier que les résidus Trp-284, Val-296 et Val-297 sont très importants dans la liaison normale des ligands delta-sélectifs SNC-80, DPDPE, deltorphine-II et naltrindole (Fig. 1.3) au récepteur δ -opioïde (Tab.1). La mutation simultanée de ces trois résidus hydrophobes altère considérablement la liaison de ces quatre ligands sans affecter la liaison des ligands non sélectifs comme la Bremazocine (Tab.1) (Réf.3).

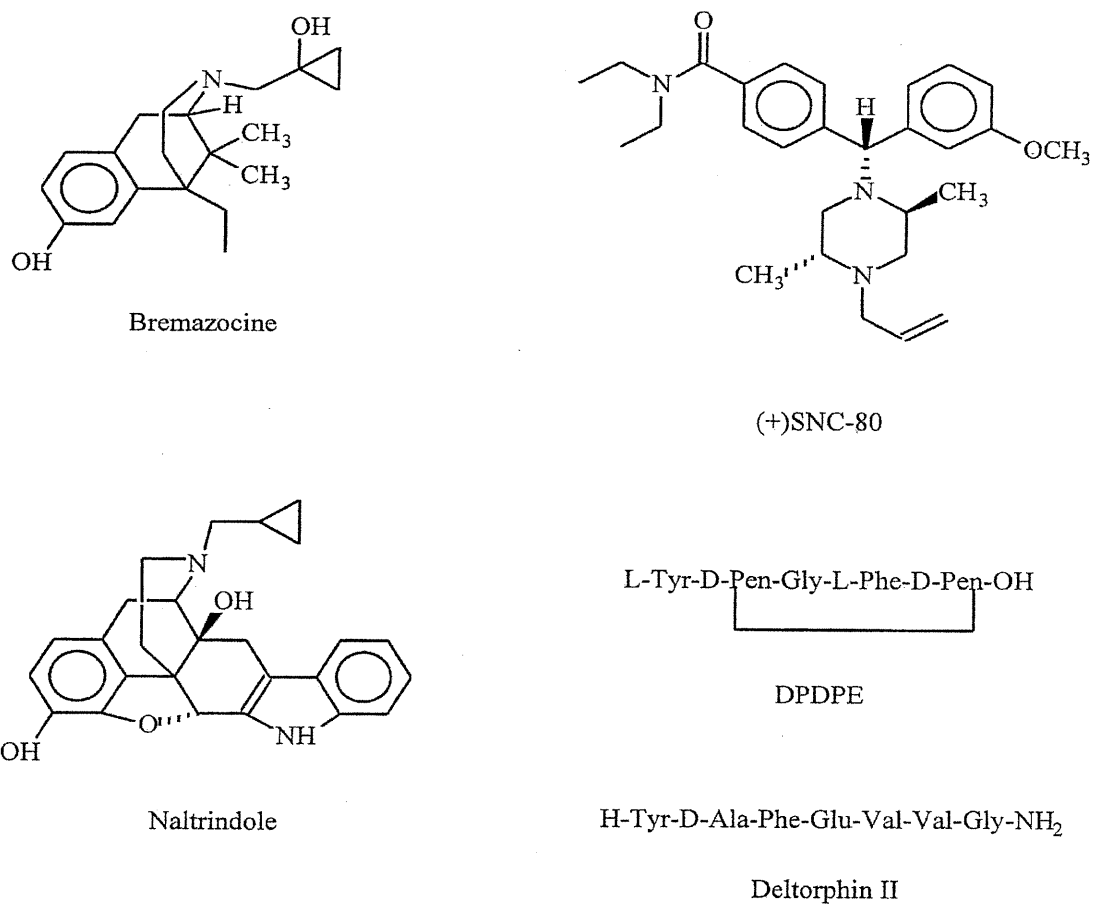


Figure 1.3 : Séquences des acides aminés du DPDPE et de la deltorphine-II ainsi que la structure chimique de la bremazocine, du SNC-80 et du naltrindole.

Tableau I.I : Affinité des ligands pour des récepteurs δ -opioïdes sauvage et mutants. (Réf. 3)

	K_d (nM), [³ H]Bremazocine	K_i (nM)			
		SNC-80	DPDPE	DELT II	NALT
WT hDOR	3.05 ± 0.37	2.19 ± 0.29	3.25 ± 0.84	0.49 ± 0.13	0.04 ± 0.02
W284A	3.67 ± 0.32	59.33 ± 10.21	31.91 ± 3.81	8.24 ± 1.05	0.29 ± 0.07
V296A	3.47 ± 0.57	13.81 ± 3.34	11.87 ± 1.39	3.77 ± 0.49	0.144 ± 0.05
V297A	4.25 ± 0.52	7.18 ± 1.62	4.65 ± 0.70	8.90 ± 1.68	0.23 ± 0.07
V296A + V297A	3.74 ± 0.89	31.48 ± 10.45	19.73 ± 5.71	8.85 ± 4.45	0.14 ± 0.05
W284A + V296A +V297A	6.12 ± 0.59	306 ± 59	281 ± 62	424 ± 23	0.9 ± 0.2

Parmi les différentes mutations, la substitution du résidu Trp-284 par une alanine ou une lysine est celle qui a le plus affecté la liaison des ligands. Cela suggère que le résidu Trp-284 joue un rôle majeur dans la détermination de la sélectivité des ligands. En effet, la présence de résidu Trp-284 dans le chimère δ/μ 288-300 contribue, du moins en partie, à la restauration de la liaison des ligands delta-sélectifs (Réf.3).

L'analyse d'alignement de séquence suggère que le résidu Trp-284 est localisé dans la partie N-terminale de la troisième boucle extracellulaire et que les valines 296 et 297 sont localisées à la surface extracellulaire de TM7 (Fig 1.4). En se basant sur un modèle en trois dimensions, il semble que ces trois résidus participent directement au processus de liaison au lieu de seulement stabiliser la conformation du récepteur. Le fait que la liaison de la Bremazocine au récepteur ne soit pas affectée par les mutations supporte cette hypothèse (Réf.3).

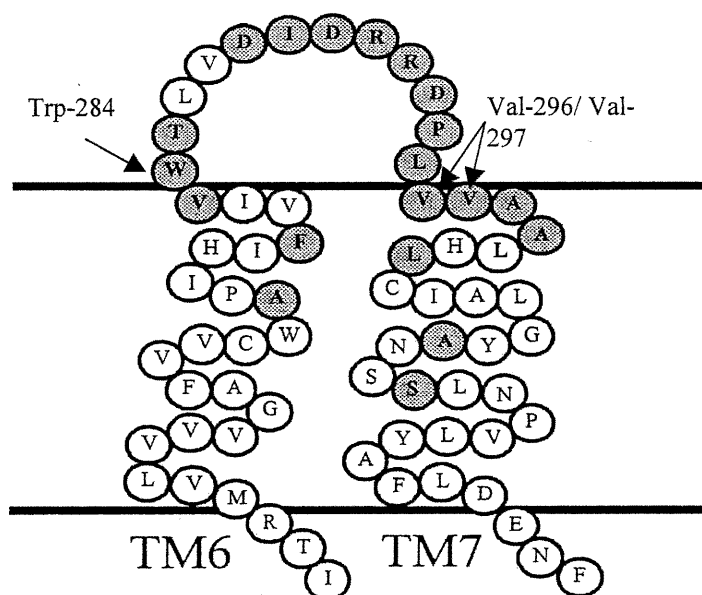


Figure 1.4 : Région de la troisième boucle extracellulaire du récepteur sauvage δ -opioïde soumis aux mutations par des alanines.

En somme, plusieurs données semblent supporter l'hypothèse suivante : la liaison des ligands δ -sélectifs est réalisée en deux étapes. La première étape serait la reconnaissance des ligands δ par leur interaction avec les résidus Trp-284, Val-296 et Val-297 qui sont situés à l'entrée du pore formé par les sept passages transmembranaires. La deuxième étape serait l'interaction du ligand avec le domaine général de liaison (Réf.3). Supportant cette hypothèse, l'effet de la mutation de résidus Trp-284, Val-296 et Val-297 sur la liaison des ligands semble corrélérer avec leur degré de sélectivité. Cet effet semble plus important pour les ligands fortement sélectifs comme le SNC-80 et la deltorphine-II que pour le naltrindole, un ligand faiblement sélectif.

1.5 Caractéristiques des ligands endogènes du récepteur δ -opioïde

Les deltorphines constituent une classe d'heptapeptides isolés de la peau des amphibiens *Phyllomedusa* dont la puissance pharmacologique, l'affinité et la sélectivité de liaison aux récepteurs opioïdes sont très supérieures à celles de tous les ligands opioïdes endogènes ou synthétiques actuellement connus. Le premier de ces peptides fascinants a émergé en 1987 par le clonage de cADN de la peau d'une grenouille (Réf. 8-10). La caractéristique distincte des deltorphines est la présence d'un acide aminé de configuration D à la deuxième position dans l'extrémité N-terminale de leur séquence comparable à celle de la dermorphine, qui est le prototype d'un groupe d'opioïdes mu-sélectifs venant de la même source (Réf. 8-10).

Il existe trois types de deltorphines (A, B et C ou deltorphine, deltorphine-I et deltorphine-II respectivement) mais seulement la deltorphine-II sera traitée dans ce mémoire (Fig 1.5). En effet, la deltorphine-II démontre la plus haute affinité de liaison et la plus grande sélectivité au récepteur delta parmi les trois types de deltorphines. La deltorphine-II est généralement décrite dans la littérature comme étant une molécule bivalente, c'est-à-dire que la séquence des deltorphines est subdivisée en deux parties : un domaine de message (Tyr-D-Ala-Phe-Glu) qui est nécessaire pour la reconnaissance

au ligand et un domaine d'adresse (Val-Val-Gly) qui attribue la sélectivité à chacun des sous-types de récepteurs.

Deltorphine : H-Tyr-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp-NH₂
 Deltorphine-I : H-Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH₂
 Deltorphine-II : H-Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH₂

Figure 1.5 : Séquence des acides aminés des deltorphines.

Il est possible de penser qu'un ligand doit s'ajuster à la cavité de liaison du récepteur tout comme un substrat s'ajuste au site actif d'un enzyme. Par conséquent, le ligand et le récepteur doivent être mutuellement compatibles et plusieurs études ont été entreprises pour déterminer le rôle de chaque acide aminé de deltorphine-II dans le processus d'interaction avec le récepteur δ -opioïde. En général, la liaison des agonistes ou antagonistes delta à la poche du récepteur est caractérisée par la présence d'une amine protonée, d'une hydrophobicité associée aux constituants aliphatiques et aux cycles aromatiques et d'un groupe hydroxyle sur le cycle de tyramine. Plus spécifiquement, la présence d'un azote protoné à l'extrémité N-terminal, des cycles aromatiques des résidus Tyr-1 et Phe-3 et des chaînes latérales des cinquième et sixième résidus sont considérés comme des éléments cruciaux pour que les deltorphines se lient efficacement (Réf.4).

Étant donné la nécessité de la présence de l'azote protoné de l'amine du résidu Tyr-1 et les centres hydrophobes des résidus Tyr-1 et Phe-3, un modèle rigide en forme de T a été proposé pour la structure des deltorphines. Les caractéristiques importantes du modèle sont la présence d'une base forte (amine à côté de la chaîne latérale du résidu Tyr-1) et d'une base faible (amine à côté du cycle du résidu Phe-3) et l'orientation spatiale appropriée des deux résidus aromatiques. Cela nous amène à souligner l'importance du rôle du résidu D-Ala dans le peptide. La substitution du résidu D-alanine à la deuxième position par divers acides aminés fournit l'évidence que la

configuration et les propriétés de la chaîne latérale sont essentielles pour la liaison au récepteur (Réf.4).

L'importance du groupe hydroxyle du résidu Tyr-1 pour la liaison des opioïdes et pour leur bioactivité a été démontrée par la perte d'activité engendrée lors du remplacement par un résidu phénylalanine. En effet, l'orientation spatiale de la chaîne latérale du résidu tyrosine est très importante. De plus, le résidu Phe-3 paraît être crucial dans la liaison de la deltorphine-II au récepteur. La substitution de ce résidu par un Aib achiral, l'acide 1-aminocyclohexane carboxylique ou par d'autres résidus non-polaires démontre qu'un résidu hydrophobe avec une chaîne latérale de longueur spécifique ou d'une certaine orientation spatiale est requis pour une liaison optimale car la plupart des substitutions sont délétères pour la liaison au récepteur delta. Il est intéressant de noter que certains chercheurs pensent que la force de la liaison cation- π qui peut impliquer l'interaction de l'extrémité N-terminale protonée ou un autre résidu cationique du peptide avec une chaîne latérale aromatique de la poche du récepteur, permet de promouvoir la liaison du ligand aux récepteurs opioïdes (Réf.4).

La fonction acide du résidu acide glutamique fournit la charge négative nécessaire à l'obtention de la sélectivité au récepteur delta. Cette charge négative portée par le peptide δ -opioïde distingue les récepteurs delta et mu par répulsion des charges. En effet, la neutralisation de la charge négative dans tous les analogues de deltorphines conduit à l'augmentation de leur interaction avec le récepteur μ -opioïde sans vraiment affecter l'affinité de leur liaison avec le récepteur δ -opioïde. En d'autres termes, l'absence d'un résidu anionique dans l'extrémité C-terminale de la deltorphine-II aboutit normalement à une affinité similaire ou à un manque de sélectivité entre les récepteurs delta et mu (Réf.4).

La nature hydrophobe des cinquième et sixième résidus est cruciale pour maintenir les extraordinaires affinité et sélectivité de la deltorphine-II. En outre, Crescenzi et al. ont conclu que la conformation de la chaîne principale du peptide n'est pas seulement définie par la séquence de l'extrémité N-terminale mais aussi par la contribution des

résidus Val-5 et Val-6 du domaine d'adresse (Réf.11, 12). Certains chercheurs ont déduit que la chaîne principale de la deltorphine-II existe sous forme d'une courbe sinusoïdale dont le térapeptide N-terminal assume soit une conformation hélicale soit une conformation allongée dans lequel le tripeptide C-terminal (Val5-Val6-Gly7-NH₂) se plie en-dessous de la région N-terminale (Tyr1-D-Ala2-Phe3-Glu4) (Fig 1.6) (Réf.13, 14). Cette observation a renforcé l'hypothèse que la deltorphine-II pourrait favoriser une pseudo-cyclisation entre la tête et la queue (« favor head-to-tail pseudo-cyclization ») par un lien hydrogène. La proximité des régions N- et C-terminales de la deltorphine soutient les conclusions tirées au sujet de la deltorphine-II (Réf.12). Cependant, d'autres interprétations des données ont suggéré qu'il existe un équilibre entre un mélange des conformères pliés et étendus dû à la présence possible de plusieurs structures de faible énergie composées de différents types de coudes β (Réf.14).

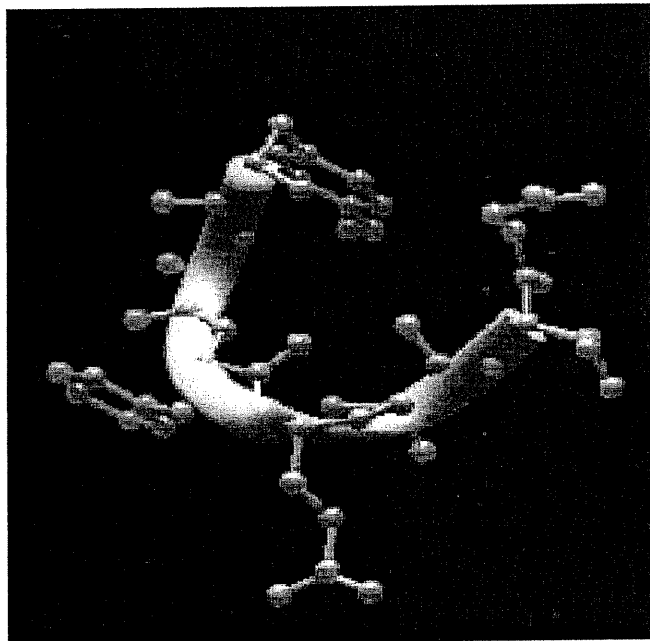


Figure 1.6 : Conformation de base énergie de deltorphine-II.

1.6 Endomorphine 1 et 2

Il y a plus de deux décennies, les trois familles endogènes de peptides opioïdes (endorphines, enképhalines et dynorphines) ont été identifiées et caractérisées. Bien que la sélectivité des enképhalines pour le récepteur delta-opioïde et celle des dynorphines pour le récepteur kappa-opioïde aient été démontrées, aucun ligand endogène n'avait été attribué au récepteur mu jusqu'à très récemment. Zadina et ses collègues ont isolé du cortex humain deux peptides nommés endomorphine-1 et endomorphine-2 (Fig 1.7) (Réf.15).

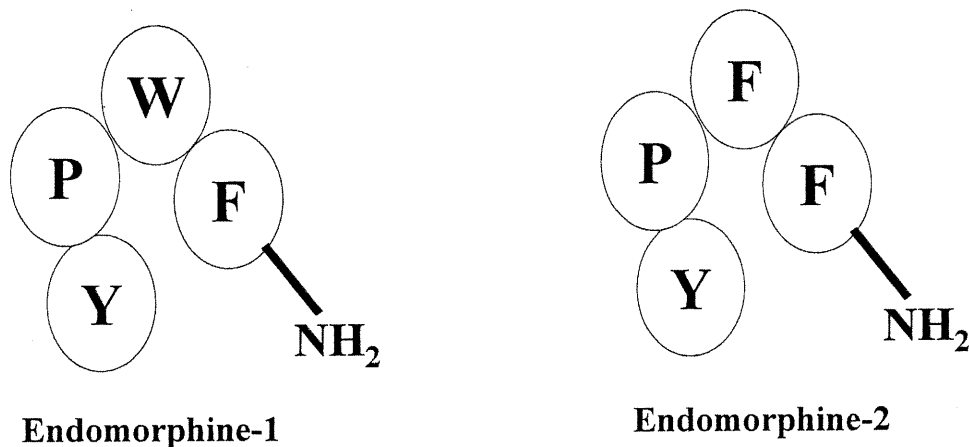


Figure 1.7 : Séquence en acides aminés des endomorphines 1 et 2.

L'endomorphine-1 est largement distribuée dans tout le cerveau, tandis que l'endomorphine-2 est plus répandue dans le tronc cérébral et la moelle épinière (Réf.16). Bien que les endomorphines ne partagent pas une séquence commune aux autres opiacés endogènes connus, ces peptides démontrent une affinité et une sélectivité plus élevées pour le récepteur μ -opioïde. En effet, les valeurs de EC₅₀ des endomorphines (10.78 et 10.64 nM pour l'endomorphine-1 et 2 respectivement) sont légèrement meilleures que

celle de la morphine (80.60 nM). De plus, Monory et al. sont arrivés à la conclusion que les endomorphines ne se lient pas au récepteur delta-opioïde (Réf.15).

1.7 U50,488

Le composé trans-3,4-dichloro-N-méthyl-N-[2-(1-pyrrolidiny)-cyclo-hexyl]-Benzeneacetamide, U50,488, est un agoniste spécifique au récepteur κ -opioïde (Fig 1.8) (Réf.17). C'est un agoniste non peptidique de type acylacétamide et il semble ne se lier qu'à une partie des sites kappa-opioïde contrairement aux molécules appartenant à la famille des benzomorphans. En effet, la majorité des agonistes hautement sélectifs au récepteur kappa-opioïde est dérivée du prototype U50,488 dont la structure est différent de la morphine (Réf.52). Il semble que l'U50,488 nécessite le récepteur kappa en entier, à l'exception de la deuxième boucle extracellulaire, pour se lier au récepteur (Réf.51). Les points de contacts entre la molécules et le récepteur kappa-opioïde se passe au niveau de pyrrolidinyl et le benzenacetamide (Réf. 52).

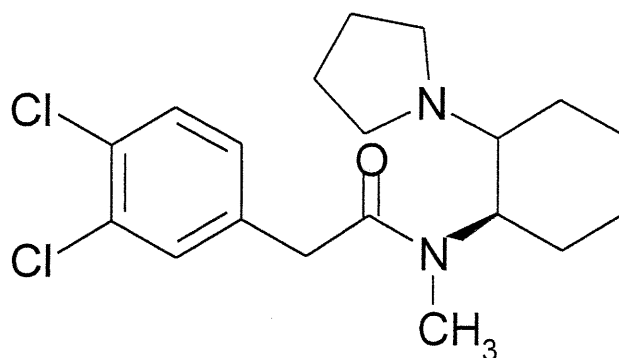


Figure 1.8 : Structure chimique de U50,488.

CHAPITRE II

DICHROISME CIRCULAIRE

Il est maintenant possible de produire une grande variété de protéines par synthèse chimique, particulièrement par synthèse en phase solide, et par des méthodes de recombinaison d'ADN. Ces avancements pour produire des protéines de toutes les sortes ont provoqué une reprise d'intérêt dans le dichroïsme circulaire (CD), une technique spectroscopique qui est sensible à la structure secondaire des protéines et peptides, et qui peut être appliquée aux protéines et aux polypeptides en solution. Cependant, les spectres dérivés d'une spectroscopie de CD n'ont pas la même teneur informationnelle qu'un diagramme de diffraction de rayons-X ou que la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN), mais la technique compte tout de même des avantages certains. La spectroscopie de CD s'est considérablement améliorée ces dernières années et il est maintenant possible d'analyser le spectre d'une protéine pour déterminer la structure secondaire d'un peptide avec une fiabilité élevée (Réf.18).

Le but de cette section est de déterminer un environnement approprié afin de pouvoir étudier la conformation de la troisième boucle extracellulaire. De plus, une information globale de repliement secondaire des peptides peut être obtenue très rapidement avec le CD. Par conséquent, nous avons dépisté les peptides qui ont le plus de conformation pour faire des études plus approfondies par la RMN. La spectrométrie de dichroïsme circulaire nous a permis de caractériser les changements structuraux des peptides induits par l'interaction avec les ligands endogènes du récepteur delta ou mu opioïde, ou agonist kappa-opioïde.

2.1 Théorie de base du dichroïsme circulaire (CD)

Le dichroïsme circulaire (CD) est une variation spéciale de la spectroscopie d'absorption dans la région ultra-violet/visible (UV/VIS) du spectre électromagnétique. Le principe de base de cette méthode est l'interaction de la lumière polarisée avec les substances optiquement actives. Si une onde de lumière linéairement polarisée traverse une substance optiquement active, la direction de la polarisation changera. Ce

phénomène est dépendant de la longueur d'onde. Les ondes de lumières linéairement polarisées peuvent être décrites comme la superposition de deux ondes de lumière circulairement polarisée. Si une substance absorbe ces deux composés circulairement polarisés à différents degrés, c'est-à-dire que si le coefficient d'absorption pour la composante circulairement polarisée de droite est différent de celle pour la lumière circulairement polarisée de gauche, cette différence est décrite en tant que dichroïsme circulaire (Fig. 2.1).

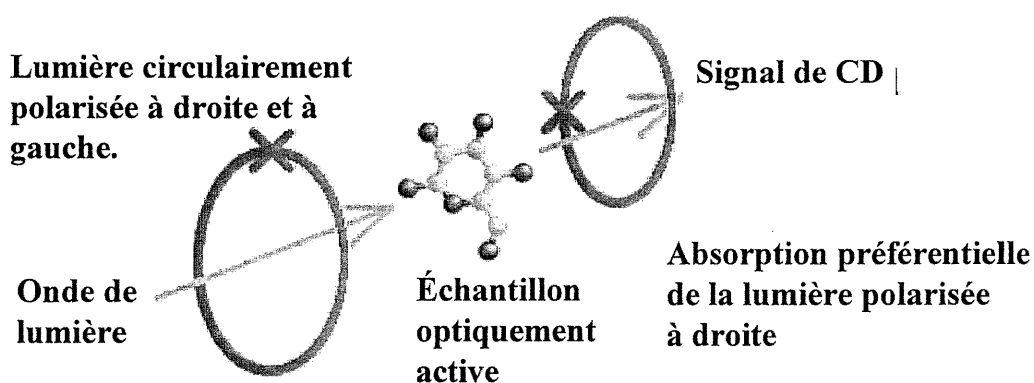


Figure 2.1: Représentation schématique de l'obtention du signal de CD.

2.1.1 Lumière circulairement polarisée

La lumière circulairement polarisée peut être décrite en terme électrique (e) et mouvement magnétique (m) d'onde. Chaque onde a des propriétés de grandeur et d'oscillation. La grandeur d'onde électrique (e) est constante et la direction oscille entraînant le vecteur électrique à tracer un cercle (Réf.20).

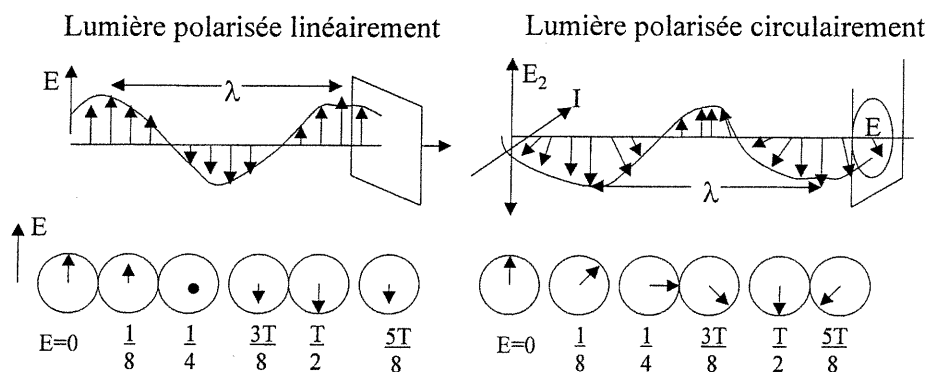


Figure 2.2 : Diagramme schématique montrant la composante électrique de la lumière linéairement polarisée (gauche) et circulairement polarisée (droite). Au-dessous de chacun apparaissent les vecteurs de la composante électrique sont visualisés le long de l'axe de propagation de la gauche du diagramme ci-dessus.

Quand le faisceau de lumière circulairement polarisée traverse un échantillon optiquement actif, l'amplitude de la composante électrique (e) de l'onde est modifiée en raison des changements des coefficients d'extinction molaire de la lumière polarisée à droite et à gauche. Cet effet transforme le vecteur électrique qui trace maintenant une ellipse au lieu d'un cercle (Réf.20).

2.1.2 Mesure du dichroïsme circulaire

Les résultats d'une analyse par CD peuvent être rapportés de différentes façons. L'ellipticité moléculaire moyenne, la différence des coefficients d'extinction ($\Delta\epsilon$) et l'ellipticité molaire sont diverses unités mentionnées dans la littérature. L'ellipticité moléculaire est la façon la plus utilisée (unités : degré. cm^2 . dmol^{-1}) et la différence des coefficients d'extinction ($\Delta\epsilon$) est une unité fréquente des spectres tracés par l'appareil de

CD. Elle est désignée sous le nom de dichroïsme circulaire molaire (unités : litre. mol⁻¹.cm⁻¹), pour ne pas être confondue avec l'ellipticité molaire (unités : degré. decilitres. mol⁻¹. dm⁻¹) (Réf.20)

L'ellipticité est définie comme la tangente du rapport entre les axes d'ellipticité mineur et majeur (Fig 2.3). Les instruments plus modernes de CD mesurent la différence d'absorption (ΔA) de la lumière circulaire polarisée à droite (A_D) et à gauche (A_G) en fonction de la longueur d'onde

$$\Delta A(\lambda) = A_G(\lambda) - A_D(\lambda) = [\varepsilon_G(\lambda) - \varepsilon_D(\lambda)]/c = \Delta\varepsilon l c.$$

Le CD est défini comme la différence des coefficients d'extinctions (ε) et le $\Delta\varepsilon$ est l'ellipticité molaire (Réf.21).

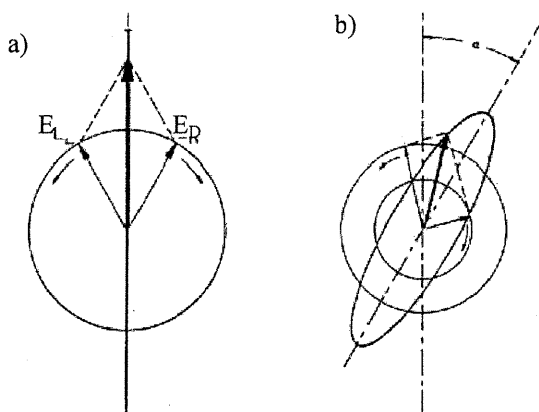


Figure 2.3 : (a) la lumière linéairement polarisée peut être visualisée comme la résultante de la superposition de lumières circulairement polarisées d'amplitude et de phase égales; (b) l'absorption différente de la lumière polarisée de gauche et de droite mène à l'ellipticité (CD).

L'absorption différentielle observée varie habituellement de quelques centièmes à quelques dixièmes de un pourcentage, ceci pouvant cependant être déterminé de façon

exacte (Réf.22, 23). Ainsi, si les données brutes sont tracées sur l'enregistreur de diagramme représentant l'ellipticité de l'échantillon, l'équation de radians sera

$$\theta_r = \frac{2.303}{4} \cdot (A_G - A_D) \cdot [\text{radian}]$$

où : θ_r = est l'ellipticité en radian

A_G = lumière polarisée à gauche

A_D = lumière polarisée à droite

Lorsque convertie en degrés, cette équation devient :

$$\theta_d = \frac{2.303}{4} \cdot (A_G - A_D) \cdot \frac{180}{\pi} \cdot [\text{degré}]$$

Pour pouvoir comparer ces valeurs d'ellipticité, elles doivent être converties en valeurs normalisées. La façon de rapporter les résultats la plus généralement utilisée dans les travaux portant sur les protéines et les peptides est l'ellipticité molaire moyenne par résidu (θ_{mr}). Quand la longueur de la cellule (l) utilisée pour mettre la solution à mesurer, la concentration (c) de l'échantillon, le poids moléculaire (M) du peptide ou de la protéine et le nombre de résidu (n_r) du peptide ou de la protéine sont considérés, l'équation devient

$$\theta_{mr} = \theta_d \cdot \frac{M}{c \cdot l \cdot n_r}$$

Avec les unités appropriées (car les spectroscopistes de CD utilisent la décimole) l'équation devient

$$\theta_{mrd} = \frac{\theta_{mr}}{10} \left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol} \cdot \text{résidu}} \right]$$

2.1.3 Dichroïsme circulaire des protéines et peptides

Par définition, la spectroscopie CD est la mesure différentielle d'absorbance entre la lumière circulaire polarisée à gauche et à droite. La majorité des protéines étant des molécules chirales, la spectroscopie CD devrait permettre d'obtenir des informations sur la structure en trois dimensions de ces molécules. Ainsi, cette méthode peut fournir des informations au sujet de la structure secondaire et tertiaire d'une protéine ou d'un peptide donné. En effet, l'absence de structure régulière a comme conséquence une intensité nulle dans le CD, alors qu'une structure ordonnée donne un spectre qui peut contenir des signaux positifs et négatifs (Réf. 24).

Les chromophores des protéines peuvent être divisés en trois classes : le lien peptidique, les chaînes latérales des acides aminés et les groupes prosthétiques. Des informations structurelles importantes peuvent être révélées par l'absorption dans la région des rayons ultra-violet du spectre des liaisons peptidiques (chromophores symétriques) et des chaînes latérales des acides aminés. La plus basse transition d'énergie dans le chromophore du peptide est la transition de faible intensité $n \rightarrow \pi^*$ observée à 210-220 nm (Fig 2.4a). Cette transition ($n \rightarrow \pi^*$) apparaît, dans la forme hélicoïdale du polymère, comme une petite épaulement près de 220 nm (Fig 2.4b). La transition du $\pi \rightarrow \pi^*$ mène à une bande négative à 208 nm et à une bande positive très intense à 192 nm. Cette transition ($\pi \rightarrow \pi^*$) est responsable de la majorité de l'absorbance de lien peptidique. L'intensité et l'énergie de ces transitions dépendent de ϕ et ψ , c'est-à-dire de la structure secondaire (Fig 2.4a) (Réf.25, 26)

Le spectre de CD d'un feuillet β comporte une bande négative à 218 nm (transition $\pi \rightarrow \pi^*$) et une bande positive à 196 nm (transition $n \rightarrow \pi^*$) tandis que le spectre de CD d'une conformation aléatoire consiste en une bande positive se trouvant à 212 nm (transition $\pi \rightarrow \pi^*$) et une bande négative à 196 nm (transition $n \rightarrow \pi^*$) (Fig 2.4b) (Réf.25, 26).

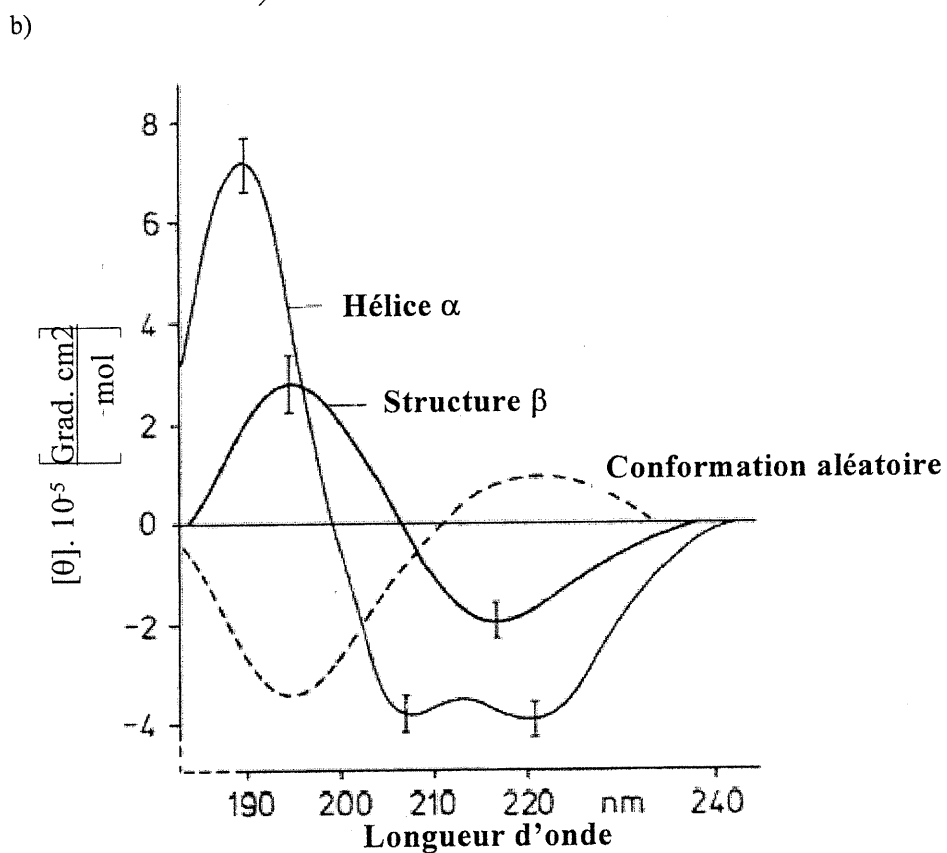
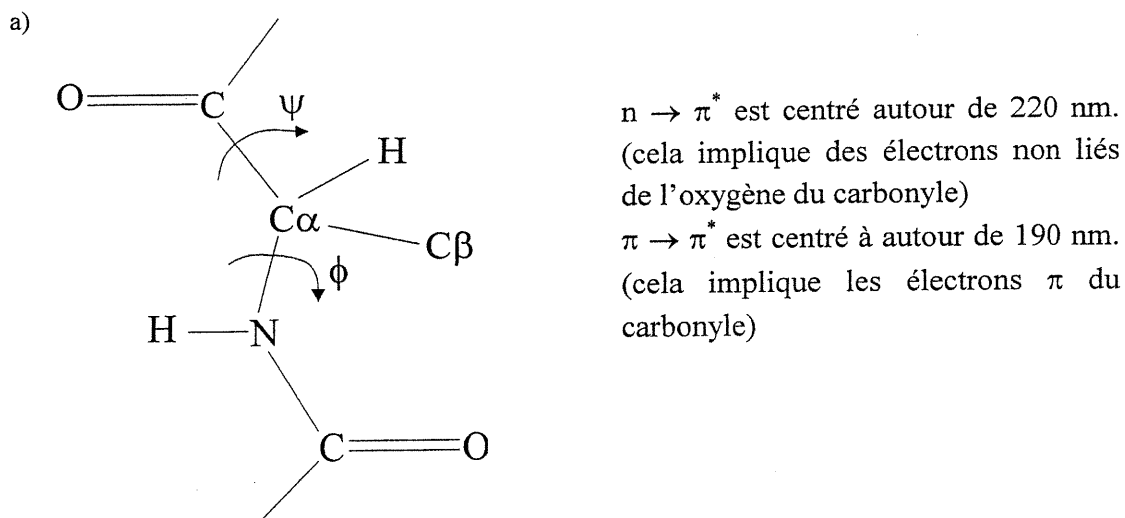


Figure 2.4 : a) Représentation schématique de la structure d'un acide aminé montrant la rotation des angles ψ et ϕ de la chaîne principale d'un peptide; b) spectre de CD correspondant aux structures secondaires hélice α , feuillet plissés et arrangement aléatoire.

Les trois chaînes latérales aromatiques qui se trouvent dans les protéines (groupe phényle de Phe, groupe phénol de tyrosine, et groupe indole de tryptophane) ont également des bandes d'absorption dans le spectre ultra-violet. Cependant, pour les protéines, les contributions au spectre de CD (où l'information de la structure secondaire est localisée) sont habituellement négligeables. Les résidus aromatiques, si rarement abondants, peuvent avoir des effets significatifs sur les spectres CD dans la région inférieure à 230 nm compliquant ainsi l'analyse.

Comme les autres formes de la spectroscopie d'absorption (UV/VIS, IR, etc), le CD est particulièrement puissant pour étudier les changements conformationnels. Dans la région 230-178 nm, il est possible d'observer les changements de conformation de la chaîne principale du peptide lors de la liaison du substrat ou après dénaturation. Une estimation du pourcentage de la structure secondaire (hélice α , feuillet β , coude β , conformation aléatoire) contenue dans le peptide est rendue possible aussi (Réf.27).

2.2 Partie expérimentale

2.2.1 Provenance des produits

Quatre peptides de longueurs différentes (LB, M2, M1 et PB), contenant tous la partie de la troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde et quelques acides aminés des parties C- et N-terminales de TM6 et TM7 respectivement, ont été préparés (Tab.II.I et Fig 2.5) par le Dr Ralf Schmidt à AstraZeneca R&D Montréal. Les peptides ont été synthétisés sur support solide en utilisant un synthétiseur multiple de type de la compagnie Proteur Technologies. Des procédures standards de chimie de type 9-fluorénylméthyl carbamate (« Fmoc ») avec O-(7-azabenzotriazol-yl)-tétraméthyl uronium hexafluoro-phosphate *HATU* comme réactif de couplage ont été sélectionnées. Le polymère de départ était une résine amide de type « CLEAR » ou « TentaGel R

RAM » (Peptides International) avec des capacités de chargement de 0.4 mmol/g et 0.22 mmol/g respectivement. Les peptides bruts ont été clivés de la résine au moyen d'un mélange acide trifluoroacétique/triisopropylsilane/thioanisole/H₂O (94 :2 :2 :2). Les peptides ont été isolés par précipitation dans de l'éther diéthylique ils ont été purifiés par chromatographie préparative avec un instrument HPLC Hitachi équipé d'une colonne Jupiter RP-4 (250x22mm). Les produits synthétisés ont été obtenus avec un rendement élevé et une pureté supérieure à 96% telle que déterminée par analyse HPLC avec instrument Jupiter RP-18 muni d'une colonne Vydac 218TP54 et par LC-MS. La spectrométrie de masse (« electrospray ») à l'aide d'un spectromètre de masse a fourni le poids moléculaire approprié de chaque peptide.

Tableau II.I : Séquence d'acides aminés des quatre peptides utilisés pour l'expérimentation.

	Séquence
PB (283-297)	V-W-T-L-V-D-I-D-R-R-D-P-L-V-V-NH ₂
M1 (283-299)	V-W-T-L-V-D-I-D-R-R-D-P-L-V-V-A-A-NH ₂
M2 (281-279)	V-I-V-W-T-L-V-D-I-D-R-R-D-P-L-V-V-NH ₂
LB (279-299)	I-F-V-I-V-W-T-L-V-D-I-D-R-R-D-P-L-V-V-A-A-NH ₂

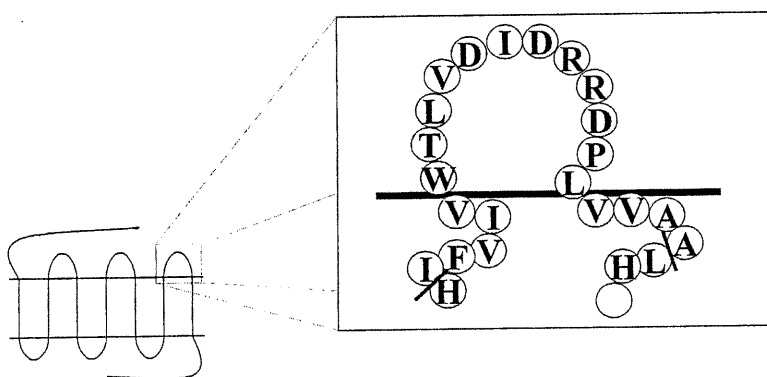


Figure 2.5 : Présentation schématique de la troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde humain.

Le deltorphine-II a été achetée de la compagnie BACHEM (CA, USA). L'endomorphine-1 et l'endomorphine-2 ont été achetées de la compagnie BACHEM Bioscience Inc (PA, USA). Leur pureté a été établie à 98% et 99% respectivement. Le composé U50,488 et le phosphate de sodium ont été achetés de la compagnie Sigma (MO, USA). Le trifluoroéthanol (TFE) et l'hexafluoroisopropanol (HFIP) ont été achetés de la compagnie Aldrich Chemical Inc (ON, CN). Le dodécylsulfate de sodium (SDS) a été acheté de la compagnie Bio-RAD Laboratories.

2.2.2 Préparation des échantillons

Pour chaque échantillon de la troisième boucle extracellulaire en solution, quelques milligrammes de peptide ont été dissous dans un des solvants suivant : TFE : H₂O (440 µl/60µl), HFIP : H₂O (440 µl/60µl), SDS (28 mg dissous dans 500 µl de tampon de phosphate de sodium (NaPi), 50 mM, à pH 6) à une concentration finale de 2 mM. Le pH des solutions aqueuses est vérifié à l'aide d'un pH-mètre de marque 340 CORNING muni d'une (« Semi-Micro Combo »). Les solutions de peptides dissous dans le TFE/ H₂O avait une valeur de pH d'environ 3.6 et celles dissoutes dans HFIP/ H₂O avait une valeur de pH de 1.8. Le pH de certains échantillons a été ajusté à des valeurs plus hautes avec du NaOH.

Après avoir laissé chaque échantillon reposer pendant une heure, afin que tout le peptide soit bien solubilisé et avoir une solution claire, la solution est transférée dans une cellule de CD de 0.1 mm de longueur (1x 165-QS). Les spectres sont enregistrés dans un spectropolarimètre de marque Jasco J710 à la température de la pièce. 15 scans ont été enregistrés pour chaque échantillon sur une région de longueur d'ondes entre 260 et 180 nm. Une résolution de 0.2 nm, une largeur de bande de 1.00, une vitesse de scan de 100 nm/min et un temps de réponse de 0.25 sec ont été utilisés. Les spectres enregistrés ont été améliorés par la soustraction du spectre contrôle qui est le solvant

utilisé sans le peptide. Ensuite, le spectre est converti dans les unités de l'ellipticité molaire par résidu ($\text{degré cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$).

2.3 Résultats et discussion

Le premier volet de notre projet est de trouver un solvant approprié pour dissoudre le LB tout en ayant une conformation stable. Au début, on a essayé les micelles de SDS car c'est le détergent le plus utilisé pour former des micelles comme alternative aux vésicules de bicouches (Réf.28, 45). Nous avons observé que le LB n'est pas tout à fait soluble dans le SDS car il y a un peu de précipité au fond du tube. Le spectre de CD montre une bande négative à 218 nm et une bande positive à 193 nm indiquant la présence de la structure β dans la molécule (Fig 2.6). La présence de précipitation et la forme du spectre indiquent qu'il y a probablement un phénomène d'agrégation du peptide. Nous avons opté pour le système de cosolvants TFE/H₂O. Le TFE est un solvant organique bien connu pour sa capacité d'induire une structure secondaire aux peptides et protéines. En effet, l'ajout de TFE aux solutions aqueuses dans lesquelles le peptide est soluble stabilise la conformation hélicoïdale. De plus, un certain nombre d'études ont prouvé que les tendances conformationnelles des peptides dans le TFE sont semblables à celles qui se produisent quand les peptides interagissent avec les récepteurs ou les membranes (Réf.29, 46). La forme du spectre de CD obtenu est caractéristique d'un peptide avec une structure secondaire partiellement hélicoïdale car il y a deux bandes négatives à 222 et 208 nm accompagnées d'une bande positive à 192 nm. Un spectre similaire a été observable pour le LB quand il est solubilisé avec le cosolvant HFIP/H₂O (Fig 2.6). Le cosolvant HFIP/H₂O a été choisi pour avoir de meilleurs résultats dans les expériences de RMN (voir chapitre 3).

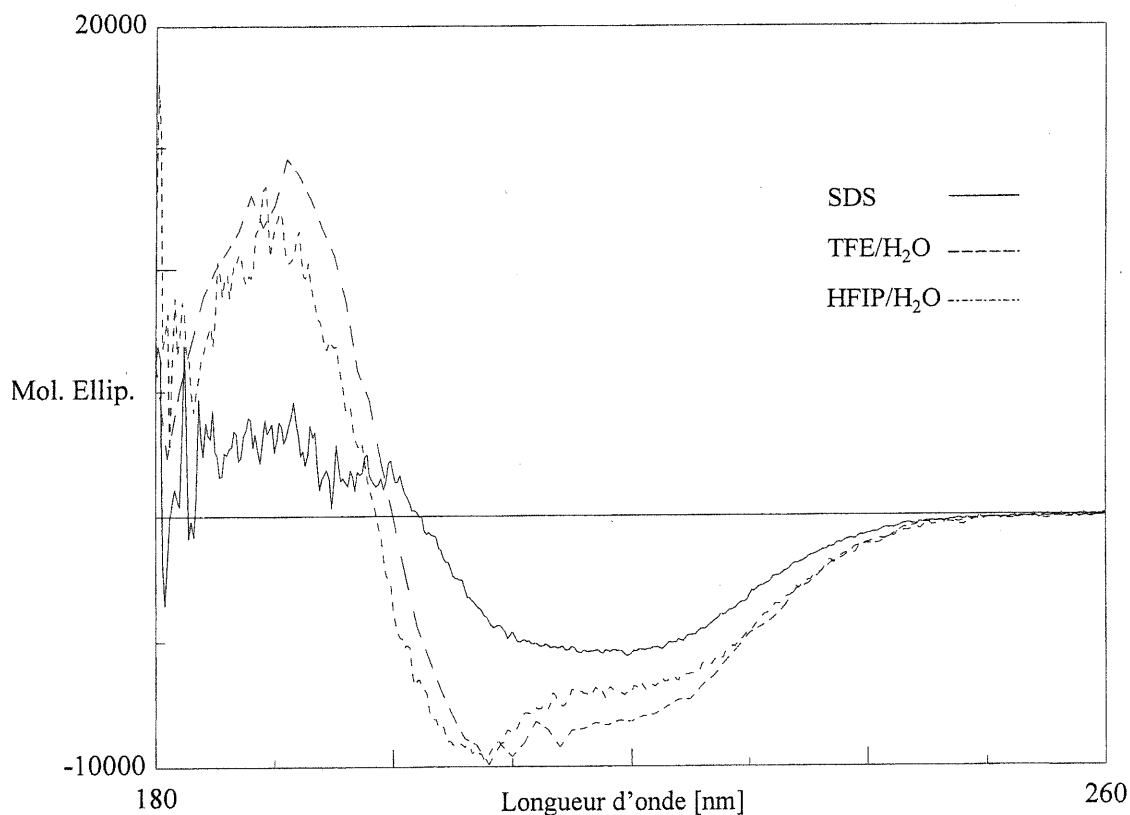


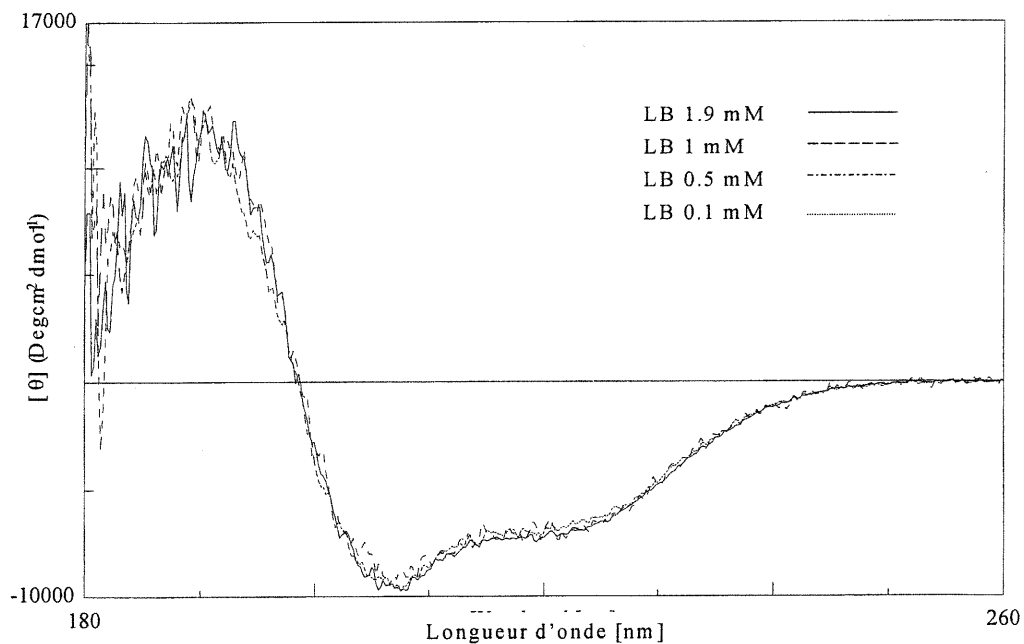
Figure 2.6 : Spectre de dichroïsme circulaire de LB dans des mélanges aqueux de SDS, TFE et HFIP.

Pour s'assurer que l'agrégation ne se produit pas à une concentration de 2 mM du LB dans la solution HFIP/H₂O, des spectres de CD sont enregistrés pour quatre concentrations entre 2 et 0.1 mM. La forme des spectres de CD est restée constante pour toutes ces concentrations (Fig. 2.7a) ce qui nous assure que la conformation adoptée par le LB n'est pas due au phénomène d'agrégation.

Le pH de l'échantillon du LB dans HFIP/H₂O a une valeur de 1.8 (cette valeur de pH est acide par rapport au pH des compartiments cellulaires). Nous avons voulu vérifier si la forme de spectre de CD changeait en augmentant la valeur de pH à 5 (pH physiologique ~ 7). D'après les spectres, la conformation de peptide demeure la même dans les deux milieux (pH 1.8 et 5). Cela suggère que les charges sur les chaînes latérales du peptide (Asp, Glu) n'influencent pas la conformation du peptide. Concernant

l'arginine, il est toujours chargé positivement dans les deux milieux (pH 1.8 et 5) car sa valeur de point isoélectrique est de 10.8.

a)



b)

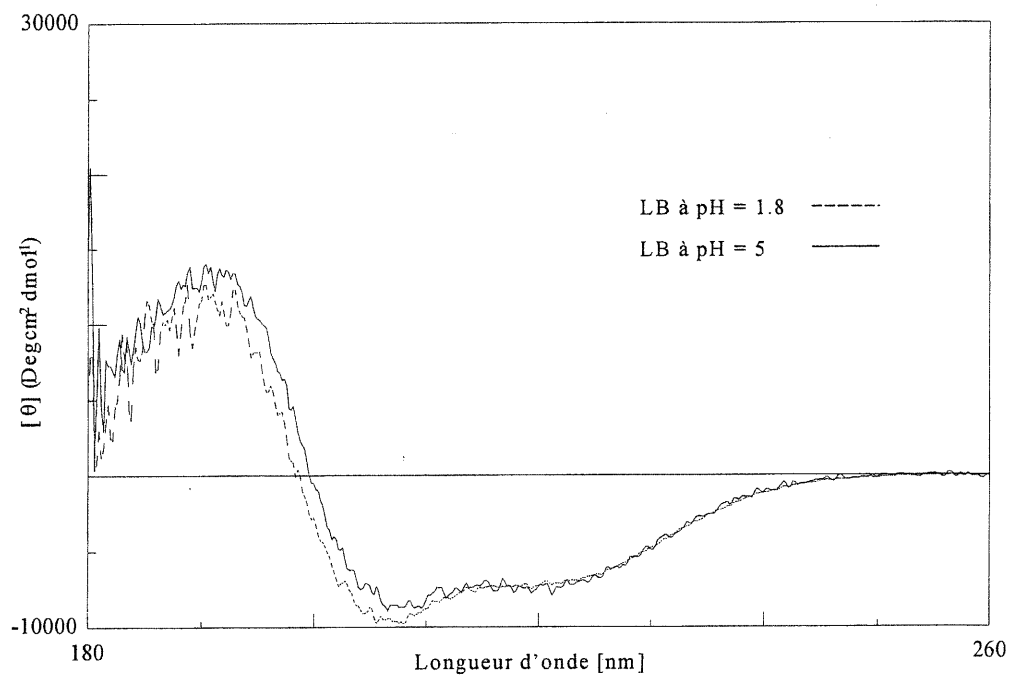


Figure 2.7 : Spectre de CD de LB a) à différentes concentrations (2 mM, 1mM, 0.5 mM et 0.1 mM); b) à différents pH (1.8 et 5) dans le cosolvant HFIP/H₂O.

A présent, nous avons établi que le LB adopte une conformation partielle d'hélice- α et que cette dernière n'est pas due à l'agrégation du peptide. Ceci nous amène au deuxième volet de l'étude qui est de déterminer quels sont les acides aminés responsables de la formation de cette conformation d'hélice. Pour cela, les trois autres peptides (M1, M2 et PB) ont été synthétisés. La seule ressemblance entre tous les peptides est la présence de la partie extracellulaire au complet (voir Tableau II et Fig. 2.5) et nous pouvons donc déterminer le rôle des acides aminés transmembranaires affectant la conformation de la troisième boucle extracellulaire de récepteur delta-opioïde humain.

Le spectre de CD de chaque peptide a été pris (Fig. 2.8) dans les mêmes conditions que le LB (concentration de peptide, ratio HFIP/H₂O, pH et température). Le spectre de M2 montre une conformation partiellement hélicoïdale avec deux bandes négatives, une à 222 nm et l'autre à 203 nm, et une bande positive à 190 nm. Il est à noter que la deuxième bande négative (203 nm) est déplacée vers la gauche par rapport au spectre typique d'hélice- α . Cela peut nous indiquer que M2 adopte une conformation d'hélice moins prononcée que LB. D'après ces résultats, il est seulement possible de dire que l'absence de deux acides aminés du côté N-terminal (isoleucine et phénylalanine) et de deux acides aminés du côté C-terminal pourrait déstabiliser la conformation d'hélice dans le LB (des conclusions plus détaillées pourront être faites dans le chapitre sur la RMN).

M1 et PB semblent avoir une conformation moins ordonnée. Nous ne pouvons pas dire qu'ils aient une conformation aléatoire (bande négative à 196 nm et une bande positive à 212 nm) car ils semblent contenir quand même une petite épaule à 222 nm et une bande positive à 190 nm. M1 semble avoir plus de conformations que PB car la petite épaule à 222 nm est plus visible dans le spectre de CD de M1 que dans celui de PB. La différence entre les deux peptides est l'ajout de deux alanines au côté C-terminal du PB.

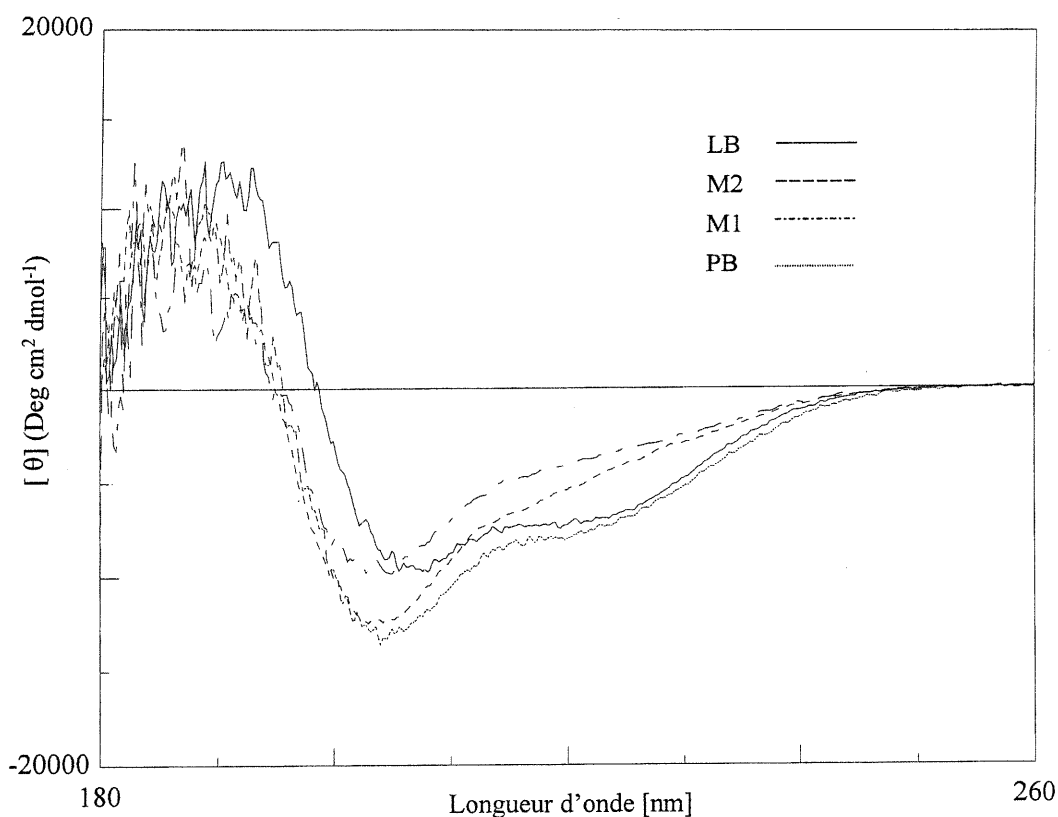


Figure 2.8 : Spectre de CD de LB, M2, M1 et PB dans un mélange HFIP/H₂O à une concentration de 2 mM.

En somme, plus nous éliminons des acides aminés hydrophobes du sixième et septième domaine transmembranaire, plus la troisième boucle extracellulaire perd sa conformation hélicoïdale.

Le troisième volet consiste à examiner les changements de conformation provoqués par l'interaction de la troisième boucle extracellulaire du récepteur delta avec la deltorphine-II (ligand endogène du récepteur δ -opioïde). En même temps, la comparaison de ces modifications entre les trois peptides sera faite (LB, M2 et M1). Il est à noter que le PB n'a pas été inclus dans les résultats car il a le même comportement que M1.

Le spectre de CD de LB a subi une certaine modification lors de l'ajout de la deltorphine-II (Fig. 2.9). Tout d'abord, la bande négative à 222 nm a diminué d'intensité et la bande négative à 208 nm a été déplacée vers la gauche (205 nm). Le spectre de CD de LB+Delto-II manifeste tout comme le LB seul une conformation partielle d'hélice mais les deux n'auront pas le même pourcentage d'hélice. Pour l'instant nous ne pouvons pas en dire davantage car le spectre de CD ne montre pas assez d'informations pour préciser le type de changement que le LB a subi.

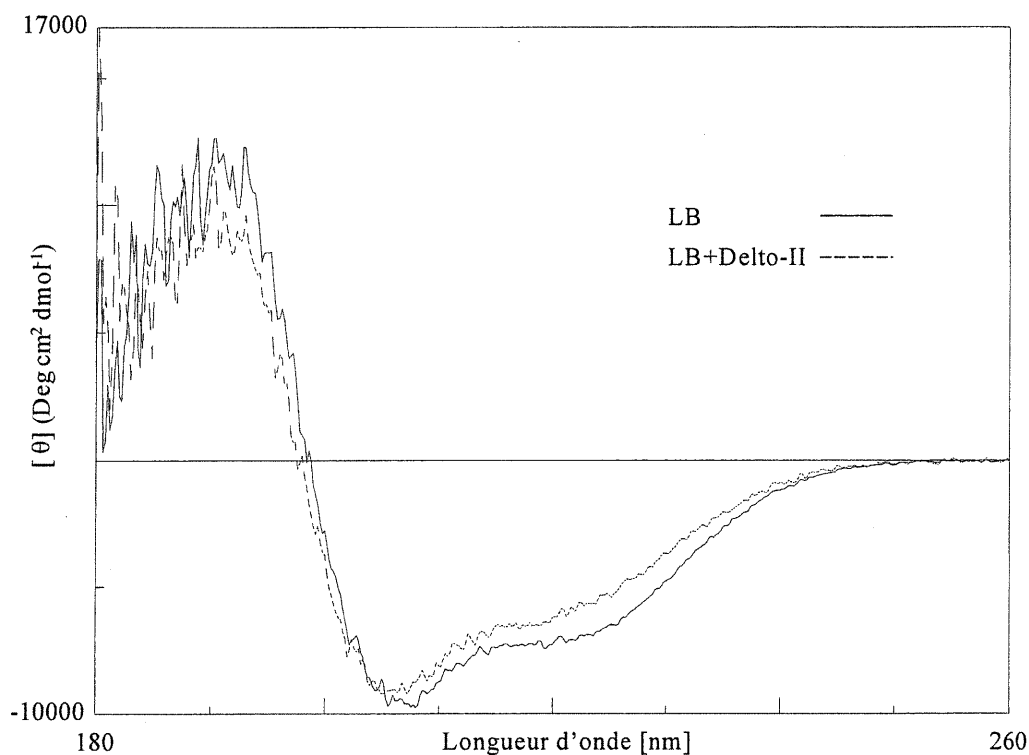


Figure 2.9 : Spectre de CD de LB seul ou en présence de deltorphine-II dans un mélange HFIP/H₂O à une concentration de 2 mM.

Tout comme LB, M2 a aussi encouru des modifications mais moins importantes. La bande négative à 222 nm a presque disparu mais la bande négative se trouvant à 203 nm garde toujours la même place (Fig. 2.10). Cela est probablement dû au fait que M2 a une hélice moins stable que LB. Le déplacement de l'absorbance de 208 à 202 nm

démontre cette diminution. Par contre, l'addition de la deltorphine-II à M1 ne semble pas affecter grandement la conformation du peptide. Il est vrai que la bande négative à 204 nm semble plus intense que celle observée quand le peptide est seul mais cette bande est déplacée vers la gauche, c'est-à-dire vers la partie de conformation aléatoire (Fig. 2.11).

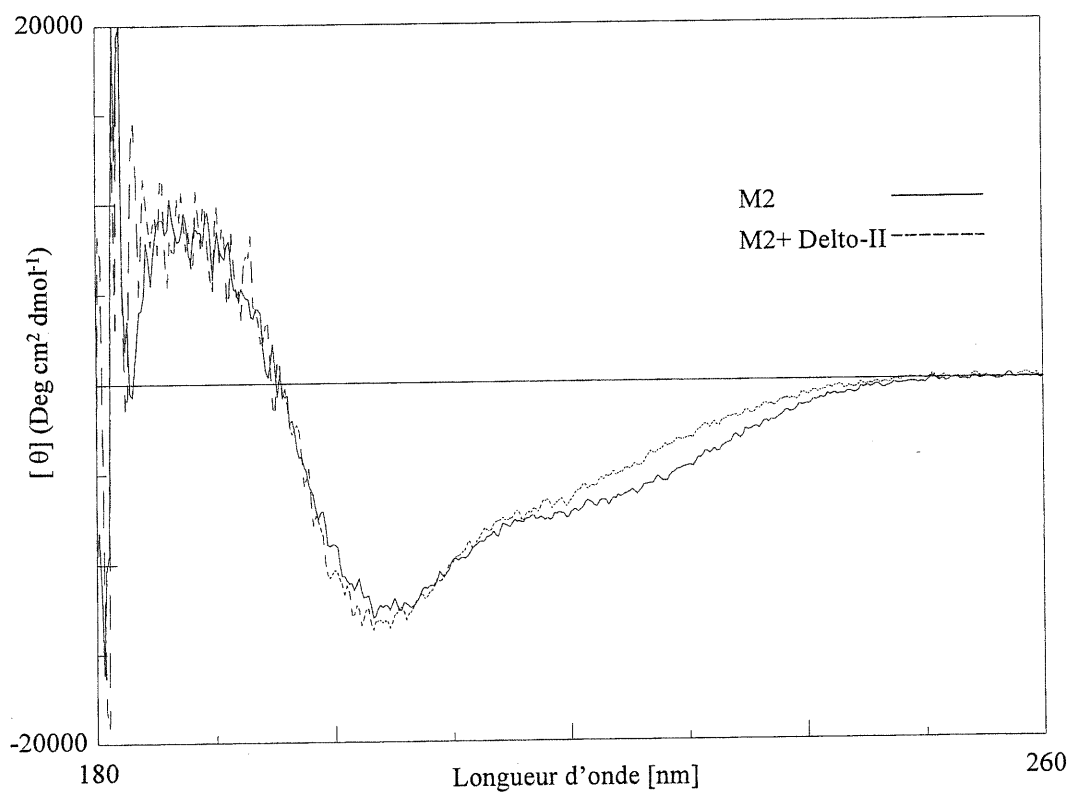


Figure 2.10 : Spectre de CD de M2 seule ou en présence de la deltorphine-II dans un mélange HFIP/H₂O à une concentration de 2 mM.

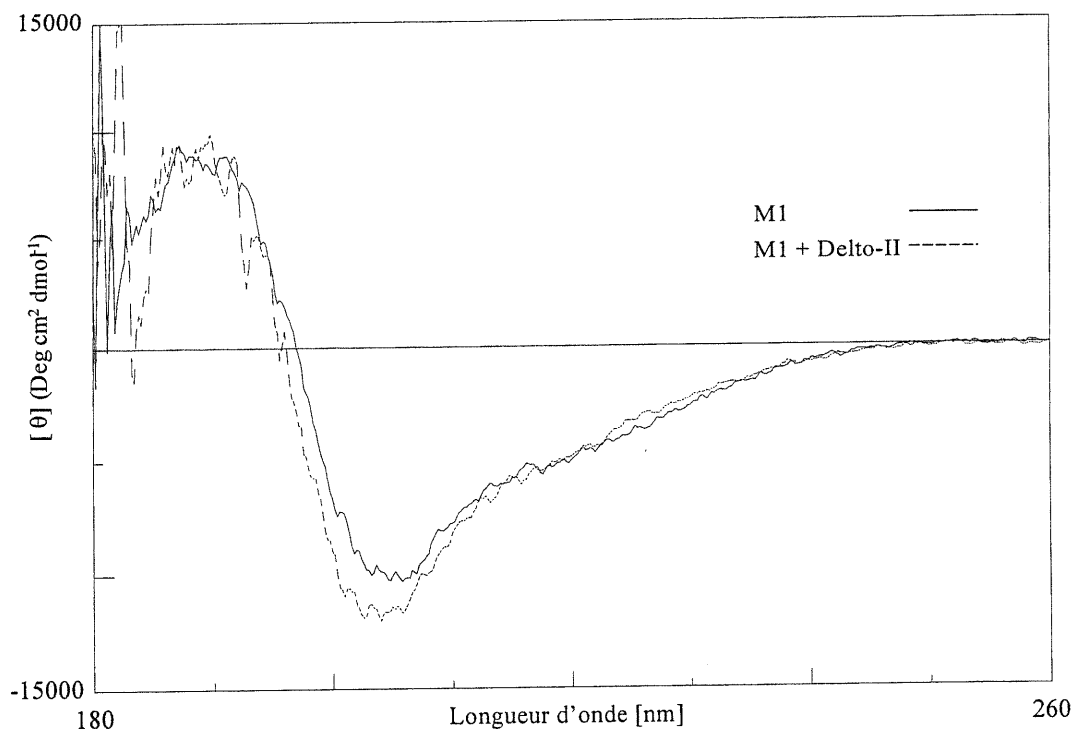


Figure 2.11 : Spectre de CD de M1 seule ou en présence de la deltorphine-II dans un mélange HFIP/H₂O à une concentration de 2 mM.

Le dernier volet de ce chapitre s'intéresse à vérifier si les ligands endogènes des récepteur μ -opioïde (endomorphine-1 et endomorphine-2) et κ -opioïde (U50,488) vont affecter la conformation de la troisième boucle extracellulaire δ -opioïde. Selon les spectres de CD de LB+Endo1 et LB+Endo2 (Fig 2.12a et 2.12b), ces deux peptides changent la conformation de LB. Il est intéressant de noter que le spectre de CD de l'endomorphine-2 en présence de LB est un peu semblable à celui de la deltorphine-II (la bande négative à 222 nm a diminué d'intensité). Dans le cas de l'endomorphine-1, la bande négative à 222 nm diminue d'intensité et elle ne garde pas la même forme. De plus, la bande négative à 208 est devenue un peu plus intense que quand le LB est seul. Nous pouvons présumer qu'il existe une interaction entre les endomorphines et la troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde. Mais cette interaction ne semble pas être assez forte ou complète pour que les essais de liaisons (binding assay) puisse les détecter (Nous reviendrons sur le sujet dans la partie discussion).

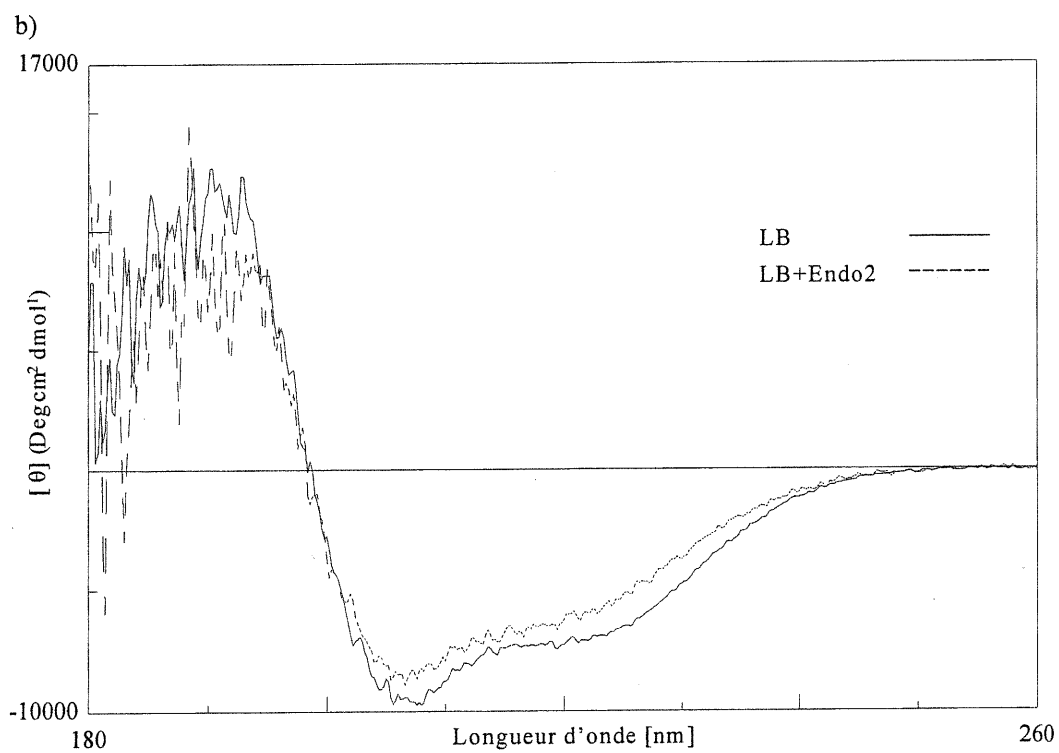
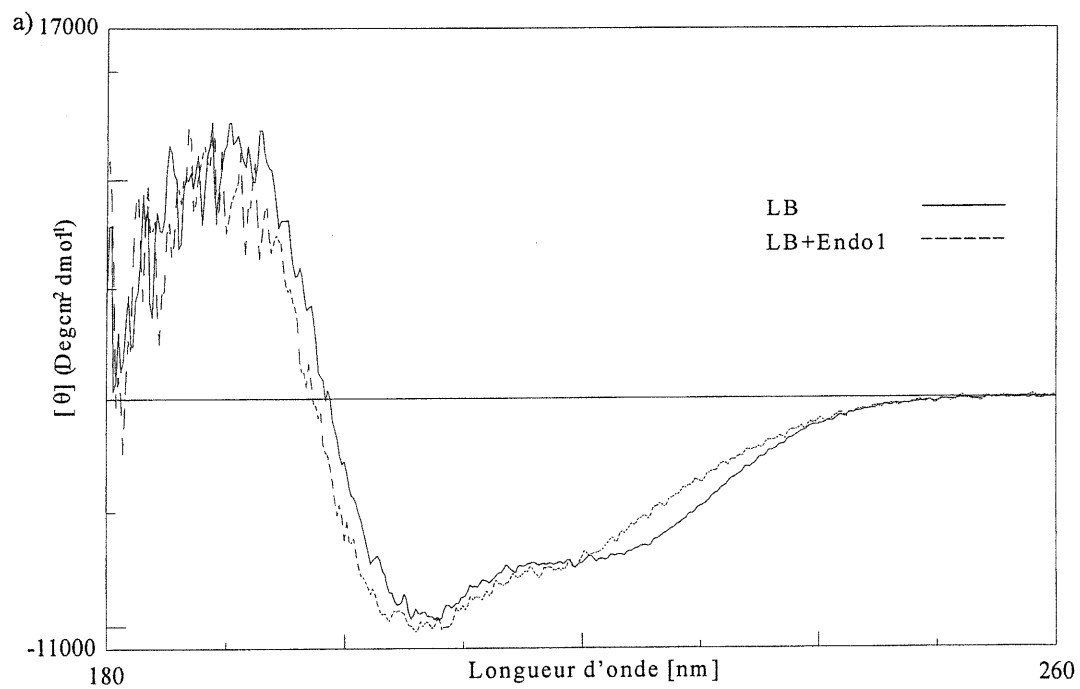


Figure 2.12 : Spectre de CD de LB seule ou en présence de a) endomorphine-1; b) endomorphine-2 dans un mélange HFIP/H₂O à une concentration de 2 mM.

Dans le cas de l'agoniste κ -sélectif, le spectre de CD est demeuré le même lorsque LB est en présence ou en absence de l'agoniste (Fig. 2.13). Il apparaît donc que l'agoniste U50,488 n'affecte pas la conformation de la troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde.

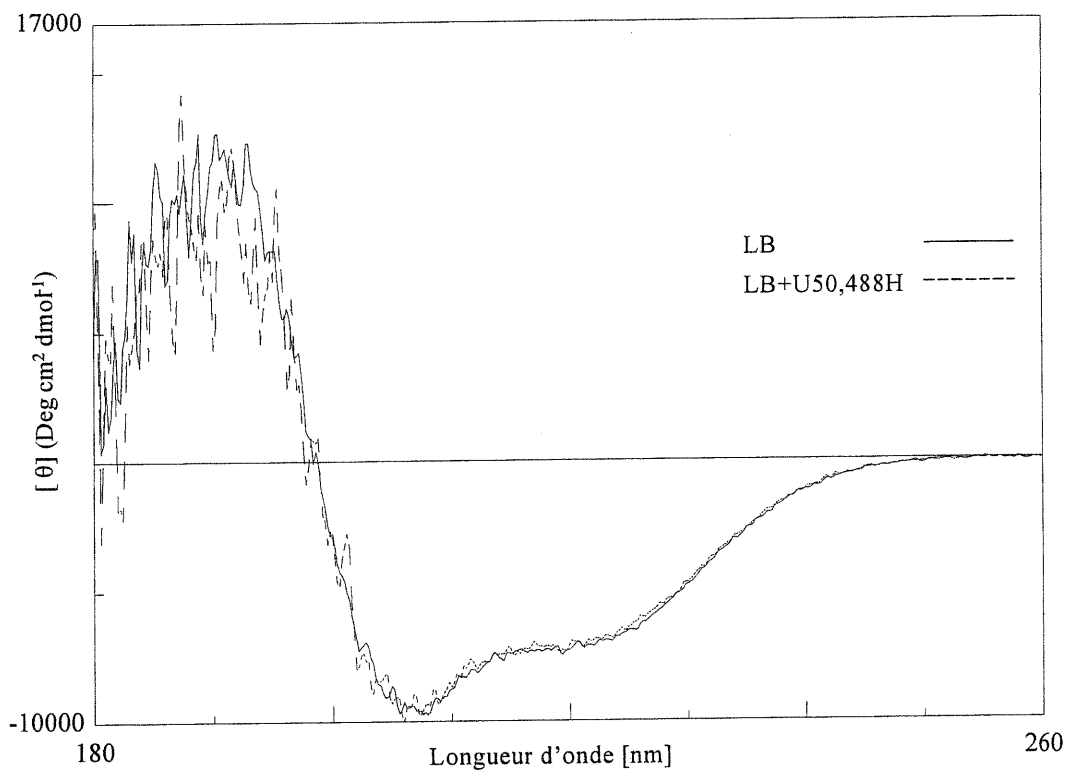


Figure 2.13 : Spectre de CD de LB seule ou en présence de U50,488 dans un mélange HFIP/H₂O à une concentration de 2 mM.

CHAPITRE III

RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

3.1 Historique

Parmi les diverses méthodes spectroscopiques permettant d'étudier la structure et les comportements physico-chimiques des arrangements moléculaires, la résonance magnétique nucléaire (RMN) est relativement récente. En effet, les premières expériences de RMN ont été conduites à la fin de l'année 1945 par deux équipes américaines. Les premiers résultats furent publiés dans les premiers mois de 1946 par Edward M. Purcell et Félix Bloch. Ces travaux leur valurent conjointement le Prix Nobel de Physique en 1952. Ce n'est qu'au début des années 1970 que la spectroscopie RMN prit son essor grâce aux travaux du suisse Richard R. Ernst (Prix Noble de Chimie en 1991). Dès 1966, il proposa en collaboration avec Willian A. Anderson d'utiliser des techniques impulsionnelles pour générer des signaux qui seraient analysés par transformée de Fourier. En utilisant cette technique, un spectre de fréquence en une dimension (1D) présentant les résonances caractéristiques de la molécule étudiée est obtenu. En quelques années, la RMN aura bénéficiée de formidables progrès. Mais ces techniques impulsionnelles à 1D ne donnent que des informations partielles et certaines corrélations sont souvent difficiles voire impossible à détecter dans des spectres 1D. Le belge Jean Jeener proposa en 1971 de faire une spectroscopie à deux dimensions. La théorie de la spectroscopie RMN bidimensionnelle a été mise en pratique par Ernst en 1975 et par Freeman en 1977. Cette technique de RMN 2D constitue de nos jours la base d'un grand nombre d'expériences dans tous les domaines de la RMN, et est devenue une formidable technique d'analyse de routine. A présent, la RMN est développée et utilisée de façon spectaculaire dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie, la biochimie, la pharmacologie, les matériaux et elle trouve aussi des applications en imagerie médicale (Réf.30).

Pendant les dix dernières années, la spectroscopie de RMN s'est avérée être une alternative puissante à la cristallographie pour la détermination de la structure tridimensionnelle des macromolécules. La technique de RMN a l'avantage de fournir

une structure moléculaire en solution et ainsi évite le processus de cristallisation nécessaire en radiocristallographie. Cependant, cette technique se voit limitée aux macromolécules de moins de 35-40 kD. Heureusement, un grand nombre de protéines globulaires et la plupart des domaines de protéine tombent dans cette région de poids moléculaire (Réf.27) et par conséquent, il est possible de déterminer la structure secondaire d'une protéine en utilisant les techniques de RMN sans avoir à déterminer la structure tridimensionnelle. Des trois méthodes les plus généralement utilisées pour la détermination de la structure secondaire d'un peptide sans recours à la structure tridimensionnelle, la RMN est potentiellement la plus puissante. À la différence des déterminations de structure secondaire par dichroïsme circulaire et par infrarouge, qui fournissent le contenu global de la structure secondaire (% d'hélice, % de feuillet bêta, etc), les paramètres de la RMN permettent de localiser les structures secondaires de segments spécifiques de la chaîne des polypeptides. Cependant, l'obtention de la structure secondaire par les données de RMN exige considérablement plus de composé (milligrammes), plus d'effort et de temps d'analyse que les autres techniques spectroscopiques. De plus, la résolution des spectres, qui dépend directement de la puissance des champs magnétiques utilisés pour exciter les atomes constitue une limitation importante. Cette limite dans la résolution restreint la RMN à l'étude de protéines de taille moyenne (Réf.27).

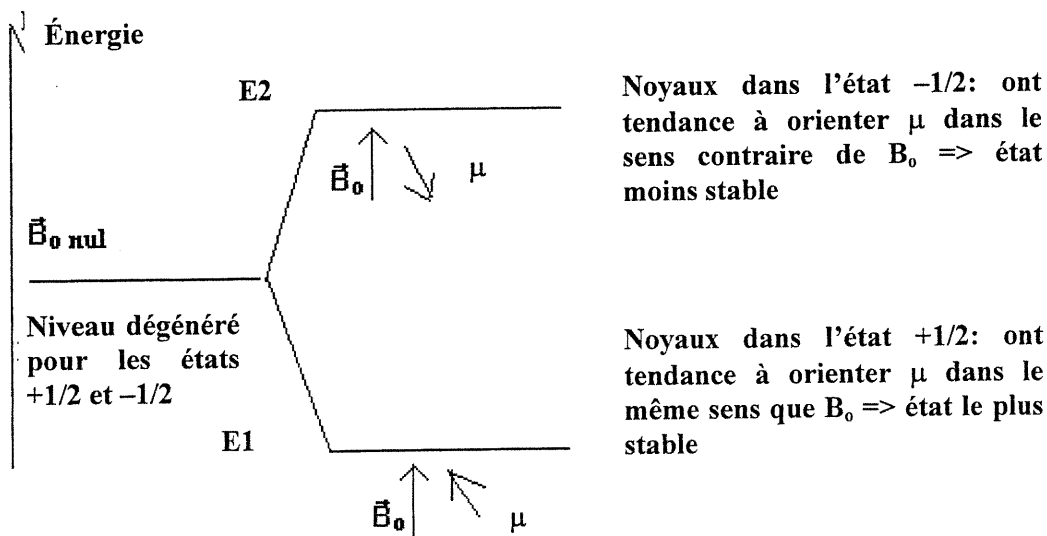
La suite logique du principe de la spectroscopie de RMN bidimensionnelle a abouti ces dernières années au développement de méthodes de mesure tri- et même quadridimensionnelle, particulièrement précieuses en analyse des spectres compliqués de biomolécules polymériques (Réf.30). La RMN à trois ou quatre dimensions permet d'obtenir des spectres mettant en évidence des interactions entre triplets ou quadruplets d'atomes (Réf.50). Ces expériences de RMN permettent de relier entre elles les fréquences de résonances des différents protons. La spectroscopie de RMN-3D représente aujourd'hui, malgré la durée des temps de mesure et le coût du traitement des données, une technique efficace et séduisante pour des utilisations spécifiques, surtout dans le domaine des macromolécules biologiques (Réf.30).

3.2 Magnétisme nucléaire.

Le noyau d'un atome est composé de nucléons : les protons, chargés positivement, et les neutrons, électriquement neutres. Les protons et les neutrons possèdent un moment magnétique qui est dû à la répartition des quarks qui les composent et à d'autres phénomènes de mécanique quantique. Le moment magnétique (μ) du neutron est environ égal au 2/3 de celui du proton (Réf.30)..

Au sein des noyaux, les différentes particules s'agencent de manière à minimiser le moment magnétique total pour maintenir un niveau d'énergie nucléaire faible et le plus stable possible. Les moments s'annulent deux à deux et seuls les noyaux ayant un nombre impair de nucléons ont un moment magnétique résultant non nul. Le RMN utilise le fait qu'en présence d'un champ magnétique externe, tous les moments magnétiques ont tendance à s'orienter dans la direction de ce champ magnétique, et dans les deux sens possibles, ce qui les sépare en deux populations de niveaux d'énergie différents (Fig. 3.1) (Réf.30, 31).

Figure 3.1 : Énergie des états des noyaux.



3.2.1 Phénomène de résonance magnétique.

La résonance magnétique nucléaire consiste à étudier les modifications d'aimantation d'une substance sous l'action de champs magnétiques. Les protons, en présence d'un champ magnétique B_0 ne s'alignent pas exactement sur celui-ci. Ils se séparent en deux populations tournant autour de B_0 avec un angle fixe (précession) (Fig. 3.2), soit dans la même direction que B_0 (parallèle) soit dans la direction opposée (antiparallèle), en raison de phénomènes de mécanique quantique (Réf.30,32-33).

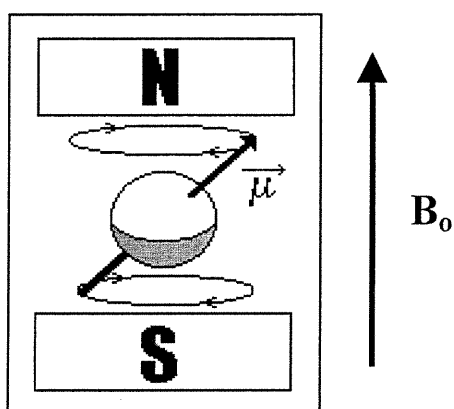


Figure 3.2 : Mouvement de précession

La résonance magnétique utilise en fait deux champs magnétiques distincts. L'un est fort et fixe (B_0), l'autre est un champ tournant (B_1). En l'absence de ces deux champs, les protons d'un échantillon sont tous orientés aléatoirement et la somme de leur moment magnétique est nulle. Quand on applique B_0 à cet échantillon, l'orientation de ces protons fait que la somme de leur contribution représente une aimantation macroscopique qui n'est pas nulle. En fait chaque proton tourne autour de B_0 selon la relation $\omega_0 = \gamma B_0$, où ω_0 est la vitesse angulaire et γ le rapport gyromagnétique du noyau (Réf.30, 33).

Il existe une différence entre les répartitions des populations parallèle et antiparallèle et cela produit le signal de RMN sous la forme d'une aimantation M non nulle. Cette aimantation a une composante longitudinale M_z suivant l'axe z (B_0) (Fig.

3.3a). Le grand nombre de noyaux fait que toutes les composantes transversales sont dispersées et la résultante M_{xy} est par conséquent nulle. Il est impossible de mesurer directement M_z qui est négligeable par rapport à B_0 . C'est ici qu'intervient le second champ magnétique B_1 tournant dans le plan xOy . Pour qu'il y ait résonance, et que B_1 puisse transmettre de l'énergie au système il faut que sa vitesse de rotation soit égale à la fréquence de Larmor spécifique (ω_1) du proton, c'est-à-dire qu'il faut satisfaire l'équation suivante : $\omega_1 = \omega_0 = \gamma B_0$ (Réf.30, 33).

Après l'application de B_1 , le vecteur d'aimantation qui avait un mouvement de précession fixe autour de B_0 aura également, un mouvement de précession tournant autour de B_1 (Fig. 3.3b). Ce mouvement complexe est la composition de deux rotations distinctes et indépendantes (Fig. 3.3c).

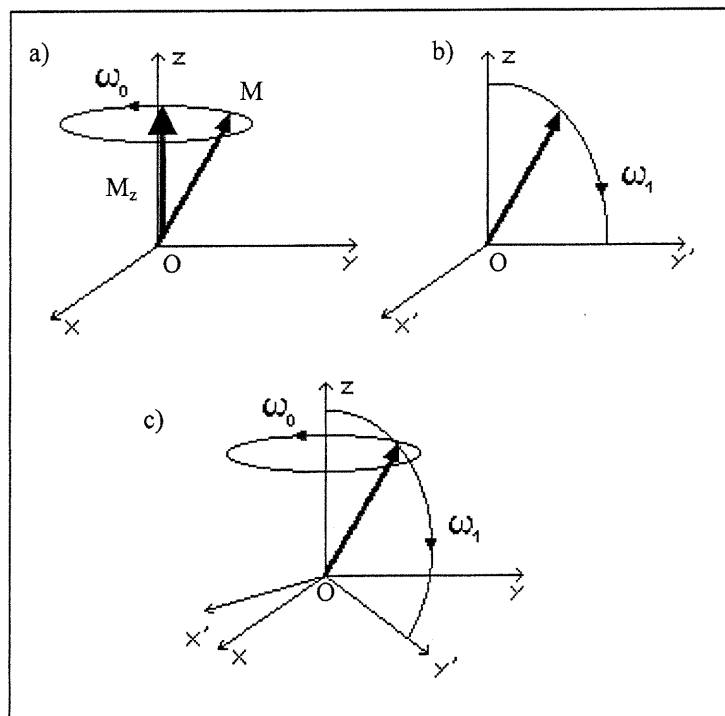


Figure 3.3 : a) Précession fixe de M autour de B_0 ; b) Précession tournant de M; c) double précession de M.

Le champ B_1 peut être de deux types en RMN : une impulsion de radiofréquence (RF) de 90° ou une impulsion de 180° . Pour simplifier la notation, les axes (x',y',z') du repère attaché à B_1 seront maintenant notée (x,y,z). Au début de l'impulsion, le vecteur M est aligné sur B_0 suivant Oz (M_{z0}). L'impulsion RF fait basculer M autour de Ox . À la fin d'une impulsion de 90° , M est aligné avec Oy (Fig. 3.4a). À la fin d'une impulsion de 180° , M est toujours aligné sur Oz , mais totalement inversé (Fig.3.4b) (Réf.30, 33).

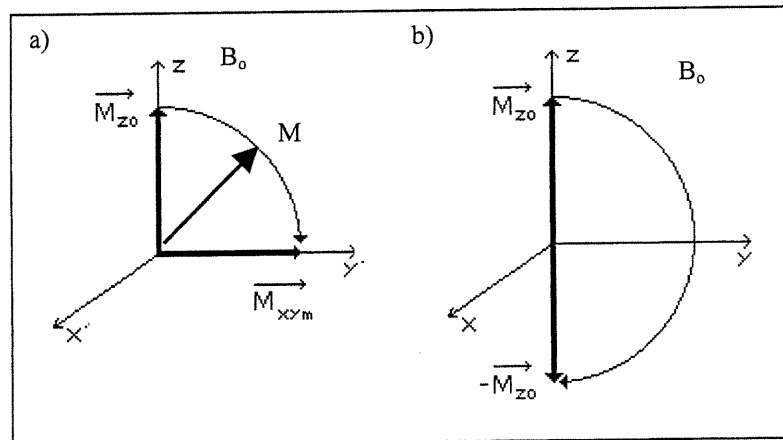


Figure 3.4 : a) Impulsion de 90° , b) Impulsion de 180° .

Les durées de ces impulsions sont respectivement de $T/4$ (90°) et de $T/2$ (180°) où T est la durée nécessaire à M_{z0} pour faire un tour complet ($T=2\pi/\omega_1$) et se réaligne sur l'axe Oz . À la fin de l'impulsion RF, le vecteur M retourne à son état d'équilibre initial tout en continuant sa précession autour de B_0 . L'amplitude de la composante transversale M_{xy} connaît donc une diminution rapide alors que la composante longitudinale M_z connaît une repousse progressive, ces deux phénomènes faisant intervenir des mécanismes de relaxation différents (Réf.30, 33).

3.2.4 Mesure du signal RMN.

Une expérience de RMN se résume à des opérations assez simples (Fig.3.5) : il suffit de placer un échantillon dans l'entrefer d'un aimant qui produit le champ B_0 . Si on s'intéresse à l'hydrogène, il suffira d'envoyer dans une bobine dont l'axe est

perpendiculaire au champ B_0 un courant sinusoïdal à la fréquence de résonance caractéristique à ce noyau. À l'arrêt de l'excitation, cette bobine recueillera un signal sinusoïdal amorti correspondant au retour à l'équilibre de la composante transversale créée lors de l'excitation initiale. La transformée de Fourier permet d'avoir le spectre ou la raie de résonance (Réf.34).

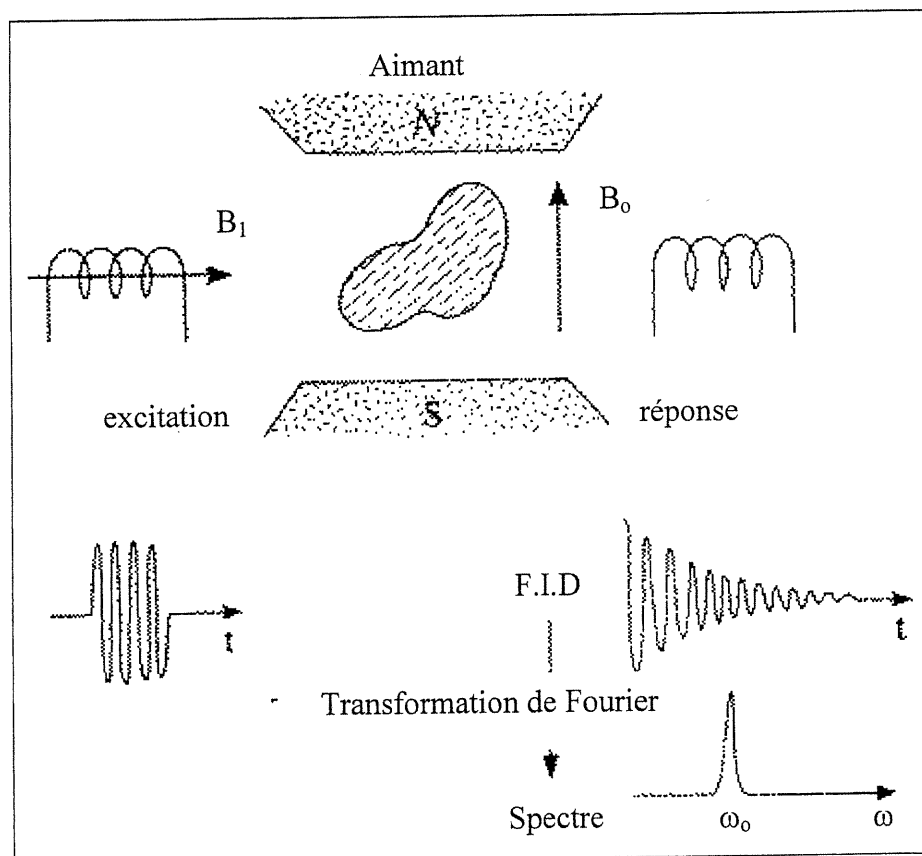


Figure 3.5 : Principe d'une mesure RMN : l'échantillon placé dans le champ magnétique B_0 acquiert une aimantation M_0 dans l'axe du champ B_0 . Une excitation B_1 à la fréquence de résonance du noyau étudié modifie cet équilibre. À l'arrêt de l'excitation, le retour de l'aimantation à sa valeur d'équilibre induit dans cette même bobine un signal à la fréquence de résonance : c'est le signal FID (Free Induction Decay). La transformée de Fourier de ce signal fournit le spectre de RMN.

3.2.4a *Le déplacement chimique*

La valeur du déplacement chimique traduit l'effet de l'environnement électronique autour du noyau (liaison chimique). Ce terme d'interaction est dû à l'effet d'écran induit par les électrons environnants sur le champ magnétique appliqué. Ces électrons créent un champ électrique local très faible qui s'oppose au champ B_0 extérieur, de telle manière que le champ effectif subi par le noyau (B_{eff}) vaut :

$$B_{\text{eff}} = (1 - \sigma)B_0$$

σ est composée de deux termes : un terme constant responsable de la position de la raie (le déplacement chimique isotrope), et un terme angulaire responsable de l'élargissement de la raie. Les noyaux de même espèce, mais situés dans des environnements chimiques différents, présentent ainsi des fréquences de résonance différentes, d'où le nom de « déplacement chimique » donné à σ , qui est exprimé en ppm de la fréquence ω_0 . En général le déplacement chimique est repéré par rapport à un composé de référence dont le déplacement chimique est noté $\sigma_{\text{réf}}$. Le déplacement chimique δ relatif à $\sigma_{\text{réf}}$ est alors défini par la relation suivante :

$$\delta_{\text{ppm}} = \frac{\nu - \nu_{\text{réf}}}{\nu_{\text{réf}}} \times 10^6 = (\sigma_{\text{réf}} - \sigma) \times 10^6$$

où $\nu_{\text{réf}}$ est la fréquence de résonance de Larmor du composé de référence, et ν la fréquence de résonance de Larmor mesurée pour l'échantillon considéré (Réf.30).

3.2.4b *Interaction dipolaire*

Cette interaction est due au couplage magnétique entre les spins nucléaires, qu'il soit homonucléaire, comme l'interaction proton-proton, ou hétéronucléaire, comme l'interaction carbone-proton. Ces moments magnétiques induisent un champ magnétique local qui s'ajoute au champ magnétique extérieur B_0 (Réf.30).

3.2.4c *Interaction scalaire spin-spin*

Il s'agit d'une interaction magnétique transmise entre les protons par les nuages électroniques qui est due à la polarisation induite des zones de recouvrement orbitalaire.

Ainsi la polarisation d'un noyau entraîne l'apparition d'une polarisation opposée dans le noyau auquel il est directement lié, ce qui modifie le champ effectif ressentie par ce dernier noyau. Ce couplage peut être caractérisé par une énergie d'interaction spin-spin, qui modifie l'énergie attribuée à l'état quantique du noyau dans un champ magnétique (Réf.30, 35).

3.3 Principe de la spectroscopie de RMN à deux dimensions.

3.3.1 Définition

L'expérience de RMN à deux dimensions appartient autant à la spectroscopie à transformée de Fourier qu'à celle à impulsion et repose sur une succession de trois intervalles de temps : préparation, évolution et détection (Réf.30). Dans un certain nombre d'expériences s'ajoute une autre période avant la détection, le temps de mixage (Fig.3.6).

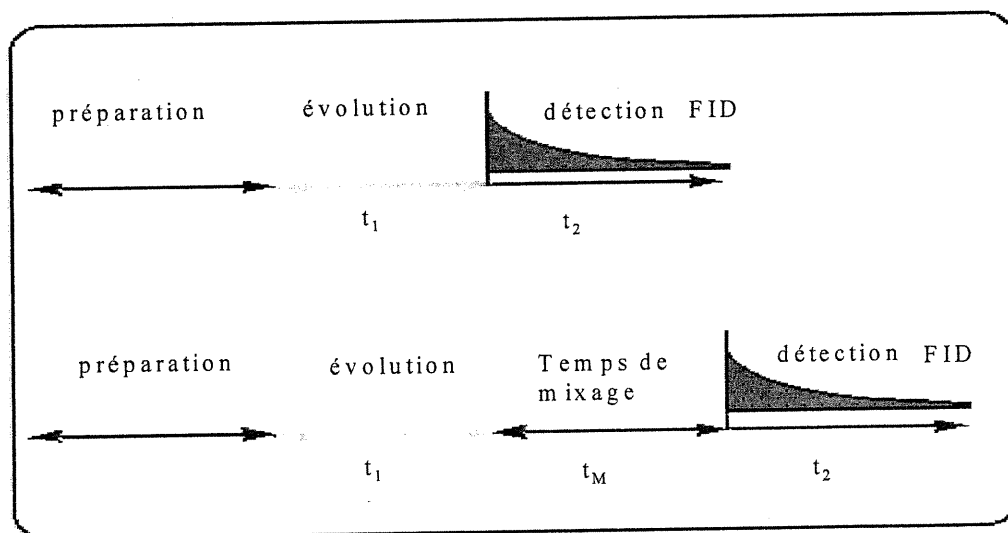


Figure 3.6 : Schématisation des intervalles de temps pour une expérience de RMN à deux dimensions.

3.3.1a *Le temps de préparation :*

Lors du temps de préparation, on prépare le système de spins à étudier pour l'expérience, par exemple en appliquant une expérience de découplage ou simplement en créant une magnétisation transversale à l'aide d'une impulsion à 90° . Cette étape est destinée à permettre le retour des noyaux excités à leur état d'équilibre entre deux exécutions successives de la séquence (Réf.42).

3.3.1b *Le temps d'évolution t_1 :*

Pendant le temps d'évolution t_1 , le système de spins évolue sous l'influence de divers facteurs, chaque cohérence évolue à sa fréquence caractéristique en fonction du déplacement chimique (voir plus loin) et des couplages scalaires (transfert de magnétisation entre les paires de protons à travers les liaisons) du noyau correspondant.

3.3.1c *Le temps de mixage :*

Il se compose d'une séquence d'impulsions qui a pour objet de réaliser des transferts de cohérence de manière à pouvoir corrélérer des fréquences différentes.

3.3.1d *Le temps de détection :*

L'acquisition du signal modulé a lieu pendant la période de détection.

La séquence décrite ci-haut ne constitue pas encore en soi une expérience de RMN 2D.

3.3.2 La RMN 2D

3.3.2a L'idée de JEENER :

L'idée de Jeener consiste à augmenter à pas réguliers la valeur du temps d'évolution t_1 . Ceci permet d'obtenir un signal de RMN sous la forme d'une collection de signaux de précession libre du type $s(t_2)$. Ces FID ne seront différents les uns des autres que par la durée de la période t_1 représentée sous la forme matricielle $s(t_1, t_2)$ (Réf.30, 36, 41). Le délai t_1 est le temps entre la première et la deuxième impulsion. (Fig 3.7).

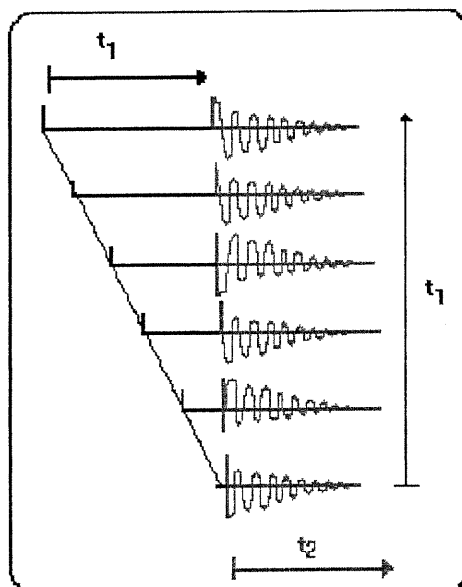


Figure 3.7 : Collection de signaux de précession libre du type $s(t_2)$.

La première transformée de Fourier par rapport à t_1 nous donne un interférogramme de la forme $s(t_2, \omega_1)$ (Fig. 3.8)

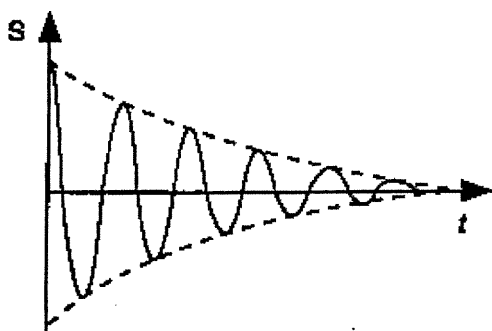


Figure 3.8 : Interférogramme de la forme $s(t_2, \omega_1)$.

Une deuxième transformée de Fourier, par rapport à la deuxième variable t_2 , donne un spectre de RMN à deux dimensions fréquentielles F_1 et F_2 (Fig.3.9). Le résultat de cette double transformée de Fourier ne constitue pas deux spectres $s(\omega_1)$ et $s(\omega_2)$ mais un seul spectre, en fonction de deux fréquences (Ω_1, Ω_2). En effet, une aimantation évoluant à la fréquence Ω_1 au cours du temps t_1 a été convertie en une autre cohérence évoluant à la fréquence Ω_2 pendant la période t_2 . Cette double transformée de Fourier bidimensionnelle fournit donc une matrice $s(\omega_1, \omega_2)$ (Réf.30, 36).

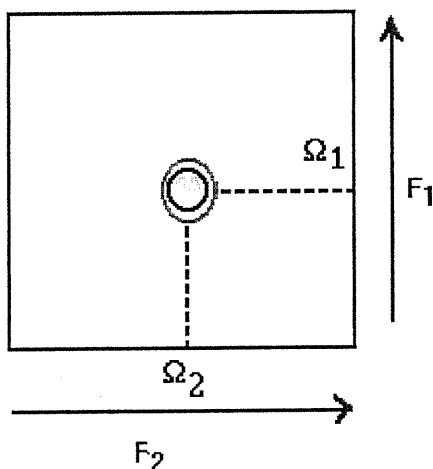


Figure 3.9 : Spectre de RMN à deux dimensions après la deuxième transformée de Fourier.

Le spectre COSY (Correlation Spectroscopy) est la plus simple expérience 2D. (Fig.3.10a). Le transfert de magnétisation se passe entre seulement trois liaisons

chimiques comme montré dans la figure 3.10b. Il y a donc un transfert de magnétisation entre le proton A vers le proton M seulement puis un transfert de magnétisation entre le proton M vers le proton X. Il est impossible d'avoir un transfert de magnétisation entre les protons A et X par l'expérience de COSY (Réf.30, 37).

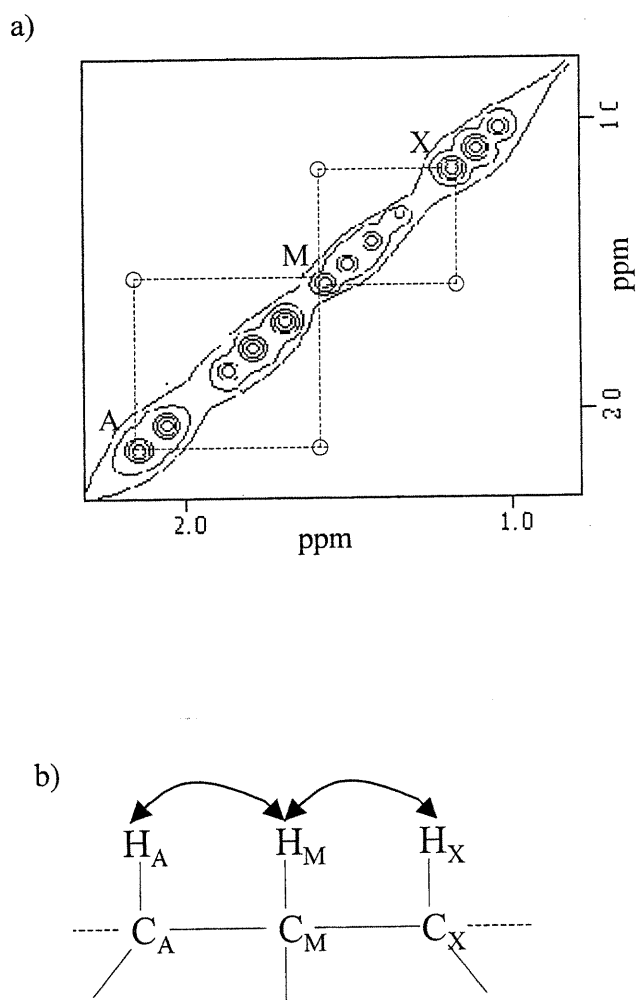


Figure 3.10 : a) spectre de COSY d'un système AMX; b) représentation schématique d'une molécule possédant trois atomes de carbones et les couplages selon une expérience de COSY entre ces atomes.

3.3.2b TOCSY (Total Correlation Spectroscopy):

Ce type d'expérience est connu sous l'acronyme d'HOHAHA (Homonuclear Hartmann-Hahn). Cette méthode permet de montrer les couplages spin-spin scalaires. Le transfert de magnétisation s'étend des noyaux immédiatement voisins vers des noyaux plus éloignés et gagne finalement la totalité du réseau des noyaux. De cette manière, des noyaux qui ne sont pas directement couplés avec le noyau étudié sont également touchés. Par exemple, pour un système AMX (Fig.3.10b), la magnétisation sera alors transmise du noyau A au noyau M et de là, au noyau X. Des spectres dits spectres-relais sont obtenus, où apparaissent des signaux croisés entre protons non immédiatement voisins. Par contre, dans le cas des acides aminés (voir les sections 3.4.1 et 3.4.2) le transfert de magnétisation ne peut traverser les carbonyles des peptides. Par conséquent, le transfert de magnétisation reste toujours dans le même acide aminé même si la chaîne latérale possède plusieurs carbones (Fig.3.11) (Réf.30, 35, 43).

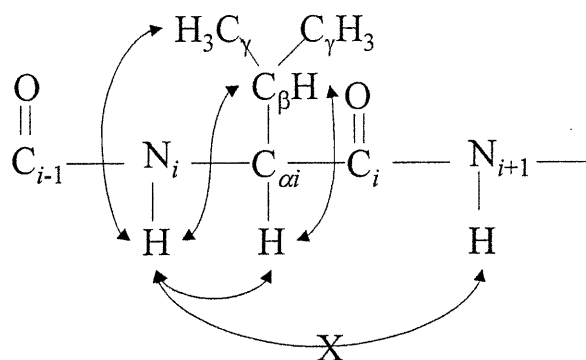


Figure 3.11 : Représentation schématique d'un acide aminé valine en position i entre deux autres acides aminés $i-1$ et $i+1$. Dans le TOCSY, le transfert de magnétisation ne peut pas traverser les carbonyles.

3.3.2c Spectroscopie de l'effet nucléaire Overhauser bidimensionnelle (NOESY) :

Pour expliquer le NOESY, il faut tout d'abord introduire le NOE. Le NOE est une des sources principales d'information structurale, car il concerne le couplage dipôle-dipôle qui traverse l'espace entre deux protons. L'intensité d'un NOE entre deux protons est proportionnelle à l'inverse de la sixième puissance de la distance les séparant ($I \propto 1/r^6$) et il est habituellement observé si deux protons sont séparés par moins de 5 Å ($1\text{Å} = 1 \times 10^{-10} \text{ m}$). Ainsi le NOE est une sonde sensible des courtes distances intramoléculaires. Les NOE sont classés par catégorie selon l'emplacement des deux protons impliqués dans l'interaction étudiée. Les NOE intranucléaires sont entre les protons dans le même résidu tandis que les NOE séquentiel, moyen, et long sont entre les protons sur des résidus séquentiellement adjacents, séparés par un ou plusieurs résidus dans la séquence d'un polypeptide (Réf.27, 38).

L'expérience de NOESY permet d'accéder au terme de relaxation croisée σ qui gouverne l'effet Overhauser nucléaire. Elle permet de mettre en évidence soit une interaction dipolaire, donc une certaine proximité spatiale (2 à 5Å) entre les spins considérés, soit un échange chimique (Fig.3.12). Elle peut être un outil de choix pour élucider la structure de grosses molécules telles que les protéines. Ce type d'expérience demande une préparation particulière de l'échantillon car son résultat est fortement dépendant du système étudié.

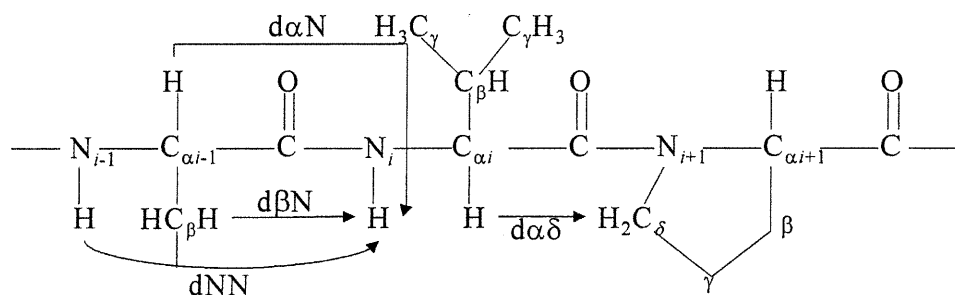


Figure 3. 12 : Segment d'une chaîne polypeptide avec indication des connectivités séquentielles de NOE des acides aminés.

3.4 RMN des acides aminés et peptides

3.4.1 Structure et systèmes de spins des acides aminés

La première étape dans l'analyse structurale des polypeptides est d'identifier l'appartenance de chacun des protons à un résidu acide aminé spécifique. Pour ce faire, il est nécessaire de connaître la structure de chacun des acides aminés (Fig.3.13) que l'on retrouve dans les protéines à étudier et leurs systèmes de spins respectifs. Ces systèmes de spins spécifiques à chacun des acides aminés entraînent l'existence de réseaux de connectivité (TOCSY) caractéristiques qui permettent dans un premier temps d'assigner les fréquences de résonance formant un réseau particulier à un type de résidu (par exemple AMX pour Asp, A_3B_3MPTX pour Ile etc...) et, dans un second temps, l'assignation des fréquences de résonance à chacun des protons spécifiques de ces résidus (i.e. α , β , γ etc.) (Réf.35 et 38).

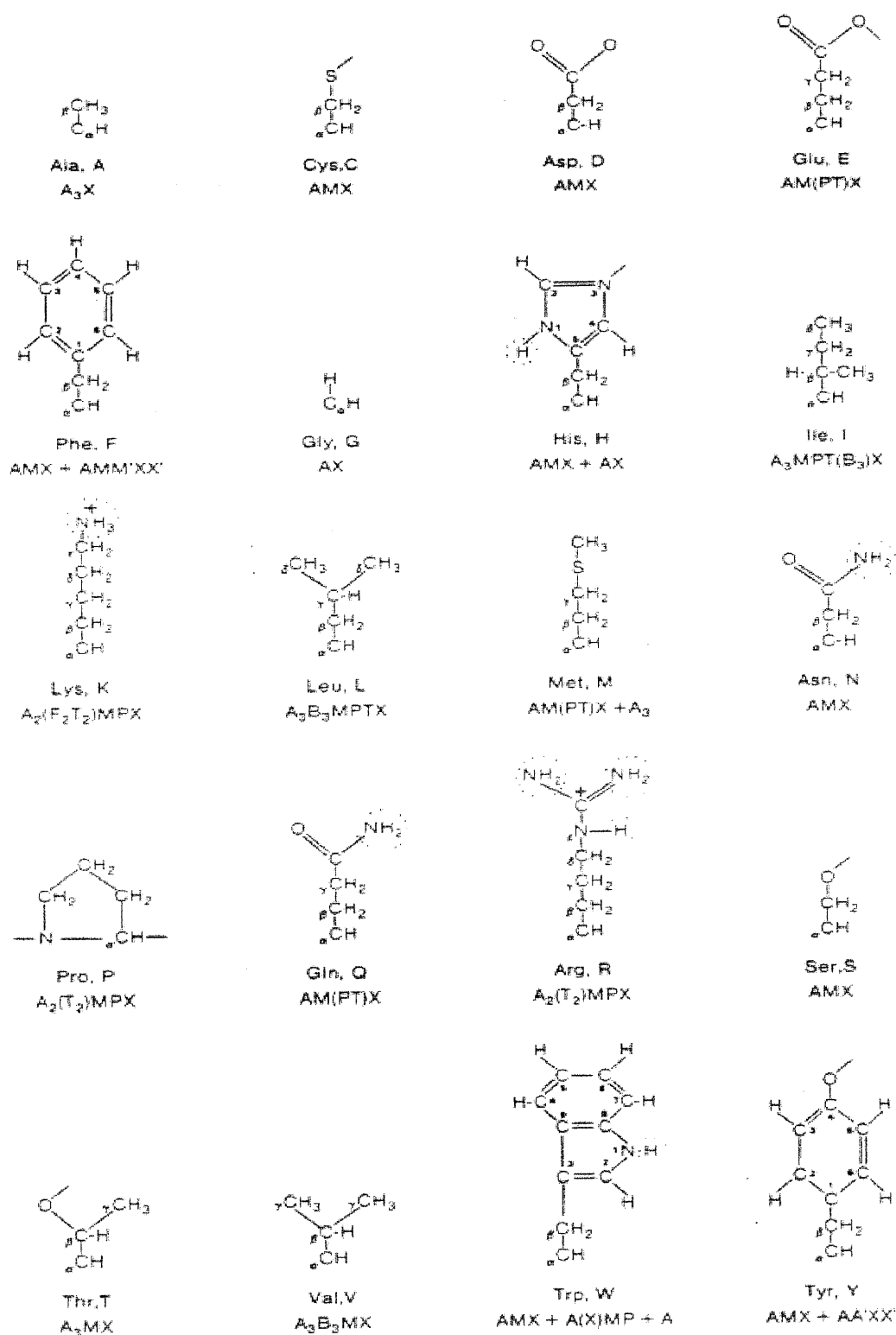


Figure 3.13 : chaînes latérales R, nomenclature à trois lettres et à une lettre pour les 20 acides aminés communs, et systèmes de spins des protons non-labiles dans les fragments moléculaires H- α C-R.

3.4.2 Réseaux de connectivités TOCSY des acides aminés

Dans les protéines, les résidus d'acides aminés conservent leurs réseaux caractéristiques de connectivités à travers les couplages scalaires, ce qui permet d'identifier le type de résidu auquel appartient un proton dont la fréquence de résonance spécifique est mesurée.

La figure 3.14 montre les principaux réseaux de connectivités TOCSY caractéristiques de l'ensemble des résidus constituant les protéines. Il devient donc facile de distinguer un système A_3X (typique de l'alanine) d'un système M_3B_3MPTX caractéristique de l'isoleucine ou de la leucine (similaire) ou d'un système AMX caractéristique des résidus d'acide aspartique, d'asparagine, de phénylalanine, de tyrosine, de sérine et de cystéine. Donc, d'après le nombre de connectivités présentes dans un réseau, il est possible d'assigner, a priori, un proton à un type de résidu spécifique (Réf.35, 38).

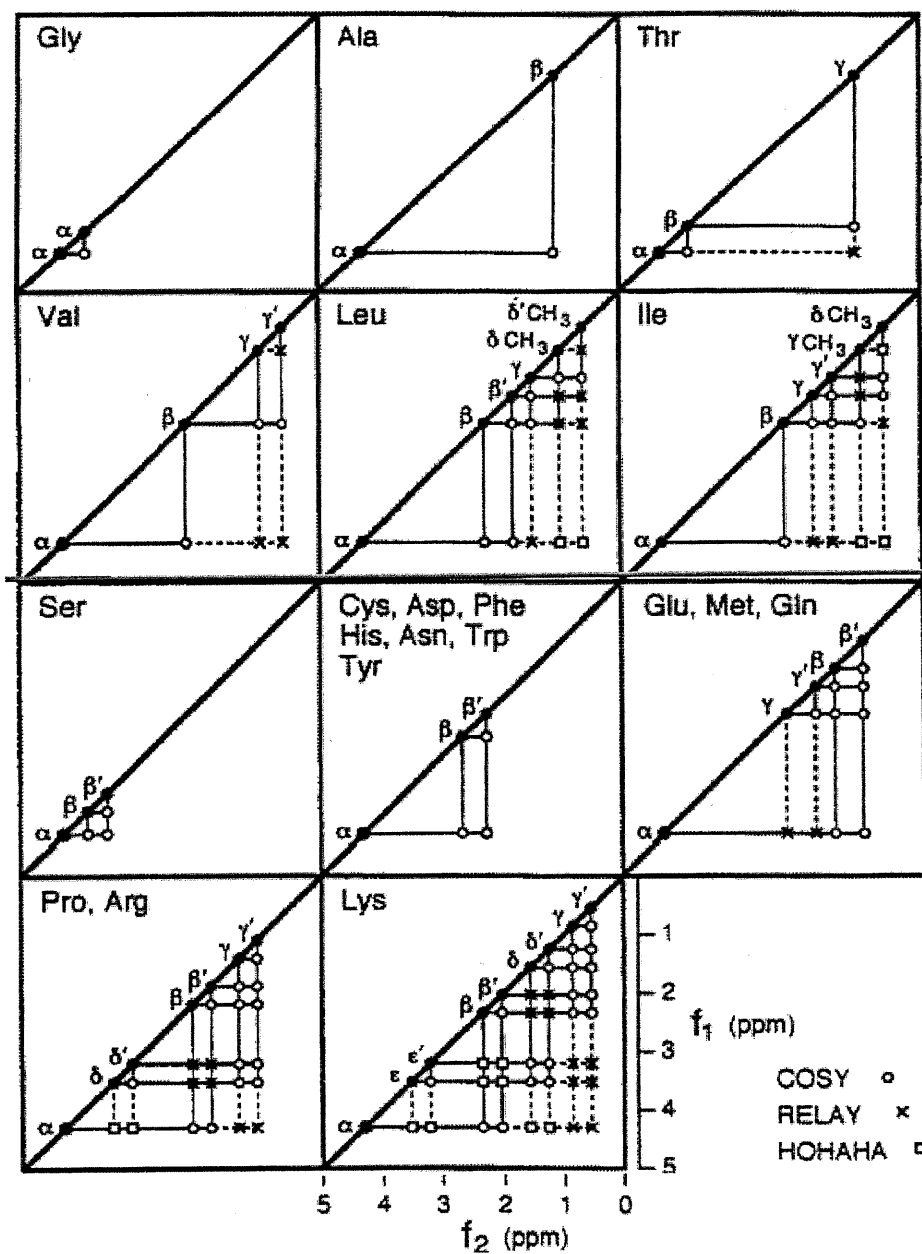


Figure 3.14 : Réseaux de connectivités pour les systèmes de spins des protons non-labiles des acides aminés communs. Les déplacements chimiques sont arbitraires (Réf.35).

3.4.3 Déplacements chimiques des acides aminés libres ou dans la chaîne protéique.

Les déplacements chimiques et les constantes de couplage des protons appartenant aux acides aminés libres ont été publiés par Roberts et Jardetzky (1970) et Anteunis et Gelan (1977). Dans les structures protéiques aléatoires, ces déplacements chimiques sont majoritairement respectés, les changements les plus grands se situant au niveau des protons sur le carbone voisin, (en position α) au lien peptidique qui sont déplacés de façon relativement importante à bas champs. Le tableau III.I liste les déplacements chimiques du proton dans les structures aléatoires pour chaque acide aminé naturel (Réf.38).

Dans les structures protéiques définies, il y a plusieurs contributions structurelles au déplacement chimique. Ces diverses contributions ont été discutées par Roberts et Jardetzky (1970). Toutefois, bien que certaines corrélations empiriques entre déplacements chimiques et structure puissent être établies, il est impossible de déterminer la structure d'une protéine par la seule observation des variations des déplacements chimiques par rapport aux structures aléatoires. Avec le développement de la spectroscopie RMN à deux dimensions une méthode beaucoup plus efficace existe : il s'agit, après assignation séquentielle des protons, de déterminer des réseaux de connectivités interspatiales provenant de l'analyse de spectres de l'effet nucléaire Overhauser à deux dimensions (NOESY) (Réf.35, 38).

Bien que les déplacements chimiques ne soient pas d'une grande utilité pour l'analyse structurelle, leurs valeurs de base sont toutefois utiles lorsque débute l'analyse spectrale, visant, en premier lieu, à établir les systèmes de spins et à assigner tous les protons à leurs fréquences de résonance spécifiques.

Tableau III.I. Déplacements chimiques du ^1H dans des structures aléatoires pour les vingt acides aminés communs.

Résidu	NH	αH	βH	Autres
Gly	8,39	3,97		
Ala	8,25	4,35	1,39	
Val	8,44	4,18	2,13	γCH_3 0,97; 0,94
Ile	8,19	4,23	1,90	γCH_2 1,48; 1,19 γCH_3 0,95 δCH_3 0,89
Leu	8,42	4,38	1,65; 1,65	γH 1,64 δCH_3 0,94; 0,90
Pro ^b		4,44	2,28; 2,02	γCH_2 2,03; 2,03 δCH_2 3,68; 3,65
Ser	8,38	4,50	3,88; 3,88	
Thr	8,24	4,35	4,22	γCH_3 1,23
Asp	8,41	4,76	2,84; 2,75	
Glu	8,37	4,29	2,09; 1,97	γCH_2 2,31; 2,28
Lys	8,41	4,36	1,85; 1,76	γCH_2 1,45; 1,45 δCH_2 1,70; 1,70 ϵCH_2 3,02; 3,02 ϵNH_3^+ 7,52
Arg	8,27	4,38	1,89; 1,79	γCH_2 1,70; 1,70 δCH_2 3,32; 3,32 NH 7,17; 6,62
Asn	8,75	4,75	2,83; 2,75	γNH_2 7,59; 6,91
Gln	8,41	4,37	2,13; 2,01	γCH_2 2,38; 2,38 δNH_2 6,87; 7,59
Met	8,42	4,52	2,15; 2,01	γCH_2 2,64; 2,64 ϵCH_3 2,13
Cys	8,31	4,69	3,28; 2,96	
Trp	8,09	4,70	3,32; 3,19	H2 7,24 H4 7,65 H5 7,17 H6 7,24 H7 7,50 NH 10,22
Phe	8,23	4,66	3,22; 2,99	H2, H6 7,30 H3, H5 7,39 H4 7,34
Tyr	8,18	4,60	3,13; 2,92	H2, H6 7,15 H3, H5 6,86
His	8,41	4,63	3,26; 3,20	H2 8,12 H4 7,14

3.4.4 Distances interprotoniques caractéristiques de structures secondaires régulières dans les polypeptides.

Un réseau de ces courtes distances inter-proton forme la structure tridimensionnelle de la chaîne principale. Certains NOE de courte distance ($<5 \text{ \AA}$) sont spécifiques à des éléments de structure secondaire (Fig.3.15). Par exemple, l'hélice alpha est caractérisée par des courtes distances entre certains protons sur les résidus voisins dans la séquence comme dans le cas des protons des groupements amides de la chaîne principale, le d_{NN} , ainsi qu'entre les protons bêta de résidu i et les protons d'amide de résidu $i + 1$, $d_{\beta N}$. Des conformations hélicoïdales résultent des courtes distances entre les protons alpha du résidu i et le proton amide du résidu $i + 3$ et à un moindre degré pour $i + 4$ et $i + 2$. Ces NOE de $i + 2$, $i + 3$ et $i + 4$ sont désignés collectivement sous le nom de NOE à moyenne étendue tandis que les NOE connectant les résidus séparés par plus de 5 résidus sont désignés sous le nom de NOE à longue étendue. Des conformations étendues (par exemple, les brins bêta) sont caractérisées par des courtes distances séquentielles, $d_{\alpha N}$. La formation des feuillets bêta a également comme conséquence des courtes distances entre les protons sur les brins adjacents (par exemple, $d_{\alpha\alpha}$ et $d_{\alpha N}$) (Réf.38, 40).

	$\beta, \beta p$	Hélice α	Hélice 3_{10}	Coude β de type I
$d_{\alpha N} (i, i+4)$				
$d_{\alpha\beta} (i, i+3)$				
$d_{\alpha N} (i, i+3)$				
$d_{NH} (i, i+2)$				
$d_{\alpha N} (i, i+2)$				
d_{BN}				
d_{NN}				

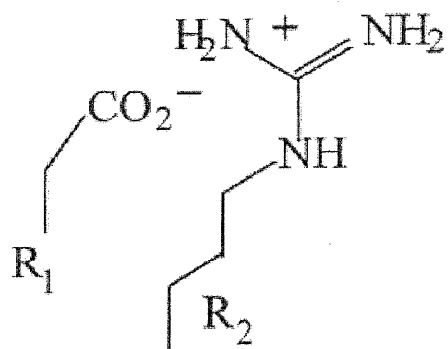
Figure 3.15 : Résumé des NOE 1H-1H séquentiels et à distance moyenne dans les structures secondaires suivantes : feuillet β parallèle ou antiparallèle, hélice α , hélice 3_{10} , coude β de type I. Les distances 1H-1H courtes sont indiquées par des lignes reliant les résidus contenant les protons connectés; la largeur de la ligne est proportionnelle à l'intensité des signaux NOESY théoriques.

3.4.5 Types d'interaction dans les protéines

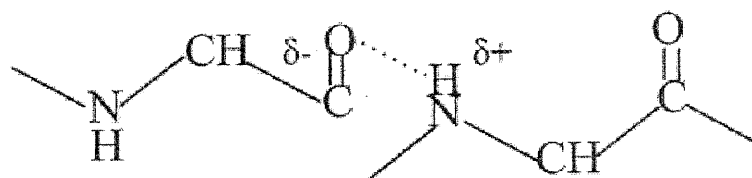
Les protéines adoptent une structure tridimensionnelle qui est induite à travers les interactions entre les atomes des chaînes latérales des acides aminés, entre les atomes de la chaîne principale du peptide ou entre les atomes des chaînes latérales des acides aminés avec la chaîne principale. Il y a quatre types majeurs d'interactions qui contribuent à la structure d'une protéine :

a) interaction électrostatique

R₁= Asp,
R₂= Arg

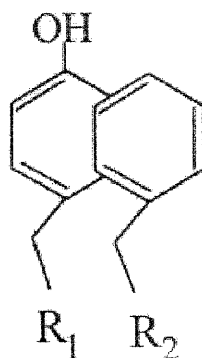


b) liaison
hydrogène



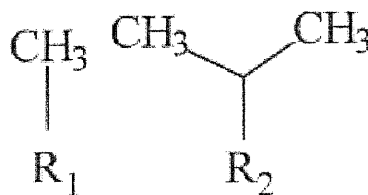
c) interaction
aromatique-aromatique.

R₁= Tyr,
R₂= Phe



d) interaction
hydrophobe

R₁= Ala,
R₂= Val



3.4.6 La vitesse d'échange des protons des groupements amides.

Les liaisons hydrogène régulières de la structure secondaire protègent les protons des groupements amides impliqués dans celles-ci, tel que le démontre leur taux d'échange sensiblement réduit quand le solvant est l'eau (H_2O). Bien que presque tous les protons amides des peptides soient impliqués dans des liaisons hydrogène dans une protéine globulaire (Baker et Hubbar, 1984) ceux dans la structure secondaire régulière semblent rester plus longtemps. Par exemple, si un peptide est dissous dans l'eau deutérée (D_2O), beaucoup de protons amides seront remplacés par des deutérons en l'espace d'une heure. Au cours des heures suivantes, les protons amides dans le N-terminal puis les protons amides C-terminale seront complètement échangés. Cependant, quelques protons amides qui participent dans un centre de feuillet antiparallèle seront encore présents après quelques mois (Réf.35, 40).

3.4.7 Déplacements chimiques des protons α

Puisque le déplacement chimique d'un noyau est sensible à son environnement immédiat, il contient également de l'information structurale. Des corrélations entre les tendances des déplacements chimiques et les structures secondaires ont été identifiées. Le déplacement chimique du proton alpha de chacun des vingt acides aminés naturels montre une forte corrélation avec la structure secondaire. En 1992, Wishart et ses collaborateurs ont développé une méthode simple pour déterminer la structure secondaire en analysant la différence entre les déplacements chimiques des protons alpha pour chaque résidu. Cela a été également rapporté pour le même résidu dans une conformation aléatoire (Tableau III.II). Les segments hélicoïdaux ont des groupements de protons alpha dont les déplacements chimiques sont uniformément inférieurs aux valeurs dans les conformations aléatoires tandis que les brins bêta ont des valeurs uniformément plus élevées (Fig.3.16). De cette façon, la détermination de la position de l'hélice ou de brin est possible (et tout à fait fiable) bien que les bornes des éléments de structure secondaire ne soient pas aussi bien définies (Réf.39).

Tableau III.II : Valeurs des déplacements chimiques des protons alpha dans une conformation aléatoire.

résidu	proton alpha (ppm)	résidu	proton alpha (ppm)
Ala	4.35 ± 0.10	Met	4.52 ± 0.10
Cys	4.65 ± 0.10	Asn	4.75 ± 0.10
Asp	4.76 ± 0.10	Pro	4.44 ± 0.10
Glu	4.29 ± 0.10	Gln	4.37 ± 0.10
Phe	4.66 ± 0.10	Arg	4.38 ± 0.10
Gly	3.97 ± 0.10	Ser	4.50 ± 0.10
His	4.63 ± 0.10	Thr	4.35 ± 0.10
Ile	3.95 ± 0.10	Val	3.95 ± 0.10
Lys	4.36 ± 0.10	Trp	4.70 ± 0.10
Leu	4.17 ± 0.10	Tyr	4.60 ± 0.10

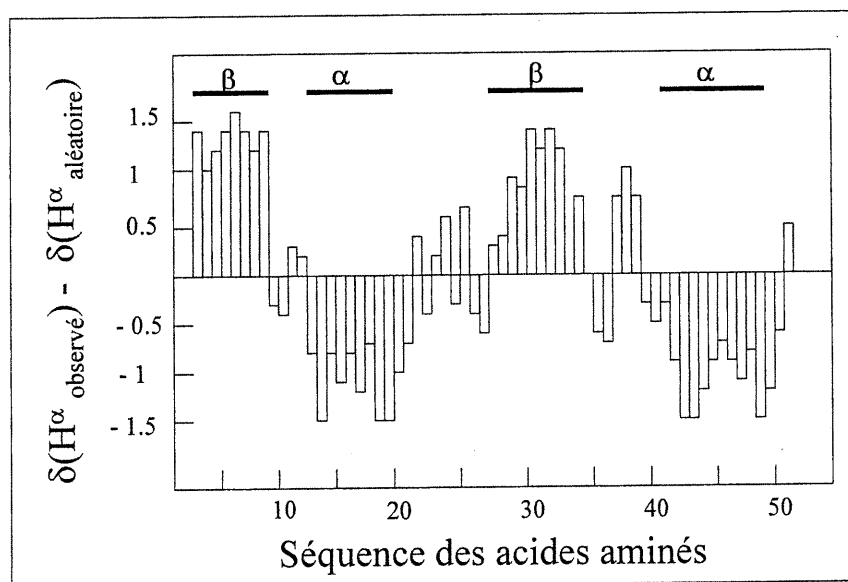


Figure 3.16 : Représentation de la différence entre les valeurs de déplacements chimiques des protons alpha observés et celle de conformation aléatoire.

3.5 Modélisation moléculaire

Les techniques de résonance magnétique nucléaire permettent aujourd'hui d'accéder à un grand nombre d'information sur la structure moléculaire. Parmi ces techniques, la RMN du proton est la plus utilisée et permet d'accéder aux distances inter-protons en utilisant les NOE. Ces NOE sont utilisés pour modéliser les structures moléculaires par mécanique ou dynamique moléculaire et obtenir ainsi une structure raffinée. En effet, on peut vouloir faire de la modélisation moléculaire pour une variété de raisons. Par exemple, les cristallographes effectuent de telles études pour trouver les structures en accord avec leurs cartes de densité électronique et comparer les structures dans différents environnements cristallins tandis que les spectroscopistes veulent confirmer leurs assignations spectrales et exploiter des systèmes reliés (Réf.41).

Les méthodes couramment utilisées pour obtenir les structures tridimensionnelles issues des paramètres RMN peuvent être regroupées en deux familles : les méthodes de « géométrie des distances » et les méthodes de mécanique et dynamique moléculaire sous contraintes.

Les méthodes de « géométrie des distances » sont en fait des procédures qui permettent de générer à partir d'un jeu de distances donné, un jeu de coordonnées moléculaires. La méthode ne traite que des distances entre les points. Le nom vient du fait que ce programme (algorithme) peut convertir des contraintes géométriques en coordonnées moléculaires. Il existe deux types de méthodes de « géométrie des distances » : la méthode métrique, qui utilise les coordonnées cartésiennes et la méthode de la fonction cible, qui utilise les variables internes de la molécule. Seulement la première méthode sera abordée ici.

La méthode de la matrice métrique utilise un algorithme mathématique (algorithme d'embedding) afin de déterminer les coordonnées d'un ensemble de points à partir d'un jeu de distances mesurées entre ces points. Ceci consiste en fait à calculer les valeurs propres de la matrice métrique G qui est dérivée de la matrice des distances D_{ij} . Le

théorème fondamental de la géométrie de distance affirme qu'un ensemble de distance correspond à un objet tridimensionnel, seulement si la matrice est de rang trois, c'est-à-dire qu'elle possède trois valeurs propres non nulles et $N-3$ valeurs propres nulles où N est le nombre d'atomes.

Au départ, les données géométriques disponibles sont les suivantes : 1) les distances caractérisant la géométrie covalente de la molécule, soit les longueurs de liaison (atomes directement liés) et les angles de valence (atomes séparés par deux liaisons); 2) les contraintes de distances fournies par l'analyse des effets NOE.

L'ensemble de ces informations est alors représenté sous forme de deux matrices, l'une correspondant aux limites inférieures (L_{ij}) et l'autre aux limites supérieures (U_{ij}) des intervalles de distances, de sorte que $L_{ij} \leq D_{ij} \leq U_{ij}$. Une troisième matrice (D_{ij}) est alors construite par tirage aléatoire de valeurs choisies dans l'intervalle $[L_{ij}, U_{ij}]$ défini par les deux matrices précédentes. La matrice métrique G est ensuite construite à partir de la matrice des distances D_{ij} et ses éléments sont calculés.

Il s'agit ensuite de procéder à la diagonalisation de la matrice métrique G et au calcul de ses valeurs propres. Cette matrice possède en fait plus de trois valeurs propres non nulles et les trois plus grandes valeurs seront choisies pour calculer les coordonnées cartésiennes : c'est l'étape d'embedding. En dernier lieu, une phase d'optimisation est entreprise dans laquelle la structure obtenue est raffinée par minimisation d'une fonction cible. Plusieurs triages aléatoires sont effectués, ce qui permet d'obtenir non pas une structure unique mais bien un ensemble de structure tridimensionnelle.

Par la suite, il y aura l'application de la méthode de la dynamique moléculaire et de recuit simulé sous contraintes afin d'être capable de franchir de petites barrières énergétiques (la hauteur de la barrière va dépendre de la température à laquelle est effectuée la simulation) et de localiser plus efficacement des minima locaux plus profonds. Donc, dans un premier temps, la technique peut faire évoluer une structure obtenue par "géométrie des distances" vers une structure de moindre énergie. Le protocole général se décompose en cinq étapes :

- préparation et minimisation de la structure initiale prise au hasard;
- échantillonnage pour franchir plusieurs barrières en variant la température de 0K à 1000K;
- repliement en poursuivant la dynamique pour 20 à 30 picosec à cette température;
- refroidissement lent de la structure jusqu'à 300K sur 30 picosec, (de cette manière, les interactions non-liantes sont totalement prises en compte);
- minimisation de la structure obtenue dans un champ de force plus réaliste.

3.6 Partie expérimentale

3.6.1 Provenance des produits

Pour la provenance de tous les peptides utilisés, voir chapitre II. Le 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol-d₂ (HFIP-d₂) est acheté de la compagnie ACROS. L'eau deutérée + 0.15% TPS (w/w) [sodium 3-(triméthylsilyl) propionate-2,2,3,3-d₄] est acheté de la compagnie CDN, l'eau deutérée (D₂O) est acheté de la compagnie Aldrich Chemical Inc. Les tubes de RMN de type 535-pp sont achetés de la compagnie New ERA.

3.5.2 Préparation des échantillons et procédures expérimentales RMN

Tous les échantillons utilisés dans les expériences de RMN sont préparés de la façon suivante : dissoudre quelques milligrammes de peptide dans une solution de 440 µl de HFIP, 55 µl de H₂O et 5 µl de TSP pour la référence.

Pour faire les études d'échange NH de proton amide, le peptide est dissous dans le HFIP-d₂ et incubé pendant 1 jour. Puis, l'échantillon est lyophilisé et redissous avec le solvant normalement utilisé (HFIP/H₂O/TSP). Plusieurs spectres à différents temps sont collectés. Avec d'autres expériences d'échange NH de proton amide, l'inverse a été fait. Le peptide est dissous dans un solvant non deutéré et après lyophilisation, il est redissout avec un solvant complètement deutéré.

Toutes les expériences sont faites avec un spectromètre Bruker Avance-600. Tous les assignements sont faits à l'aide des expériences de TOCSY avec un temps de contact de 50 ms et des spectres de NOESY avec un temps de mixage de 200 ms. Les deux expériences de 2D sensibles à la phase ont été faites en utilisant la méthode de l'accroissement de phase proportionnelle au temps « States-TPPI ».

3.6.3 Procédure expérimentale de modélisation moléculaire

La molécule LB a été construite à l'aide du module Biopolymer du logiciel (« Molecular Simulations Inc ») (MSI) version 9.80. Ensuite, une conformation d'hélice entre les acides aminés V281-R291 est définie et le potentiel est appliqué avec force field de CHARMM. La molécule a été soumise à plusieurs cycles (10,000) de dynamique moléculaire suivi d'une minimisation graduelle d'énergie.

Pour la deltorphine-II, un modèle est construit à l'aide des NOE trouvés dans les spectres de NOESY.

3.7 Résultats et discussion

3.7.1 Partie RMN

Dans le chapitre précédent, il a été démontré par les spectres de CD que LB adopte une conformation similaire lorsqu'il est dissous dans un mélange de TFE/H₂O ou de HFIP/H₂O. Par contre, les spectres de RMN de LB dans un mélange de HFIP/H₂O fournissent plus d'informations que dans le cas de TFE/H₂O. Les protons amides labiles de la chaîne principale du peptide sont plus visibles dans HFIP/H₂O, c'est-à-dire que dans ce solvant il y a moins d'échange entre les protons labiles et les deutérons. De plus, le peptide semble être plus soluble dans HFIP/H₂O à des valeurs de pH bas (1.8, non ajusté). Selon les spectres de CD, l'élévation du pH de l'échantillon ne pose pas de problème pour le peptide car sa conformation n'est pas affectée. Dans le cas de la RMN, les spectres sont plus clairs lorsque le pH est bas. Par conséquent, les meilleures conditions afin d'avoir une bonne solubilité du peptide tout en ayant une visibilité adéquate des protons amides sont l'utilisation du cosolvant HFIP/H₂O et une faible valeur de pH.

Dans ce chapitre, il est question des études de RMN menées sur les échantillons étudiés par CD pour déterminer de façon plus précise la conformation des peptides. Le LB a d'abord été étudié car d'après les résultats de CD, il a une conformation hélicoïdale partielle plus prononcée que les peptides plus petits.

D'après les analyses des spectres de TOCSY et NOESY et en utilisant la méthode de Wishart et al (1992) (qui relie les valeurs de déplacements chimiques des protons alpha à la conformation de structure secondaire de protéine) (Réf.39), nous avons déterminé qu'il y a une conformation en hélice entre Val-283 et Arg-291. En effet, selon la figure 3.17, les acides aminés dans cette région ont une valeur négative par rapport aux déplacements chimiques des acides aminés dans une conformation aléatoire.

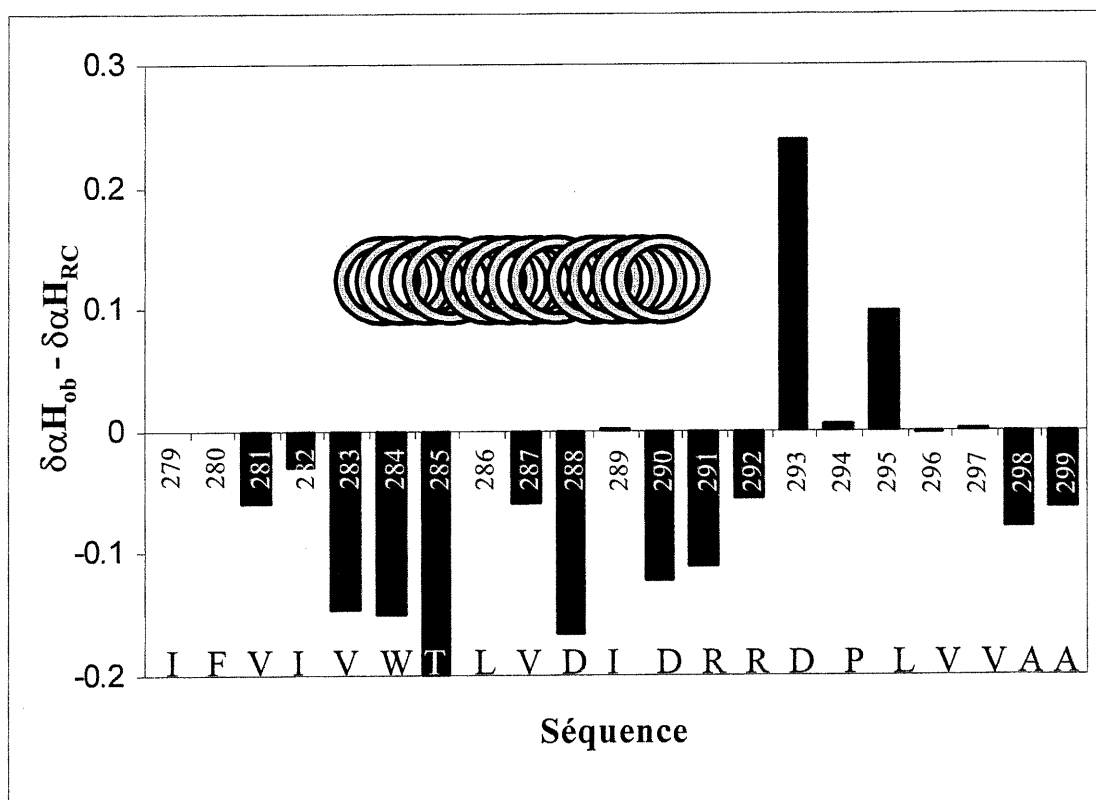


Figure 3.17 : L'indice des déplacements chimiques des protons alpha de LB dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Il est intéressant de noter que la conformation en hélice s'étend sur une région qui est plutôt longue dans le peptide (de Val-283 à Arg-291). De plus, le segment C-terminal ne semble pas avoir de préférence pour une conformation donnée.

Ensuite, nous avons regardé la conformation de M2, M1 et PB pour évaluer l'implication de chaque acide aminé dans le peptide à promouvoir la conformation hélicoïdale dans la troisième boucle extracellulaire. Comme il est déjà mentionné dans le chapitre 2, les deux premiers acides aminés en N-terminal (Ile-279, Phe-280) et les deux derniers en C-terminal (Ala-298, Ala-299) de LB sont manquants dans M2. L'élimination de deux acides aminés (Ile-279 et Phe-280) déstabilise la conformation d'hélice observée dans le LB car, avec M2, l'hélice ne s'étend qu'entre les résidus Asp-288 et Arg-291 (Fig.3.18). Par contre, l'absence des deux alanines en C-terminal stabilise le peptide car il y a apparition d'une structure bêta entre Asp-293 et Val-297. Cette structure bêta est probablement due à un coude centré sur le Pro-294.

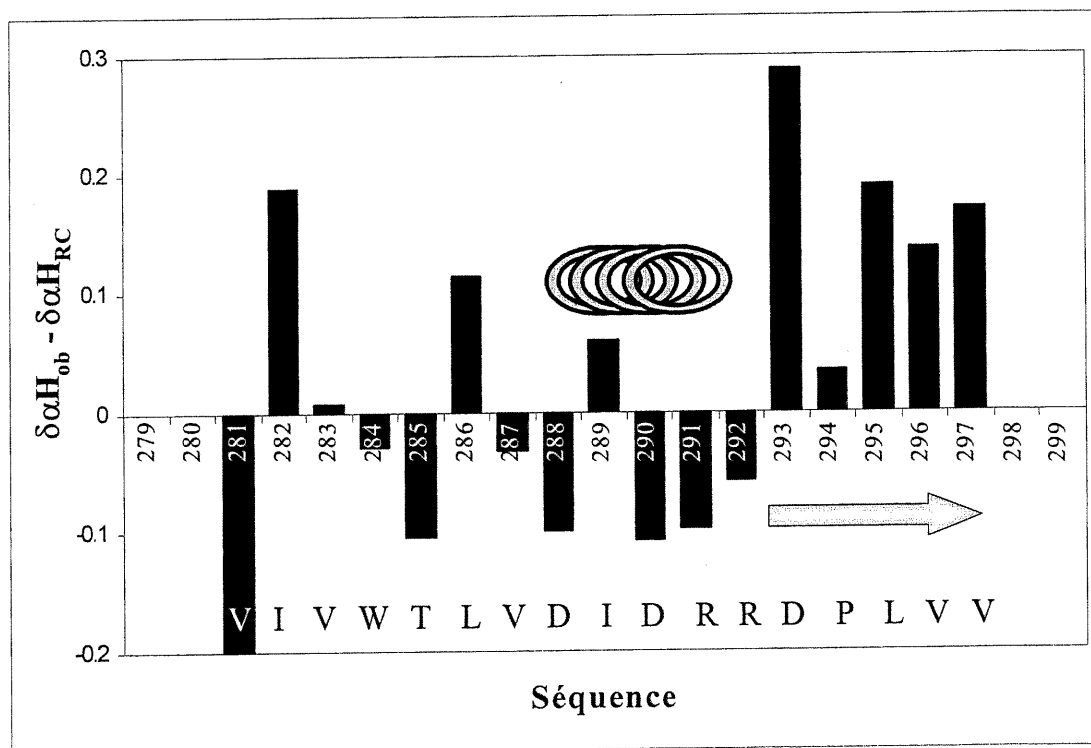


Figure 3.18 : L'indice des déplacements chimiques des protons alpha de M2 dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Dans le peptide M1, deux acides aminés supplémentaires du côté N-terminal ont été enlevés dans le but de vérifier si la conformation en hélice serait affectée davantage. Selon la figure 3.19, l'hélice existant dans M1 ne semble pas être affaiblie par rapport à celle de M2. Cependant, quand les deux alanines sont rajoutées en C-terminal il y a déstabilisation de cette partie de séquence et la conformation bêta disparaît.

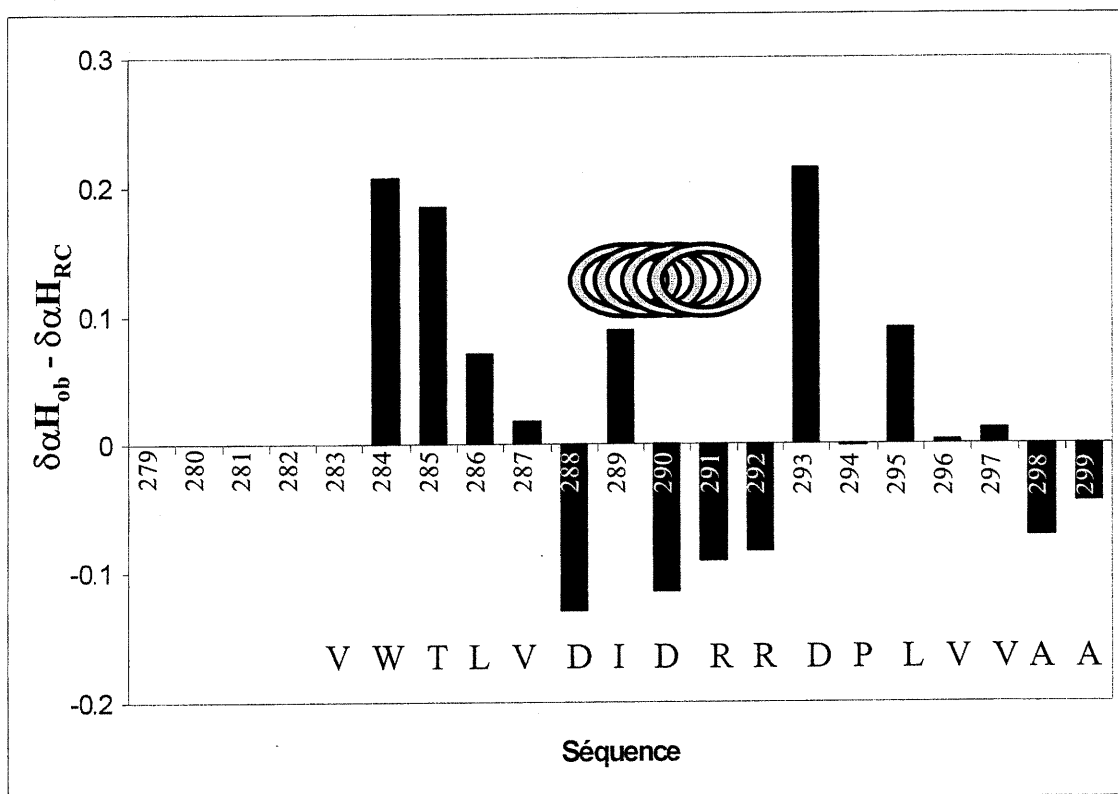


Figure 3.19 : L'indice des déplacements chimiques des protons alpha de M1 dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Finalement, le plus petit peptide, PB, a été étudié. Le N-terminal du PB est identique à celui de M1. Toutefois, nous n'avons pas observé la conformation en hélice existant dans M1 (Fig.3.20). Tout comme dans le cas de M2, l'élimination des deux alanines de l'extrémité C-terminale stabilise cette partie du peptide et il y a apparition d'une conformation bêta.

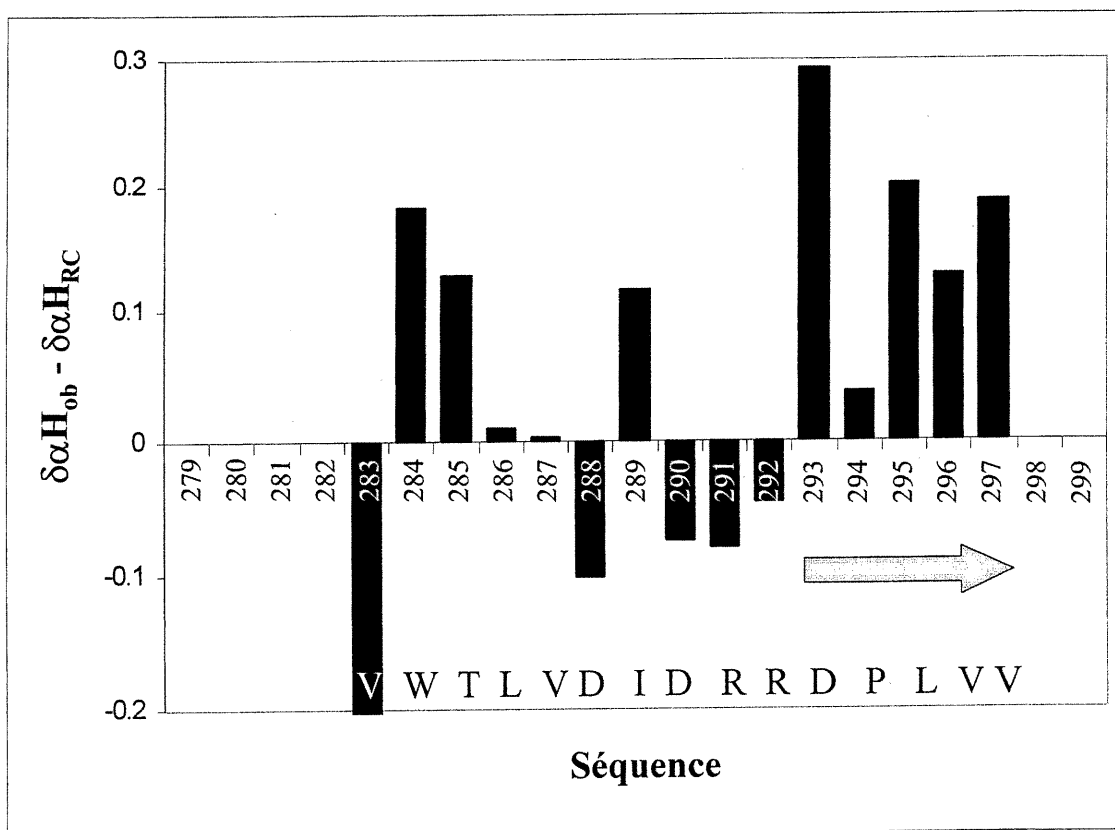


Figure 3.20 : L'indice des déplacements chimiques des protons alpha de PB dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Des études de NOE ont été effectuées pour M2, M1 et SL dans le but de spécifier les acides aminés qui sont proches dans l'espace dans chacun des peptides. Nous remarquons qu'il y a plusieurs NOE de type $(i, i+2)$ et $(i, i+3)$ dans la portion N-terminale et dans le centre de M2 (Fig. 3.21). Cela suggère qu'il y a une hélice naissante dans la partie N-terminale qui n'est cependant pas assez stable pour former une grande hélice comme dans le LB. Donc, le rôle des résidus isoleucine et phénylanine dans la partie N-terminale de LB est de stabiliser cette hélice naissante dans le M2. Dans l'extrémité C-terminale, il y a deux NOE de $(i, i+2)$ incluant le Pro-294. Ces NOE sont caractéristiques de la conformation d'un coude β .

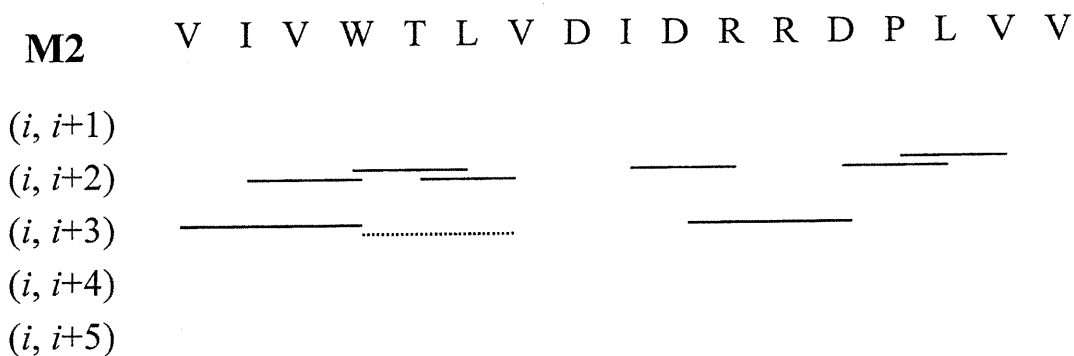


Figure 3.21 : Représentation schématique des NOE inter-résidus observés pour M2 dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Les NOE de M1 montrent aussi l'existence d'une hélice naissante du côté N-terminal tout comme dans M2 (Fig. 3.22). Par contre, le nombre de NOE se trouvant dans M1 est moindre que celui de M2. Cela est probablement dû à l'absence de deux acides aminés hydrophobes (Val-281 et Ile-282) dans l'extrémité N-terminale. Donc, l'hélice naissante est encore moins stable que dans le M2. L'ajout de deux alanines aux positions 298 et 299 de l'extrémité C-terminale fait en sorte que cette partie du peptide est déstabilisée car il n'y a plus de NOE dans cette région.

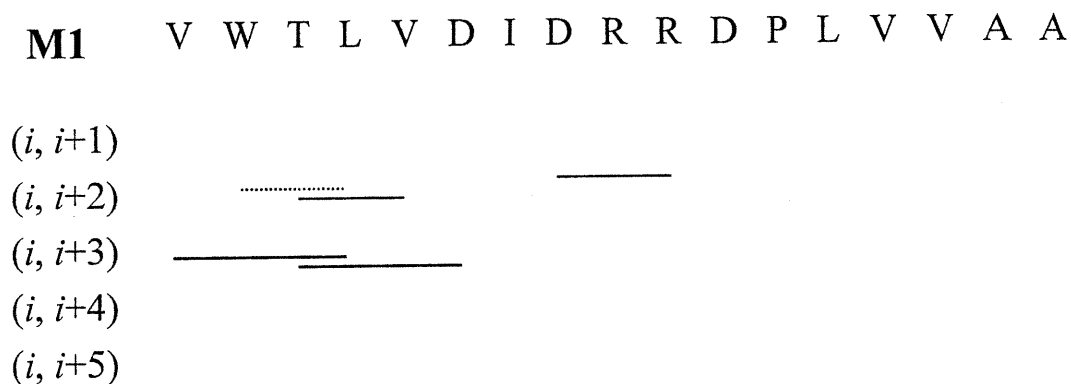


Figure 3.22 : Représentation schématique des NOE inter-résidus observés pour M1 dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Il est intéressant de voir que PB possède plusieurs NOE du côté N-terminal (Fig.3.23) sans vraiment adopter une conformation définie lors des études de déplacement

chimique des protons alpha. Toutefois, les NOE indiquent qu'il y a probablement la présence d'une hélice naissante dans cette région. Tout comme dans M2, l'absence des deux alanines permet l'induction d'un coude β qui inclut le résidu proline-294.

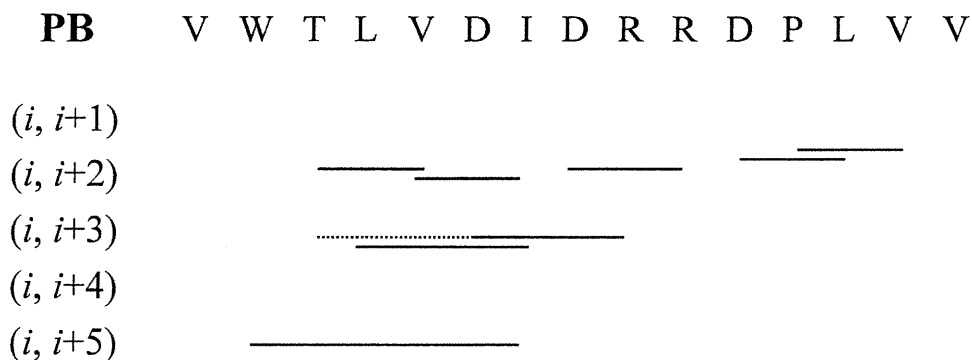


Figure 3.23 : Représentation schématique des NOE inter-résidus observés pour le PB dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

A présent, nous pouvons étudier les changements de conformation des peptides lorsqu'ils sont en présence de la deltorphine-II. La conformation de LB a changé lors de l'ajout de la deltorphine-II (Fig.3.24). En effet, l'interaction de deltorphine-II avec LB déstabilise la conformation en hélice entre les résidus Val-283 et Arg-291 afin d'en former une plus petite entre les résidus Asp-288 et Arg-291. De plus, l'interaction avec la deltorphine-II semble stabiliser l'extrémité C-terminale de LB car il y a apparition d'une structure bêta entre les résidus Asp-293 et Val-297. Il est à noter que plusieurs acides aminés ont subi des changements importants dans leur déplacement chimique comme Trp-284, Thr-285, Leu-286 et les valines 296 et 297. Trois de ces acides aminés (Trp-284, Val-296 et Val-297) sont des résidus importants, pour la sélectivité de liaison au récepteur delta-opioïde, comme mis en évidence en moyen d'expériences de mutagenèse dirigée.

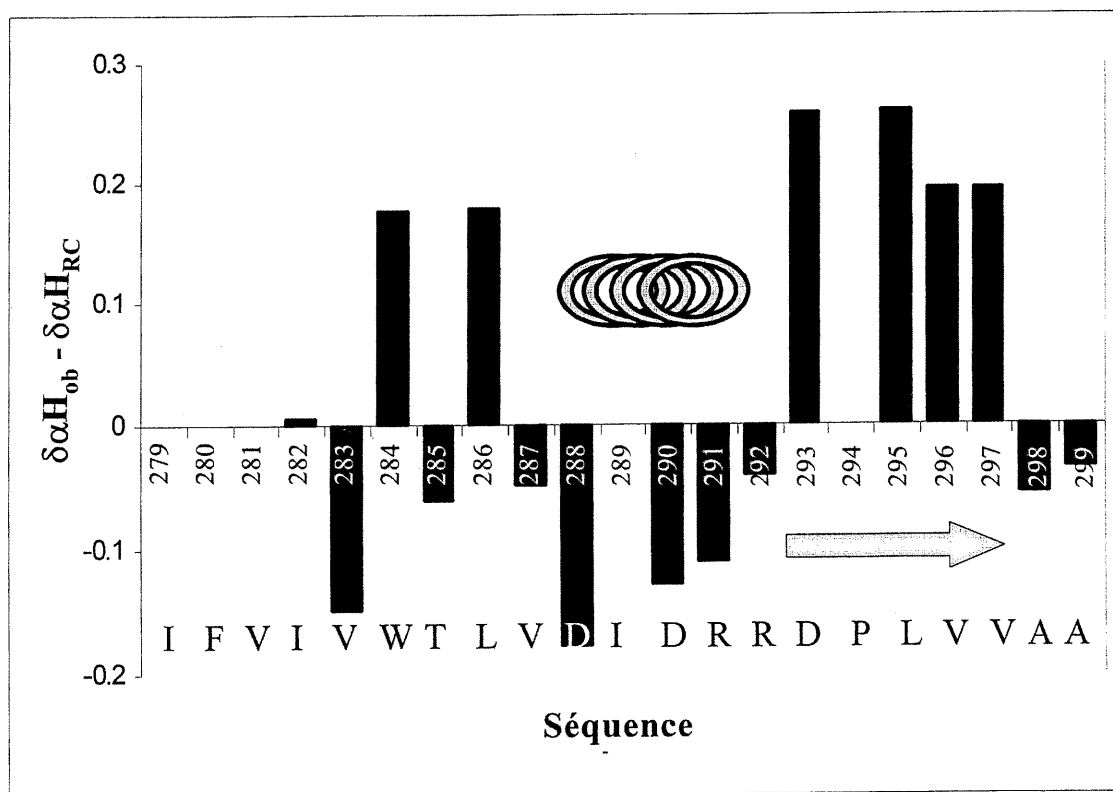


Figure 3.24 : Indice des déplacements chimiques des protons alpha de LB en présence de deltorphine-II dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Il a été démontré que M2 possède une structure bêta à l'extrémité C-terminale et une petite conformation en hélice entre les résidus Asp-288 et Arg-291. Par conséquent, il paraît que la présence de deltorphine-II n'a pas d'effet sur la structure secondaire de M2 car la position en hélice est demeurée la même ainsi que la structure bêta (Fig.3.25), mais le déplacement chimique des α H des résidus Val-296 et 297 ont changé.

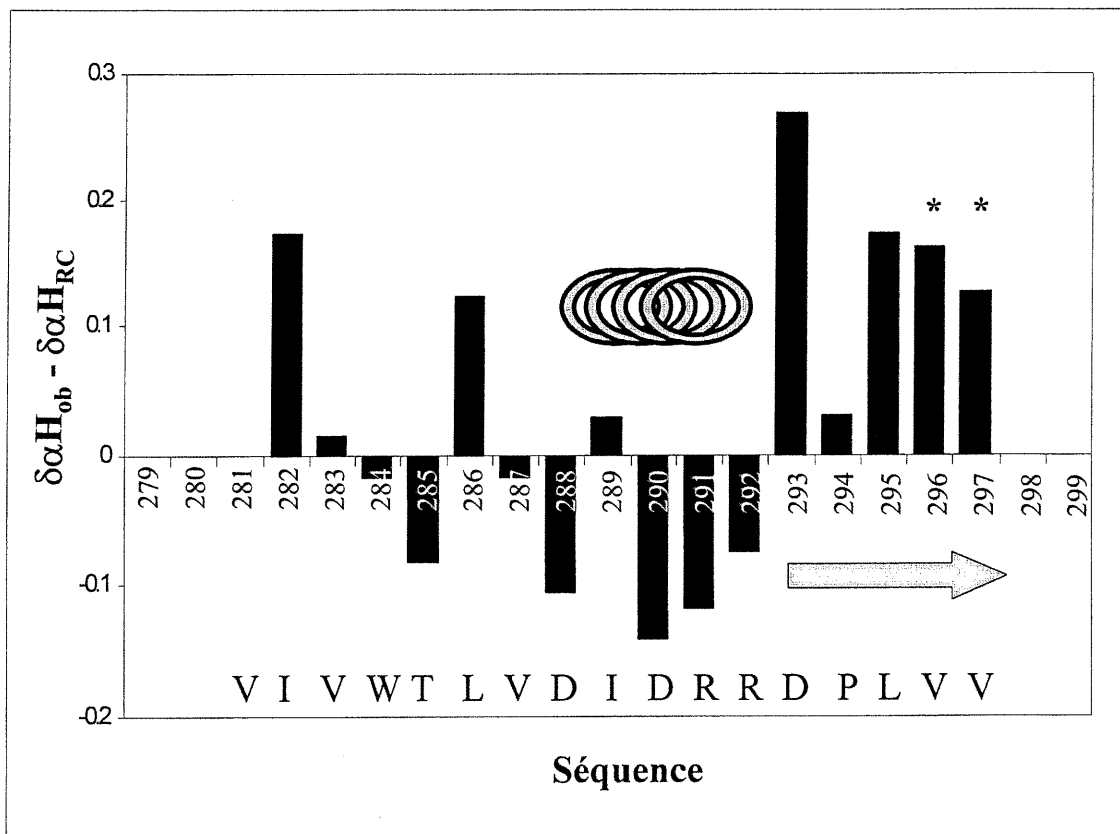


Figure 3.25 : Indice des déplacements chimiques des protons alpha de M2 en présence de deltorphine-II dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Le même phénomène a été observé pour M1 : la présence de deltorphine-II n'a pas induit de changements dans la conformation de M1 (Fig.3.26). Il est important de mentionner que la partie C-terminale de M1 qui n'adopte pas de structure bêta n'a pas été stabilisée par l'interaction de la deltorphine-II avec le peptide, tout comme dans le cas de LB.

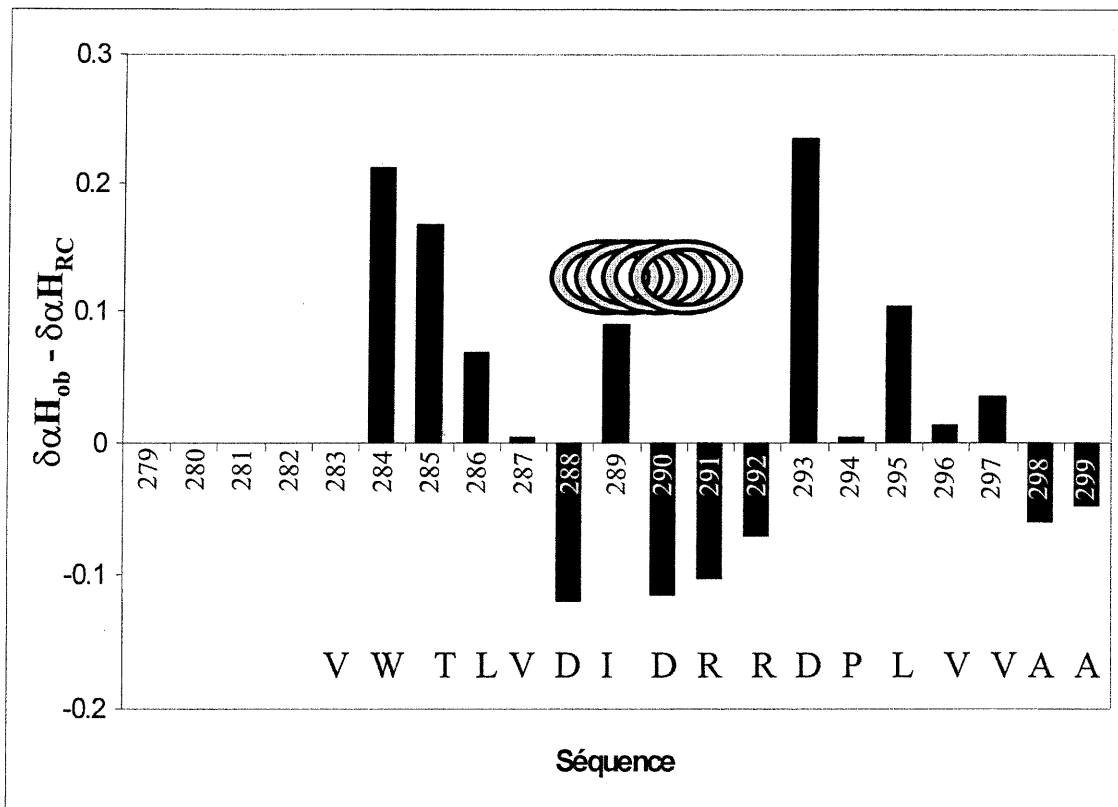


Figure 3. 26 : Indice des déplacements chimiques des protons alpha de M1 en présence de deltorphine-II dans un mélange de HFIP/H₂O à 25°C.

Des études de NOE ont été faites pour la deltorphine-II afin d'avoir une idée sur sa conformation adoptée dans le cosolvant HFIP/H₂O et ainsi faire de la modélisation. Étant donné que la deltorphine-II est un petit peptide, les échanges de conformations sont très rapides. Alors, la valeur de la température a été descendue jusqu'à 10 °C pour ralentir cet échange et ainsi pouvoir observer des NOE entre les acides aminés. La figure 3.27 montre qu'il y a trois NOE dont deux impliquent le résidu Glu-4 : un avec Val-6 et l'autre avec Ala-2 suggérant qu'il y a un coude ou un repliement autour de Glu4. Plusieurs conformations de deltorphine-II ont été rapportées dans la littérature et celle obtenue ici semble être en accord avec la conformation qui rapproche les deux extrémités de peptide.

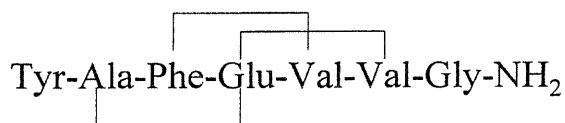


Figure 3.27 : Représentation schématique des NOE inter-résidus observés dans la deltorphine-II dans un mélange de HFIP/H₂O à 10 °C.

Des études d'échange de protons amide de la deltorphine-II ont été faites pour localiser les protons qui sont impliqués dans un pont hydrogène ou ceux qui sont enfouis dans le peptide, qui sont inaccessibles au solvant, afin d'échanger le deuterium pour un proton. D'après les résultats obtenus (Fig.3.28), tous les deuteriums des acides aminés de la deltorphine-II, à la seule exception de celui de l'acide glutamique, ont été échangés pour un proton après 15 minutes (Fig.3.28a). Après trois heures d'incubation, les signaux représentant les protons de l'acide glutamique ne sont pas aussi intenses que les autres acides aminés se trouvant dans le peptide (Fig.3.28b) ce qui suggère que le proton amide de la chaîne principale de l'acide glutamique est impliqué dans un pont hydrogène ou simplement qu'il est protégé du solvant par le repliement du peptide.

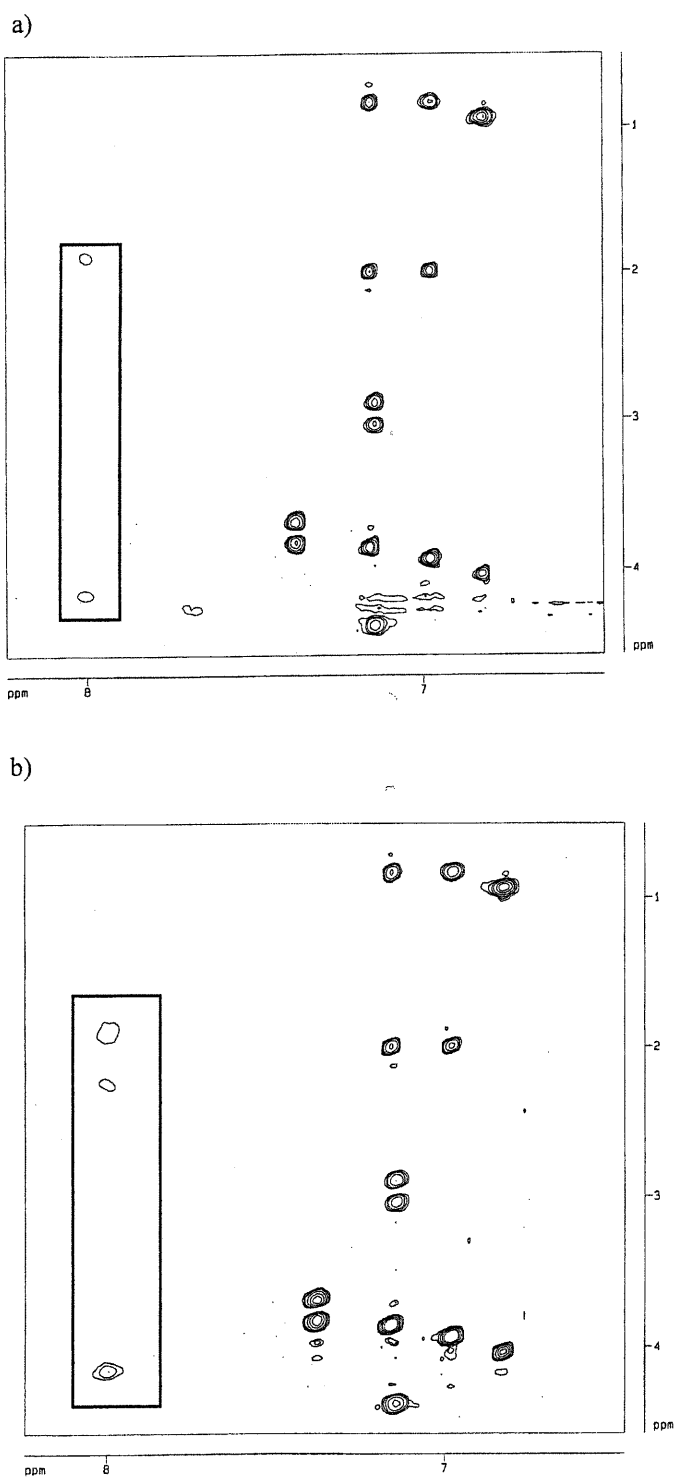


Figure 3.28 : Échange des protons amides de la deltorphine-II a) après 15 minutes d'incubation; b) après 3 heures d'incubation.

Nous avons donc voulu vérifier si l'interaction de la deltorphine-II avec le peptide LB affecte le milieu de l'acide glutamique. D'après le spectre de TOCSY (Fig.3.29 a et b), le proton amide de l'acide glutamique est aussi visible que les autres protons de la deltorphine-II mais pas pour ses protons alpha et bêta. Or, si le NH de Glu-4 de la deltorphine-II est normalement engagé dans un pont hydrogène, l'interaction de la deltorphine-II avec la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain delta opioïde semble briser ce pont d'hydrogène suite à un changement probable de la conformation de la deltorphine-II.

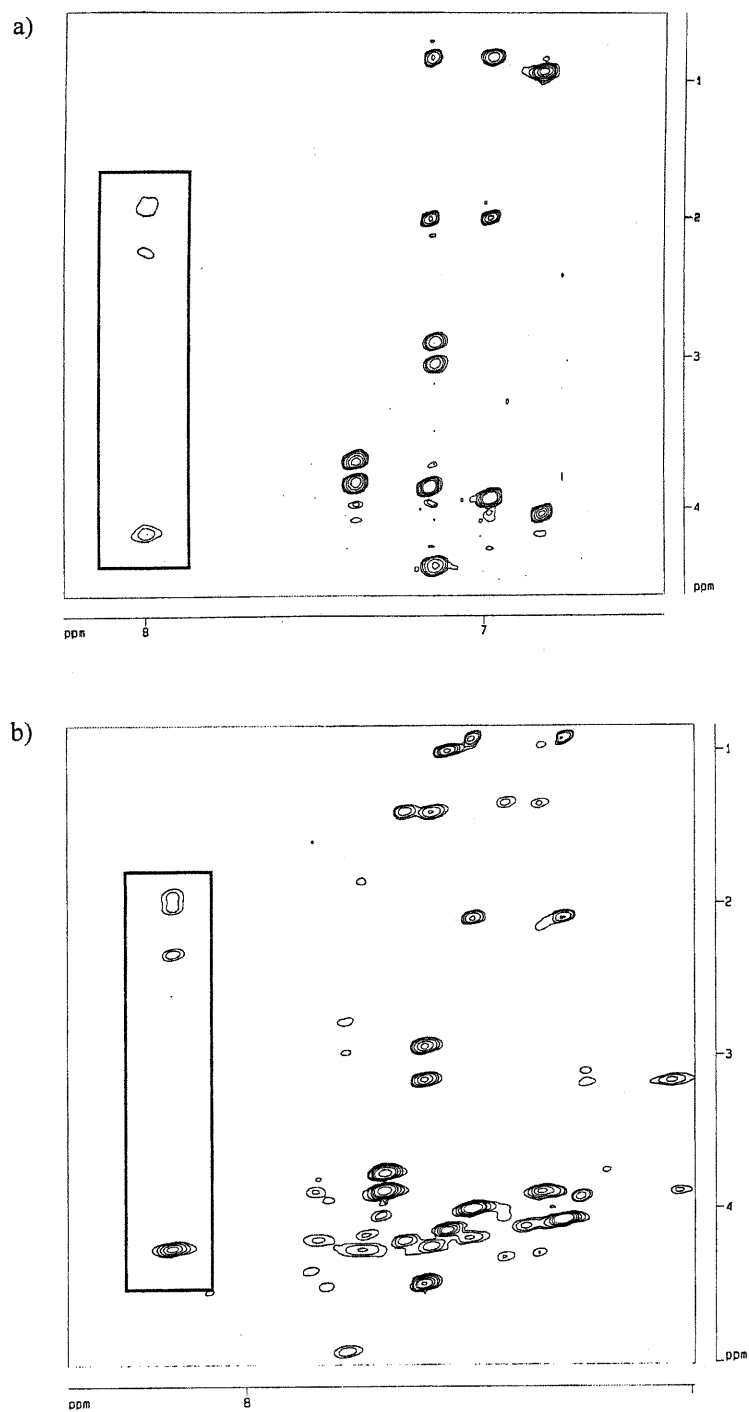


Figure 3.29 : Spectre de TOCSY montrant l'implication de Glu4 de la deltorphine-II dans l'interaction récepteur-peptide; a) deltorphine-II seule; b) deltorphine-II en présence de LB.

Étant donné qu'il est difficile d'analyser le spectre de TOCSY de l'expérience d'échange des protons amides de LB, l'expérience avec M2 a été répétée. Le M2 est solubilisé dans un mélange de HFIP/D₂O et incubé pendant 1h30 puis un spectre de TOCSY a été enregistré. Deux signaux seulement sont observés (Fig.3.30) qui représentent le proton amide des résidus valine 287 et 296, tous les autres protons ayant été échangés pour des deutérons. Cela veut dire que les deux protons amide sont soit impliqués dans un pont hydrogène soit inaccessibles au solvant.

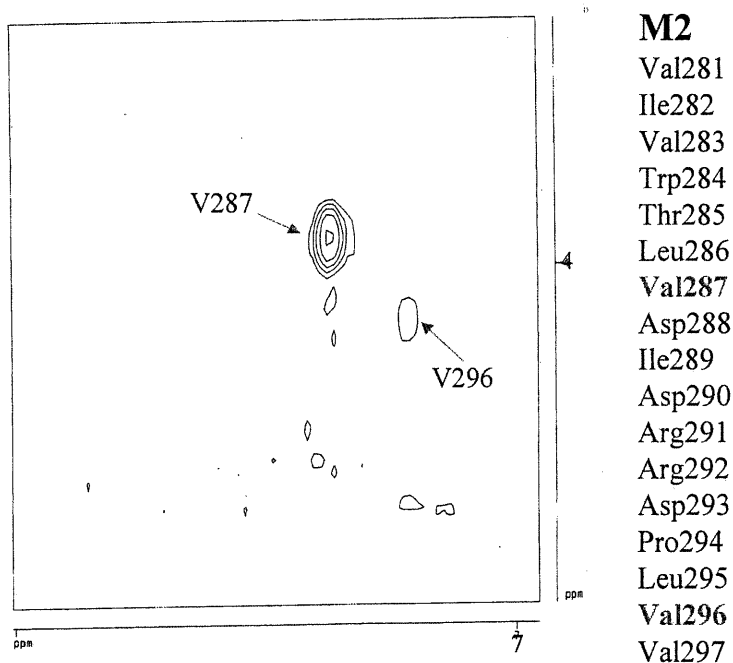


Figure 3.30 : Spectre de TOCSY montrant l'échange de proton amide (α H-NH) de M2 dans un mélange de HFIP/D₂O après 1h30.

En revanche, l'ajout de deltorphine-II semble faire augmenter le nombre de signaux dans le spectre de TOCSY (Fig.3.31). Les protons NH de la Thr-285, Leu-286, Val-287, Leu-295 et des deux valines 296 et 297 du côté de M2 et la glycine du côté de la deltorphine-II sont visibles et il est intéressant de noter que ces acides aminés sont regroupés dans deux régions qui ont un caractère plutôt hydrophobe et qui représentent

les régions importants comme démontrées par la mutagenèse dirigée. La première région est proche du résidu Trp-284 et la deuxième région contient les valines 296 et 297. Alors, il est possible que ces acides aminés jouent un rôle dans le processus de liaison avec la deltorphine-II.

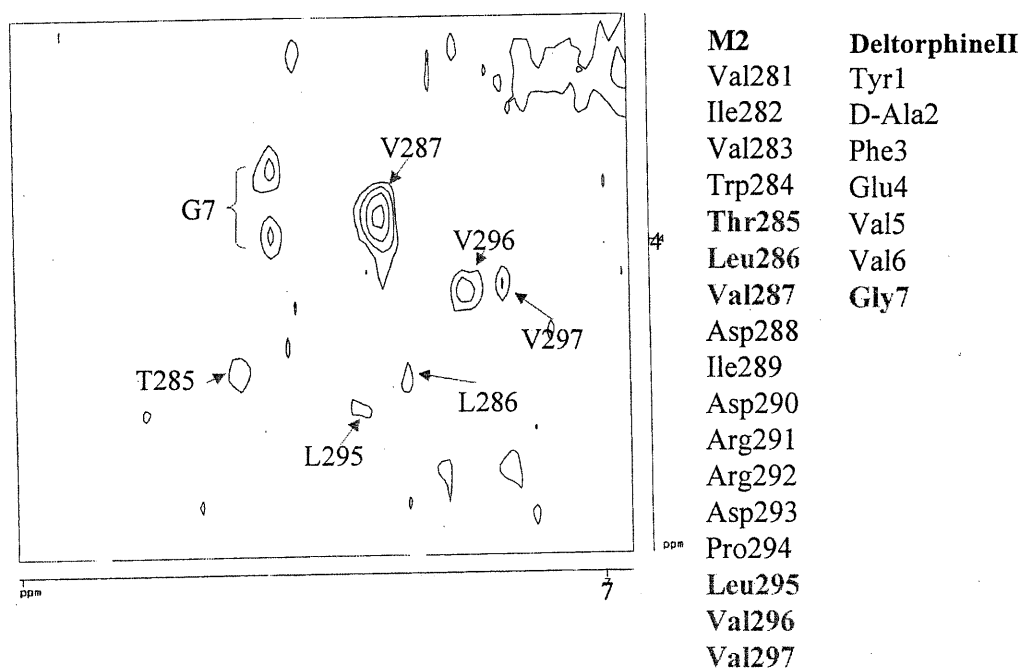


Figure 3.31 : Spectre de TOCSY montrant l'échange des protons amides (α H-NH) de M2 et de la deltorphine-II dans un mélange de HFIP/D₂O après 1h30.

3.7.2 Modélisation moléculaire

Après avoir soumis le LB à plusieurs cycles (> 10,000) de dynamique moléculaire, nous avons obtenu une molécule dont la conformation en hélice a gardé le même emplacement spécifié au début (Fig.3.32). Cela peut indiquer que la conformation adoptée par LB est relativement stable et qu'elle possède une énergie minimale. Donc, nous avons une hélice dans l'extrémité N-terminale tandis qu'une conformation non définie ou aléatoire est retrouvée dans la partie C-terminale. Il est intéressant de noter que les deux groupements aromatiques des résidus Phe-280 et Trp-284 sont très proches

l'un de l'autre. Il est possible d'avoir des interactions aromatique-aromatique entre ces deux acides aminés qui stabilisent l'extrémité N-terminale de l'hélice pour stabiliser la conformation hélicoïdale.

Dans le cas de la deltorphine-II, elle semble posséder une conformation en forme de U dans laquelle les extrémités N- et C-terminales sont proches l'un de l'autre. Les groupements aromatiques des résidus Tyr-1 et Phe-3 sont également à proximité l'un de l'autre.

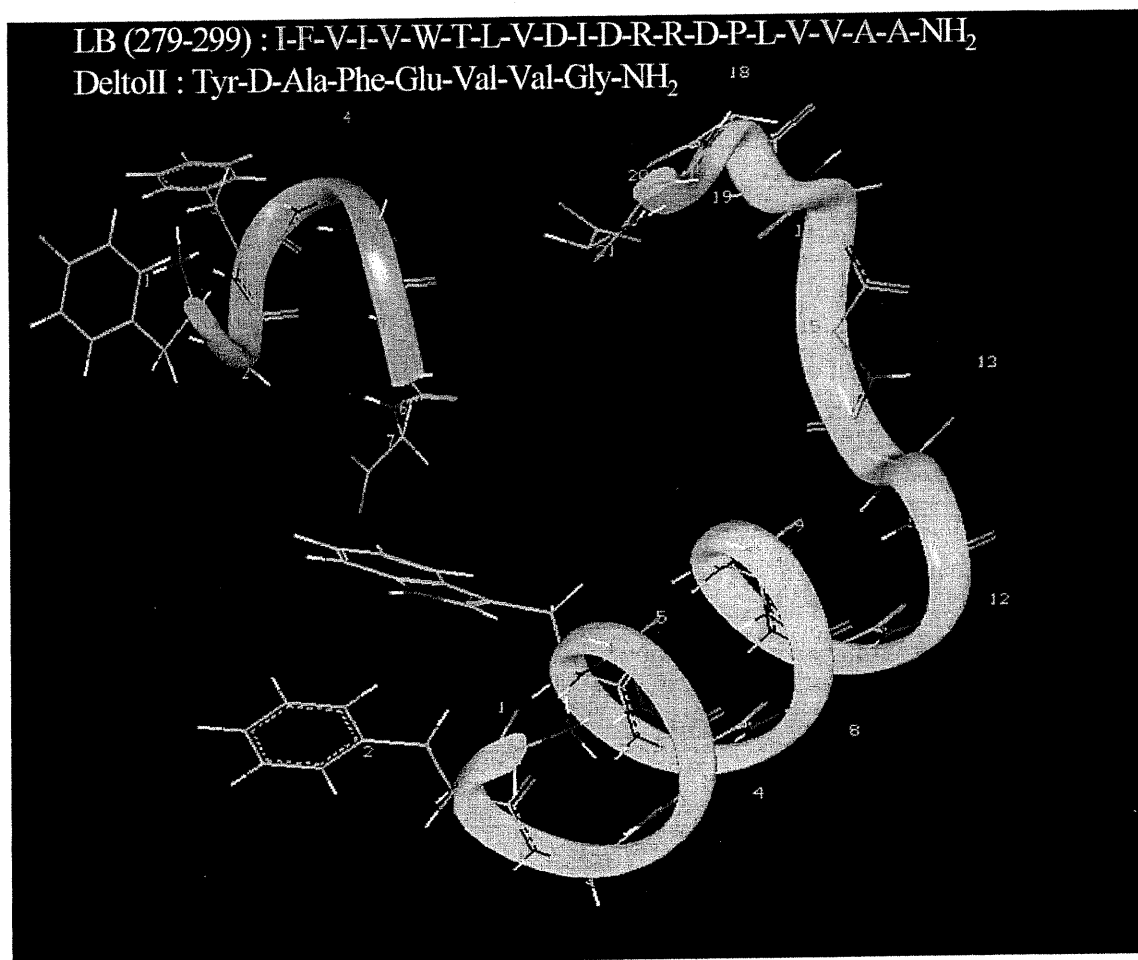


Figure 3.32 : Structure de LB et de la deltorphine-II par modélisation moléculaire.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le premier volet de ce mémoire était de déterminer le meilleur environnement pour permettre l'étude de la conformation de la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain δ -opioïde (chapitre I). Plusieurs solvants ont été essayés, comme des mélanges de SDS/H₂O, TFE/H₂O et HFIP/H₂O. Par des études de CD, il a été observé que le peptide semble adopter une conformation β dans les micelles de SDS. Cette conformation est probablement due à l'agrégation du peptide, des précipités ayant été observés au fond du tube. Le système de cosolvant TFE/H₂O semble être un meilleur solubilisant du peptide car ce dernier a adopté une conformation partiellement hélicoïdale selon le spectre de CD. Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'utilisation du système de cosolvant HFIP/H₂O et c'est ce dernier qui a été adopté pour poursuivre les études car les spectres de RMN sont plus faciles à analyser dans ce système en raison de la visibilité des protons amides de la chaîne principale. Par la suite, il a été démontré que la conformation partielle d'hélice observée n'est pas causée par agrégation ou par dimérisation par une étude de concentration et de pH. De plus, le fait que le pH n'affecte pas la conformation du peptide indique que les charges (acide aminé chargé comme Asp) ne jouent pas un rôle important dans la formation ou dans la stabilisation de la conformation en hélice (voir plus loin pour la deltorphine-II).

Le deuxième volet était d'identifier les résidus importants, qui sont responsables de la conformation hélicoïdale partielle de la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain δ -opioïde, en variant le nombre d'acides aminés TM présents dans le peptide. Quatre peptides de longueur différente ont été synthétisés, possédant tous la partie extracellulaire de la troisième boucle du récepteur δ -opioïde et un nombre différent d'acides aminés compris dans TM6 et TM7. Par des études de CD et de RMN, il a été possible de déterminer l'implication de chaque acide aminé TM dans la conformation du LB. En ce qui concerne la partie N-terminale du peptide, il a été observé que l'élimination des résidus Ile-279 et Phe-280 du LB affecte beaucoup la stabilité de l'hélice dans M2. L'hypothèse qu'il est possible de formuler pour expliquer ce phénomène est que l'absence de l'interaction aromatique-aromatique entre les résidus Phe-280 et Trp-284 existant dans LB déstabilise la conformation d'hélice. En effet, M2

contient une hélice naissante selon les NOE observés dans le NOESY. Les deux acides aminés ayant des positions relatives de $(i, i+3)$ leur chaîne latérale peuvent être proches l'une de l'autre et participer à une interaction qui stabilise la conformation d'hélice. Supprimer deux acides aminés supplémentaires du côté N-terminal (Val-281 et Ile-282) semble affaiblir légèrement la stabilité de l'hélice, ce qui a été observé dans le spectre de CD de M1 et par les études de NOE mais pas par les indices de déplacements chimiques des protons α . La valine et l'isoleucine sont des acides aminés hydrophobes et cela peut probablement stabiliser la conformation d'hélice. Cette constatation est toutefois incertaine car le PB ne semble pas posséder une conformation en hélice comme le M1 même s'il contient les mêmes acides aminés à l'extrémité N-terminale. En réalité, le N-terminal de PB apparaît avoir une conformation aléatoire. Éventuellement, il y a d'autres facteurs qui jouent ici de façon importante comme la grandeur du peptide et la conformation du côté C-terminal. Du côté C-terminal, la présence des alanines 298 et 299 dans LB et M1 déstabilise une structure β observée dans M2 et PB. D'après les NOE aperçus dans le NOESY, il y a probablement un coude impliquant le résidu Pro-294 dans cette région. L'ajout de deux alanines vient, en quelque sorte, interrompre cette structure. En effet, les deux NOE de $(i, i+2)$ existant dans M2 et PB ont disparus dans M1 car il possède les résidus Ala-298 et Ala-299.

Dans le troisième et dernier volet, il sera possible d'analyser les changements obtenus par l'interaction de la deltorphine-II, qui est le ligand endogène du récepteur δ -opioïde, avec la troisième boucle extracellulaire (LB, M2 et M1) et de les comparer avec ceux obtenus par l'interaction avec d'autres ligands μ ou κ -sélectifs. Par les expériences de CD et de RMN, il a été observé que l'ajout de deltorphine-II au LB déstabilise la conformation en hélice et induit l'apparition d'une structure β du côté C-terminal. Nous pouvons avancer comme hypothèse que l'interaction aromatique-aromatique existante entre les résidus Phe-280 et Trp-284 a été interrompue lors de l'interaction de la deltorphine-II avec LB. Nous savons que la deltorphine-II possède deux groupements aromatiques, un dans l'acide aminé Tyr-1 et l'autre dans Phe-3. Ainsi, lorsque les deux peptides sont à proximité (LB et deltorphine-II), il est possible que les groupements

aromatiques de la deltorphine-II s'approchent des deux groupements aromatiques de LB (Phe-280 et Trp-284) de telle sorte à déranger, voire briser, l'interaction aromatique-aromatique présente dans LB entre le résidu Phe-280 et Trp-284. Cette brisure pourrait être la cause de la déstabilisation de l'hélice dans le LB. En effet, la conformation en hélice observée dans le LB en présence de la deltorphine-II ressemble plutôt à celle de M2. Puisque M2 ne contient pas le résidu Phe-280, il n'a pas le groupement aromatique pour faire une interaction avec le résidu Trp-284. Par conséquent, l'absence de l'interaction aromatique-aromatique semble déstabiliser la conformation hélicoïdale dans le cas de M2 et de LB en présence de la deltorphine-II.

Du côté C-terminal, l'apparition d'une structure β quand le LB est en présence de la deltorphine-II a été observée. Cela est probablement dû à l'interaction des valines 5 et 6 de la deltorphine-II avec le segment C-terminal de LB. Cette interaction permet la formation d'un coude β autour du résidu Pro-294. Apparemment, les résidus alanines 298 et 299 interagissent avec les valines 296 et 297 ou bien ils sont disposés d'une manière à ce que l'adoption d'un coude autour du résidu Pro-294 soit impossible, comme il est observé dans le cas de M1 et LB. De plus, l'absence des deux alanines permet la formation de la structure β dans M2 et PB. Il est à noter que Val 5 et Val 6 sont des acides aminés critiques pour la sélectivité de la deltorphine-II envers la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain delta-opioïde (Réf.4, 10).

Si nous examinons plus profondément les changements provoqués par l'ajout de deltorphine-II au LB, nous remarquons que les déplacements chimiques des protons alpha de cinq acides aminés de LB ont changé de manière très marquée par rapport aux autres. Ces acides aminés sont les résidus Trp-284, Thr-285, Leu-286, Val-296 et Val-297. Cela nous indique que l'environnement proche autour de ces acides aminés a beaucoup changé. Nos résultats sont parfaitement en accord avec ce que Valiquette et all ont trouvé au moyen d'études de mutagenèse dirigée. Ils ont mis en évidence l'importance des résidus Trp-284, Val-296 et Val-297 dans la sélectivité du récepteur delta-opioïde à leurs ligands (Réf.3).

Le proton amide de l'acide glutamique 4 de la deltorphine-II semble être impliqué dans un pont hydrogène ou est inaccessible au solvant. D'après les NOE trouvés et par modélisation moléculaire, la deltorphine-II adopte une conformation impliquant un coude centré sur le résidu Glu-4 de sorte à rapprocher l'une de l'autre les extrémités N- et C-terminales. Cette observation est déjà rapportée par d'autres groupes de recherche avec d'autres solvants (Réf.14). L'interaction de LB avec la deltorphine-II fait en sorte que le pont hydrogène est brisé ou que la deltorphine-II change de conformation, rendant ainsi le proton amide plus accessible au solvant. Par conséquent, il y a une ouverture de la conformation de la deltorphine-II et les deux extrémités s'éloignent l'une de l'autre pour sans doute aller interagir avec deux régions différentes de la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain delta-opioïde. Effectivement, plusieurs groupes de chercheurs ont mis en évidence l'importance de l'acide glutamique dans la sélectivité de la deltorphine-II au récepteur delta-opioïde (Réf.4, 13).

L'interaction de la deltorphine-II avec M2 et M1 a aussi été étudiée. D'après le spectre de CD, il apparaît qu'en présence de deltorphine-II il y a un changement de conformation dans le cas de M2, et beaucoup moins important dans le cas de M1. Ceci est aussi observé par RMN mais de façon très subtile. En examinant de plus près M2 seul, nous remarquons que sa conformation est très similaire à celle de LB après interaction avec la deltorphine-II. Cela veut dire que M2 seul adopte une conformation très semblable à celle trouvée par LB après interaction avec la deltorphine-II. Donc, l'ajout de deltorphine-II au M2 devrait déstabiliser encore plus une conformation en hélice déjà instable ou une hélice naissante vu qu'il n'y a pas les interactions aromatique-aromatique entre les résidus Phe-280 et Trp-284. De plus, le M2 a une structure β du côté C-terminal à cause de l'absence des alanines 298 et 299. Donc, les valines 5 et 6 de la deltorphine-II ne vont pas promouvoir un coude déjà existant autour de Pro-294. Par contre, il y a un changement dans le déplacement chimique des protons alpha de Val-296 et Val-297, ce qui suggère une interaction entre les deux peptides à ce niveau. Par conséquent, la RMN n'a pas pu détecter des changements dans la structure secondaire du peptide comme c'est le cas pour LB.

Pour le cas de M1, nous ne pensons pas qu'il y ait une vraie interaction entre le peptide et la deltorphine-II. Il est possible que l'absence de deux acides aminés hydrophobes du côté N-terminal (Val-281 et Ile-282) fasse en sorte que le résidu Trp-284 ait un grand degré de liberté (très mobile) et qu'il soit très difficile pour la deltorphine-II d'interagir avec ce dernier. Cette constatation a été faite car il n'y a pas de changement de conformation du côté C-terminal lors de l'ajout de deltorphine-II, comme dans le cas de LB, car M1 possède aussi les alanines 298 et 299.

Nous savons maintenant que LB et M2 peuvent interagir avec la deltorphine-II. Vu la difficulté de faire une étude d'échange de protons amides avec LB, cette étude a plutôt été faite avec M2. Cette expérience a été menée pour déterminer quels sont les protons amides impliqués dans des ponts hydrogène ou ceux qui sont inaccessibles au solvant. Les résidus Val-287 et Val-296 semblent être impliqués dans une de ces deux situations. L'interaction de la deltorphine-II avec M2 semble faire augmenter le nombre de ponts hydrogène ou l'inaccessibilité du solvant aux protons amides des résidus Thr-285, Leu-286, Val-287, Leu-295, Val-296 et Val-297. Il est intéressant de noter que ces acides aminés sont regroupés en deux régions hydrophobes. La première région hydrophobe est juste à côté d'un résidu important, pour la sélectivité de liaison au récepteur delta-opioïde, déterminé par des expériences de mutagenèse dirigée, Trp-284. La deuxième région implique deux autres résidus importants qui sont valines 296 et 297. En effet, l'importance de la région hydrophobe dans la troisième boucle extracellulaire pour la sélectivité de liaison delta-opioïde a été rapportée par Pepin et al. (Réf.5). Ils ont mis l'emphase sur la région hydrophobe entre les acides aminés 295 et 300 plutôt que sur des acides aminés particuliers comme l'a fait Valiquette et al. (Réf.3) pour l'interaction de la troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde avec les ligands delta sélectifs. Du côté de la deltorphine-II, seulement les signaux du résidu Gly-7 sont observables dans le spectre de TOCSY ce qui indique qu'il y a probablement une interaction entre le segment C-terminal de la deltorphine-II et M2.

Finalement, les changements de conformation de LB en présence des ligands endogènes des récepteurs μ -opioïdes (endomorphine-1 et -2) et κ -opioïde (U50,488) ont

été comparés. Les endomorphines-1 et -2 semblent affecter la conformation de LB. La conformation obtenue suite à l'interaction de LB avec l'endomorphine-2 ressemble à celle obtenue lors de l'interaction de LB avec la deltorphine-II. L'endomorphine-2 comporte, tout comme la deltorphine-II, un résidu tyrosine en position 1 et un résidu phénylalanine en position 3. Nous pouvons imaginer que le type d'interaction entre la deltorphine-II et LB est semblable à celui entre l'endomorphine-2 et LB au niveau du côté N-terminal. Plusieurs études ont démontré que l'orientation spatiale des groupements aromatiques des résidus Tyr-1 et Phe-3 dans la deltorphine-II est importante pour la liaison au récepteur delta-opioïde. Une orientation parallèle des chaînes latérales a été déterminée entre les résidus Tyr-1 et Phe-3 (Réf.4, 42). Il est possible que la présence du résidu proline au lieu de l'alanine en position 2 n'affecte pas tellement l'orientation des chaînes latérales des résidus Tyr-1 et Phe-3 dans l'endomorphine-2. Par conséquent, lorsque la deltorphine-II ou l'endomorphine-2 sont ajoutées au LB, il y a la même interruption de l'interaction aromatique-aromatique entre les résidus Phe-280 et Trp-284 (dans LB) et par la suite une déstabilisation de la conformation en hélice. Par contre, les valines en position 5 et 6 ne sont pas présentes dans l'endomorphine-2. En effet, toute l'extrémité C-terminale de la deltorphine-II est absente de l'endomorphine. Cela veut dire qu'il n'y a pas une bonne interaction entre l'endomorphine et la boucle pour continuer le processus de liaison et ainsi activer le récepteur. D'après des études de biologie moléculaire, plusieurs ont suggéré l'existence de deux étapes dans le processus de liaison des ligands au récepteur delta-opioïde (Réf.3). La première étape est l'interaction du ligand avec la ou les boucle(s) extracellulaire(s) pour la sélectivité delta-opioïde tandis que la deuxième étape est une interaction générale avec les ligands qu'ils soient delta-sélectifs ou non-sélectifs. Une étude récente faite par Monory et al. a démontré par des expériences de liaison que les endomorphines 1 et 2 ne se lient pas au récepteur delta-opioïde de la souris et qu'ils n'inhibent pas l'accumulation d'AMP cyclique ni ne stimulent la liaison de [³⁵S]GTPγS (Réf.15). D'abord, il faut mentionner que les concentrations d'endomorphine utilisées dans leurs études variaient de l'ordre du nanomolaire à l'ordre du micromolaire tandis que nos expériences ont été menées à des concentrations de l'ordre du millimolaire.

Selon nos résultats, il y a une interaction entre les endomorphines et la troisième boucle extracellulaire qui est trop faible pour être détectée par les techniques de liaisons (binding). Cela est probablement dû au fait qu'elles ne possèdent pas l'extrémité C-terminale reconnue comme étant très importante pour l'interaction de la deltorphine-II avec la boucle. De plus, les groupements aromatiques ne sont peut-être pas bien agencés dans l'espace à cause de la présence du résidu proline. Il y a des groupes de recherche essayant de faire des antagonistes au récepteur delta-opioïde avec deux ou trois groupements aromatiques (Réf.44, 48, 49). Pour cette raison, il sera intéressant de faire des modifications à ces peptides pour améliorer leur affinité pour le récepteur delta-opioïde afin de les utiliser comme antagonistes. Par leurs groupements aromatiques, avec une affinité améliorée, les endomorphines peuvent se lier au récepteur sans pouvoir l'activer.

Pour l'endomorphine-1, il y a un changement de conformation lors de l'ajout de l'endomorphine-1 au LB, mais ce n'est pas comme dans le cas de l'endomorphine-2 car cette dernière possède un résidu phénylalanine au lieu d'un résidu tryptophane en position 3. Il est vrai que les deux peptides possèdent deux groupements aromatiques et que les deux devraient provoquer une déstabilisation de l'hélice mais il y a peut-être d'autres facteurs qui entrent en jeu comme l'orientation spatiale des groupements aromatiques ou un effet stérique de la chaîne latérale du tryptophane qui n'existe pas avec le résidu phénylalanine. Quand nous avons ajouté U50,488 avec LB, nous n'avons observé aucun changement dans le spectre de CD. Cela veut dire que cet agoniste κ -sélectif n'interagit pas du tout avec LB. Il est à noter que U50,488 possède seulement un groupement aromatique. De plus, plusieurs ligands et agonistes sélectifs pour le récepteur delta-opioïde contiennent deux groupements aromatiques comme ceux utilisés dans l'étude de Valiquette et al. (voir Fig. 1.3) (Réf.3). Cela suggère fortement que la première interaction se passe au niveau des acides aminés contenant un groupement aromatique et qu'il en faut deux. Par la suite, la deuxième interaction (interaction hydrophobique) sera le tour des valines qui sont très importantes pour la sélectivité aux récepteurs delta-opioïdes.

Les résidus Arg-291 et Arg-292 ont été identifiés comme étant importants pour la liaison de la deltorphine-II au récepteur (Réf. 3-5). En effet, il est possible que la charge positive portée par ces deux résidus permette une interaction électrostatique avec la charge négative du résidu Glu-4 dans la deltorphine-II. Cela est concordant avec notre modèle d'interaction car l'extrémité N-terminale de la deltorphine-II interagit avec l'extrémité N-terminale de la boucle (interaction au niveau des groupements aromatiques) et le segment C-terminal interagit avec les résidus valines 296 et 297. Donc, une interaction entre les chaînes latérales de Glu-4, Arg-291 et Arg-292 est fort possible. Il nous a été impossible de vérifier cette hypothèse (interaction entre le Glu-4 et les Arg 291 et 292) car le pH de nos échantillons était bas ce qui rend le Glu-4 neutre.

En somme, nous avons démontré que la troisième boucle extracellulaire du récepteur humain delta-opioïde adopte une conformation en hélice partielle dans le cosolvant HFIP/H₂O et que cette dernière s'étend entre les résidus Val-283 et Arg-291. La conformation hélicoïdale est stabilisée par une interaction aromatique-aromatique entre les résidus Phe-280 et Trp-284 tandis que la présence des résidus alanines 298 et 299 déstabilise une conformation de coude β impliquant le résidu Pro-294. L'interaction de la deltorphine-II avec la troisième boucle extracellulaire déstabilise la conformation en hélice en interrompant l'interaction aromatique-aromatique existant dans l'extrémité N-terminale du peptide entre les deux groupements aromatiques de la deltorphine-II (Tyr-1 et Phe-3). De plus, l'extrémité C-terminal de deltorphine-II semble stabiliser la portion C-terminale de la troisième boucle extracellulaire car cette dernière retrouve une structure β . Finalement, nous avons mis en évidence l'importance des résidus Trp-284, Val-296 et Val-297 dans l'interaction de la troisième boucle extracellulaire avec la deltorphine-II, comme il avait été démontré précédemment au moyen des études structure-fonction lors d'expériences de mutagenèse dirigée.

Plusieurs études futures peuvent être entreprises, par exemple démontrer le rôle de chaque acide aminé dans le changement de conformation de la troisième boucle extracellulaire. Cela serait possible en faisant des mutations ponctuelles des résidus pour les remplacer par des alanines, dont la chaîne latérale n'est constituée que d'un

groupement de méthyle, et ainsi étudier la conformation par RMN et CD. De cette manière, il serait possible d'avoir une idée précise de l'implication de chaque acide aminé dans le changement de conformation du peptide. Par exemple, le remplacement de Trp-280 par un alanine pourrait déstabiliser l'hélice existante dans la troisième boucle extracellulaire du récepteur delta-opioïde. Ainsi, nous pouvons élucider les détails d'interaction ligand-récepteur. Une autre étude possible est de déterminer la distance entre la deltorphine-II et la troisième boucle extracellulaire par spectrométrie de fluorescence afin de vérifier si réellement il y a une interaction ou un rapprochement des groupements aromatiques entre les deux peptides. Par la suite, il serait intéressant de comparer la distance déterminée de cette manière avec celle entre la troisième boucle extracellulaire et les ligands μ - et κ -opioïdes. Finalement, il serait intéressant de faire des mutations ponctuelles dans la deltorphine-II et d'étudier la conformation de la troisième boucle extracellulaire en présence de ces mutants pour mettre en évidence l'implication des acides aminés dans la deltorphine-II dans le processus d'interaction.

RÉFÉRENCES

1. C. Dubray. Les systèmes opioïdurgiques, Laboratoire de Pharmacologie médicale-INSERM EPI 9904 - Clermont-terran. (<http://www.univ-st-etienne.fr/stephado/capacite/cours/opioid.htm>).
2. Pr. H. Allain et al. Les récepteurs aux opiacés, Laboratoire de Pharmacologie Expérimentale et Clinique, (<http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pharmaco/opiacés.htm>).
3. M. Valiquette et al. Involvement of Trp-284, Val-296, and Val-297 of the Human δ -Opioid Receptor in Binding of δ -Selective Ligands. The Journal of Biological Chemistry, 1996, Vol. 271, No (31), 18789-19796.
4. L. H. Lazarus et al. What peptides these deltorphins be, Progress in Neurobiology, 1999, Vol. 57, 377-420.
5. M-C. Pepin et al. Novel « Restoration of Function » Mutagenesis Strategy to Identify Amino Acids of the δ -Opioid Receptor Involved in Ligand Binding. The Journal of Biological Chemistry, 1997, Vol. 272, No 14, 9260-9267.
6. Metzger, T. G. et al. On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity, FEBS Lett., 1995, Vol. 375, 1-4.
7. Wang, X. et al. Role of opioid receptors (μ , δ_1 , δ_2) in modulating responses of nociceptive neurons in the superficial and deeper dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis) in the rat, Brain Res. 1996, Vol. 739, 235-243.
8. D. Tourwé et al. Conformational Restriction of Tyr and Phe Side Chains in Opioid Peptides : Information About Preferred and Bioactive Side-Chain Topology, Biopolymers, 1995, Vol. 38, 1-12.

9. R. Guerrini et al. Opioid receptor selectivity alteration by single residue replacement : synthesis and activity profile of [Dmt¹] deltorphin B, *European Journal of Pharmacology*, 1996, Vol. 302, 37-42.
10. P. Melchiorri et al, Structure-activity relationships of the δ -opioid-selective agonists, deltorphins, *European Journal of Pharmacology*, 1991, Vol. 195, 201-207.
11. O. Crescenzi et al. δ -Selective opioid peptides containing a single aromatic residue in the message domain: an NMR conformational analysis, *Journal of Peptide Science*, 1995, Vol. 2, 290-308.
12. G. Balboni et al. New features of the δ -opioid receptor : conformational properties of deltorphin I analogues, *Biochemical and Biophysical research communications*, 1990, Vol. 169, 617-622.
13. Y. Ohno et al. Conformation of deltorphin-II in membrane environment studied by two-dimensional NMR spectroscopy and molecular dynamics calculations, *Eur. J. Biochem*, 1992, Vol. 212, 185-191.
14. M. Segawa et al. Comparative conformational analyses of μ -selective dermorphin and δ -selective deltorphin-II in aqueous solution by ¹H-NMR spectroscopy, *Int. J. Peptide Protein Res*, 1994, Vol. 44, 295-304.
15. K. Monory et al. Specific activation of the μ opioid receptor (MOR) by endomorphin 1 and endomorphin 2, *European Journal of Neuroscience*, 2000, Vol. 12, 577-584.
16. The discovery and isolation of a potent and selective agonist for the μ -opiate receptor from brain, (<http://www.peptide.co.jp/eng/new/pinews/4333-v.htm>).
17. Ronsisvalle G. et al. Non-peptide ligands for opioid receptors. Design of kappa-specific agonists, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1993, Vol. 36(13), 1860-5.

18. W. Curtis Johnson. Jr. Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Practical Guide, , PROTEINS: Structure, Function, and Genetics, 1990, Vol. 7, 205-214.
19. Spectroscopic Methods in Biochemistry, 87-100.
20. Circular Dichroism Spectroscopy (http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/info_cd.html).
21. J-W. Cheng. Circular Dichroism course, (http://tel.life.nthu.deu.tw/BiophyChem/CD/CD_1htm).
22. Michael Prince Okoh, Applications of CD spectroscopy to protein structure research, (<http://pps98.cryst.bbk.ac.uk/assignment/projects/okoh/cdpro.htm>), 1997/1998.
23. Alliance Protein Laboratories Inc, Circular Dichroism, (http://www.ap-lab.com/circular_dichroism.htm).
24. B. Rupp, Circular Dichroism Spectroscopy, (<http://www-structure.llnl.gov/cd/cdtutorial.htm>), 2000.
25. Cours gradué de chimie à l'université Rutgers, Circular Dichroism Spectroscopy of Biomolecules, (<http://chemistry.rutgers.edu.chem585/lecture1.html>).
26. Y-H. Chen et al. Determination of the Secondary Structures of Proteins by Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion, (1972), pp.
27. Birkbeck University of London, The Principles of Protein Structure, (http://broccoli.mbb.ki.se/pps_course_96/ss_960723_21.html), 1996.
28. M. Pellegrini et al. Conformational Characterization of a Peptide Mimetic of the Third Cytoplasmic Loop of the G-Protein Coupled Parathyroid

- Hormone/Parathyroid Hormone Related Protein Receptor, Wiley & Sons Inc., 1997, 653-666.
29. K. Mukhopadhyay et al. Conformation induction in melanotropic peptides by trifluoroethanol: fluorescence and circular dichroism study, *Biophysical Chemistry*, 1998, Vol. 74, 175-186.
 30. H. Gunther, *La spectroscopie de RMN*, Masson, Paris Milan Barcelone, 1994.
 31. F. Rivoal et al. Cours sur la RMN, Ressources national de chimie, (<http://www.educnet.education.fr/rnchimie/phys/magnet/rmn/rmn.htm>).
 32. S. Faucquez, *Spectroscopie de Résonance Magnétique (RMN)*, (<http://perso.libertysurf.fr/sylvain.faucquez/Science/Chimie.htm>).
 33. Vincent Roukine, *Mesure de temps de relaxation en résonance magnétique nucléaire*, (<http://perso.wanadoo.fr/rsf/rmn/magenu.htm>), 1998.
 34. Cours à l'Université de Rennes, *Imagerie par résonance magnétique*, (http://www.med.univ-rennes1.fr/cerf/edicerf/BASES/BA004_idx.html).
 35. Wuthrich, Kurt, *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley & Sons, Inc, 1986.
 36. Marc Bria et Pierre Watkin, *La spectroscopie de RMN à deux dimensions*, Centre Commun de Mesures RMN (Lille_1), (http://www.univ-lill1.fr/lcom/RMN2D/index1.htm#p08_fr.htm), 1996-2001.
 37. Dr. Keates, *Cours Chem*730 Proteins and Nucleic acids*, University of Guelph, 2001.
 38. Yves Thériault, *Détermination de la structure tridimensionnelle de polypeptides hormonaux par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire*, Université de Montréal, 1988.

39. D. S. Wishart et al. The chemical shift index: A fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy, *Biochemistry*, 1991, Vol. 31, 1647-1651.
40. H. Jane Dyson and Peter E. Wright, Defining solution conformations of small linear peptides, *Annu. Res. Biophys. Biophys. Chem*, 1991, Vol. 20, 519-38.
41. Hermann Dugas, Introduction à la modélisation moléculaire, cours CHM6361, (www.centrcn.umontreal.ca/~dugas/CHM6361).
42. RMN 2D, Bruker (1993), Poly. 1, 2 et 3.
43. Jeremy K. M. Sanders et Brian K. Hunter, *Modern NMR Spectroscopy: A guide for Chemists*, 2ème édition, Oxford University press, 1994.
44. Peter W. Schiller et al. TIPP[Ψ]: A highly potent and stable pseudopeptide δ opioid receptor antagonist with extraordinary δ selectivity, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1993, Vol. 36, 3182-87.
45. D. Vincent Waterhous et al. Importance of Environment in Determining Secondary Structure in Proteins, *Biochemistry*, 1994, Vol. 33, 2121-2128.
46. John R. Cort et al. Formation of a Molten-Globule-like State of Myoglobin in Aqueous Hexafluoroisopropanol, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, Vol.233, 687-691.
47. Sharon D. Bryant et al. Topographical conformations of deltorphins predicated δ opioid receptor affinity, *J. Am. Soc*, 1992, Vol. 115, 8503-04.
48. G. Gregg Bonner et al. Opiate aromatic pharmacophore structure-activity relationships in CTAP analogues determined by topographical bias, two-dimensional NMR, and biological activity assays, *J. Med. Chem*, 2000, Vol. 43, 569-580.

49. Wolfgang Brandt. A uniform molecular model of δ opioid agonist and antagonist pharmacophore conformations, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1998, Vol. 12, 615-621.
50. Christine Gaspin et al. <http://www.inra.fr/bia/T/schiex/Doc/SCP/node17.html>, Institut National de la recherche Agronomique, 1996.
51. Ji-Chun Xue et al. Differential Binding domains of Peptide and Non-Peptide ligands in the Cloned Rat κ Opioid Receptor, *JBC*, 1994, Vol. 269, No. 48, 30196-30199.
52. Irina D. Pogozheva. Opioid Receptor Three-Dimensional Structures from Distance Geometry Calculations with Hydrogen Bonding Constraints, *Biophysical Journal*, 1998, Vol. 75, 612-634.