

NES, G. J. H. VAN & VOS, A. (1979). *Acta Cryst.* To be published.  
 STEWART, R. F. (1977). *Isr. J. Chem.* **16**, 124–131.  
 STEWART, R. F., BENTLEY, J. & GOODMAN, B. (1975). *J. Chem. Phys.* **63**, 3786–3793.  
 WAL, H. R. VAN DER (1979). Thesis, Univ. of Groningen.

WAL, H. R. VAN DER, DE BOER, J. L. & VOS, A. (1979). *Acta Cryst.* **A35**, 685–688.  
 WAL, H. R. VAN DER & VOS, A. (1979a). *Acta Cryst.* **B35**, 1793–1804.  
 WAL, H. R. VAN DER & VOS, A. (1979b). *Acta Cryst.* **B35**, 1804–1809.

*Acta Cryst.* (1979). **B35**, 1812–1819

## Opiacés Peptidiques: Structure et Conformation de Deux Fragments d'Enképhalines, Tyr-Gly-Gly-Phe et Gly-Gly-Phe-Leu

PAR THIERRY PRANGÉ ET CLAUDINE PASCARD

Laboratoire de Cristallogénie, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91190 Gif sur Yvette, France

(Reçu le 23 octobre 1978, accepté le 23 avril 1979)

### Abstract

The crystal structures of two enkephalin fragments, Tyr-Gly-Gly-Phe (TGGP),  $C_{22}H_{26}N_4O_6$ , and Gly-Gly-Phe-Leu (GGPL),  $C_{19}H_{28}N_4O_5$ , have been determined by direct methods. TGGP is orthorhombic, space group  $P2_12_12_1$  with  $a = 12.912$  (4),  $b = 21.730$  (5),  $c = 10.760$  (4) Å,  $V = 3019.0$  Å<sup>3</sup>,  $D_x = 1.20$  Mg m<sup>-3</sup>,  $Z = 4$ ; GGPL is monoclinic, space group  $P2_1$  with  $a = 9.110$  (3),  $b = 6.200$  (2),  $c = 19.760$  (4) Å,  $\beta = 102.6$  (1)°,  $V = 1089.9$  Å<sup>3</sup>,  $D_x = 1.25$  Mg m<sup>-3</sup> and  $Z = 2$ . Refinements with least-squares methods led to  $R = 8.2\%$  with 2396 reflections (TGGP) and  $R = 7.3\%$  with 1719 reflections (GGPL) [ $I > 2\sigma(I)$ ]. The conformations of the chains are rather different; TGGP undergoes a  $GG\beta$  turn, while GGPL exhibits mainly a bent conformation without intramolecular head-to-tail interaction. These structural features are compared to those of Leu-enkephalin and discussed in terms of possible conformational influence on the biological response for the peptide.

La découverte de petits peptides responsables d'une puissante activité analgésique, de type morphinique, dans le cerveau des mammifères (Hughes, Smith, Kosterlitz, Fothergill, Morgan & Morris, 1975), a soulevé un intérêt considérable quant à leur utilisation potentielle en thérapeutique humaine. Cependant, si ces espoirs ont été rapidement déçus,\* l'intérêt pour les études structurales des sites récepteurs des dérivés opiacés a rebondi. Il s'agit en effet de toute une famille

de substances dont il est possible de faire varier la composition, suivant les possibilités de la synthèse peptidique, et de comparer leur pouvoir morphinique, afin de préciser la nature et la topologie de ces sites récepteurs. Ainsi, depuis la découverte des deux pentapeptides responsables de l'activité endogénique, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met ('Met-Enk') et Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu ('Leu-Enk'), de nombreux dérivés ont été obtenus (Bajusz, Ronai, Szekely, Dunai-Kovacs & Graf, 1976; Terenius, Wahlström, Lindberg, Karlsson & Ragnarsson, 1976; Morgan, Smith, Waterfield, Hughes & Kosterlitz, 1976; Dulla, Gormley, Hayward, Morlay, Shaw, Stacey & Turnbull, 1977). Ils ont permis de dégager, pour le maintien de l'activité, les principaux caractères suivants:

— La Tyr<sup>1</sup>, amino acide N-terminal, est essentielle, ainsi que le résidu Gly<sup>3</sup>.

— L'acide aminé C-terminal (Leu<sup>5</sup> ou Met<sup>5</sup>) est assez peu sélectif, mais son élimination entraîne une perte importante de l'activité.

— Le remplacement du résidu Gly<sup>2</sup> par un autre amino acide peut induire une augmentation notable de son pouvoir analgésique, surtout s'il s'agit d'un résidu D qui entraîne un surcroît de résistance aux peptidases (Pert, Pert, Chang & Fong, 1976; Hambrook, Morgan, Rance & Smith, 1976; Yamashiro, Tseng, Doneen, Loh & Li, 1977; Walker, Berntson, Sandman, Coy, Schally & Kastin, 1977).

— La modification du quatrième résidu (Phe) n'est pas très importante, tant que l'on respecte le stéréomimétisme (groupe N-benzyle...); l'activité disparaît rapidement dans les autres cas.

L'analyse de ces relations mène à faire plusieurs remarques: (1) La présence des deux phényles est primordiale (ceci rejoint les conclusions structurales de

\* A cause du phénomène d'accoutumance que l'on aurait pu croire absent, du fait de la nature endogénique des produits.

quelques agonistes de la morphine). (2) Les interactions hydrophobes de la chaîne jouent un rôle important. Par contre, les interactions dipolaires  $\text{NH}_3^+/\text{COO}^-$  semblent moins déterminantes: l'activité subsiste si l'on rajoute d'autres résidus, ou groupes alkyles aux deux extrémités. (3) Les possibilités de torsion de la chaîne peptidique, *a priori* plus importantes que dans le cas des morphiniques, doivent être réduites pour les enképhalines. Elles constituent la grande inconnue de toute étude de relation structure/activité, et c'est pour cette raison que de nombreuses équipes se sont attachées à les découvrir et les décrire, soit en solution par méthodes physico-chimiques [spectroscopie de fluorescence (Schiller, Yam & Lis, 1977); RMN du proton et du  $^{13}\text{C}$  (Roques, Garbay-Jaureguiberry, Oberlin, Anteunis & Lala, 1976; Jones, Gibbons & Garsky, 1976; Garbay-Jaureguiberry, Roques, Oberlin, Anteunis & Lala, 1976; Garbay-Jaureguiberry, Roques, Oberlin, Anteunis, Combrisson & Lallemand, 1977; Khaled, Long, Thompson, Bradley, Brown & Urry, 1977); dichroïsme circulaire (Spirtes, Schwartz, Mattice & Coy, 1978)], soit par des études de conformations théoriques (De Coen, Humblet & Koch, 1977; Isogai, Nemethy & Scheraga, 1977; Momany, 1977; Bradbury, Smyth & Snell, 1976).

Toutes ces études ont permis de dégager les caractéristiques structurales suivantes:

– Dans tous les cas, la chaîne adopte une conformation privilégiée très bien définie, repliée par liaison hydrogène intramoléculaire ( $\beta$  turn) pour les formes zwitterioniques, linéaires pour les formes cationiques (Bleich, Cutnell, Day, Freer, Glasel & McKelvy, 1976).

– Leu<sup>5</sup> ou Met<sup>5</sup> n'induisent pas de changement conformationnel notable, l'un par rapport à l'autre.

– Les structures zwitterioniques semblent bloquées par liaison hydrogène entre le CO de Gly<sup>2</sup> et le NH de Leu<sup>5</sup> (ou Met<sup>5</sup>) (créant un GG $\beta$  turn observé par RMN).

– Les conformations théoriques, déduites de considérations énergétiques, sont elles aussi en faveur de  $\beta$  turns (dont un entre le CO de Tyr<sup>1</sup> et le NH de Phe<sup>4</sup>).

– La distance des deux noyaux aromatiques de Tyr<sup>1</sup> et Phe<sup>4</sup> est d'environ 10 à 11 Å (Schiller *et al.*, 1977).

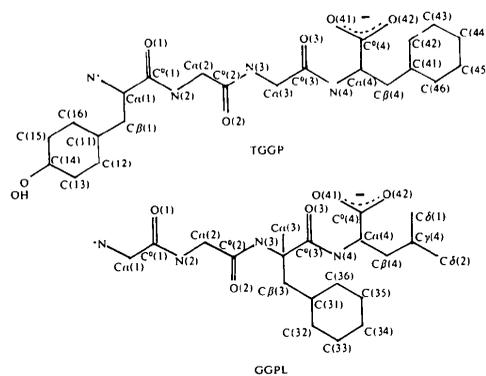
– La distance des deux pôles hydrophiles  $\text{OH}(\text{Tyr}^1) \cdots \text{NH}_3^+(\text{Tyr}^1)$  doit être d'environ 6,8–7,2 Å, distance semblable à celle observée dans les dérivés morphiniques (Horn & Rodgers, 1976; Mackey & Crowfoot-Hodgkin, 1955; Lami & Jung, 1970, 1971).

Si rien ne permet d'affirmer qu'une conformation privilégiée de la chaîne peptidique en solution se retrouve intacte aux sites récepteurs, il est possible de prédire que les conformations interdites, ou énergétiquement défavorisées, soit ne s'y retrouveront pas, soit entraîneront une perte de l'activité. C'est souvent sur ces bases que des modèles conformationnels ont été suggérés.

L'étude par rayons X de monocristaux d'enképhalines a également été très tôt envisagée; il est en effet séduisant de penser que les interactions peptide/peptide dans le cristal présentent quelques analogies avec les interactions peptide/protéine au site récepteur. Cependant, les cristaux d'enképhalines sont difficiles à obtenir: la Met-Enk cristallise très mal; seule la Leu-Enk a pu donner des cristaux petits et de piètre valeur. D'un autre côté, la forme cationique de la Leu-Enk cristallise bien mais la structure est en désordre et relativement complexe (deux molécules dans l'unité asymétrique).

La résolution de la structure de la Leu-Enk vient d'être récemment publiée (Smith & Griffin, 1978).

Pour notre part, nous nous sommes attachés à étudier la conformation de deux fragments d'enképhalines: Tyr-Gly-Gly-Phe et Gly-Gly-Phe-Leu (TGGP et GGPL, respectivement).



Le premier composé semble posséder encore une faible affinité pour le récepteur, mais il est, comme le deuxième composé, totalement inactif.

Ces deux dérivés ont été sélectionnés afin de vérifier l'hypothèse d'une influence conformationnelle sur l'activité. Il a en effet récemment été supposé qu'un repliement de la chaîne de type GP $\beta$  'bend' est beaucoup plus favorable qu'un repliement de type GG $\beta$  bend (Fournié-Zaluski, Prangé, Pascard & Roques, 1977; Roques, Fournié-Zaluski, Gacel, Garbay-Jaureguiberry, Feillion & Oberlin, 1979). C'est dans cette optique que nous avons analysé ces deux tétra-peptides en déterminant l'influence de la suppression, soit du résidu N-terminal (GGPL), soit du résidu C-terminal (TGGP). Les résultats obtenus seront comparés avec ceux de la Leu-Enk.

## Partie expérimentale

Les deux fragments Tyr-Gly-Gly-Phe (TGGP) et Gly-Gly-Phe-Leu (GGPL) ont été obtenus de façon classique par synthèse peptidique en phase liquide (Fournié-Zaluski, Prangé, Pascard & Roques, 1977). Les cristallisations ont été faites, par diffusion d'eau

dans une solution concentrée du diméthylsulfoxyde ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), dans le cas de TGGP, et simple recristallisation dans l'eau pour GGPL.

Les paramètres de maille ont été mesurés sur diffractomètre automatique à quatre cercles Philips PW 1100, avec la radiation  $\text{Cu } K\alpha$ , sélectionnée par un monochromateur au graphite. Les intensités ont été mesurées, par la méthode de balayage  $\theta/2\theta$  (entre les limites  $2^\circ < 2\theta < 64^\circ$ ). Les conditions d'enregistrement sont les suivantes: TGGP: dimensions du cristal:  $0,3 \times 0,3 \times 0,4 \text{ mm}$  ( $\mu = 0,74 \text{ mm}^{-1}$ ), vitesse de balayage:  $0,12^\circ \text{ s}^{-1}$ , chaque réflexion étant mesurée quatre fois sous un angle de  $2,5^\circ$ ; GGPL: dimensions du cristal:  $0,1 \times 0,1 \times 0,5 \text{ mm}$  ( $\mu = 0,76 \text{ mm}^{-1}$ ) sous capillaire de Lindemann, vitesse de balayage:  $0,05^\circ \text{ s}^{-1}$ , chaque réflexion étant mesurée deux fois sous un angle de  $1,8^\circ$ . Dans chaque cas, le fond continu a été déduit par extrapolation d'une courbe de mesure en fonction de  $\theta$ . Les intensités ont été converties en facteurs de structure après corrections des facteurs de Lorentz et de polarisation.

### Détermination des structures et affinements

Les deux structures ont été résolues de façon classique par l'application de la technique de multirésolution (Germain, Main & Woolfson, 1971). Les différents paramètres ont été affinés, dans les deux cas (méthode des moindres carrés) par des cycles en matrice complète (Busing, Martin & Levy, 1962) sur les coordonnées et les facteurs d'agitation thermique isotropes. En fin d'affinement, une molécule de  $\text{Me}_2\text{SO}$ , relativement désordonnée et de poids voisin de  $\frac{1}{2}$ , et trois molécules d'eau ont été localisées dans la structure de TGGP. Le deuxième fragment GGPL pour sa part ne retient qu'une molécule d'eau dans la maille cristalline.

Les atomes d'hydrogène ont été, pour la plupart, introduits en position théorique en les affectant d'un facteur d'agitation thermique isotrope égal à celui de l'atome porteur.

Une deuxième série de cycles d'affinements, en employant des facteurs d'agitation thermique anisotrope, a alors été entreprise sur les atomes lourds et a conduit aux facteurs d'accord  $R = 8,2\%$  pour TGGP ( $R_w = 9,4\%$ ) et  $R = 7,3\%$  pour GGPL ( $R_w = 9,2\%$ ).  $R_w$  a été calculé en minimisant  $\sum w(F_o - F_c)^2$  où  $w = 1/\sigma^2(F_o)$ ,  $\sigma$  étant déterminé à partir des erreurs statistiques de comptage.\*

Les coordonnées atomiques sont données dans le Tableau 1 pour les atomes lourds. Les distances en Å et les angles de valence en degrés sont indiqués sur la Fig. 1.

### Discussion

Comme il a été indiqué plus haut, deux paramètres importants sont à dégager: (1) la conformation des chaînes peptidiques, (2) l'agencement des liaisons hydrogène, résultant des interactions peptide/peptide dans la maille.

#### (1) Conformation des chaînes

TGGP. La Fig. 2 représente une projection stéréoscopique. Elle indique clairement que la molécule adopte une structure hélicoïdale *a priori* non attendue dans le cristal: les résidus Gly ayant tendance à donner,

\* Les listes des facteurs de structure, des paramètres thermiques anisotropes, et des coordonnées des atomes d'hydrogène non-affinés ont été déposées au dépôt d'archives de la British Library Lending Division (Supplementary Publication No. SUP 34364: 23 pp.). On peut en obtenir des copies en s'adressant à: The Executive Secretary, International Union of Crystallography, 5 Abbey Square, Chester CH1 2HU, Angleterre.

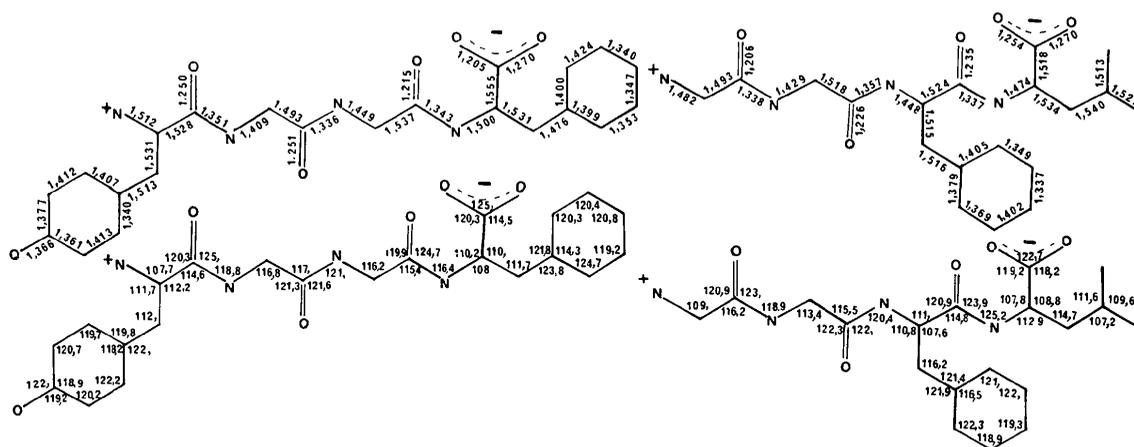


Fig. 1. Distances (Å) et angles de valence ( $^\circ$ ) mesurés dans TGGP ( $\langle\sigma\rangle = 0,006 \text{ Å}, 0,3^\circ$ ) et GGPL ( $\langle\sigma\rangle = 0,004 \text{ Å}, 0,1^\circ$ ).

Tableau 1. Coordonnées atomiques ( $\times 10^4$ ) de TGGP et de GGPL

Dans la molécule de  $\text{Me}_2\text{SO}$ , seul l'atome de soufre a été considéré comme anisotrope, et l'atome d'oxygène ne pouvant pas être distingué des carbones, le facteur de diffusion atomique du carbone a été utilisé dans l'affinement pour les trois atomes DM(1), DM(2) et DM(3).

	x	y	z	$B_{\text{eq}} (\text{Å}^2)$
<b>TGGP</b>				
N <sup>+</sup>	9519 (5)	9138 (2)	8624 (5)	4,2
Ca(1)	9748 (5)	8539 (3)	7954 (7)	3,6
C <sup>0</sup> (1)	8937 (6)	8471 (3)	6916 (7)	3,5
O(1)	8178 (3)	8814 (2)	6872 (5)	4,7
C $\beta$ (1)	9750 (6)	7995 (3)	8838 (7)	4,3
C(11)	10584 (6)	8040 (3)	9800 (7)	3,6
C(12)	10337 (5)	8155 (3)	11038 (6)	3,9
C(13)	11134 (7)	8218 (3)	11949 (7)	3,9
C(14)	12148 (7)	8179 (4)	11592 (7)	4,4
C(15)	12411 (6)	8071 (4)	10385 (7)	5,7
C(16)	11611 (7)	7986 (4)	9501 (7)	4,9
OH	12954 (4)	8261 (3)	12443 (5)	6,3
N(2)	9128 (4)	8014 (2)	6105 (5)	3,4
Ca(2)	8390 (5)	7874 (3)	5185 (7)	3,4
C <sup>0</sup> (2)	8318 (6)	8313 (3)	4116 (7)	3,3
O(2)	7596 (4)	8286 (2)	3369 (6)	5,5
N(3)	9069 (4)	8737 (2)	3997 (5)	3,1
Ca(3)	9046 (5)	9195 (3)	3025 (7)	3,4
C <sup>0</sup> (3)	8509 (6)	9797 (4)	3368 (7)	3,5
O(3)	8474 (5)	10212 (2)	2599 (5)	5,1
N(4)	8091 (5)	9835 (2)	4509 (6)	3,6
Ca(4)	7520 (6)	10412 (3)	4827 (7)	3,5
C <sup>0</sup> (4)	8262 (5)	10962 (3)	4967 (6)	3,4
O(41)	9131 (4)	10884 (2)	5399 (5)	3,9
O(42)	7893 (4)	11482 (2)	4630 (5)	4,0
C $\beta$ (4)	6948 (6)	10300 (3)	6043 (8)	4,2
C(41)	6188 (6)	10796 (3)	6312 (8)	4,3
C(42)	6329 (7)	11221 (5)	7266 (9)	6,2
C(43)	5642 (10)	11712 (5)	7433 (12)	8,7
C(44)	4770 (9)	11751 (5)	6703 (13)	7,8
C(45)	4611 (8)	11351 (5)	5790 (12)	6,9
C(46)	5293 (7)	10899 (4)	5576 (10)	5,6
W(1)	5000 (0)	5000 (0)	3233 (6)	4,1
W(2)	3797 (4)	2653 (2)	3782 (5)	5,4
W(3)	6252 (5)	5392 (3)	-17 (6)	8,4
S(DM)	8229 (3)	3845 (3)	176 (7)	9,3
DM(1)	7096 (8)	4058 (5)	-143 (10)	5,6
DM(2)	8746 (12)	4409 (7)	1036 (16)	5,5
DM(3)	8551 (32)	4132 (20)	-1156 (45)	12,1
<b>GGPL</b>				
N(1)	938 (5)	7315 (8)	9606 (3)	2,5
Ca(1)	2589 (6)	6991 (10)	9779 (3)	3,7
C <sup>0</sup> (1)	3159 (6)	7018 (9)	9125 (3)	3,4
O(1)	2301 (4)	7042 (9)	8566 (2)	5,0
N(2)	4655 (5)	6996 (9)	9201 (3)	3,7
Ca(2)	5275 (6)	7145 (11)	8597 (4)	4,0
C <sup>0</sup> (2)	5003 (5)	5147 (9)	8144 (4)	3,3
O(2)	4778 (5)	3369 (7)	8374 (2)	4,5
N(3)	5164 (5)	5415 (7)	7483 (3)	3,3
Ca(3)	5081 (5)	3580 (9)	7023 (3)	3,3
C $\beta$ (3)	5380 (6)	4255 (11)	6329 (3)	4,0
C(31)	4159 (7)	5574 (10)	5867 (3)	3,6
C(32)	4423 (8)	7701 (11)	5678 (4)	4,8
C(33)	3384 (10)	8788 (13)	5211 (4)	5,7
C(34)	2060 (11)	7913 (17)	4913 (5)	7,1
C(35)	1724 (8)	5814 (18)	5094 (4)	6,8
C(36)	2779 (7)	4702 (13)	5565 (3)	4,7

Tableau 1 (suite)

	x	y	z	$B_{\text{eq}} (\text{Å}^2)$
C <sup>0</sup> (3)	6246 (6)	1878 (9)	7328 (3)	3,1
O(3)	5968 (5)	-63 (6)	7239 (2)	4,3
N(4)	7598 (4)	2660 (7)	7630 (2)	3,4
Ca(4)	8841 (5)	1393 (8)	8049 (3)	3,2
C <sup>0</sup> (4)	9365 (6)	2544 (10)	8737 (3)	3,5
O(41)	8929 (5)	4437 (7)	8803 (2)	4,6
O(42)	10246 (4)	1545 (7)	9222 (2)	3,7
C $\beta$ (4)	10180 (6)	1148 (9)	7700 (3)	3,8
C $\gamma$ (4)	9824 (7)	-46 (12)	7000 (4)	4,5
C $\delta$ (1)	9431 (10)	-2386 (14)	7088 (5)	6,9
C $\delta$ (2)	11231 (9)	85 (21)	6700 (5)	7,8
W	6584 (4)	6990 (8)	10574 (2)	4,6

soit des structures étendues, cf. Tyr-Gly-Gly (Carson & Hackert, 1978; Hackert & Carson, 1977) ou Gly-Gly-Gly (Shrikrishnan, Winiewicz & Parthasarathy, 1977), soit des coudes très prononcés ('hairpin') comme dans les protéines.

L'analyse des angles de torsion (convention IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1970) et des angles des plans moyens des liaisons peptidiques (Tableaux 2 et 3) indique que:

- Toutes les liaisons sont *trans*, les angles  $\omega$  s'écartent peu de la valeur moyenne de  $180^\circ$ , à l'exception du premier résidu. Cette torsion résulte du rejet, à l'extérieur du  $\beta$  turn, du noyau aromatique de Tyr<sup>1</sup>.

- Les angles  $\phi$  des deux résidus Gly<sup>2</sup> et Gly<sup>3</sup> ont des valeurs voisines, préfigurant un pas régulier de l'hélice. Par contre,  $\phi_4$ , bien que de même amplitude, est négatif. Ceci indique que le dernier résidu Phe<sup>4</sup> subit une rotation qui rejette aussi le noyau aromatique vers l'extérieur.

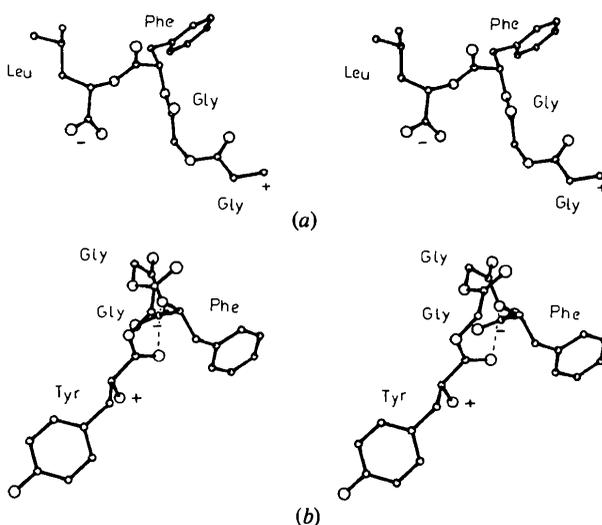


Fig. 2. Vue stéréoscopique des deux tétrapeptides. (a) TGGP. (b) GGPL.

Tableau 2. Angles de torsion ( $^{\circ}$ ) (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1970)Les écarts types sont de  $0,8^{\circ}$  pour TGGP et  $0,4^{\circ}$  pour GGPL.

TGGP				
Résidu	Tyr <sup>1</sup>	Gly <sup>2</sup>	Gly <sup>3</sup>	Phe <sup>4</sup>
$\varphi$	—	74,3	90,6	-71,7
$\psi$	170,5	11,0	-0,5	-34,9
$\omega$	174,5	-177,6	-177,1	—
$\chi_1$	63,8	—	—	168,6
$\chi_2$	70,5	—	—	70,0
GGPL				
Résidu	Gly <sup>1</sup>	Gly <sup>2</sup>	Phe <sup>3</sup>	Leu <sup>4</sup>
$\varphi$	—	69,1	55,5	127,7
$\psi$	172,5	161,6	-41,6	-12,8
$\omega$	-177,0	174,1	170,4	—
$\chi_1$	—	—	71,0	61,1
$\chi_2$	—	—	65,5	66,1

Tableau 3. Plans moyens des liaisons peptidiques et distances aux plans ( $\text{Å}$ )Les écarts types sont: TGGP:  $\sigma = 8 \times 10^{-3}$  Å; GGPL:  $\sigma = 6 \times 10^{-3}$  Å; les atomes sont donc, pour la plupart, parfaitement coplanaires.

## TGGP

	Plan (I) ( $i = 1$ )	Plan (II) ( $i = 2$ )	Plan (III) ( $i = 3$ )
Atomes dans le plan			
$C\alpha(i)$	-0,003	$10^{-3}$	-0,002
$C^{\beta}(i)$	0,013	$10^{-3}$	0,006
$O(i)$	-0,002	$10^{-3}$	0,002
$N(i + 1)$	-0,003	$10^{-3}$	-0,002
$\chi^2$	4,1	0,07	1,22
Coefficients* des équations des plans			
<i>A</i>	0,5107	0,5300	-0,865
<i>B</i>	0,6388	-0,6300	-0,366
<i>C</i>	-0,5754	-0,5677	-0,3426
<i>D</i>	-13,37	8,196	18,54
Angles dièdres, $\alpha$	(I)/(II) = $78,8^{\circ}$		(II)/(III) = $91,9^{\circ}$

## GGPL

	Plan (I) ( $i = 1$ )	Plan (II) ( $i = 2$ )	Plan (III) ( $i = 3$ )
Atomes dans le plan			
$C\alpha(i)$	-0,002	0,014	-0,01
$C^{\beta}(i)$	0,007	-0,036	0,034
$O(i)$	-0,002	0,009	-0,008
$N(i + 1)$	-0,002	0,009	-0,008
$\chi^2$	1,78	57,2	41,9
Coefficients* des équations des plans			
<i>A</i>	-0,004	-0,9481	0,503
<i>B</i>	-0,9998	0,1902	-0,0055
<i>C</i>	-0,0192	-0,2547	-0,8642
<i>D</i>	1,896	3,858	3,3811
Angles dièdres, $\alpha$	(I)/(II) = $100,5^{\circ}$		(II)/(III) = $117,1^{\circ}$

\* De la forme  $Ax + By + Cz + D = 0$ .

— La disposition adoptée par les deux résidus centraux de la chaîne, Gly<sup>2</sup> et Gly<sup>3</sup>, analysée en termes énergétiques (diagramme  $\varphi/\psi$ , Ramachandran, Ramakrishnan & Sasisekharan, 1963; Goodman, Verdini, Choi & Masuda, 1970) est en faveur d'une torsion hélicoïdale gauche conduisant à une énergie conformationnelle élevée (Fig. 3); le même résultat est obtenu si l'on choisit le diagramme de la poly-glycine (Leach, Nemethy & Scheraga, 1976), un peu plus précis.

— Le fait le plus significatif est le maintien de cette structure hélicoïdale par une faible liaison hydrogène intramoléculaire entre le CO de Tyr<sup>1</sup> et le NH de Phe<sup>4</sup> ( $O \cdots N \approx 3,2$  Å). Le même résultat (GG $\beta$  bend) est déduit des études en solution dans le Me<sub>2</sub>SO par RMN (Fournié-Zaluski, Prangé, Pascard & Roques, 1977). Une disposition tout à fait analogue peut aussi être observée dans le cas de la Leu-Enk dans le cristal (Smith & Griffin, 1978). Dans l'état solvaté, la Leu-Enk possède encore une liaison intramoléculaire, mais il s'agit cette fois d'un GP $\beta$  bend.

Cette ressemblance stéréochimique est tout à fait remarquable: elle implique dans les deux cas un système aromatique bipolaire hydrophile/hydrophobe (Tyr<sup>1</sup>/Phe<sup>4</sup>) avec une distance entre les deux sites d'environ 10,9 Å dans TGGP. Il est intéressant de noter que cette distance est identique à celle déterminée en solution par fluorescence (Schiller *et al.*, 1977), dans le cas de la Leu-Enk.

Dans le térapeptide TGGP, une distance  $OH(Tyr^1) \cdots NH_3^+(Tyr^1)$  de 6,3 Å est relevée, valeur proche de la distance bipolaire relevée dans la morphine et dérivés (Lami & Jung, 1970, 1971).

Ces faits révèlent que TGGP possède intrinsèquement les propriétés stéréochimiques des dérivés de la morphine. La diminution de son activité, résultant de la

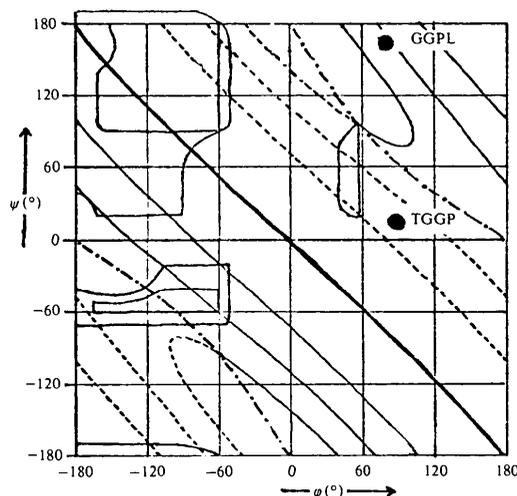


Fig. 3. Positions des résidus glycine dans le diagramme de Ramachandran.

perte du 5<sup>ème</sup> résidu pourrait provenir: (1) soit de la disparition d'un système d'«ancrage» hydrophobe placé en avant de la chaîne, côté C-terminal (Fournié-Zaluski, Feillion & Roques, 1977), (2) soit de l'induction d'une mauvaise conformation de la chaîne, (3) soit d'une combinaison des deux phénomènes.

**GGPL.** La vue stéréoscopique est également indiquée Fig. 2. La présence des deux glycines N-terminales devrait, par analogie avec Gly-Gly-Gly (Shrikrishnan *et al.*, 1977), conduire la chaîne à adopter une structure étendue. Il n'en est rien, on obtient dans ce cas aussi une structure repliée mais de nature très différente:

– Le résidu Phe<sup>3</sup>, partie hydrophobe de la molécule, est au centre d'une importante pliure de la chaîne. La conformation est plus proche d'une 'épingle' que d'une hélice. L'angle  $\omega$  autour de ce résidu s'écarte d'environ 10° de la valeur moyenne. Il met en évidence une certaine tension à ce niveau, sans qu'il y ait de liaison hydrogène intramoléculaire, comme dans le cas de TGGP.

– L'analyse des angles  $\phi/\psi$  (Tableau 2, Fig. 3) montre que cette forte pliure conduit à rapprocher les deux CO de Gly<sup>2</sup> et Phe<sup>3</sup> l'un vers l'autre dans une conformation inhabituelle et stériquement très défavorisée (distance C=O...O=C = 3,1 Å). Pour leur part, les angles dièdres des liaisons peptidiques (Tableau 3) indiquent également une forte pliure autour du résidu Phe<sup>3</sup> ( $\alpha^{IV/III} = 117^\circ$ ).

Ces résultats appellent les commentaires suivants:

– Si GGPL en solution présente une structure repliée maintenue par liaison hydrogène intramoléculaire (GP $\beta$  turn) entre le premier et le quatrième résidu, conformation en tous points similaire à celle présentée

par TGGP (Fournié-Zaluski, Prangé, Pascard & Roques, 1977), la conformation observée à l'état cristallin est radicalement différente, aussi bien par rapport à TGGP que Leu-Enk.

– L'absence du résidu N-terminal (Tyr<sup>1</sup>) semble donc déterminante: il s'agit du point d'ancrage le plus important de la structure et son absence met bien en valeur le rôle essentiel joué par ce résidu pour une interaction favorable, et donc pour le maintien de l'activité analgésique.

## (2) Empilements cristallins

Les Figs. 4 et 5 montrent la disposition des molécules peptidiques dans la maille cristalline. Cette disposition se caractérise par de très nombreuses interactions type liaison hydrogène, soit entre les molécules elles-mêmes, soit entre les molécules et la (ou les) molécule(s) de solvant, incluses dans la structure.

**TGGP.** Quatre molécules de solvant sont retenues: une molécule de Me<sub>2</sub>SO, avec un facteur d'occupation d'environ  $\frac{1}{2}$  et affectée d'un désordre relatif, et trois molécules d'eau dont l'une sur un axe binaire, bloquée au centre d'une cavité constituée par deux molécules de peptide enroulées autour de cet axe.

Les liaisons hydrogène que l'on peut relever sont indiquées dans le Tableau 4.

Si le Me<sub>2</sub>SO apparaît peu lié au reste de la structure, occupant seulement un 'trou' de l'empilement, la présence des molécules d'eau est par contre très importante pour la cohésion de l'édifice cristallin, et plus particulièrement celle notée W(1) (Fig. 4).

On remarque que dans ce tétrapeptide, la plupart des interactions intermoléculaires ont effectivement lieu au niveau des amino-acides considérés comme essentiels

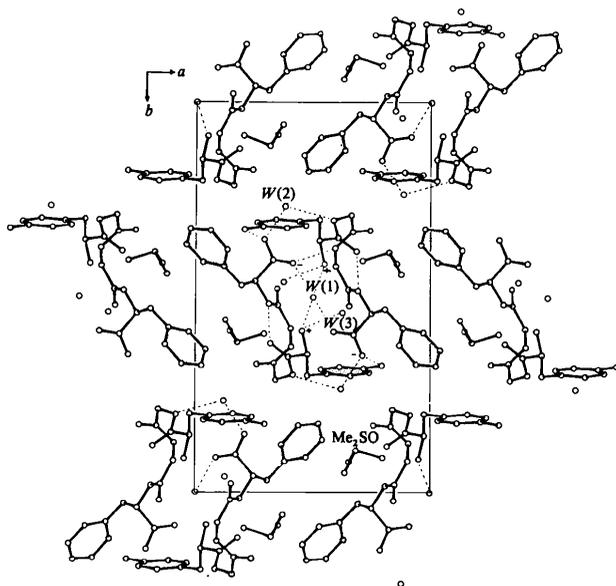


Fig. 4. Tyr-Gly-Gly-Phe: empilement (plan  $xOy$ ).

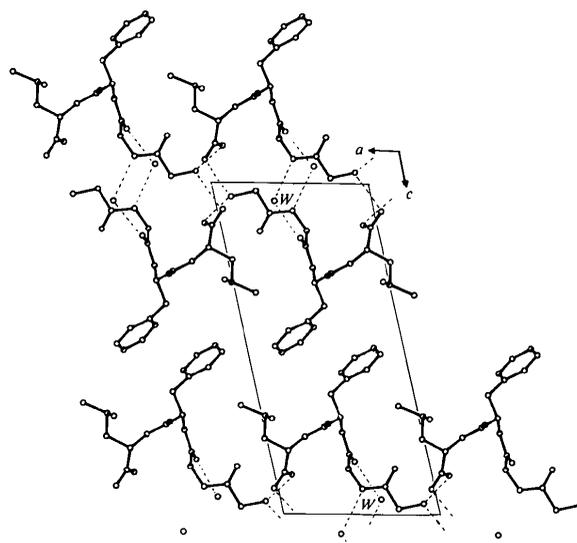


Fig. 5. Gly-Gly-Phe-Leu: empilement (plan  $xOy$ ).

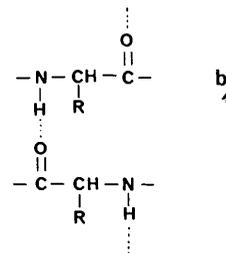
pour le maintien de l'affinité et de l'activité: Tyr<sup>1</sup>, Phe<sup>4</sup> et les molécules d'eau.

Concernant les interactions résidu/résidu, seules deux liaisons hydrogène sont à signaler: il s'agit de Phe<sup>4</sup>...Gly<sup>3</sup> d'une part, de Phe<sup>4</sup> vers le OH de Tyr<sup>1</sup> d'autre part. Il est à noter que cette structure repliée ne possède d'interaction tête-queue NH<sub>3</sub><sup>+</sup>/COO<sup>-</sup> qu'au travers d'une molécule d'eau, et que les différentes molécules de la maille s'associent préférentiellement par paires autour de l'axe binaire, axe que l'on retrouve aussi dans la structure de la Leu-Enk (Smith & Griffin, 1978).

Si l'on peut assimiler le voisinage de la molécule à une simulation d'interactions peptide/protéine, on voit que le résidu Tyr<sup>1</sup> est particulièrement bien entouré: il occupe une 'cage' dans laquelle il est bloqué par quatre liaisons hydrogène. Ceci est en faveur du mécanisme actuellement proposé (Fournié-Zaluski, Feillion & Roques, 1977). Ce résidu interagirait de façon énergique dans un site qui lui est propre, et en premier. Le reste de l'affinité pourrait alors dépendre en force et intensité, des interactions induites par modifications *trans*-conformationnelles successives se propageant le long de la chaîne peptidique.

**GGPL.** Le réseau cristallin ne contient qu'une molécule d'eau. Les liaisons hydrogène y sont moins

nombreuses et se caractérisent surtout par: (1) Une interaction entre les résidus Phe<sup>3</sup> de deux molécules différentes (Fig. 5), constituant des hélices infinies autour de l'axe *b*, précisément à l'endroit du coude de la structure, et (2) par une interaction tête-queue NH<sub>3</sub><sup>+</sup>/COO<sup>-</sup> beaucoup plus forte que dans le cas de TGGP, le long de l'axe *a*.



Cette interaction directe, provenant probablement de la plus grande flexibilité des résidus Gly N-terminaux, peut être responsable d'une orientation bloquée de la molécule, orientation défavorable pour l'affinité comme pour l'activité.

### Conclusion

L'étude de ces deux peptides permet d'apporter quelques éléments de discussion quant à la définition stéréochimique des sites récepteurs morphiniques et des mécanismes possibles d'interaction:

- Le térapeptide TGGP, comparé à la Leu-Enk, possède toutes les particularités susceptibles de le rendre actif, à l'exception du résidu C-terminal. La présence de ce résidu semble déterminante pour l'affinité mais sa structure n'est pas sélective: il est donc non seulement nécessaire de disposer en avant d'une zone hydrophobe (Fournié-Zaluski, Feillion & Roques, 1977; Smith & Griffin, 1978; Bajusz, Pathy, Kenessey, Graf, Ronai & Szekely, 1978) qui accepte Leu, Met, voire Pro... - mais aussi d'avoir une orientation convenable du squelette peptidique. En ce sens, ce cinquième amino-acide joue un rôle important.

- A l'inverse, GGPL, s'il est susceptible de remplir cette condition, ne possède pas le résidu N-terminal Tyr<sup>1</sup> interagissant dans une première 'zone' de sélectivité beaucoup plus grande que la deuxième énoncée plus haut.

- Il est remarquable de constater que l'analogie entre les résultats des rayons X et ceux obtenus en solution par RMN est parfaite du point de vue des conformations déduites des angles  $\omega$ ,  $\phi$ ,  $\psi$  (Fournié-Zaluski, Prangé, Pascard & Roques, 1977) pour TGGP, mais pas pour GGPL. Ceci donne à la liaison hydrogène intramoléculaire un rôle tout à fait particulier.

- Enfin cette étude, par le nombre de liaisons hydrogène le liant au réseau, met en valeur le rôle clé du résidu Tyr<sup>1</sup>. Ceci renforce les hypothèses d'un mécanisme d'interaction plus proche du type 'zipper',

Tableau 4. *Liaisons hydrogène ou contacts courts dans les empilements cristallins*

Code de symétrie

(i)	$x - \frac{1}{2}, \frac{3}{2} - y, 1 - z$	(vii)	$1 + x, y, z$
(ii)	$x - \frac{1}{2}, \frac{3}{2} - y, 2 - z$	(viii)	$x - 1, y - 1, z$
(iii)	$\frac{3}{2} - x, y - \frac{1}{2}, 1 - z$	(ix)	$x, y, z - 1$
(iv)	$\frac{3}{2} - x, y + \frac{1}{2}, 1 - z$	(x)	$1 - x, y - \frac{1}{2}, -z$
(v)	$1 + x, 2 - y, z$	(xi)	$x, 1 + y, z$
(vi)	$2 - x, 2 - y, z - 1$	(xii)	$x, y - 1, z$

### TGGP

Résidus en interaction	(i)	(Sym.)	<i>d</i> (Å) (± 0,01 Å)	Remarques
Tyr <sup>1</sup> /H <sub>2</sub> O	W(1)...	N <sup>(i)</sup>	2,80	Les H de W(1) ne sont pas localisés
Tyr <sup>1</sup> /H <sub>2</sub> O	W(1)...	N <sup>(iii)</sup>	2,80	
Tyr <sup>1</sup> /H <sub>2</sub> O	W(3)...	N <sup>(iii)</sup>	2,88	{ H[N(2)]...W(2) = 1,76 Å
Gly <sup>2</sup> /H <sub>2</sub> O	N(2)...	W(2) <sup>(iv)</sup>	2,74	
Phe <sup>4</sup> /Gly <sup>3</sup>	O(41)...	N(3) <sup>(v)</sup>	2,88	Deuxième partie de l'interaction tête-queue
Phe <sup>4</sup> /H <sub>2</sub> O	W(1)...	O(41) <sup>(i)</sup>	2,67	
Phe <sup>4</sup> /H <sub>2</sub> O	W(1)...	O(41) <sup>(iii)</sup>	2,67	
Phe <sup>4</sup> /H <sub>2</sub> O	W(2)...	O(42) <sup>(i)</sup>	2,79	
Phe <sup>4</sup> /Tyr <sup>1</sup>	O(42)...	OH <sup>(vi)</sup>	2,65	Intramoléculaire
Tyr <sup>1</sup> /Phe <sup>4</sup>	O(1)...	N(4) <sup>(i)</sup>	3,20	

### GGPL

Résidus en interaction	(i)	(Sym.)	<i>d</i> (Å) (± 0,007 Å)	Remarques
Gly <sup>1</sup> /Leu <sup>4</sup>	N <sup>+</sup> ...	O(41) <sup>(vii)</sup>	2,79	Interaction tête-queue
Gly <sup>1</sup> /Leu <sup>4</sup>	N <sup>+</sup> ...	O(42) <sup>(viii)</sup>	2,76	
Gly <sup>2</sup> /H <sub>2</sub> O	N(2)...	W <sup>(ix)</sup>	2,90	Hélice infinie le long de <i>b</i> (voir Fig. 5)
Gly <sup>2</sup> /H <sub>2</sub> O	O(2)...	W <sup>(x)</sup>	2,80	
Phe <sup>3</sup> /Phe <sup>3</sup>	N(3)...	O(3) <sup>(xi)</sup>	2,96	Zigzag le long de <i>b</i>
Phe <sup>3</sup> /Phe <sup>3</sup>	O(3)...	N(3) <sup>(xii)</sup>	2,96	

avec induction primaire de la partie tyramine (Fournié-Zaluski, Prangé, Pascard & Roques, 1977; Roques *et al.*, 1979) que d'un mécanisme 'lock and key' que l'on peut supposer vraisemblable dans le cas des opiacés, molécules pour le moins rigides.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements aux Professeurs M. C. Fournié-Zaluski et B. P. Roques (Université de Paris V) pour de fructueuses discussions et remarques, ainsi que la fourniture des tétrapeptides utilisés. Nous remercions également les Drs De Coen (Université Libre de Bruxelles) et Hauptmann (Université de Buffalo) pour l'intérêt porté à notre manuscrit et une communication préliminaire de la structure de la Leu-Enk.

#### Références

- BAJUSZ, S., PATHY, A., KENESSEY, A., GRAF, L., RONAI, A. Z. & SZEKELY, J. I. (1978). *Abstracts of the 15th European Peptide Symposium*, Gdansk, Pologne, p. 81.
- BAJUSZ, S., RONAI, A. Z., SZEKELY, J. I., DUNAI-KOVACS, Z. & GRAF, L. (1976). *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **11**, 305-309.
- BLEICH, H. E., CUTNELL, J. D., DAY, A. R., FREER, R. J., GLASEL, J. A. & MCKELVY, J. F. (1976). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **73**, 2589-2593.
- BRADBURY, A. F., SMYTH, D. G. & SNELL, C. R. (1976). *Nature (London)*, **260**, 165-166.
- BUSING, W. R., MARTIN, K. O. & LEVY, H. A. (1962). *ORFLS. Report ORNL-TM-305*. Oak Ridge National Laboratory, Tennessee.
- CARSON, W. M. & HACKERT, M. L. (1978). *Acta Cryst.* **B34**, 1275-1280.
- DE COEN, J. L., HUMBLET, C. & KOCH, M. H. J. (1977). *FEBS Lett.* **73**, 38-42.
- DULLA, A. S., GORMLEY, J. J., HAYWARD, C. F., MORLAY, J. S., SHAW, J. S., STACEY, G. J. & TURNBULL, M. T. (1977). *Life Sci.* **21**(4), 559-562.
- FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C., FEILLION, E. & ROQUES, B. P. (1977). *Acta Pharm. Suec.* **14** (Suppl.), 57.
- FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C., PRANGÉ, T., PASCARD, C. & ROQUES, B. P. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **79**, 1109-1116.
- GARBAY-JAUREGUIBERRY, C., ROQUES, B. P., OBERLIN, R., ANTEUNIS, M. J. O., COMBRISSE, S. & LALLEMAND, J. Y. (1977). *FEBS Lett.* **76**, 93-98.
- GARBAY-JAUREGUIBERRY, C., ROQUES, B. P., OBERLIN, R., ANTEUNIS, M. J. O. & LALA, A. K. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 558-565.
- GERMAIN, G., MAIN, P. & WOOLFSON, M. M. (1971). *Acta Cryst.* **A27**, 368-376.
- GOODMAN, M., VERDINI, A. S., CHOI, N. S. & MASUDA, Y. (1970). *Top. Stereochem.* **5**, 69-166.
- HACKERT, M. L. & CARSON, W. M. (1977). *Am. Crystallogr. Assoc. Meet.*, Aug. 7-12, Michigan State Univ. [*Am. Crystallogr. Assoc. Rep.* **5**(2), 69].
- HAMBROOK, J. M., MORGAN, B. A., RANCE, M. J. & SMITH, C. F. C. (1976). *Nature (London)*, **262**, 782-783.
- HORN, A. S. & RODGERS, J. R. (1976). *Nature (London)*, **260**, 795-797.
- HUGHES, J., SMITH, T. W., KOSTERLITZ, H. W., FOTHERGILL, L. A., MORGAN, B. A. & MORRIS, R. H. (1975). *Nature (London)*, **258**, 577-579.
- ISOGAI, Y., NEMETHY, G. & SCHERAGA, H. A. (1977). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **74**, 414-418.
- IUPAC-IUB COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE (1970). *J. Mol. Biol.* **52**, 1-17.
- JONES, R. C., GIBBONS, W. A. & GARSKY, V. (1976). *Nature (London)*, **262**, 779-782.
- KHALED, M. A., LONG, M. M., THOMPSON, W. O., BRADLEY, J. R., BROWN, G. B. & URRY, D. W. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **76**, 224-231.
- LAMI, H. & JUNG, L. (1970). *Chim. Ther.* **6**, 391-395.
- LAMI, H. & JUNG, L. (1971). *Chim. Ther.* **5**, 341-345.
- LEACH, S. J., NEMETHY, G. & SCHERAGA, H. A. (1976). *Biopolymers*, **4**, 369-407.
- MACKAY, M. & CROWFOOT-HODGKIN, D. (1955). *J. Chem. Soc.* pp. 3261-3267.
- MOMANY, F. A. (1977). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 1098-1103.
- MORGAN, B. A., SMITH, T. W., WATERFIELD, A. A., HUGHES, J. & KOSTERLITZ, H. W. (1976). *J. Pharm. Pharmacol.* **28**, 660-661.
- PERT, C. B., PERT, A., CHANG, J. K. & FONG, B. T. W. (1976). *Science*, **194**, 330-332.
- RAMACHANDRAN, G. N., RAMAKRISHNAN, C. & SASISEKHARAN, V. (1963). *J. Mol. Biol.* **7**, 95-99.
- ROQUES, B. P., FOURNIÉ-ZALUSKI, M. C., GACEL, G., GARBAY-JAUREGUIBERRY, C., FEILLION, E. & OBERLIN, R. (1979). *Life Sci.* Sous presse.
- ROQUES, B. P., GARBAY-JAUREGUIBERRY, C., OBERLIN, R., ANTEUNIS, M. J. O. & LALA, A. K. (1976). *Nature (London)*, **262**, 778-779.
- SCHILLER, P. W., YAM, C. F. & LIS, M. (1977). *Biochemistry*, **16**, 1831-1838.
- SHRIKRISHNAN, T., WINIEWICZ, N. & PARTHASARATHY, R. (1977). *Am. Crystallogr. Assoc. Meet.*, Aug. 7-12, Michigan State Univ. [*Am. Crystallogr. Assoc. Rep.* **5**(2), 69].
- SMITH, D. & GRIFFIN, J. (1978). *Science*, **199**, 1214-1216.
- SPIRITES, M. A., SCHWARTZ, R. W., MATTICE, W. L. & COY, D. H. (1978). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 602-609.
- TERENIUS, L., WAHLSTRÖM, A., LINDBERG, G., KARLSSON, S. & RAGNARSSON, Y. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 175-179.
- WALKER, J. M., BERNTSON, G. J., SANDMAN, C. A., COY, D. H., SCHALLY, A. V. & KASTIN, A. J. (1977). *Science*, **196**, 85-87.
- YAMASHIRO, D., TSENG, L. F., DONEEN, B. A., LOH, H. H. & LI, C. H. (1977). *Int. J. Peptide Protein Res.* **10**, 159-166.