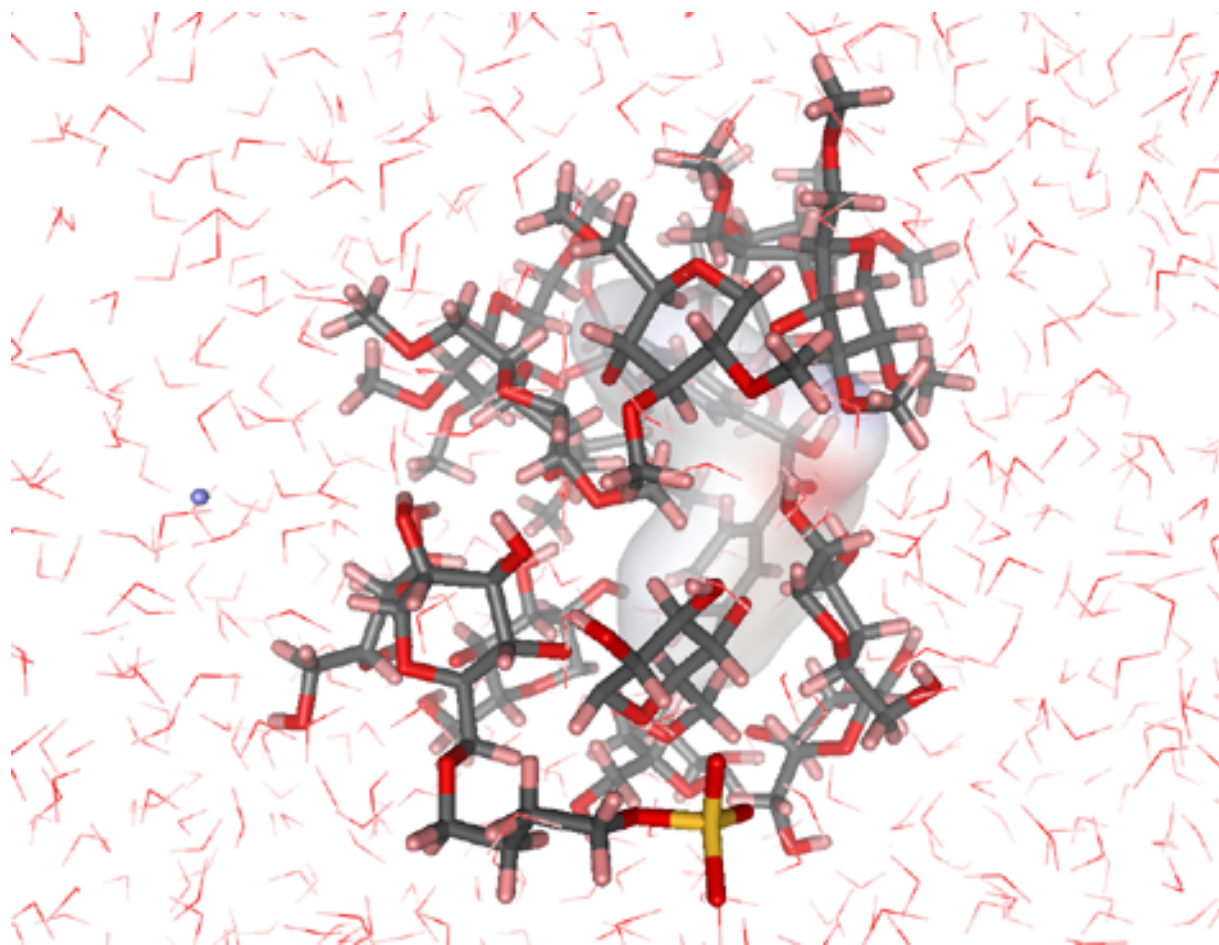


**7 ETUDE PAR DYNAMIQUE MOLECULAIRE DE LA SELECTION
CHIRALE EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DES DERIVES
DE β -CYCLODEXTRINE.**



7.1 Objectif.

Ce travail de recherche est le résultat d'une étroite collaboration avec le laboratoire de chimie analytique de l'I.C.O.A. qui a effectué les séparations en électrophorèse capillaire.

La séparation d'énantiomères est possible par électrophorèse capillaire chirale. Il est nécessaire d'utiliser un agent chiral pour créer un environnement asymétrique (ou dissymétrique). Cet agent chiral peut être une cyclodextrine native ou dérivée.

Notre étude est basée sur des résultats expérimentaux de la séparation énantiomérique d'une molécule organique (la benzoïne) par électrophorèse capillaire. L'énantiosélectivité donnait des résultats différents suivant la concentration et la nature du mélange du sélecteur chiral, celui-ci étant composé de dérivés de cyclodextrines ayant un rôle de molécule cage et de vecteur. Nous avons voulu modéliser une partie du processus de séparation afin de pouvoir éventuellement mieux l'interpréter.

Dans cette étude nous allons reproduire les complexes de différentes stœchiométries (1:1 et 2:1) formés par la benzoïne, et un mélange de dimères de β -cyclodextrines neutres et anioniques, comme de la triméthyl- β -cyclodextrine et de la mono et tétrasulfobutyléther- β -cyclodextrine.

Nous essayerons d'évaluer, grâce au calcul de l'énergie d'interaction, la stabilité des différents complexes suivant toutes les orientations possibles de chaque stœchiométrie et de déterminer ainsi la sélectivité chirale.

7.2 L'électrophorèse capillaire.

A cause des propriétés thérapeutiques différentes, les énantiomères, couramment utilisés dans les produits pharmaceutiques, doivent être correctement analysés. Donc, les techniques de séparation des énantiomères et de détermination de leur pureté énantiomérique sont des procédés très étudiés par les laboratoires d'analyse. Les principaux buts de cette recherche sont d'augmenter les possibilités de séparation chirale, d'augmenter les taux de

pureté énantiomérique et de diminuer les coûts de production. Il existe plusieurs techniques de séparation, telles que les chromatographies en phase gazeuse (CPG), en phase liquide (CPL) et en phase supercritique (CPS), l'électrophorèse capillaire (EC), etc.

L'électrophorèse capillaire est une technique dont les principes ont été énoncés à la fin du XIXe siècle par Kohlrausch¹⁷¹. Son principe est basé sur le déplacement d'espèces chargées sous l'action d'un champ électrique. Son principal inconvénient est l'effet Joule qui provoque un gradient de température et donc de viscosité dans le tube électrophorétique, ce qui diminue grandement les performances de séparation de cette technique. L'apparition de tubes capillaires permet de diminuer considérablement les nuisances de l'effet Joule sur l'efficacité de la technique. Cela a permis également l'augmentation de la tension ce qui a eu pour conséquence une diminution des temps d'analyses.

On peut l'utiliser pour la séparation de nombreuses molécules biologiques^{172, 173} : les protéines, les lipoprotéines, les acides nucléiques et des molécules organiques de petite taille¹⁷⁴.

Le principe de séparation de l'électrophorèse capillaire est basé sur la différence de mobilité d'espèces chargées (anions ou cations) sous l'influence d'un champ électrique. L'appareillage utilisé est toujours constitué des mêmes éléments quelle que soit l'analyse électrophorétique effectuée. Il est constitué d'un capillaire de silice fondue de diamètre intérieur à 50 ou 75 μm et de quelques dizaines de centimètres de longueur (50 à 70 cm), recouvert de polyimide qui lui confère une certaine résistance mécanique. Chaque extrémité du tube plonge ensuite dans un réservoir d'électrolyte où se trouve également, d'un côté l'anode et de l'autre côté la cathode.

171 - Heiger, David N. *High Performance Capillary Electrophoresis : An Introduction*. 2^e Ed, Hewlet-Packard Company, 1992.

172 - Lunte, M.S. ; Radzik, M.D : *Pharmaceutical and biomedical applications of capillary electrophoresis*. Elsevier, 1996.

173 - Cohen, A.S. ; Terabe, S. ; Deyl, Z. *Capillary Electrophoretic separation of drugs*. Elsevier, 1996.

174 - Blessum, C. ; Jeppson, J.O. ; Aguzzi, F. ; Bernon, H. ; Biennu, J. *Annales de Biologie Clinique* **1999**, 57, 643.

Une différence de potentiel de 20 à 30 kV de courant continu est appliquée entre ces deux électrodes. La séparation des composés s'effectue dans le capillaire, puis ceux-ci sont détectés par spectrométrie UV directement au travers du capillaire.

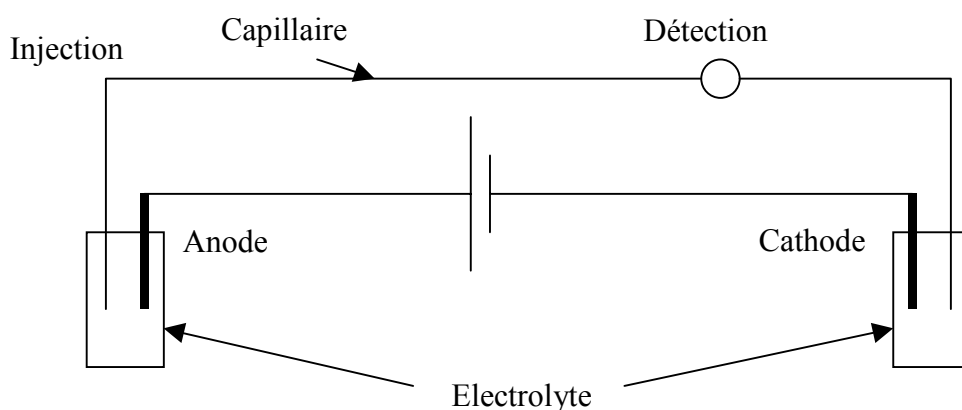


Figure 82 : Schéma de principe de l'électrophorèse capillaire.

Le flux électroosmotique est un phénomène qui fait avancer l'électrolyte (la solution tampon) dans le capillaire lorsque celui-ci est soumis à une différence de potentiel. La silice fondue est constituée en surface de groupements silanols, siloxanes et SiO^- présents en fonction du pH. La silice est ionisable dès que le pH est supérieur à 2, des fonctions SiO^- apparaissent à la surface et elles sont d'autant plus nombreuses que le pH augmente. La charge de surface de la silice devient donc négative. Par électroneutralité locale, des charges positives issues du tampon vont s'adsorber en face de chaque groupement SiO^- . Il va donc se former un gradient de charge positive entre la surface de la colonne et le centre de celle-ci. On parle de la double couche de Stern. Le flux électroosmotique créé se déplace ainsi de l'anode vers la cathode. Les charges positives se déplacent dans le sens du champ électrique et par solvatation toute la solution tampon est entraînée.

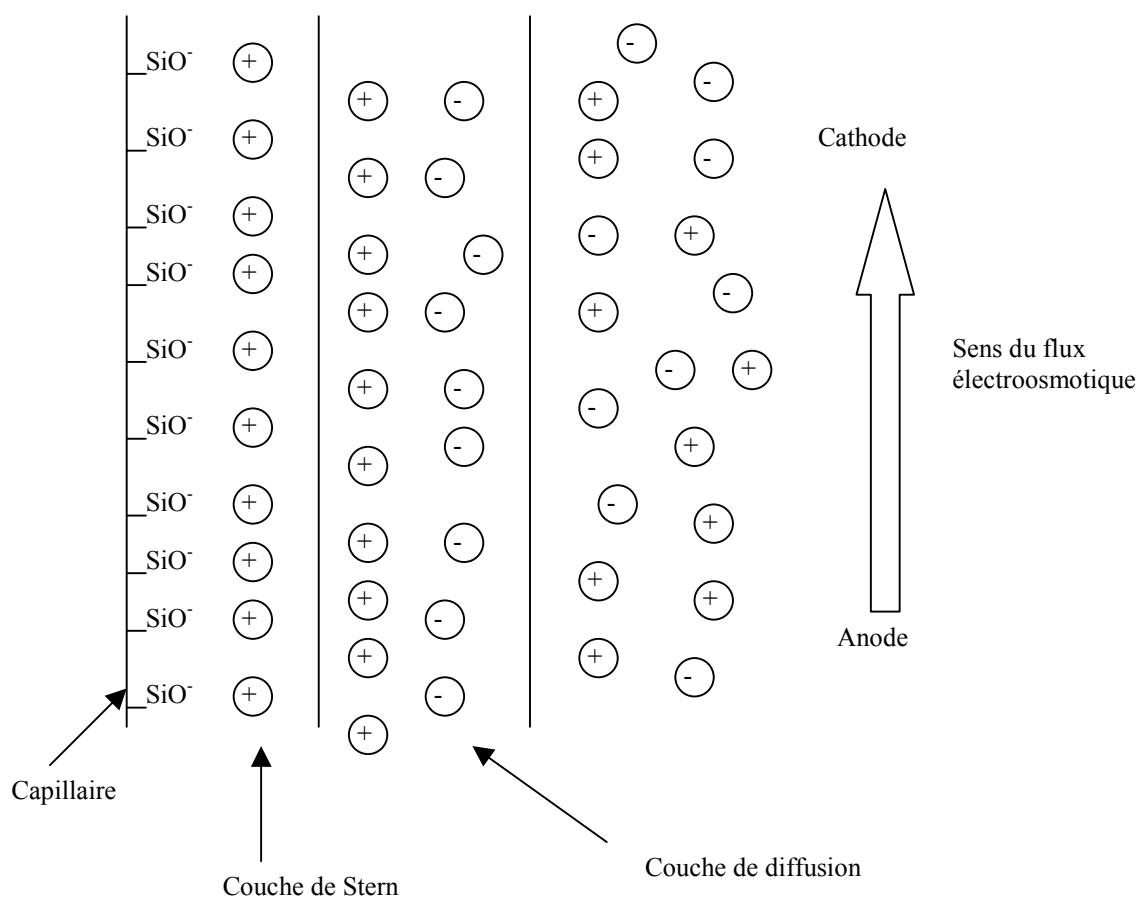


Figure 83 : Représentation schématique de la double couche du capillaire.

Le déplacement des espèces chargées dans un champ électrique est dû à leur mobilité propre sous l'effet de ce champ électrique.

La vitesse du flux électrophorétique dépend du champ électrique et de la mobilité électrophorétique dépendant elle-même de charge de l'ion, de la viscosité du tampon et du rayon de l'ion.

La mobilité électrophorétique est donc d'autant plus élevée que la charge de l'ion sera élevée et son diamètre faible. Il est à noter que les cations et les anions se déplaceront en sens opposé sous l'action d'un champ électrique.

La vitesse apparente (V_m) d'un ion en électrophorèse capillaire est égale à la somme des vitesses électroosmotiques (V_{eo}) et électrophorétiques (V_{ep}).

On peut donc schématiser le déplacement des différentes espèces comme le montre la Figure 84.

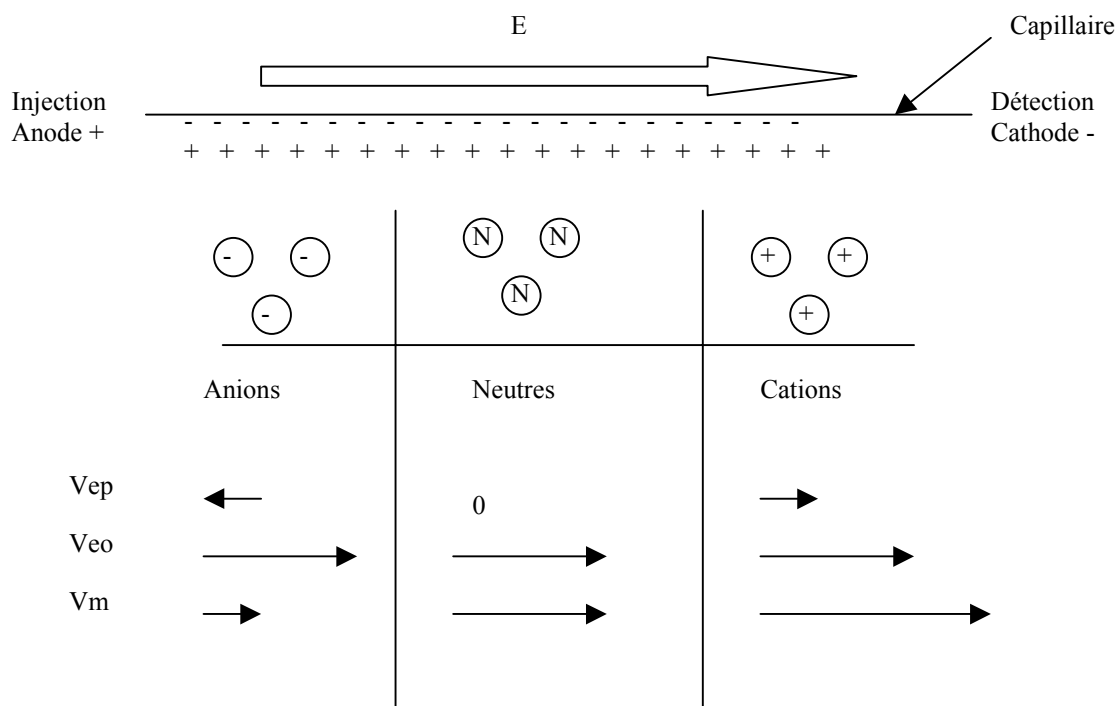


Figure 84 : Déplacement des différentes espèces, cations, anions, neutres.

D'après ce schéma nous pouvons constater que les cations seront détectés les premiers, les composés neutres seront entraînés avec le flux électroosmotique, nous parlerons de marqueur de flux, et les anions sortiront les derniers.

Dans notre cas le montage utilisé a été un peu différent. L'injection se fait à la cathode et la détection à l'anode. Ceci était nécessaire car le flux électrophorétique (V_{ep}) des anions de la sulfobutyléther- β -cyclodextrine était supérieur au flux électroosmotique (V_{eo}) et donc la migration de ces anions se faisant en sens inverse.

7.3 Résultats expérimentaux.

Une étude expérimentale a été réalisée en utilisant initialement de la benzoïne racémique (Figure 85) comme soluté chiral et de la sulfobutyléther- β -cyclodextrine (5mM)

comme agent de solvataion chiral (Figure 86). La séparation n'est pas réalisée, un seul pic est obtenu pour les 2 énantiomères.

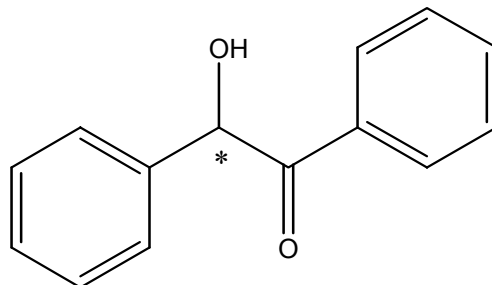


Figure 85 : Représentation schématique de la benzoïne.

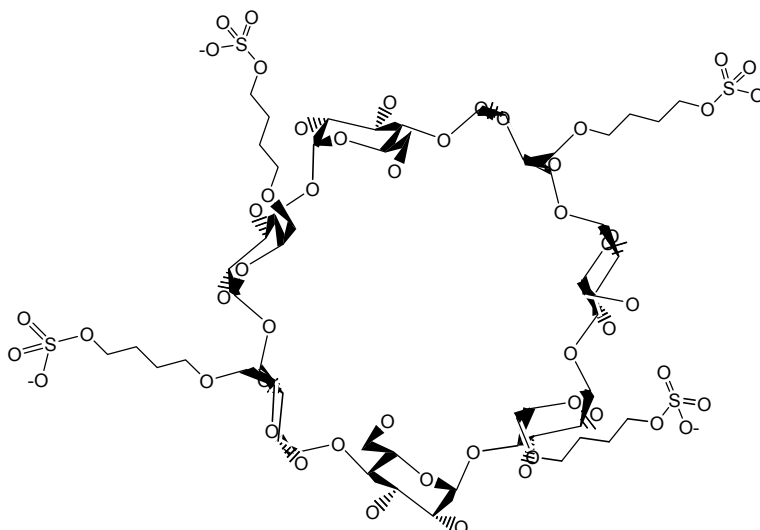


Figure 86 : Représentation d'un des isomères de la tétrasulfobutyléther- β -cyclodextrine.

Cependant, l'addition de triméthyl- β -cyclodextrine (Figure 87) (de 5 à 50 mM) améliore considérablement la séparation, et deux pics deviennent nettement visibles. La combinaison de ces deux dérivés est couramment utilisée¹⁷⁵.

175 - Fillet, M. ; Fotsing, L. ; Hubert, Ph. ; Crommen, J. Symposium on Chiral Discrimination, Vienne, 1998.

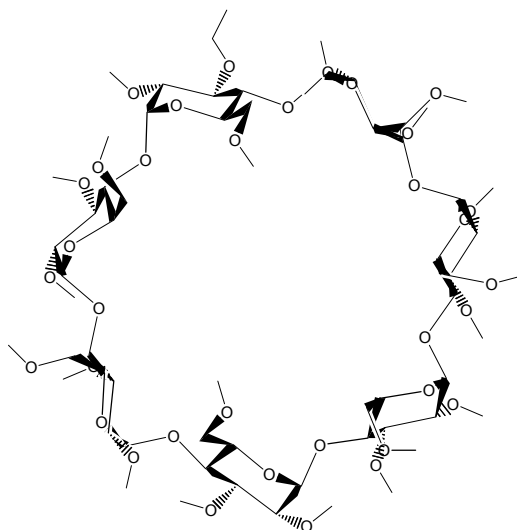


Figure 87 : Représentation schématique de la triméthyl- β -cyclodextrine.

Tableau 46 : Temps de migration des 2 énantiomères avec les systèmes combinés : sulfobutyléther- β -cyclodextrine (5mM) et triméthyl- β -cyclodextrine de 10 à 50 mM.

Concentration de triméthyl- β -CD	tm1 :énantiomère <i>S</i> (Temps de migration)	tm2 :énantiomère <i>R</i> (Temps de migration)	R (Résolution)
0 mM	10.5	10.5	0
10 mM	12.0	12.2	1.2
20 mM	13.5	13.7	1.5
30 mM	15.4	15.7	1.8
40 mM	18.0	18.4	1.7
50 mM	20.3	20.7	1.7

Le tampon utilisé est : H_3PO_4 à 10 mM/ triéthanolamine. Le pH de la solution est de 3. La tension électrique est de 15 kV.

Nous remarquons d'après le Tableau 46, que la séparation commence à être visible dès l'ajout de la triméthyl- β -cyclodextrine car deux temps de migration sont visibles. Il existe un ralentissement dans la migration de la benzoïne probablement dû à sa complexation avec la triméthyl- β -cyclodextrine.

L'analyse de la solution en sortie de capillaire, montre que l'énantiomère *S* migre avant l'énantiomère *R*. Ceci permet d'affirmer que l'énantiomère *R* a plus d'affinité pour la triméthyl- β -cyclodextrine que l'énantiomère *S*, puisqu'il est plus retardé.

7.4 Méthodologie utilisée.

7.4.1 Les hypothèses.

Pour rendre compte de la séparation des énantiomères et de l'énantiosélectivité, nous avons décidé d'étudier deux stœchiométries différentes. En effet, nous ne connaissons pas la stœchiométrie des complexes d'inclusion qui se forment. Nous savons que la présence de deux dérivés de β -cyclodextrine est nécessaire pour avoir une énantiosélectivité. A partir de ces données, nous pouvons donc penser qu'il existe une stœchiométrie hétérogène de type 2:1 avec une molécule de triméthyl- β -cyclodextrine, une de sulfobutyléther- β -cyclodextrine et la benzoïne. Un des énantiomères serait mieux complexé que l'autre et ceci expliquerait la séparation. L'autre hypothèse est une complexation similaire 1:1 ou 2:1 avec la sulfobutyléther- β -cyclodextrine et une compétition avec la complexation 1:1 avec la triméthyl- β -cyclodextrine qui, elle, serait différente pour les deux énantiomères. Il peut aussi exister d'autres arrangements conduisant à des stœchiométries plus complexes telles que des stœchiométries 3:1 ou 2:2.

Les dérivés de β -cyclodextrine modélisés seront la triméthyl- β -cyclodextrine (TMBCD) (Figure 87), la monosulfobutyléther- β -cyclodextrine (1SBE) et la tétrasulfobutyléther- β -cyclodextrine (4SBE).

Les substitutions possibles des groupements sulfobutyléthers s'effectuent sur les carbones 2, 3 et 6 de la β -cyclodextrine. Expérimentalement¹⁷⁶ il a été déterminé que la substitution se fait avec un rapport de 6/3/1 (soit 60, 30 et 10%) respectivement sur les carbones 6, 3 et 2. La substitution de la fonction alcool primaire (carbone 6) est donc plus

176 - Communication personnelle du professeur Dreux, ICOA, laboratoire d'analyse, Université d'Orléans.

facile. Les possibilités de substitution (ou agencements) sont donc nombreuses : sur les carbones 2, 3 et/ou 6 et ceci multiplié par le nombre d'unités glucosidiques. A cause des temps de calculs très longs, nous ne pouvons pas étudier exhaustivement toutes les substitutions des dérivés de sulfobutyléther- β -cyclodextrine.

Nous avons donc choisi d'étudier seulement deux structures qui peuvent être considérées comme représentations limites des divers produits. Premièrement la cyclodextrine monosubstituée en position 6 sur un seul des glucoses (1SBE, Figure 88). Nous avons aussi étudié une structure substituée par 4 groupements sulfobutyles en position 6. Ce degré de substitution de 4 est le degré moyen entre 1 et 7. La structure de la 4SBE est représentée sur la Figure 86. Nous avons choisi de substituer les glucoses 1, 3, 5 et 7, c'est à dire en essayant de substituer un glucose sur deux. Nous devons dès maintenant insister sur le fait que le choix de ces 2 structures est un choix arbitraire. Expérimentalement la cyclodextrine sulfatée est un mélange de substitutions et nous devons tenir compte de ce fait lors des interprétations.

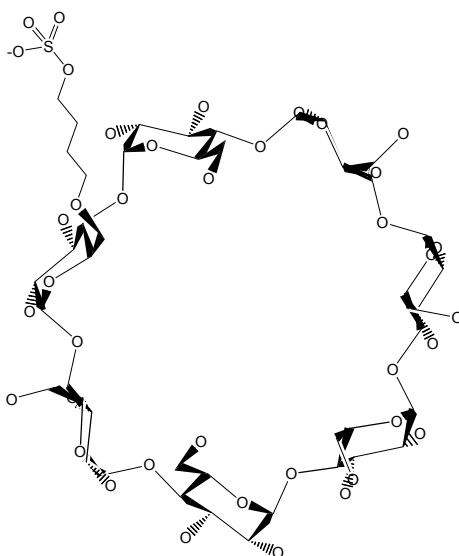


Figure 88 : Représentation de la monosulfobutyléther- β -cyclodextrine.

Le ligand étudié est la benzoïne ou 2-hydroxy-1,2-diphényléthanone. Il possède un carbone asymétrique (Figure 85) lié à une fonction alcool, à une fonction carbonyle et à un cycle benzénique. A ses extrémités, la benzoïne possède deux cycles benzéniques qui vont probablement s'inclure dans la cavité des cyclodextrines. Ce phénomène se produit pour

d'autres composés portant de tels cycles benzéniques à leurs extrémités^{177,178,179,180,181,182,183}. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2.5.1, la bimodalité représente la possibilité d'une molécule (ici la benzoïne) de s'insérer dans la cavité de la cyclodextrine sous 2 orientations différentes.

Pour cette étude nous allons devoir tenir compte de cette bimodalité (Figure 89).

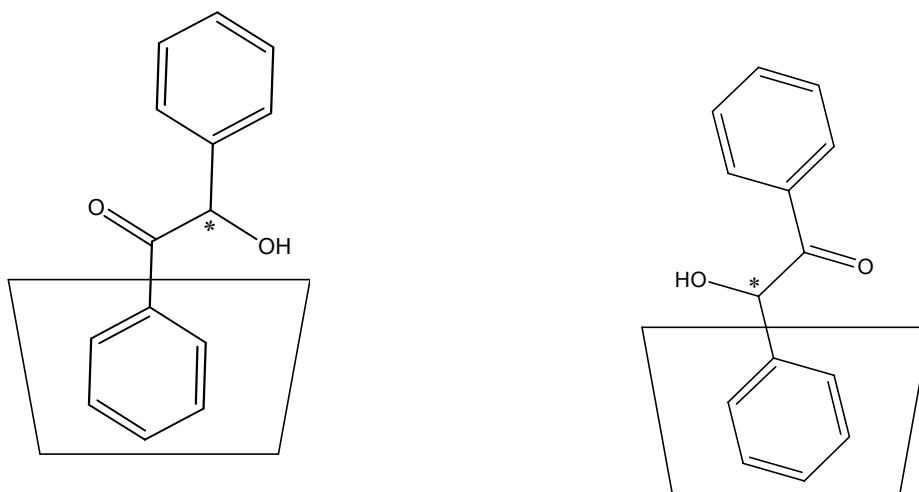


Figure 89 : Représentation de la bimodalité de la benzoïne.

De plus chaque cycle benzénique peut entrer dans la cavité soit du côté Tail (hydroxyyles primaires), soit du coté Head (hydroxyyles secondaires).

177 - Salvatierra, D. ; Jaime, C. ; Virgili, A. Sánchez-Ferrando, F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9578.

178 - Cervelló, E, Jaime, C. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1998**, *428*, 195.

179 - Cervelló, E, Jaime, C. *Anales de Quím. Int. Ed.* **1998**, *4-5*, 244.

180 - Cervelló, E. ; Mazzuchi, F. ; Jaime, C. *J. Molec. Struct. (THEOCHEM)* **2000**, *530*, 155.

181 - Salvatierra, D. ; Sánchez-Ruiz, X. ; Garduño, R. ; Cervelló, E. ; Jaime, C. ; Virgili, A. ; Sánchez-Ferrando, F. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3035.

182 - Zubiaur, M. ; Jaime, C. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8139.

183 - Beá, I. ; Cervelló, E. ; Kollman, P.A. ; Jaime, C. *Comb. Chem. High Throughput Screening*, sous presse.

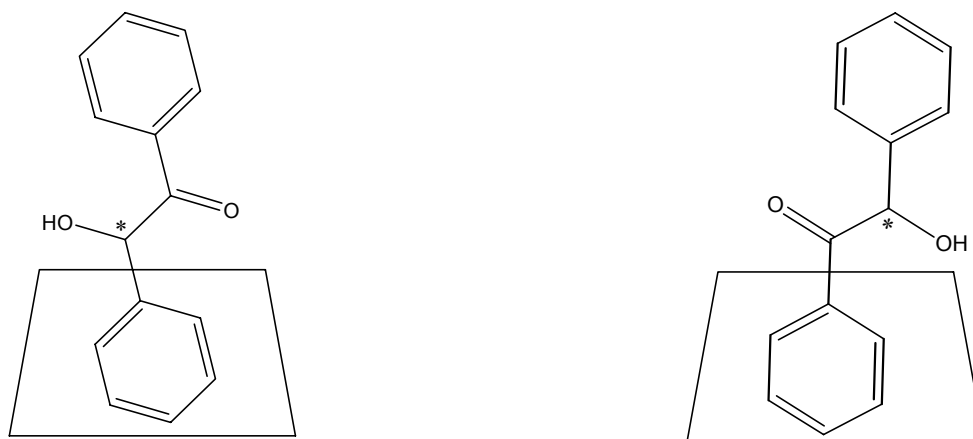


Figure 90 : Deuxième représentation de la bimodalité.

Donc pour chaque énantiomère il existe 4 orientations différentes. Pour une seule orientation (Head-Head par exemple) il faudrait donc faire 8 calculs (2 énantiomères multipliés par les 4 précédentes représentations), ce qui, vu le nombre d'orientation de dérivés de β -cyclodextrine et de stœchiométries est impossible à réaliser sur une durée raisonnable.

Nous allons donc simplifier cette représentation.

Nous avons choisi de considérer les énantiomères complètement inclus dans la cavité ce qui ne représente plus que 2 orientations possibles pour chaque énantiomère. Les temps de calcul sont ainsi divisés par deux. D'après ce que nous avons indiqué précédemment, le positionnement d'une partie polaire à l'intérieur de la cyclodextrine est défavorisé. Il est donc fort probable que les groupes benzéniques aient tendance à s'inclure dans la cavité pendant les simulations de dynamique moléculaire et que l'on arrive ainsi à la situation de bimodalité la plus stable.

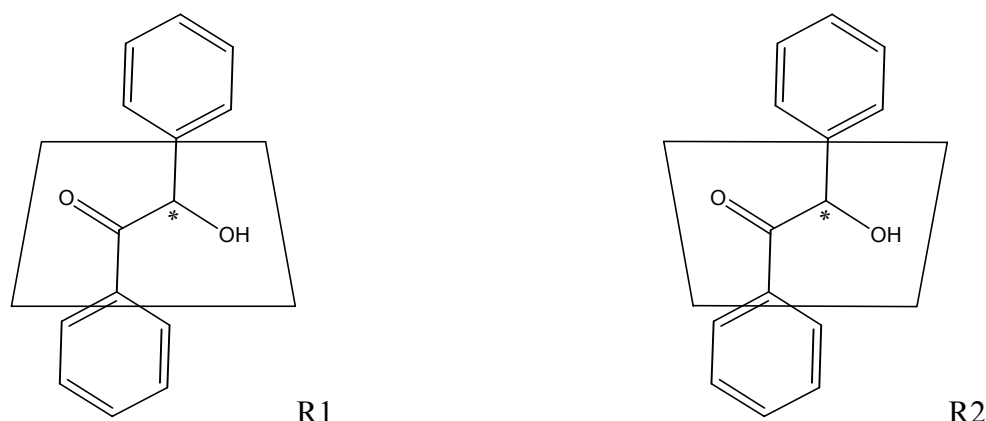


Figure 91 : Représentation des deux orientations étudiées pour chaque énantiomère.

Le flux électrophorétique est caractérisé par la différence de mouvement d'ions dans un champ électrique, ce phénomène se produisant à l'intérieur du capillaire. Il faut donc nécessairement une molécule chargée dans le capillaire. Comme la benzoïne est une molécule non chargée, la sulfobutyléther- β -cyclodextrine complexera et "transportera" la benzoïne d'une extrémité à l'autre du capillaire.

Rappel sur la nomenclature utilisée dans ce chapitre :

- la triméthyl- β -cyclodextrine = (TMBCD) (Figure 87),
- la monosulfobutyléther- β -cyclodextrine = (1SBE) (Figure 88)
- la tétrasulfobutyléther- β -cyclodextrine = (4SBE) (Figure 86)
- la benzoïne = BEN (Figure 85). Pour les complexes de stœchiométrie 1 :1 et d'après la Figure 91, l'orientation de gauche sera nommée 1 (le groupe OH de la benzoïne est du côté des hydroxyles primaires de la CD) et celle de droite 2 (le groupe OH de la benzoïne est du côté des hydroxyles secondaires de la CD).

Nous avons donc étudié les complexes suivants :

Les complexes de stœchiométries 1 :1 :

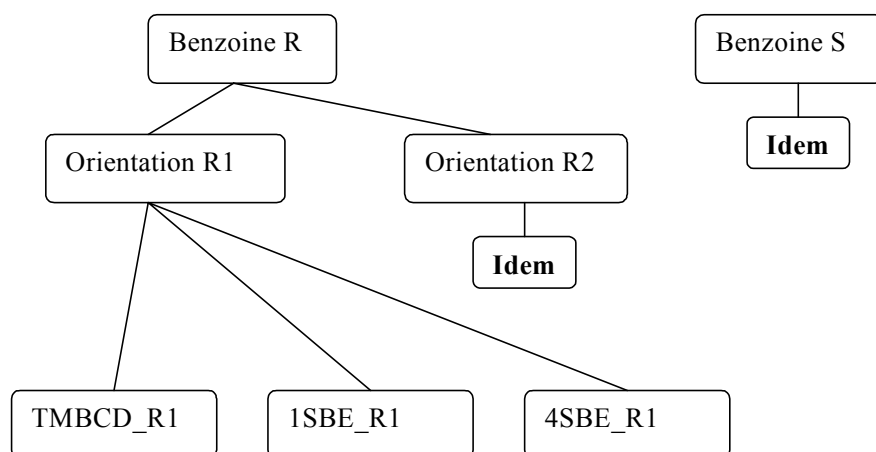


Figure 92 : Organigramme de l'étude du complexe de stœchiométrie 1 :1.

Nous avons donc étudié 12 structures différentes pour les complexes de stœchiométrie 1 :1.

Les complexes de stœchiométrie 2 :1 :

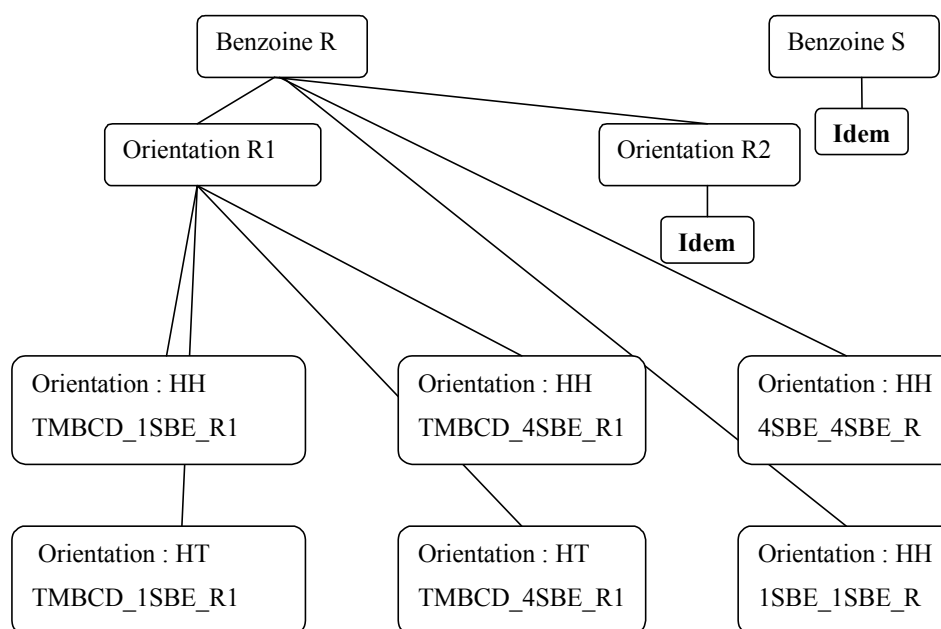


Figure 93 : Organigramme de l'étude des complexes de stœchiométrie 2 :1.

Pour clarifier cet organigramme, nous avons représenté schématiquement les complexes étudiés contenant l'énantiomère R.

- Complexes de stœchiométrie 2:1 contenant les deux cyclodextrines sulfatées.

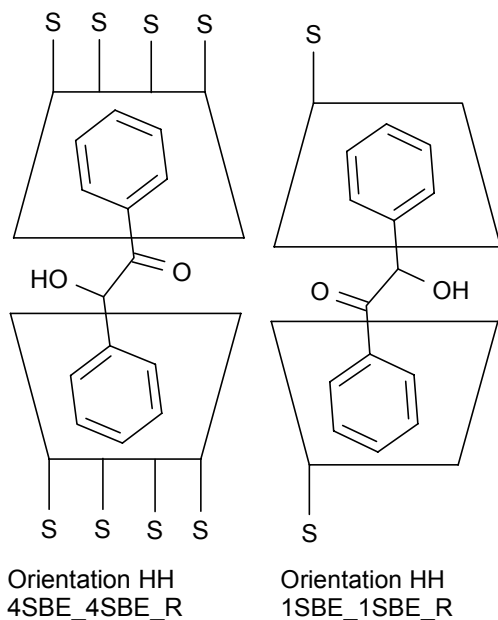


Figure 94 : Représentation des complexes de stœchiométries 2:1 contenant deux cyclodextrines sulfatées.

Afin de distinguer les complexes ne contenant pas les mêmes cyclodextrines, nous nommerons le complexe 1 celui où l'hydroxyle de la benzoïne sera plus proche de la SBE, et 2 lorsqu'il sera proche la TMBCD. (La TMBCD est représentée qu'avec un groupe méthoxy pour plus de lisibilité.)

- Complexes de stœchiométrie 2:1 contenant la benzoïne en orientation 1.

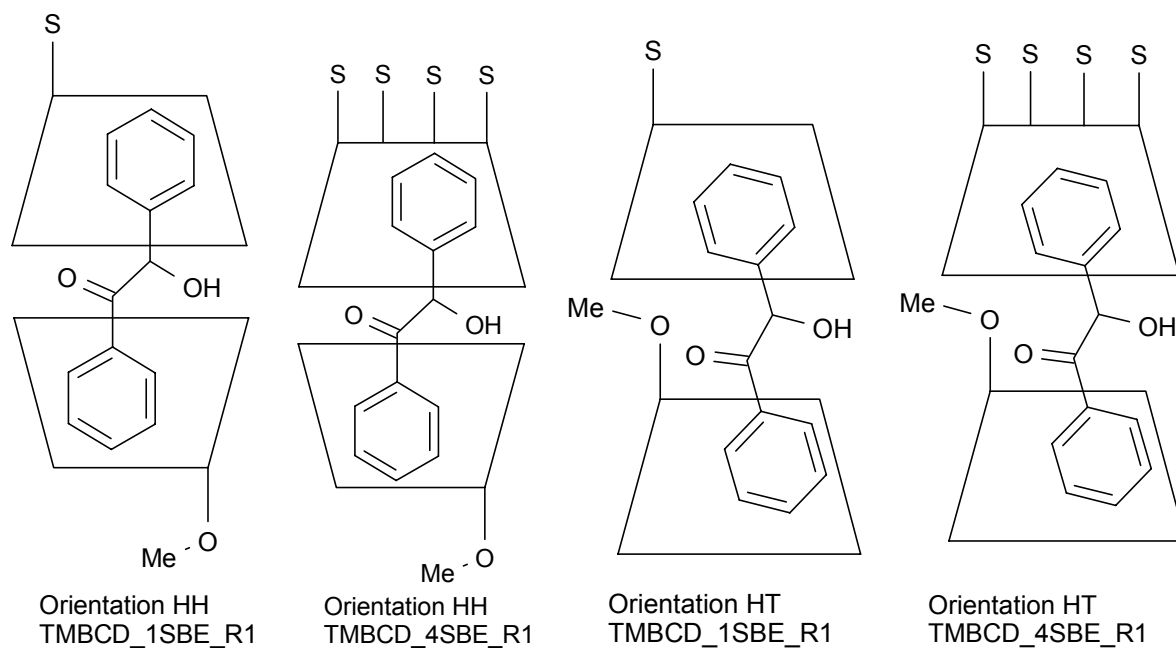


Figure 95 : Complexes de stœchiométrie 2:1 contenant la benzoïne en orientation 1.

- Complexes de stœchiométrie 2 :1 contenant la benzoïne en orientation 2.

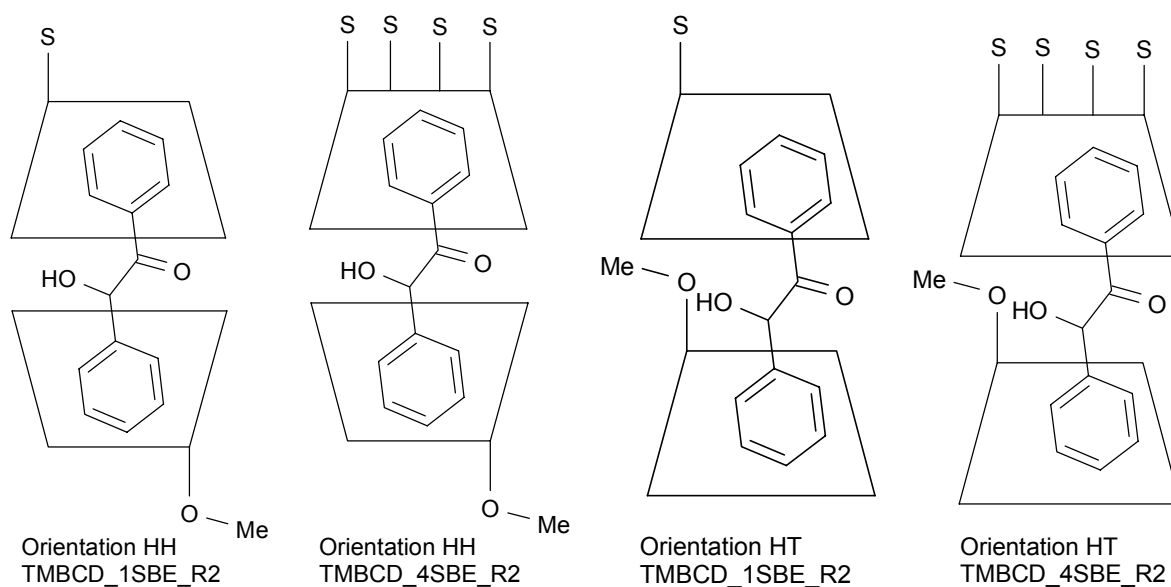


Figure 96 : Complexes de stœchiométrie 2:1 contenant la benzoïne en orientation 2.

A cause d'une gêne stérique très probable des groupements sulfobutyles, nous n'avons pas calculé les orientation Tail-Tail des dimères TMBCD_1SBE, TMBCD_4SBE,

4SBE_4SBE et 1SBE_1SBE. A cause d'absence de groupes hydroxyles et donc de liaisons hydrogènes intermoléculaires, le dimère de triméthyl- β -cyclodextrines n'a pas été étudié. Pour les complexes ayant une stœchiométrie 2 :1, nous avons donc effectué 20 simulations.

De plus, nous avons effectué des dynamiques moléculaires pour chaque cyclodextrine seule et pour chaque dimère seul, simulations nécessaires par la suite pour le calcul de l'énergie d'interaction. Considérant l'encombrement stérique des groupements sulfobutyles, c'est uniquement la triméthyl- β -cyclodextrine qui change d'orientation pour les deux dimères ayant une orientation Head-Tail, comme par exemple le passage du premier au troisième complexe des Figure 95 et Figure 96.

Les simulations, ont été réalisées avec le module SANDER du programme AMBER v.5 et étudiées dans une boîte cubique de molécules d'eau explicites TIP3P¹⁶⁵ créée à partir de 3³ cubes unitaires de 216 molécules. Le contre-ion utilisé est le sodium.

Les conditions périodiques aux frontières, 8 Å pour le premier *cutoff* et 14 Å pour le second, sont appliquées pour les interactions non-liées. Les contraintes de liaisons pour les hydrogènes sont appliquées grâce à l'option SHAKE¹⁶⁶.

Le système a été initialement minimisé, puis chauffé jusqu'à 298 K, en 3 étapes : de 0 à 50 K (1 ps), puis de 50 K à 298 K (10 ps) et enfin équilibré à 298K. Un time step de 2 fs a été utilisé. La pression et la température sont maintenues constantes.

Une fois le système équilibré, l'enregistrement des données, pour les dimères de stœchiométrie 2:1 a duré 3000 ps (parfois 6000 ps, lorsqu'il existait un changement de géométrie à la fin de la simulation) en enregistrant les trajectoires du système toutes les 5 ps (600 fichiers de coordonnées de chaque structure sont gardées). Pour les dimères de stœchiométrie 1:1, l'enregistrement a duré 1500 ps en échantillonnant les données toutes les 3 ps.

7.4.2 Calcul des charges atomiques.

7.4.2.1 La benzoïne

Comme pour les calculs des chapitres précédents, il faut générer plusieurs conformations pour améliorer la précision des charges atomiques d'une molécule. Les charges atomiques de la benzoïne ont été générées à partir de plusieurs conformations, obtenues d'un calcul de Monte Carlo effectué avec MacroModel v5.

La benzoïne est construite grâce au programme MacroModel. Le champ de force AMBER* et les mots-clés par défaut sont utilisés pour le calcul de Monte Carlo. Plusieurs conformations sont obtenues appartenant à 2 grandes familles d'énergies proches : l'une présente une orientation perpendiculaire des cycles, l'autre une orientation linéaire.

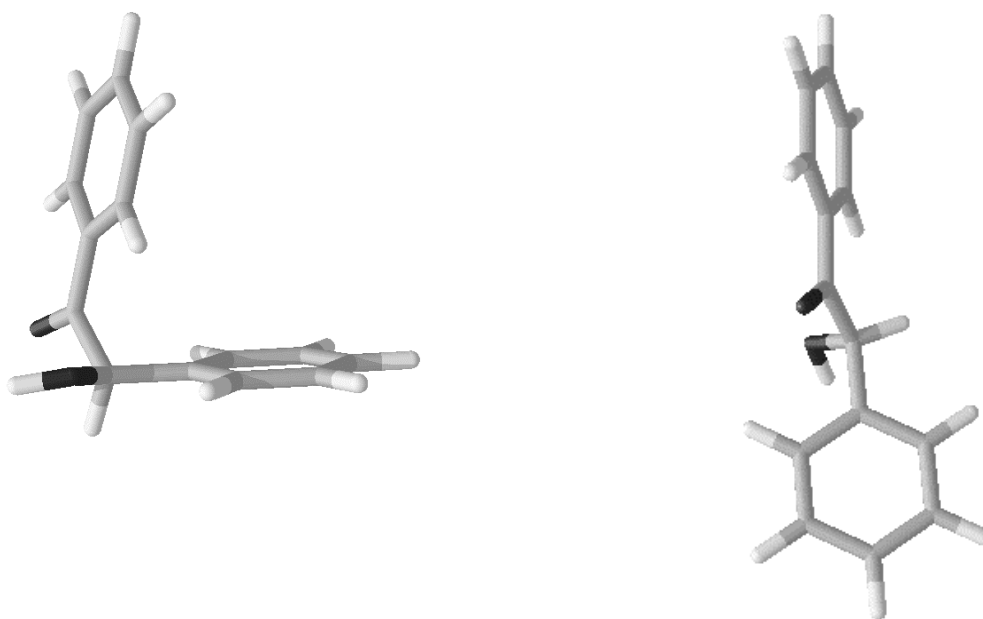


Figure 97 : Représentation des deux grandes familles de conformations obtenues par la méthode de Monte Carlo.

Dans chaque famille, nous obtenons plusieurs conformations caractérisées par des rotations relatives de 90° d'un seul cycle benzénique.

Les 5 premières conformations, qui sont les plus représentatives, ont été gardées puis transformées en format Z-matrix utilisé par le programme Gaussian. Chaque conformation est d'abord optimisée avec la base STO-3G (mots clés : Opt Pop=None Geom (NoDistance,NoAngle)).

Le potentiel électrostatique moléculaire est calculé au niveau HF/6-31G* avec les mots clés Pop=mk (Merz-Kollman)⁸³ et iop(6/33)=2 (cf. chapitre 5.2.3, pour les explications) et les charges atomiques ponctuelles de la benzoïne sont obtenues en utilisant la méthodologie RESP. Nous obtenons les charges suivantes :

C1= -0.115645 ; H11= 0.137391 ; C2= -0.151177 ; H12= 0.137326 ; C3= -0.100541 ; H13= 0.136271 ; C4= -0.151177 ; H14= 0.137326 ; C5= -0.115645 ; H15= 0.137391 ; C6= -0.040809 ; C7= 0.462041 ; O7= -0.485853 ; C8= 0.199757 ; H8= 0.023716 ; O8= -0.582804 ; HO8= 0.378723 ; C9= 0.018146 ; C10= -0.130055 ; H21= 0.131617 ; C11= -0.177162 ; H22= 0.147785 ; C12= -0.100297 ; H23= 0.131486 ; C13= -0.177162 ; H24= 0.147785 ; C14= -0.130055 ; H25= 0.131617.

La numérotation utilisée correspond à celle décrite sur la figure suivante :

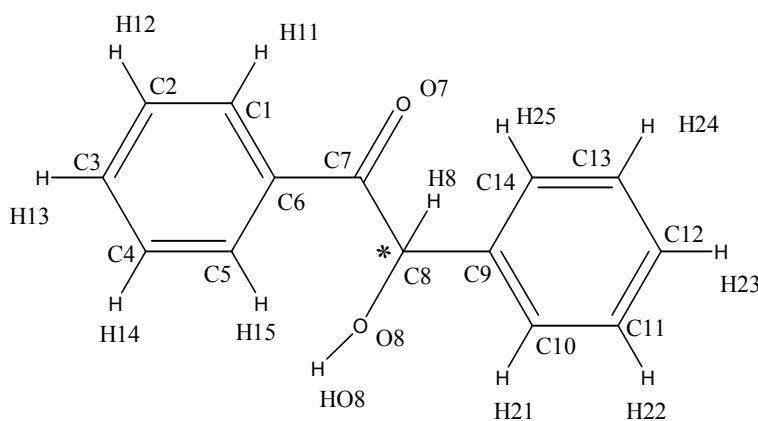


Figure 98 : Représentation de la numérotation utilisée sous AMBER.

7.4.2.2 La triméthyl- β -cyclodextrine.

A partir de la géométrie obtenue par diffraction des rayons X de la cyclodextrine, nous avons remplacé tous les groupements hydroxyles de la β -cyclodextrine par des groupements méthyléthers (OCH₃).

Ensuite, la méthodologie pour obtenir les charges atomiques est exactement la même que celle décrite dans le chapitre 5.2.3.

Nous obtenons alors les charges atomiques suivantes :

C1= 0.022057 ; H1= 0.149243 ; C2= 0.047332 ; H2= 0.125086 ; O2= -0.224672 ; C2O= -0.031503 ; H21= 0.063534 ; H22= 0.063534 ; H23= 0.063534 ; C3= -0.032159 ; H3= 0.162287 ; O3= -0.361916 ; C3O= 0.008046 ; H31= 0.060632 ; H32= 0.060632 ; H33= 0.060632 ; O1= -0.252666 ; C5= 0.015898 ; H5= 0.149851 ; C6= -0.014177 ; H6A= 0.089652 ; H6B= 0.093426 ; O6= -0.337553 ; C6O= -0.042334 ; H61= 0.070925 ; H62= 0.070925 ; H63= 0.070925 ; C4= -0.014130 ; H4= 0.191661 ; O4= -0.323869.

La numérotation de chaque résidu est représentée sur la figure suivante :

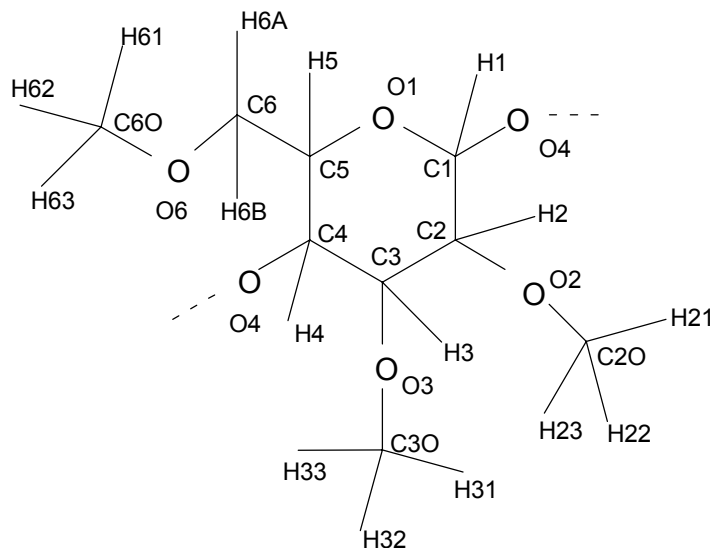


Figure 99 : Représentation de la numérotation utilisée sous AMBER.

7.4.2.3 La mono et tétrasulfobutyléther-β-cyclodextrine.

A partir de la géométrie obtenue par diffraction des rayons X, nous avons coupé la β-cyclodextrine en 7 morceaux contenant chacun 3 unités glucosidiques (cf chapitre 5.2.3). Pour le glucose central, nous avons remplacé les groupements OH de l'hydroxyle primaire (O6-H6O) de la β-cyclodextrine par des groupements O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-SO₃⁻. Chaque résidu est optimisé avec le programme Gaussian, avec la base STO-3G. Puis le potentiel électrostatique moléculaire est calculé au niveau HF/6-31G* avec les mots clés Pop=mk (Merz-Kollman)⁸³ et iop(6/33)=2 et les charges atomiques ponctuelles de chaque résidu sont obtenues en utilisant la méthodologie RESP. Pour les unités glucosidiques non modifiées, nous utiliserons les charges atomiques obtenues dans le chapitre 5.2.3.

Nous obtenons les charges atomiques suivantes pour chaque résidu modifié :

C1= 0.136884 ; H1= 0.130499 ; C2= 0.154282 ; H2= 0.122221 ; O2= -0.674316 ; H2O= 0.448765 ; C3= 0.116529 ; H3= 0.102528 ; O3= -0.635279 ; H3O= 0.430180 ; O1= -0.346359 ; C5= -0.038871 ; H5= 0.188413 ; C6= 0.025800 ; H6A= 0.122808 ; H6B= 0.129161 ; O6= -0.277733 ; C7= -0.024901 ; H7A= 0.068490 ; H7B= 0.076121 ; C8= -0.017977 ; H8A= 0.040724 ; H8B= 0.017223 ; C9= 0.017450 ; H9A= -0.003520 ; H9B= -0.015973 ; C10= 0.182887 ; H1A= -0.006914 ; H1B= 0.056562 ; O7= -0.329978 ; S6= 0.805742 ; O61= -0.497631 ; O62= -0.497631 ; O63= -0.497631 ; C4= -0.136544 ; H4= 0.163588 ; O4= -0.615596.

La numérotation de chaque résidu modifié est représentée sur la figure suivante :

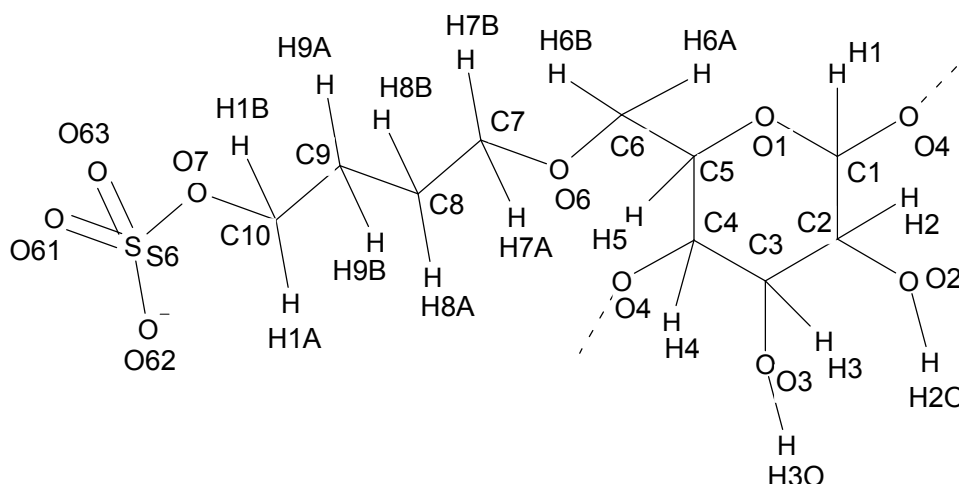


Figure 100: Numérotation utilisée sous AMBER.

Le contre-ion utilisé est le sodium. Les paramètres de ce cation sont inclus dans le champ de force parm94.dat et proviennent des travaux de Hagler et al¹⁸⁴. Les paramètres du contre-ion (R^* et ϵ) sont adaptés pour donner une fonction de distribution radiale correcte avec les atomes de solvant de type TIP3P. Ces paramètres permettent de garder la distance ion-OW à une distance correcte. R^* n'est pas le rayon de van der Waals mais un terme faisant partie de la fonction de potentiel. Les paramètres du champ de force sont : $R^* = 1.8680$ et $\epsilon = 0.0028$.

Les paramètres de l'atome de soufre ne sont pas inclus dans le champ de force. Cependant, dans le tutorial d'AMBER, la méthodologie pour retrouver les paramètres du soufre est expliquée. Ceux-ci s'apparentent à ceux du phosphore :

Paramètres d'élongation :

Types	K	Req
S6-O7	425.0	1.720
S6-O61	230.0	1.740

184 - Peng, Z. ; Ewig, C.S. ; Hwang, M.-J. ; Waldman, M. ; Hagler, A.T. *J. Phys. Chem. A*, **1997**, *101*, 7243.

Paramètre angulaire:

Atom type	K	Teq
C10-O7-S6	100.0	110.00
O10-S6-O7	100.0	103.00
O61-S6-O62	140.0	119.90

Paramètres de l'angle dièdre:

Atom type	IDIVF	PK	PHASE	PN
C10-O7-S6-O61	1	0.25	0.0	-3.0

7.4.3 Temps de calcul utilisés.

La présence de cyclodextrines sous formes ioniques et la présence des longues chaînes ramifiées engendrent une augmentation du critère de *cutoff* des molécules d'eau : 12.00 Å (9.00 Å dans les calculs similaires précédents) et donc une augmentation de la cage de solvant : environ 50 Å de côté (environ 40 Å dans les calculs similaires précédents). Le nombre total d'atomes atteint parfois 10 000. Par conséquent, les temps de calcul sont considérables.

Pour un dimère ayant une stœchiométrie 2:1 et contenant au moins un groupe sulfobutyléther, le temps de calcul pour une simulation est de 14 jours. Pour un complexe de stœchiométrie 1:1 le temps de calcul est approximativement de 3 jours. Les temps sont les temps réels moyens des calculs effectués sur les machines HP V2500, HP N4000 et ORIGIN 2000¹⁸⁵. L'ensemble des simulations de ce chapitre représente plus de 10 mois de calcul en continu sur un seul ordinateur.

185 - Voir ANNEXE.

7.5 Résultats.

7.5.1 La benzoïne seule

La simulation de la benzoïne seule montre l'existence préférentielle de deux familles de conformations comme celles obtenues avec la méthode de Monte Carlo. Nous avons calculé la variation de l'angle C3-C8-C12 pendant une simulation. Le choix volontaire de ne pas utiliser un angle dièdre est dû à la simplicité de représenter les orientations perpendiculaires et linéaires de la benzoïne, uniquement à partir de ces trois atomes.

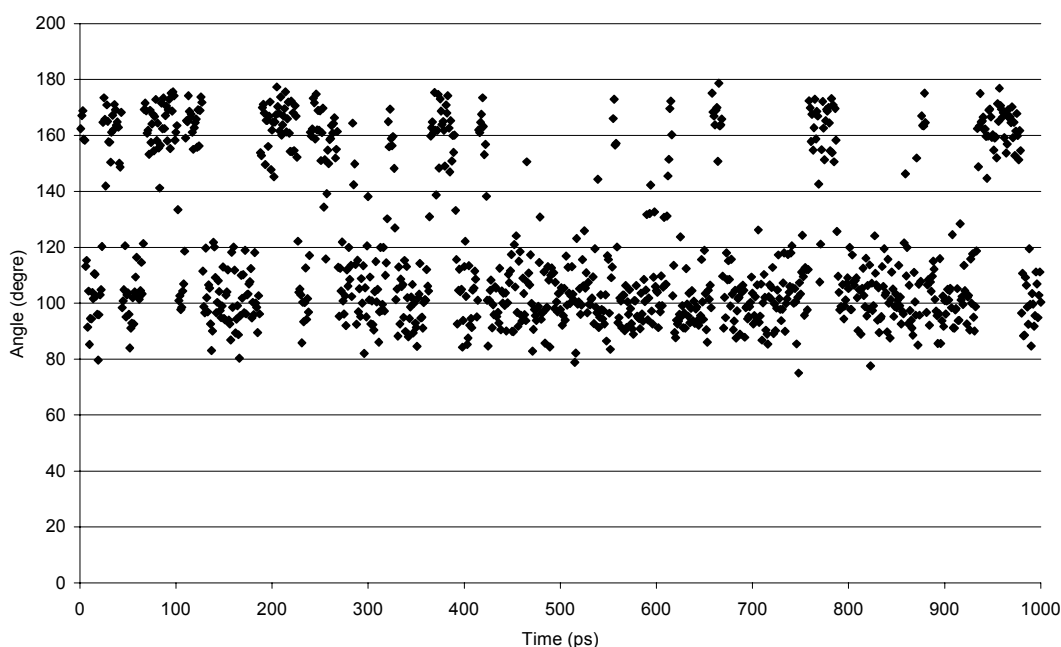


Figure 101 : Représentation de la variation d'un angle de torsion de la benzoïne.

Nous remarquons qu'il existe deux clusters d'angle : 145-175 et 80-120, correspondant respectivement à une géométrie "plane" et une géométrie "perpendiculaire" (Figure 97). Quantitativement la géométrie perpendiculaire paraît être plus représentée. En comparant le profil énergétique de la benzoïne pendant la simulation à ces données géométriques, nous remarquons qu'il n'existe pas de corrélation directe entre l'angle choisi et l'énergie qui varie entre 65 et 80 kcal.mol⁻¹ pendant la simulation sans dérive apparente.

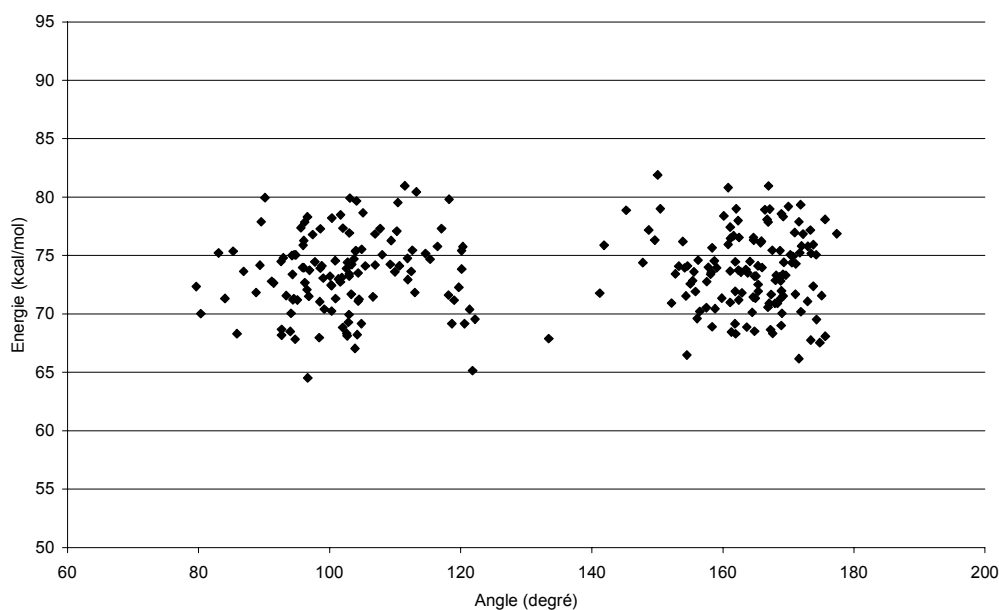


Figure 102 : Variation de l'énergie potentielle au cours de la simulation.

Les différentes composantes de cette énergie sont indiquées dans le Tableau 47 et seront utilisées dans la suite de cette étude dans le calcul des énergies d'interaction des complexes.

Tableau 47 : Valeurs des énergies calculées avec le programme MM-PBSA.

Contribution	mean	std
Eelectrostat	44.3993	1.8531
EvdW	8.6991	1.4421
Einternal	20.4658	2.9541
Egas	73.5642	3.3349
E(nonpolar)	3.2372	0.0229
E(PB)	-85.4397	56.656
E(solvation)	-82.2025	56.6572
E(PB+elect)	-41.0404	56.4587
E(total,PB)	-8.6382	56.3457

7.5.2 Les cyclodextrines non complexées.

Avant d'exécuter les simulations des complexes, nous avons effectué des dynamiques moléculaires à partir des cyclodextrines non complexées. Les résultats montrent une séparation des deux cyclodextrines pour le dimère 4SBE_4SBE et pour le dimère 1SBE_1SBE. Les deux cyclodextrines se séparent dès le début de la simulation (Figure 103).

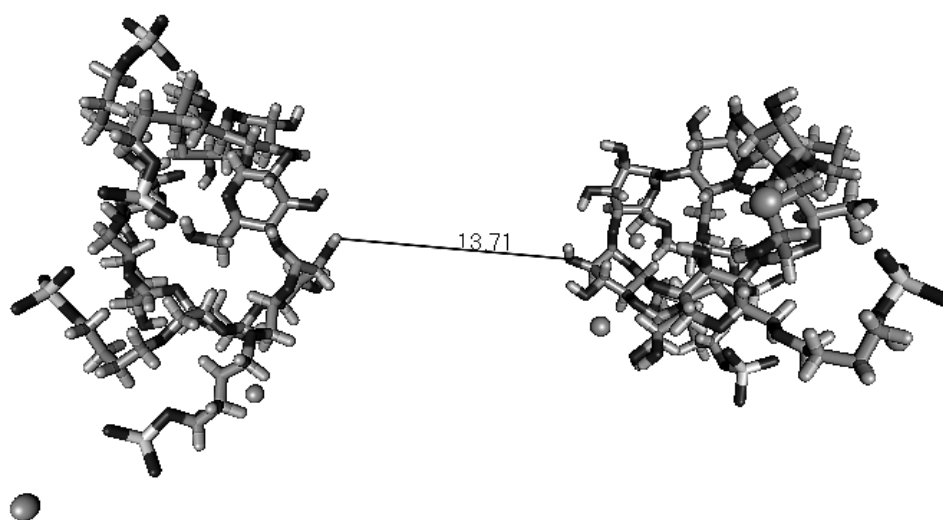


Figure 103 : Représentation du dimère 4SBE_4SBE éloigné de 13.71 Å.

Pour tous les autres types de dimères, les deux cyclodextrines restent proches et adoptent souvent une orientation perpendiculaire ou parallèle (Figure 104 et Figure 105).

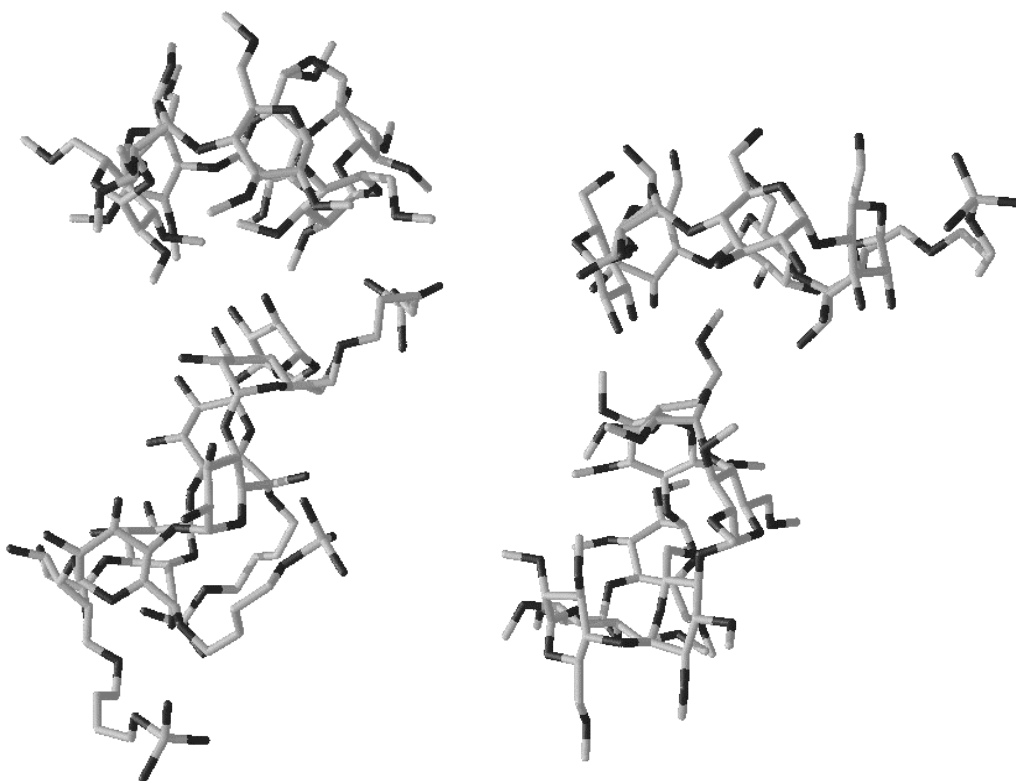


Figure 104 : Structures finales obtenues à partir de l'orientation Head-Head de 4SBE_TMBCD (à gauche) et de 1SBE_TMBCD (à droite) (les hydrogènes, les contre-ions et les molécules de solvant ont été supprimées).

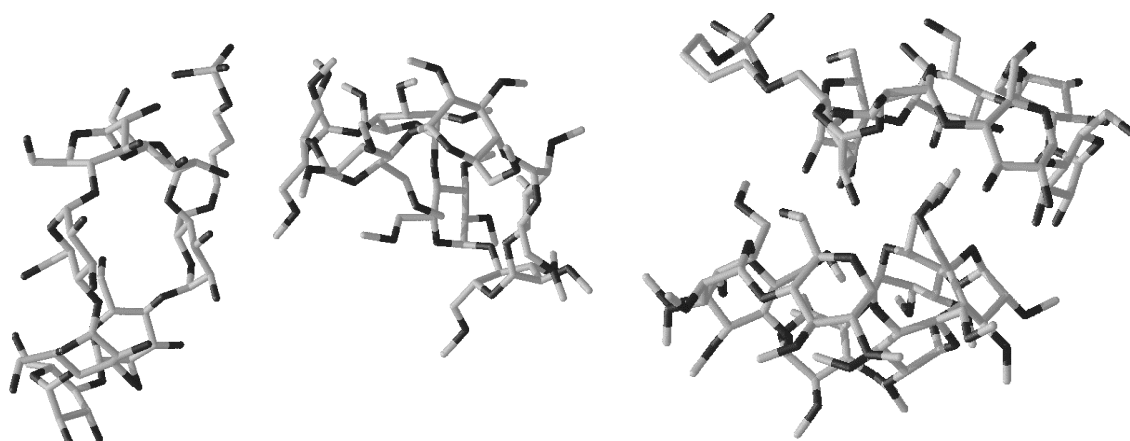


Figure 105 : Orientation Tail-Tail et Head-Tail de 1SBE_TMBCD.

De ces quatre dernières images la TMBCD est très déformée pendant les simulations. Tous les groupements hydroxyles ayant été remplacés par des groupements méthyléthers, il n'existe plus de liaisons hydrogènes intermoléculaires pour stabiliser la forme conique présente dans la β -cyclodextrine. Les groupements sulfobutyléthers de la 4SBE et la 1SBE s'éloignent vers l'extérieur de la cavité de la cyclodextrine, en étant toujours parallèle au plan formé par les oxygènes interglucosidiques. Il se forme alors des liaisons hydrogènes entre les oxygènes du groupe sulfoxyde et les hydroxyles primaires adjacents.

A partir du dimère d'orientation initiale Tail-Tail de la 1SBE-TMBCD on obtient une forme perpendiculaire proche de celle obtenue à partir de l'orientation Head-Tail (Figure 105).

Tableau 48 : Energies des différents dimères et monomères.

Contribution	HH 1SBE_TMBCD		HT 1SBE_TMBCD		TT 1SBE_TMBCD	
	mean	std	mean	std	mean	std
Eelectrostat	243.9985	14.2383	242.5203	12.8248	243.4266	12.1813
EvdW	3.1227	10.4222	-5.9699	9.0879	3.1863	8.4736
Einternal	518.4911	11.2871	521.2341	10.6531	517.0806	11.343
Egas	765.6123	17.6937	757.7845	14.3723	763.6935	14.5888
E(nonpolar)	13.7582	0.7473	12.8604	0.6159	14.2222	0.4975
E(PB)	-156.0036	12.6227	-149.1341	8.058	-156.7327	7.2499
E(solvation)	-142.2454	12.0311	-136.2737	7.77	-142.5105	7.1599
E(PB+elect)	87.9949	8.3161	93.3862	7.8868	86.6939	7.3343
E(total,PB)	623.3669	11.2496	621.5107	10.2629	621.183	11.9715

Contribution	HH 4SBE_TMBCD		HT 4SBE_TMBCD	
	mean	std	mean	std
Eelectrostat	457.809	24.88	398.61	20.545
EvdW	-8.9099	7.903	-29.2526	9.079
Einternal	580.759	13.811	590.619	13.099
Egas	1029.658	25.040	959.98	21.151
E(nonpolar)	15.933	0.528	14.223	0.434
E(PB)	-595.9749	21.876	-536.3791	16.693
E(solvation)	-580.0416	21.719	-522.1553	16.505
E(PB+elect)	-138.1654	10.532	-137.7621	9.168
E(total,PB)	449.617	12.011	437.828	12.256

Contribution	4SBE seule		1SBE seule		TMBCD seule	
	mean	std	mean	std	mean	std
Eelectrostat	413.6354	19.3674	198.7094	11.2412	56.7562	2.1115
EvdW	0.2683	6.2224	14.8289	4.8491	3.2006	5.1194
Einternal	301.4666	8.9393	226.8615	7.6338	280.0994	8.5278
Egas	715.3702	19.682	440.3998	12.205	340.0562	7.993
E(nonpolar)	9.6996	0.2499	8.1527	0.172	8.9344	0.1223
E(PB)	-224.5227	8.697	-134.3039	6.9616	-37.4246	1.5565
E(solvation)	-214.823	8.7368	-126.1512	6.892	-28.4902	1.5493
E(PB+elect)	189.1127	15.6306	64.4056	6.3299	19.3316	2.1185
E(total,PB)	500.5472	17.025	314.2486	8.0338	311.566	8.1183

Nous avons calculé, grâce au programme MM-PBSA, les énergies de solvation de chaque composé. Ces résultats nous permettront d'obtenir les énergies d'interaction des complexes.

Le dimère 4SBE_4SBE n'est pas représenté puisque, comme nous l'avons précédemment signalé, ce dimère est instable et les deux cyclodextrines se séparent pendant toute la simulation. On peut donc supposer que la 4SBE n'existe que sous forme monomère dans le milieu.

A partir du Tableau 48, les énergies des dimères de dérivés de cyclodextrines sont plus faibles que la somme de chaque monomère. Ceci implique une stabilité du dimère en milieu aqueux. Il existe aussi une très faible différence d'énergie entre les dimères 1SBE_TMBCD (orientation Head-Head, Head-Tail et Tail-Tail) et la somme des énergies de la 1SBE et TMBCD seules, ce qui laisse présager la présence de monomères et de dimères dans la solution.

De plus, nous remarquons que les énergies des dimères de 4SBE_TMBCD sont très semblables quelle que soit l'orientation. Néanmoins, l'orientation Head-Tail, orientation perpendiculaire pendant la simulation, est plus favorisée grâce au plus grand nombre de liaisons hydrogènes entre le soluté et le solvant.