

Associations moléculaires cyclodextrine (ou sérum albumine humaine)/molécule organique : rupture de symétrie et approche thermodynamique

Yves C. Guillaume* maître de conférences-HDR*, **Joelle Miller**** professeur**, **Éric Peyrin***** maître de conférences

Summary : *Molecular associations cyclodextrine (or human serum albumine)/organic molecule : symmetry breaking and thermodynamic approach*

A new field of analytical chemistry, bio-analytical chemistry is proposed. It would treat the analysis of bio-molecules or chemical unknown as well as the development of methods to search into and clarify the mysteries in nature. Some examples of our studies performed in the line of this field are presented. The proposal is made in order to stimulate young people to participate in and be involved in the promotion on analytical chemistry.

Mots clés : *Chromatographie, sérum albumine humaine, cyclodextrine, rupture de symétrie, promoteur de pénétration.*

Key-words : *Chromatography, human serum albumine, cyclodextrine, symmetry breaking, hydrophobic, penetration promoter.*

Un nouveau type de chimie, la chimie supramoléculaire s'est fortement développée ces vingt dernières années. La grande différence entre cette chimie et la chimie moléculaire classique est la nature des liaisons qui entrent en jeu [1]. En chimie moléculaire, une liaison entre deux molécules est souvent une liaison covalente forte. En chimie supramoléculaire, les liaisons qui s'établissent entre les molécules sont des liaisons non covalentes. Le but de la chimie supramoléculaire est de créer de nouveaux édifices moléculaires (supermolécules) dont le rôle est de copier ou d'imiter l'activité des enzymes. Ces molécules dites molécules cages, car contenant une cavité, ont fait apparaître la notion d'enzyme artificielle. Elles permettent des associations moléculaires entre une ou plusieurs molécules dont l'une est l'hôte (le récepteur, molécule concave) et l'autre l'invité (le substrat, molécule convexe) pour former un complexe. Jean-Marie Lehn [2] définit la chimie supramoléculaire par les termes suivants : « *c'est une chimie de creux et de bosses, une chimie de molécules qui possèdent un intérieur autant qu'un extérieur* ». Les cyclo-

dextrines (CD) font partie de ces molécules dites cages, ce qui leur permet d'encapsuler d'autres molécules (substrats organiques, sels, halogènes...). L'invité est encapsulé de façon totale ou partielle, la CD jouant le rôle de molécule hôte ou de récepteur. Les liens entre l'hôte et l'invité sont des interactions faibles qui permettent une dissociation aisée et douce. La CD peut donc être considérée comme un véhicule capable de transporter dans un organisme vivant une molécule (à activité thérapeutique par exemple) comme le font certaines protéines et notamment la sérum albumine humaine (SAH). Il existe en effet une analogie entre certaines propriétés chimiques des cavités liantes de la SAH et celle de la CD. L'intérieur de ces cavités est relativement apolaire par rapport à l'eau alors que l'extérieur est plus hydrophile. La SAH peut donc être considérée selon la terminologie de Jean-Marie Lehn comme une supermolécule. Les interactions entre ces 2 « supermolécules », SAH ou CD et leur invité, le plus souvent de faibles intensités, justifient l'utilisation des CD et de la SAH comme sélecteurs chiraux pour séparer la paire d'énantiomères d'une molécule chirale. Toutes ces analogies observées dans la formation du complexe (hôte-invité), laissent pressentir des techniques communes pour son analyse, à savoir la chromatographie liquide haute performance (CLHP), l'électrophorèse capillaire (EC), les méthodes spectrométriques (résonance magnétique nucléaire (RMN), Raman...), la diffraction des rayons X ou les méthodes d'analyses thermiques (analyse enthalpique différentielle (AES), analyse thermogravimétrique (ATG)). Après ces généralités, nous allons préciser la nature des interactions gouvernant l'association hôte-invité et présenter deux

Yves C. Guillaume est le lauréat 1998 du prix de la division Chimie analytique de la SFC.

* Laboratoire de chimie analytique, Faculté de médecine et de pharmacie, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex. Tél. : 03.81.66.55.46. Fax : 03.81.66.56.55.

E-mail : yves.guillaume@univ-fcomte.fr

** Laboratoire de pharmacie galénique, Faculté de médecine et de pharmacie, place Saint-Jacques, 25030 Besançon Cedex. Tél. : 03.81.66.55.48. Fax : 03.81.66.52.90.

E-mail : joelle.millet@univ-fcomte.fr

*** Faculté de Pharmacie, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche Cedex. Tél. : 04.76.63.71.00 (poste 83-86). Fax : 04.76.51.86.67.

E-mail : eric.peyrin@ujf-grenoble.fr

exemples d'associations moléculaires. Avec la molécule de β -CD comme récepteur, une série d'énantiomères de molécules à activité antifongique a été étudiée en tant que molécule invitée. Pour la molécule de SAH, une série d'énantiomères d'acides aminés dansylés a été considérée comme molécules complémentaires. Deux techniques d'études ont été utilisées, la chromatographie liquide en phase inversée et l'analyse enthalpique différentielle.

Nature des interactions gouvernant l'association molécule-hôte molécule-invitée

Les interactions entre l'hôte et l'invité mettent en jeu le plus souvent des liaisons non covalentes notamment :

- Les interactions électrodynamiques ou Lifshitz-van der Waals (LW),
- Les interactions polaires, donneurs d'électrons-accepteurs d'électrons, ou interactions acide-base de Lewis (AB),
- Les interactions électrostatiques (EL),
- Les interactions hydrophobes (IH),
- Le mouvement brownien (BR).

Parmi ces interactions, il faut distinguer les interactions primaires des interactions secondaires qui leur sont subordonnées. Les interactions primaires sont gouvernées par les forces agissant à longue portée (IH, EL). Elles sont responsables de l'approche de la molécule invitée du milieu à la surface de la molécule hôte ; ce sont les interactions motrices. Succédant à cette étape, la molécule invitée engage avec les résidus de la molécule hôte des interactions à courte portée (LW, par exemple). Ce sont les interactions secondaires responsables de la maturation de la liaison entre ces deux entités. Nous allons dans cette partie, plus particulièrement développer l'interaction hydrophobe, notion qui est soumise à de nombreuses controverses. Le terme est souvent employé dans la littérature avec une certaine part d'imprécision et de confusion. Cela est dû au fait qu'aucune définition théorique précise jusqu'à ce jour n'a pu être établie de façon convaincante. Toutefois, la théorie développée par Tanford [3] est la plus couramment admise. Il définit l'effet hydrophobe (assimilé aux interactions hydrophobes) comme étant la tendance qu'ont deux composés peu polaires ou apolaires à s'attirer mutuellement en milieu aqueux. Ces attractions hydrophobes sont la conséquence de l'importante énergie libre de cohésion des liaisons hydrogène des molécules d'eau entourant ces solutés. Comme le dit Israelachvili [4] « *l'eau s'aime elle-même tout simplement trop pour permettre à quelque substance d'interférer dans ses affaires* ».

Tout se passe comme si l'attraction polaire des molécules d'eau entre elles entraînait l'exclusion de toute autre molécule du système aqueux. L'attraction hydrophobe est gouvernée par le nombre de molécules d'eau ordonnées, exclues de l'interface eau-composé hydrophobe, quand le contact entre les molécules est établi [5]. Ainsi, plus la surface du soluté accessible à l'eau sera grande et plus l'effet hydrophobe sera important. Ceci est objectivé par la proportionnalité retrouvée entre les énergies libres de transfert d'hydrocarbures d'une phase aqueuse à une phase apolaire et l'aire de surface accessible au solvant de ces composés [6]. En

outre, Gill *et al* [7] ont déterminé les caractéristiques thermodynamiques de la dissolution de solutés non polaires dans l'eau. Le transfert du benzène liquide dans l'eau à 298 K est accompagné d'un faible changement d'enthalpie ΔH° positif (2,08 kJ.mol⁻¹) associé à un large changement d'entropie négatif ΔS° (- 57,8 J.mol⁻¹ K⁻¹). Dans ce processus, le soluté hydrophobe est inséré dans l'environnement aqueux polaire à forte énergie de cohésion par liaison hydrogène, ce qui entraîne un accroissement de l'ordre du système soluté-eau. Les molécules d'eau au voisinage immédiat du soluté voient leur possibilité d'orientation réduite, ce qui aboutit à une enveloppe de molécules d'eau hautement ordonnées. La diminution de l'entropie du système molécules hydrophobes-molécules d'eau est une des caractéristiques fondamentales de l'effet hydrophobe à température ambiante. Les attractions hydrophobes se produisent non seulement entre deux composés hydrophobes, mais également entre une entité hydrophobe et une entité plus hydrophile. C'est le cas le plus fréquemment rencontré en milieu biologique pour les systèmes ligand-récepteur. Une des particularités de ce système est représentée par le fait que le récepteur (ou site) se situe sur une protubérance du biopolymère. Il apparaît donc nécessaire de tenir compte de la surface de contact entre le soluté et la cavité de liaison en introduisant la notion d'une interface courbe. Les sites sont caractérisés par une courbure de leur surface accessible au solvant [8]. Le rayon de courbure caractérisant cette surface est un paramètre à intégrer lorsque l'on évoque les attractions hydrophobes impliquées dans les processus associatifs ligand-récepteur [8]. Considérons le cas simple où le site-récepteur de la molécule hôte a une surface sphérique de rayon de courbure r . Si l'on suppose qu'une molécule M de rayon A (l'eau par exemple) vient tangentiellement à cette surface, alors on démontre [9, 10] que la tension de surface est reliée au rayon r et à une constante de dimension ato-

mique Z dépendant de M par $\sigma(r) = \frac{\sigma(\infty)}{1 + \frac{2Z}{r}}$ ou $\sigma(\infty)$ corres-

pondant à la tension de la surface plane ($r \rightarrow \infty$). Un autre paramètre représentatif de l'état de la surface de la cavité est la sinuosité [11] définie par $s = L/l$ où L est la longueur entre les 2 points extrêmes de la cavité le long de la surface et l est la plus petite longueur entre ces 2 points. Ces 2 paramètres s et $\sigma(r)$, sont caractéristiques de l'état de la surface de la cavité et sont utilisés pour étudier toute modification du mécanisme d'association molécule hôte-molécule invitée.

Édifices moléculaires avec la sérum albumine humaine en tant que molécule hôte

Généralités et structures sur la sérum albumine humaine (SAH)

Structure

La SAH (masse moléculaire 66 500 Da) fait partie des protéines globulaires. Elle contient 585 résidus dont 34 rési-

deux cystéine impliqués dans 17 ponts disulfure, un thiol libre (cystéine 34) et un seul résidu tryptophane (tryptophane 214) (figure 1). Les ponts disulfure sont responsables de la formation de neuf structures répétitives en boucle-maillon-boucle caractéristique de l'albumine. Approximativement, 67 % de la structure secondaire est en hélice α . Récemment He *et al* [12] ont déterminé la structure tridimensionnelle de la SAH par cristallographie. Elle comprend trois domaines (notés I, II et III) équivalents en taille et en forme qui donnent à la protéine une forme de cœur. La structure tridimensionnelle peut être assimilée à un triangle équilatéral en 3 dimensions de 80 Å de côté et 30 Å de profondeur. Chaque domaine peut être divisé en deux plus petits domaines A et B (figure 2). Il y a 10 hélices principales par domaine (I, II et III) nommées h1-h10. Les sous domaines A comprennent six hélices h1-h6 avec h1-h6 qui sont de petites structures antiparallèles. Les sous domaines B contiennent les hélices h7-h10. Les ponts disulfure sont localisés entre h9 et h10, h9 et h7, h5 et h6, h4 et h5, h4 et h3 et h3 et h1 (excepté pour le domaine IA) [12].

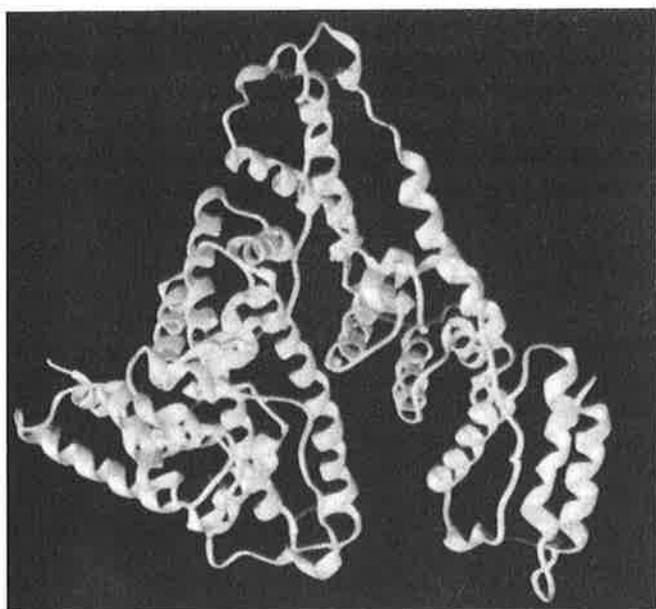


Figure 1 - Structure secondaire de la sérum albumine humaine. La position des 17 ponts disulfures et le résidu cys 34 sont indiqués en rouge (cf. couverture).

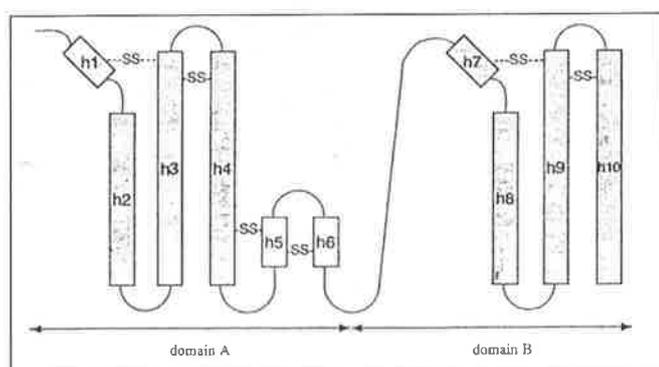


Figure 2 - Structure des sous-domaines A et B de la sérum albumine humaine.

Généralités

La sérum albumine humaine est la protéine la plus abondante du plasma, sa concentration variant chez un sujet sain

de 36 à 50 g/L. C'est une protéine très hydrophile, chargée négativement au pH physiologique puisque son pH isoélectrique est égal à 4,9 [13]. Les fonctions de l'albumine humaine sont de quatre ordres :

- rôle fondamental dans la pression osmotique et la régulation des échanges entre les différents compartiments cellulaires,
- rôle dans la nutrition grâce aux acides aminés libérés après phagocytose cellulaire,
- rôle dans la microcirculation et la cicatrisation des plaies,
- rôle dans la fixation et le transport de ligands (produits endogènes ou exogènes) et dans l'épuration de nombreux produits toxiques. C'est cette dernière fonction qui rend la SAH intéressante pour la séparation de molécules chirales.

Il est connu depuis de nombreuses années que la SAH est impliquée dans la fixation de nombreuses molécules au niveau sanguin. Elle est capable de se lier à des composés endogènes tels que la bilirubine ou les acides gras par exemple, à des cations tels que le Cu^{2+} , le Ni^{2+} ou le Ca^{2+} et à une grande partie des médicaments. De nombreux travaux basés à la fois sur le clivage enzymatique, la dialyse à l'équilibre, le dichroïsme circulaire ou la spectrofluorimétrie ont été menés pour identifier et localiser le (les) site(s) de fixation de la plupart des molécules invitées. Quatre sites principaux de fixation de molécules sur la SAH ont été différenciés [14] : le site de la bilirubine, le site des acides gras, le site indole/benzodiazépine et le site warfarine. Ces deux derniers sites sont les plus importants car fixant le plus grand nombre de ligands [15]. Le site warfarine ou site I fixe spécifiquement la warfarine bien sûr, la phénylbutazone ou l'iodipamide, tandis que le site benzodiazépine ou site II a comme marqueur des molécules telles que le L tryptophane, le diazépam ou la dansylsarcosine. Des critères structuraux déterminant la fixation des composés sur l'un ou l'autre de ces sites ont été dégagés [16]. Ainsi, les molécules se liant au site I sont globalement des composés hétérocycliques avec une charge négative localisée au milieu de leur structure (ex : phénylbutazone) alors que les molécules spécifiques du site II sont en général des acides carboxyliques aromatiques exhibant la charge négative du groupe carboxylate à l'extrémité du ligand (ex : acide flufénamique). Ces spécificités de fixation en fonction de la structure moléculaire doivent cependant être appréhendées avec précaution lorsque l'on sait que de nombreux exemples de liaison de molécules à la SAH ne répondent pas à ces critères généraux :

- Les molécules de benzodiazépines n'ont pas de fonctions carboxyliques et sont pourtant des composés spécifiques de la cavité du domaine IIIA.
- De nombreuses molécules sont capables de se fixer à la fois sur le site I et sur le site II (avec néanmoins une plus grande affinité pour l'un des deux sites). C'est le cas du dicoumarol, du kétoprofène..., etc.
- Enfin, des molécules telles que les acides aminés dansylés, ayant un squelette commun (figure 3), se fixent sur l'un ou l'autre de ces sites en fonction de la chaîne R caractéristique de l'acide aminé.

Les L acides aminés dansylés spécifiques du site II ont un groupement R neutre et hydrophobe (ex : tryptophane et

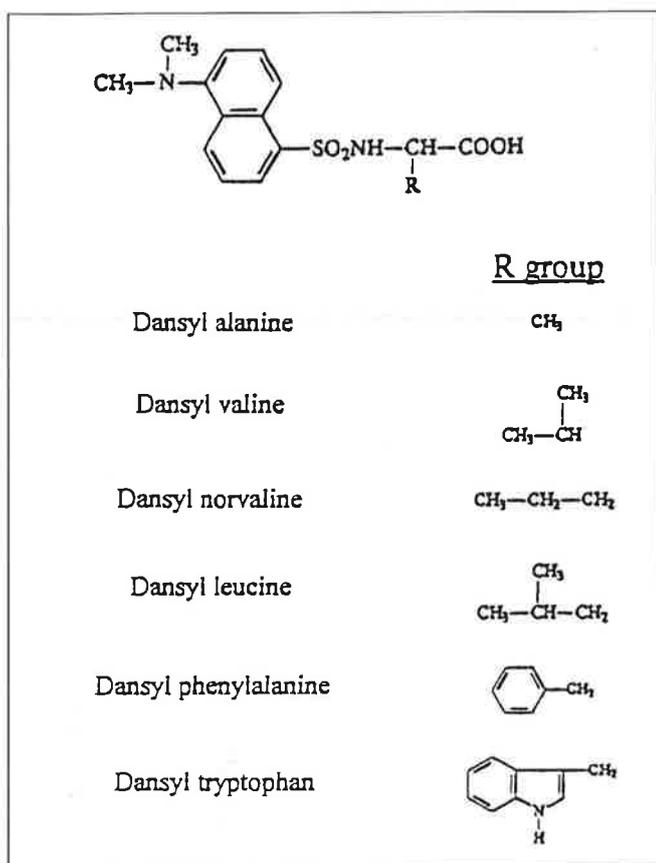


Figure 3 - Structure des acides aminés dansylés.

norvaline dansylés) tandis que ceux qui se fixent préférentiellement au site I ont généralement une chaîne hydrophile ou chargée (ex : arginine dansylée) [16].

Les sites I et II sont localisés respectivement [12] au niveau des domaines IIA et IIIA. Le site I se trouve dans une cavité formée par la boucle créée entre h5 (II) et h6 (II) et le site II se trouve entre les structures hélicoïdales h1 (III) et h2 (III). Les cavités de fixation de ces deux sites sont organisées de la même manière. La distribution des résidus des poches est distinctement asymétrique puisque l'intérieur est occupé par des résidus hydrophobes et l'extérieur par des résidus chargés. Ainsi, la poche du site II du domaine IIIA contient, dans une partie hydrophobe, les résidus pro 384, Leu 387, Ile 388, Phe 395, Leu 407, Leu 430, Val 433, Ala 439, Leu 453, Phe 488, Val 473, Leu 460 et Leu 423 [11]. Ces résidus hydrophobes délimitent la cavité qui est centrée d'une part sur le résidu chargé Arginine 410 situé à l'ouverture de la cavité et, d'autre part, sur le résidu Tyrosine 411. Nous allons maintenant expliquer comment un facteur chimique comme le pH peut influencer les propriétés fixatrices de la SAH.

Étude de l'association SAH-acides aminés dansylés (aad)

L'effet du pH sur la fixation d'une série d'aad au site II de la SAH a été analysé par chromatographie liquide haute performance en phase inversée (CLHP) (voir encadré). La phase mobile est un mélange hydroorganique contenant une fraction maximale d'acétonitrile de 15 % afin d'éviter toute dénaturation protéique.

Chromatographie liquide haute performance en phase inversée (CLHP)

La capacité d'un système chromatographique à séparer les constituants d'un mélange est fondée sur la partition des solutés entre une phase mobile et une phase fixe appelée phase stationnaire. En chromatographie sur colonne, la phase stationnaire remplissant la colonne est un liquide imprégnant un support solide ou constituant une gaine au contact d'une greffe. Les molécules de cyclodextrines ou les protéines comme la sérum albumine humaine (appelés sélecteurs chiraux) représentent des phases stationnaires chirales très employées à l'heure actuelle pour l'étude de la séparation de molécules chirales. En chromatographie liquide en phase inversée, la phase mobile utilisée est le plus souvent un mélange hydroorganique, comme le mélange acétonitrile-tampon phosphate. Les divers solutés constituant le mélange retenus par le sélecteur chiral vont donc se distribuer entre le sélecteur chiral greffé et la phase mobile. Selon leurs affinités respectives pour le sélecteur et la phase mobile, les divers solutés du mélange progressent avec une vitesse variable qui va permettre leur séparation et leur répartition dans les différentes fractions d'éluion. Chaque soluté est caractérisé par son facteur de rétention k' qui est en première approximation directement proportionnelle à la constante de complexation apparente K du soluté avec le sélecteur chiral greffé. k' peut être mesuré directement à partir du tracé chromatographique (chromatogramme) grâce au temps qui sépare le sommet du pic d'éluion du soluté de son injection. La séparation entre 2 énantiomères sur le chromatogramme peut être quantifiée à elle visualisée grâce au facteur de sélectivité α égal au rapport des constantes de complexation apparentes des 2 énantiomères. Les 2 énantiomères sont d'autant plus faciles à séparer que ce facteur α est élevé. Le tracé des courbes de van't Hoff

$$\ln K = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R \quad \text{et} \quad \ln \alpha = -\Delta(\Delta H^\circ)/RT + \Delta(\Delta S^\circ)/R$$

permettra d'analyser le mécanisme de complexation et d'énantiosélectivité du processus d'association sélecteur chiral-molécule d'énantiomère et de déterminer les diverses grandeurs thermodynamiques qui y sont attachées.

Les mesures des facteurs de rétention (image de la fixation de l'énantiomère sur le site II) des aad en fonction de l'inverse de la température pour différentes valeurs de pH (5,5-6,0-6,5-7,0-7,5-8,0) ont révélé aux pH physiologiques 7,0 et 7,5 un changement distinct de pente à basse température [9] (figure 4). Ce changement apparaît à une température critique T_{SAH}^* comprise entre 1 °C et 7 °C en fonction de l'énantiomère analysé. Des études par la technique d'analyse enthalpique différentielle (AED) réalisée sur la SAH ont, quant à elles, révélé l'existence d'un pic exothermique vers 4 °C, caractéristique d'une modification structurale de la SAH [9]. De nombreuses études ont, en effet, montré que la structure d'une protéine ressemblait plus à un état solide qu'à un état liquide [18]. Ceci est objectivé par les différences importantes observées entre les entropies et les enthalpies de repliement d'une protéine et celles du transfert de solutés hydrophobes d'une phase aqueuse à une phase apolaire. Par exemple, à 25 °C, le transfert de molécules hydrophobes d'une phase aqueuse à une phase apolaire montre un changement d'enthalpie proche de zéro avec un large changement positif d'entropie. Inversement, à la même température, le repliement de la protéine implique un changement d'enthalpie négatif important et d'entropie faiblement négatif [19]. On retrouve donc des variations d'entropie et d'enthalpie négatives en excès de celles prédites pour

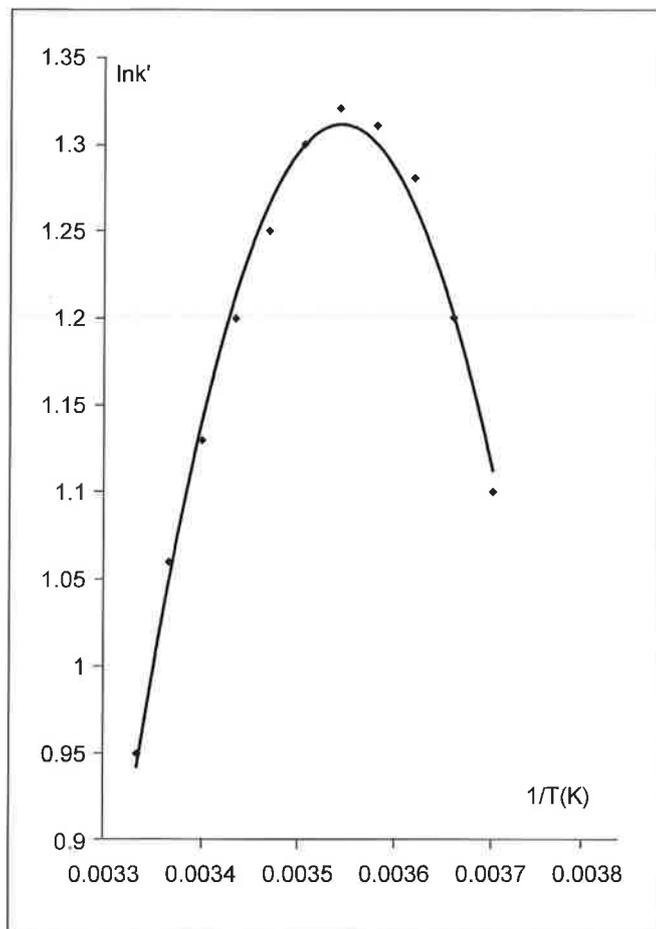


Figure 4 - Courbe $\ln k' = f(1/T)$ pour la phénylalanine dansylée à pH = 7,5.

le transfert des composés hydrophobes. L'enthalpie résiduelle est due aux fortes interactions de van der Waals qui existent entre les résidus hydrophobes à l'intérieur de la protéine [20]. L'entropie résiduelle représente une augmentation de l'ordre dans la structure repliée de la protéine par rapport à celui qui subsiste dans une phase liquide apolaire. Lors de la dénaturation protéique, le changement d'entropie est de $18 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ à 112 °C , ce qui est du même ordre de grandeur que celui retrouvé lors de la dissociation de la dicétopipérazine ($16 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) et complètement différent de celui ayant lieu lors de la dissolution d'hydrocarbure liquide ($-0,5 \text{ J.mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) [21]. Cependant, il a été montré par différentes études de mutagenèse que la structure tridimensionnelle conserve une certaine flexibilité lui permettant de s'accommoder aux substitutions d'acides aminés à l'intérieur de la protéine. On estime que les protéines possèdent donc une structure ordonnée mais douée de déformabilité, intermédiaire entre un état solide strict et un état liquide [21]. On pourra donc considérer que la transition vitreuse de la SAH visualisée sur les thermogrammes aux pH 7 et 7,5 est responsable d'une transformation de la structure de la cavité d'un état désordonné ($T < T_{\text{SAH}}^*$) à un état ordonné ($T > T_{\text{SAH}}^*$).

Dans l'état désordonné, aux faibles températures étudiées, les interactions de Lifschitz-van der Waals entre les résidus de l'intérieur de la cavité diminuent. La restriction des contraintes stériques qui en découle modifie la surface de la cavité qui se trouve avec une sinuosité minimale et une tension maximale. Les molécules d'eau du milieu, orientées

(phase mobile) autour du soluté, déterminent un environnement ordonné par rapport à l'organisation déstructurée de la cavité. Le transfert du soluté du milieu à la cavité s'accompagne donc d'une variation d'entropie positive. Les interactions de Lifschitz-van der Waals et liaison hydrogène entre l'acide aminé dansylé et les résidus de la cavité sont moins intenses entraînant une variation enthalpique positive. Dans ce cas, le mécanisme de fixation des aad au site II de la SAH est dit gouverné entropiquement. A pH = 7,0 par exemple à 0 °C , la variation d'enthalpie de transfert de la phénylalanine dansylée du milieu aqueux à la cavité de liaison est de l'ordre de $8,9 \text{ kJ/mole}$ [9].

Le transfert du soluté du milieu à la cavité de liaison s'apparente donc au transfert d'hydrocarbure, de l'eau à une phase liquide apolaire, qui présente les mêmes variations des paramètres thermodynamiques (ΔH° et $\Delta S^\circ > 0$ aux faibles températures).

Dans l'état ordonné, aux températures élevées de l'étude ($T > T_{\text{SAH}}^*$), les variations de Lifschitz-van der Waals entre les résidus à l'intérieur de la cavité sont fortes, déterminant une stabilisation hydrophobe de la cavité. La surface de la cavité se trouve alors avec une sinuosité maximale et une tension minimale. Cet état implique une forte contrainte des molécules d'eau autour de la cavité de liaison. Il a été démontré en effet, par modélisation moléculaire, que les molécules d'eau au contact de petites cavités sphériques maintiennent toutes leurs liaisons hydrogène [22] tandis que celles qui se trouvent au voisinage d'une interface plane sacrifient une liaison hydrogène [23]. Le transfert du soluté hydrophobe de l'environnement aqueux moins ordonné à la structure ordonnée de la cavité, s'accompagne d'une augmentation d'ordre objectivée par une variation d'entropie négative. Les fortes interactions de Lifschitz-van der Waals et liaison hydrogène entre le soluté et les résidus compacts de la cavité sont responsables d'une variation d'enthalpie négative rendant l'association site II de la SAH-molécule invitée plus stable que précédemment. Dans ce cas, le mécanisme de fixation des aad au site II de la SAH est dit gouverné enthalpiquement. A pH = 7,0 par exemple à 24 °C , la variation d'enthalpie de transfert de la phénylalanine dansylée du milieu aqueux à la cavité de liaison est de l'ordre $-11,2 \text{ kJ/mol}$ [9].

Le transfert des aad du milieu aqueux à la cavité de liaison s'apparente donc au transfert des résidus hydrophobes protéiques de la phase aqueuse vers l'intérieur de la protéine lors du processus de repliement de celle-ci (mêmes variations des termes enthalpiques et entropiques).

Aux autres valeurs de pH, les mesures des facteurs de rétention des aad en fonction de l'inverse de la température sont linéaires et les mesures d'analyse enthalpique différentielle (AED) sur la SAH ne montrent pas de transition. Ces résultats démontrent que pour ces valeurs de pH, la cavité de liaison présente un état structural ordonné sur tout le domaine de température. Les valeurs d'enthalpie et d'entropie de transfert du soluté du milieu à la cavité de liaison sont donc constantes et négatives. On se retrouve dans le même cas qu'aux pH = 7,0 et 7,5 à $T > T_{\text{SAH}}^*$ [9].

Le changement du mécanisme de complexation des aad avec la cavité aux pH 7,0 et 7,5 peut également s'expliquer en évoquant la transition de la SAH entre la forme neutre et

la forme basique. Une telle transition s'observant aux alentours des pH physiologiques est caractérisée par un changement conformationnel graduel et réversible de la protéine [24] qui affecte les propriétés de fixation de la sérum albumine humaine [25]. Ce changement conformationnel graduel et réversible est attribué à une légère déstructuration hélicoïdale [26] rendant la protéine plus sensible aux variations thermiques aux pH = 7 et 7,5. Il est également important de noter que les mesures des facteurs sélectivité (image de la séparation des énantiomères D et L, voir *encadré*) en fonction de l'inverse de la température présentent une variation linéaire à toutes les valeurs de pH. Ce comportement linéaire correspond à des interactions énantiosélectives constantes sur tout le domaine de température. Ce résultat suggère que la transition observée aux faibles températures aux pH physiologiques affecte peu les propriétés énantiosélectives de la SAH.

Édifices moléculaires avec la β -cyclodextrine en tant que molécule hôte

Généralités et structure des cyclodextrines

Depuis 20 ans environ, le nombre de publications consacrées aux cyclodextrines augmente considérablement, démontrant l'intérêt suscité par ces molécules chez les scientifiques du monde entier. De même, l'abondance des brevets déposés relatifs à la production et aux applications industrielles des cyclodextrines témoigne de l'avenir de ces « supermolécules ». Les cyclodextrines sont connues depuis plus d'un siècle puisqu'elles furent isolées en 1891 par Villiers [27, 28] à partir de produits de dégradation de l'amidon. Ce n'est qu'en 1979 que Saenge [29] prouve la structure macrocyclique de la molécule et décrit la structure conique tronquée. Dès lors, l'intérêt des cyclodextrines n'a cessé de croître. La plupart des travaux sont liés à l'étude des interactions et de la formation de composés d'inclusion entre les cyclodextrines et différentes molécules. La période actuelle est caractérisée par une seconde génération de cyclodex-

trines, les cyclodextrines modifiées [30]. Les dérivés alkylés, hydroxyalkylés, ramifiés ou ionisés ouvrent de nouveaux horizons en raison de leur plus grande solubilité. Les cyclodextrines sont des oligosaccharides de structure cyclique, composées d'unités glucose en conformation chaise, liées entre elles par des liaisons α -1,4 (figure 5) et présentant une forme conique tronquée creuse. Les fonctions hydroxyles portées sur les atomes de carbone secondaires C_2 et C_3 des unités glucose sont situées sur le côté le plus large du tore alors que les fonctions hydroxyles, portées par les atomes de carbone primaires C_6 des unités glucose, se trouvent du côté le plus étroit. Tournant sur eux-mêmes, les hydroxyles « primaires » bloquent partiellement la cavité de la cyclodextrine alors que les hydroxyles « secondaires » sont relativement rigides. Les cyclodextrines des 3-cyclodextrines α , β , γ comportent respectivement 6, 7 et 8 unités de glucose. Il ressort de leur structure que l'intérieur de la cavité a un caractère hydrophobe marqué et que l'extérieur a plutôt un caractère hydrophile. La figure 6 représente les zones d'hydrophilie et d'hydrophobie des molécules d' α - de β - de γ - et de δ -cyclodextrine et indique que le côté le plus large de ces molécules,

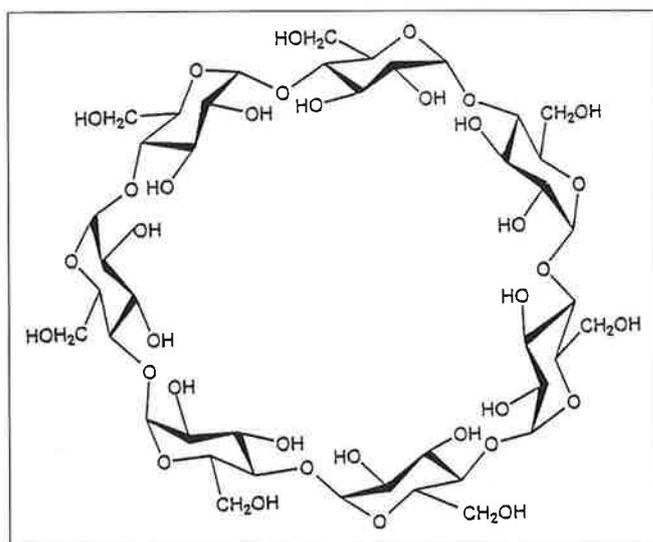


Figure 5 - Structure de la β -cyclodextrine comportant 7 unités de glucose.

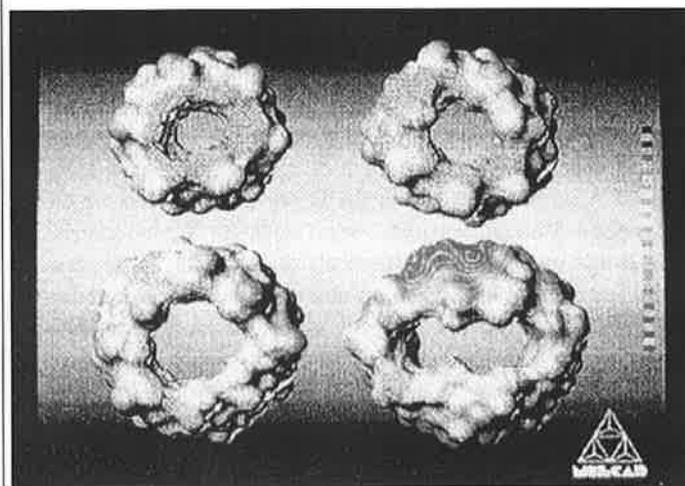
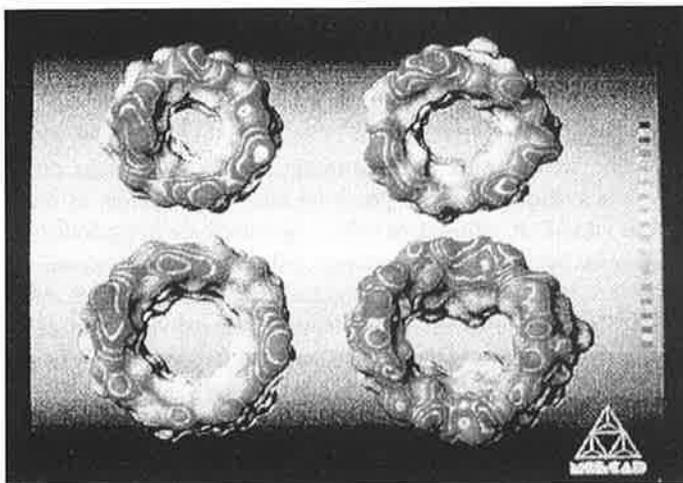


Figure 6 - Zone d'hydrophobie et d'hydrophilie de l' α -, la β -, la γ - et la δ -cyclodextrine. Profils de l' α -(haut gauche), de la β -(haut-droit), de la γ -(bas-gauche) et de la δ -cyclodextrine (bas-droit).

Conformations à l'état solide. Les vues de gauche sont prises du côté le plus large des cyclodextrines, alors que les vues de droite sont prises du côté le plus étroit.

portant les groupes hydroxyles « secondaires », est très hydrophile alors que le côté le plus étroit, portant les groupes hydroxyles « primaires » est considérablement moins hydrophile [31]. L' α -, la β - et la γ -cyclodextrine renferment dans leurs cavités un certain nombre de molécules d'eau dites de « haute énergie » donc très instables [32].

Une des propriétés les plus intéressantes des cyclodextrines est leur aptitude à former des composés d'inclusion avec une grande variété de molécules qui semblent ne devoir satisfaire qu'à 2 conditions : être relativement apolaire et s'adapter entièrement, ou au moins partiellement, à la cavité des cyclodextrines. Ce phénomène de complexation prend en compte la libération des molécules d'eau qui se trouvent dans un état énergétique instable à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine. Par conséquent, lors du processus d'inclusion du soluté à l'intérieur de la cavité certaines molécules d'eau intracavitaires sont chassées. Ces molécules d'eau rejoignent ainsi le solvant utilisé lors de la synthèse du complexe, pour lequel elles ont plus d'affinité. La couche d'hydratation entourant le soluté à inclure est détruite. Il est alors thermodynamiquement plus favorable pour cette molécule invitée relativement apolaire de réagir sur les fonctions hydroxyles situées sur le bord de la cavité de la cyclodextrine ou de s'associer à la cavité apolaire de la cyclodextrine. Enfin, la couche d'hydratation est reconstituée autour des fonctions libres de la molécule invitée, ou fonctions non incluses dans la cavité de la cyclodextrine. La libération de l'énergie de tension conformationnelle de l'anneau de la cyclodextrine, après complexation, constitue également une force favorable au processus d'inclusion.

Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus concernant l'étude du mécanisme de complexation d'une série de molécules à activité antifongique avec la β -cyclodextrine.

Étude de l'association β -CD-molécules antifongiques

L'effet du pH sur le mécanisme de fixation d'une série de molécules à activité antifongique (figure 7) avec la β -CD a été analysé par CLHP (voir encadré). La phase mobile est comme précédemment un mélange hydroorganique. Les mesures des facteurs de rétention (image de la fixation de la molécule d'antifongique avec la cyclodextrine) en fonction de l'inverse de la température pour différentes valeurs de pH (6,0 - 6,5 - 7,0 - 7,5 - 8,0 - 8,5) ont révélé aux pH 6,0 - 6,5 - 8,0 et 8,5 un changement distinct de pente à une température critique T_{CD}^* comprise entre 35 °C et 45 °C, en fonction de l'énantiomère étudié [11] (figure 8). Des études par la technique d'AED réalisées sur la β -CD ont quant à elles révélé l'existence d'un pic exothermique vers 40 °C, caractéristique d'une modification structurale de la β -CD. Cette transition de phase de la β -CD d'un état ordonné à un état désordonné a été expliquée en introduisant un paramètre physique intrinsèque à la β -CD, appelé champ de la CD, qui est lié aux molécules d'eau de hautes énergies renfermées dans sa cavité [33, 34]. La transition de phase observée caractérisée par une brisure de symétrie est décrite par ce paramètre d'ordre E_{CD} . Ce champ peut être approximativement décrit par un potentiel V (potentiel effectif) qui dépend de la température. A une température suffisamment faible [35], le potentiel a un seul minimum, $\Phi = 0$ qui respecte la symétrie.

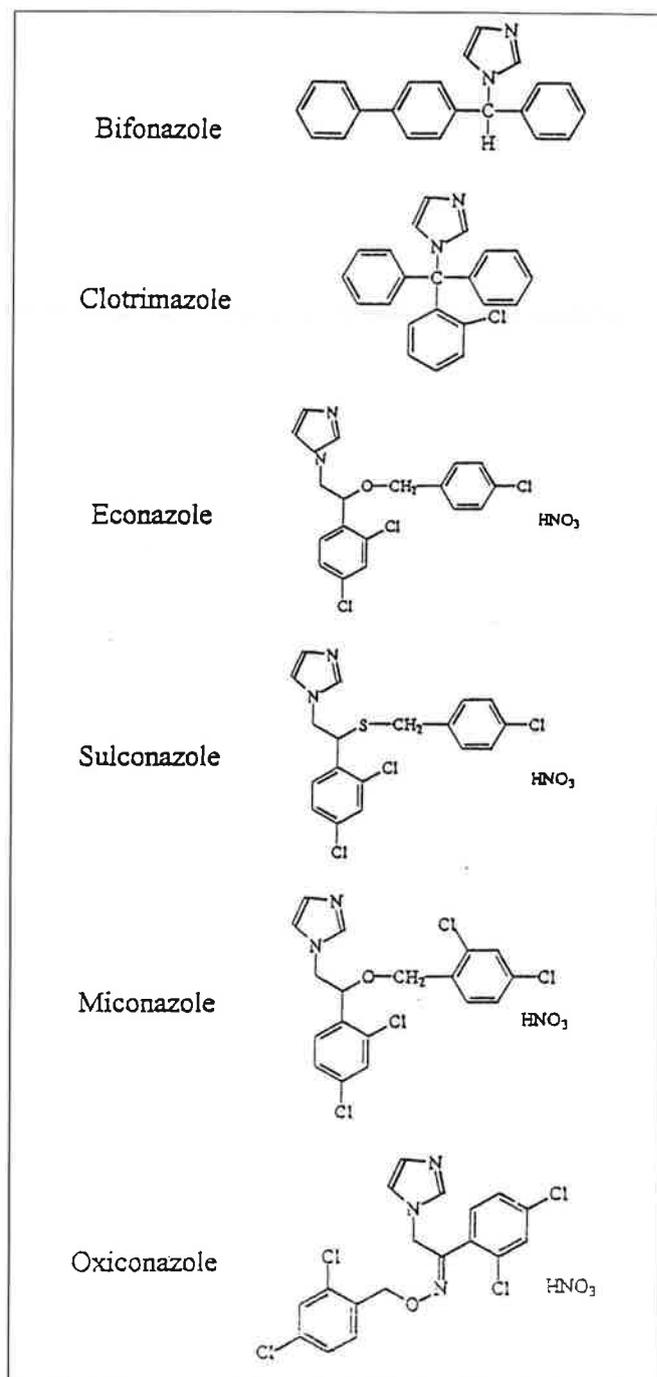


Figure 7 - Structure des molécules antifongiques.

A une température suffisamment élevée, au-dessus de la valeur critique T_{CD}^* , le potentiel change de forme, et toute une variété de minimums [35], « la variété de la cyclodextrine », se développe ou Φ est non nul. Un minimum donné de cette variété n'est plus invariant sous la symétrie de la théorie, donc celle-ci est brisée spontanément. Pendant cette transition de phase, due à cette rupture de symétrie, « la variété de la CD » admet des boucles fermées qui, à l'intérieur de cette variété, ne se laissent pas contracter en un point, et un défaut topologique apparaît assimilable à une corde énergétique, qui induit une déformation de la cavité de la cyclodextrine. La formation de cordes énergétiques est analogue à la création d'un vortex au sein de l'hélium liquide lors de sa rapide transition à l'état superliquide [36, 37].

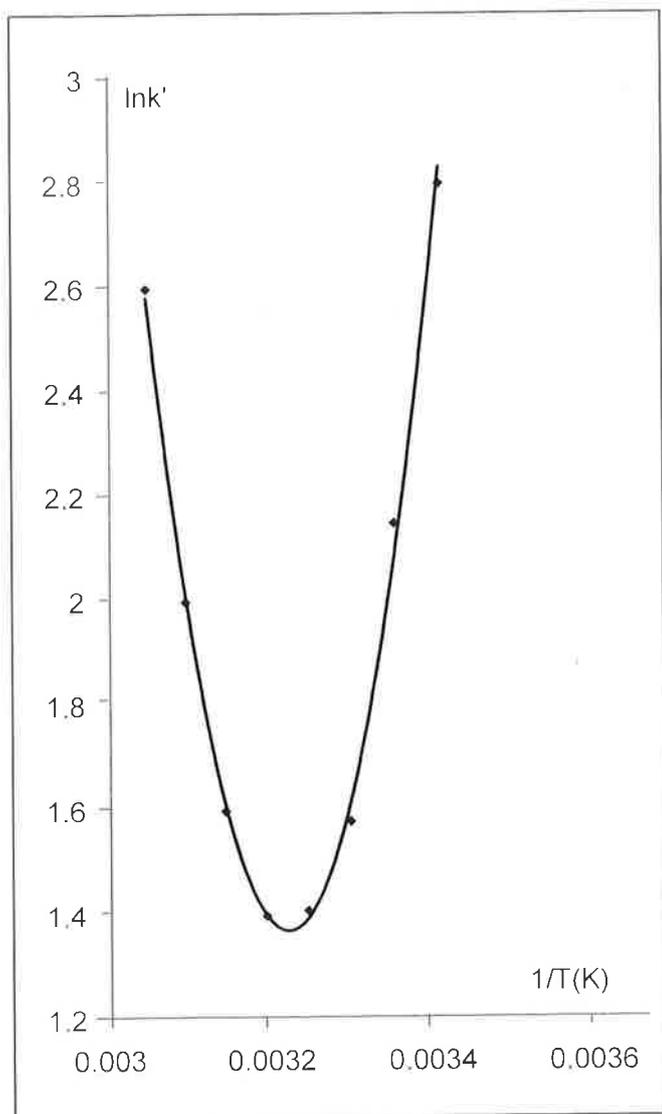


Figure 8 - Courbe $\ln k' = f(1/T)$ pour le bifonazole à pH = 6,5.

Dans l'état ordonné de la β -CD ($T < T^*_{CD}$), la sinuosité de la cavité est faible alors que sa tension de surface est élevée [11]. Ces 2 paramètres caractérisent l'organisation des groupements hydroxyles situés sur les bords extérieurs de la cavité de la cyclodextrine, ainsi que le nombre de liaisons hydrogène créées entre eux. Dans ce cas, le degré de liberté des groupes hydroxyles diminue à cause de l'augmentation du nombre de liaisons hydrogène entre eux. De plus, cette augmentation du nombre de liaisons hydrogène entre les groupes hydroxyles, réduit la possibilité, pour les molécules d'eau de haute énergie, d'interagir avec les groupements hydroxyles. Ceci engendre une augmentation du nombre de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau intracavitaires elles-mêmes. Leurs contraintes sont donc plus fortes que celles des molécules d'eau du milieu, ce qui provoque leur libération rapide à l'extérieur de la cavité. Lors du transfert du soluté du milieu (phase mobile) vers la cavité de la cyclodextrine, les interactions soluté-solvant, de faible amplitude, sont remplacées par des interactions spécifiques soluté-cyclodextrine plus fortes (interaction de Lifschitz-van der Waals, liaison hydrogène entre le soluté et la cavité) conduisant à des variations d'enthalpie et d'entropie de transfert

négatives. Le mécanisme de complexation de la molécule d'antifongiques est donc gouverné enthalpiquement. A pH = 8,5 par exemple à 25 °C, la variation d'enthalpie de transfert de la molécule de bifonazole du milieu à la cavité de la β -cyclodextrine est de 40,2 kJ/mol [11].

Lors du passage à l'état désordonné ($T > T^*_{CD}$), la création de cordes énergétiques [33] entraînent une déformation de la cavité de la β -CD et une diminution des contraintes des molécules d'eau de haute énergie. Ainsi, ces molécules d'eau seront moins facilement libérées de l'intérieur de la β -CD. On observera donc une diminution des interactions de van der Waals entre la molécule de soluté et la β -cyclodextrine et une augmentation des interactions hydrophobes entre le soluté et le milieu de synthèse du complexe objectivé par des variations positives d'enthalpie et d'entropie. Dans ce domaine de température, le mécanisme de complexation est donc conduit entropiquement. A pH = 8,5 par exemple à 55 °C, la variation d'enthalpie de transfert du bifonazole du milieu à la cavité de la β -cyclodextrine est de 17,1 kJ/mol [11].

Aux pH 7,0 et 7,5, les mesures des facteurs de rétention des molécules antifongiques en fonction de l'inverse de la température sont linéaires et les mesures d'AED sur la β -CD ne montrent aucune transition. On peut donc en conclure que la molécule de cyclodextrine est toujours dans un état ordonné et que le mécanisme de complexation est gouverné enthalpiquement. On se retrouve dans le même cas qu'aux pH 6,0-6,5-8,0 et 8,5 à $T < T^*_{CD}$. Les conditions optimales de complexation des molécules antifongiques au sein de la β -cyclodextrine correspondent à un état ordonné de la cavité de la β -CD et à des valeurs négatives des enthalpies et entropies de complexation. La température doit être si possible inférieure à T^*_{CD} pour des valeurs de pH, voisines des pH physiologiques. D'une manière analogue à la molécule de sérum albumine humaine, il a été montré que cette transition affecte peu les propriétés énantiométriques de la β -CD. L'inclusion de ces molécules antifongiques, relativement hydrophobes, à l'intérieur de la cavité de la β -CD doit améliorer leur pénétration à travers les phanères et notamment l'ongle humain. L'activité de ces molécules antifongiques contre les mycoses unguéales sera ainsi grandement améliorée. Les cinétiques de pénétration, du bifonazole non complexé et du complexe β -CD-bifonazole à travers un substrat corné ont été étudiées [38]. La concentration C de bifonazole qui ne pénètre pas à travers le substrat, suit, avec le nombre de jours de contact, entre la molécule de bifonazole non complexé et le substrat, ou, entre le complexe et ce même substrat, une loi exponentielle de la forme $C = A \exp(-kD)$. A est le facteur préexponentiel et $k = \ln 2 / D_{1/2}$ où $D_{1/2}$ est le temps de 1/2 vie correspondant au nombre de jours qu'il faut pour que la concentration de bifonazole qui ne pénètre pas soit réduite de moitié. Les valeurs de A et de $D_{1/2}$ déterminées pour la forme libre du bifonazole et sa forme complexée sont rassemblées ci-dessous [38].

Bifonazole sous la forme	A	$D_{1/2}$ (jours)
libre	0,82	12,7
complexé avec la β -CD	0,42	4,0

La forte diminution de A et de $D_{1/2}$ obtenue pour la forme complexée démontre bien que le complexe améliore la pénétration du bifonazole à travers le substrat corné.

Conclusion

Il apparaît clairement dans le cadre de ces travaux conduits par notre groupe, que les méthodes d'analyses séparatives comme la CLHP peuvent être utilisées avec succès pour l'examen de processus associatifs hôte-invité. Les analystes négligent trop souvent cette possibilité d'étude. Par ailleurs, nous avons mis en exergue des analogies entre les molécules hôtes SAH et β -CD. Nous avons montré que l'organisation structurale de la cavité de fixation (ordonnée ou désordonnée) dépend du pH et que c'est un élément essentiel du mécanisme d'association. La cavité de liaison subit une transition de phase au pH physiologique 7,0 et 7,5 pour la SAH et a des valeurs de pH égales à 6,0-6,5 et 8,0 et 8,5 pour la β -CD. Cette cavité se trouve dans un état ordonné pour une température $> \sim 4$ °C pour la SAH et $< \sim 40$ °C pour la β -CD. Dans toutes les autres conditions de pH, la cavité de fixation ne subit aucune transition de phase et est toujours dans un état ordonné. Dans ces différents cas, le mécanisme d'association est gouverné d'une manière enthalpique. A contrario, lorsque la transition de phase apparaît, la cavité de fixation se trouve dans un état désordonné pour une température $< \sim 4$ °C pour la SAH et $> \sim 40$ °C pour la β -CD. Le mécanisme de complexation est gouverné dans ces cas entropiquement et conduit à la formation d'un complexe plus instable. Il est important de noter ici que, d'une part, cette transition affecte peu les propriétés d'énantiosélectivité de ces 2 sélecteurs chiraux et, d'autre part, d'une manière physiologique, à la température du corps humain ~ 35 °C, la SAH, molécule transporteuse de médicaments est toujours dans le compartiment sanguin (pH physiologique) dans un état ordonné. Elle est donc, de façon naturelle, dans un état favorisant la fixation du médicament et permet donc son transport optimal jusqu'à l'organe cible. En ce qui concerne la β -CD au pH physiologique et à $T \sim 35$ °C, celle-ci est toujours dans un état ordonné, ce qui est en adéquation avec son utilisation éventuelle en tant que véhicule de molécules à activité thérapeutique au niveau du compartiment sanguin. Au niveau biomédical, la molécule de β -CD est également de plus en plus utilisée ainsi que ses dérivés pour améliorer la pénétration de molécules faiblement polaires (comme les molécules antifongiques imidazolés) à travers les phanères. On attend une forte expansion de ce débouché dans le futur. Dans ce domaine, les techniques d'affinités sont appelées à se développer pour mieux appréhender les capacités de complexation de médicaments au sein de nouveaux systèmes colloïdaux vésiculaires disper-

sibles à base de CD sous forme de nanosphères [39], afin de développer les possibilités de vectorisation.

Référence

- [1] Hosseini M.W., *La recherche*, **1989**, 20 (206), p. 25.
- [2] Lenh J.M., *La recherche*, **1981**, 12 (127), p. 1213.
- [3] Tanford C., *The hydrophobic effect*, Wiley., New York., **1973**.
- [4] Isarelachvili J.N., *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, Londres, **1985**.
- [5] Tanford C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, États-Unis, **1979**, 76, p. 4175.
- [6] Hermann R.B., *J. Phys. Chem.*, **1971**, 71, p. 3401.
- [7] Gill S.J., Wadso I., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, États-Unis, **1976**, 73, p. 2955.
- [8] Van Oss C.J., *Cell. Biophys.*, **1989**, 14, p. 1.
- [9] Peyrin E., Guillaume Y.C., Guinchard C., *Anal. Chem.*, **1997**, 69, p. 4979.
- [10] Choi D.S., Jhon M.S., Eyring H., *J. Chem. Phys.*, **1970**, 53, p. 2608.
- [11] Morin N., Guillaume Y.C., Peyrin E., Rouland J.C., *Anal. Chem.*, **1998**, 70, p. 2819.
- [12] He X.M., Carter D.C., *Nature*, **1992**, 209, p. 358.
- [13] Percheron F., Perles R., Foglietti M.J., *Abrégé de Biochimie Générale*, Tome 1, 2^e édition, Masson, Paris, **1985**.
- [14] Feske K.J., Muller W.E., Wollert V., *Biochem. Pharmacol.*, **1981**, 30, p. 687.
- [15] Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N., *Mol. Pharmacol.*, **1975**, 11, p. 824.
- [16] Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N., *Mol. Pharmacol.*, **1976**, 12, p. 1052.
- [17] Hazrpaz Y., Gerstein M., Chotia C., *Structure*, **1994**, 2, p. 641.
- [18] Baldium R.L. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, États-Unis, **1986**, 83, p. 8069.
- [19] Otzen D.E., Rheinacker M., Fersht A.R., *Biochemistry*, **1995**, 34, p. 13051.
- [20] Murphy K.P., Privalov P.L., Gill S.J., *Science*, **1990**, 247, p. 559.
- [21] Ericsson A.E., Baase W.A., Zhang X.J., Heinz D.W., Blaber M., Baldwin E.P., Matthews B.W., *Science*, **1992**, 178, p. 255.
- [22] Postma J.P., Berendsen H.J., Haak J.R., *Faraday. Symp. Chem. Soc.*, **1982**, 17, p. 55.
- [23] Lee C.Y., Mc Cammon J.A., Rosicky P.J., *J. Chem. Phys.*, **1984**, 80, p. 4448.
- [24] Hart B.J., Wilting J., de Gier J., *Biochim. Pharmacol.*, **1986**, 35, p. 1005.
- [25] Wilting J., Hart B.J., De Gier J.J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1980**, 626, p. 291.
- [26] Peters J.J., *Adv. Protein. Chem.*, **1985**, 37, p. 161.
- [27] Lindner K., Saenger W., *Carbohydr. Res.*, **1982**, 99, p. 103.
- [28] Pande G.S., Shangraw R.F., *Int. J. Pharm.*, **1995**, 124, p. 231.
- [29] Saenger W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1980**, 19, p. 344.
- [30] Szejtli J., *Supramol. Chem.*, **1995**, 6, p. 217.
- [31] Lichtenthaler F.W., Immel S., *Int. Sugar. Jnl.*, **1995**, 97, p. 12.
- [32] Lindner K., Saenger W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, 17, p. 694.
- [33] Guillaume Y.C., Peyrin E., *Anal. Chem.*, **1999**, 71, p. 2046.
- [34] Steiner T. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, 34, p. 1452.
- [35] Hill C.T., Schramm D.N., Fry J.N., *Commun. Nucl., Particle Phys.*, **1989**, 19, p. 25.
- [36] Ruutu W.M.H. *et al.*, *Nature*, **1996**, 382, p. 334.
- [37] Bauerle C. *et al.*, *Nature*, **1996**, 382, p. 332.
- [38] Guillaume Y.C., Peyrin E., Millet J., *J. Chromatogr. B.*, **1999**, 728 (2), p. 167.
- [39] Skiba M., Puisieux F., Duchene D., Wouessidjeive W., *Int. J. Pharm.*, **1996**, 129, p. 113.