



HAL
open science

Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés

Mohamed Haroun

► **To cite this version:**

Mohamed Haroun. Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés. Autre. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00156850

HAL Id: tel-00156850

<https://theses.hal.science/tel-00156850>

Submitted on 22 Jun 2007

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

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

Thèse

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1

Ecole doctorale : Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement (EDISCE)

Spécialité : Ingénierie pour la santé et le médicament (Contrôle de molécules d'intérêt biologique et médicamenteuse)

Présentée et soutenue publiquement par

Mohamed Haroun

le 23 mai 2007

Titre

Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés

Directeur de thèse : Pr. Eric Peyrin

Composition du Jury

Dr. Alain Berthod
Pr. Claude Vaccher
Pr. Patrice Prognon
Pr. Jean-Luc Décout
Dr. Corinne Ravelet

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Remerciements

C'est avec une certaine émotion et beaucoup de sincérité que je voudrais remercier toutes les personnes ayant soutenu mon travail.

En premier lieu, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à monsieur le professeur Eric Peyrin pour avoir dirigé mon travail depuis le D.E.A et pendant mes années de thèse. C'est l'homme qui a su me faire partager son goût et son enthousiasme pour la recherche. Avec lui j'ai appris que la chromatographie est une grande école de patience. Je le remercie chaleureusement pour son encadrement, son œil critique dans la correction de mon rapport et pour son soutien constant tout au long de ma thèse.

Mes remerciements vont conjointement à mon co-directeur de thèse Dr. Corinne Ravelet pour sa gentillesse et pour l'aide qu'elle m'a apportée au cours de ce travail. Son intérêt, sa disponibilité, son suivi quotidien de mes travaux et ses précieux conseils m'ont été d'un grand profit. Je la remercie infiniment.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury qui ont bien voulu consacrer à ma thèse une partie de leur temps. Je cite en particulier monsieur le docteur Alain Berthod et monsieur le professeur Claude Vaccher qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également monsieur le professeur Patrice Prognon pour avoir accepté d'examiner mon rapport et monsieur le professeur Jean-Luc Décout pour m'avoir accueilli au sein de son département tout au long de mes études en France, pour sa collaboration et pour avoir accepté de juger mon travail en faisant partie de mon jury de thèse.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent également, à toutes les personnes du laboratoire de chimie analytique avec qui j'ai partagé un café, un repas, une discussion ou une console d'ordinateur pendant mes années de thèse : Mme Anne Ravel, Mme Annick Villet, Mme Catherine Grosset, Mme Danièle Esnault, Mr Patrick Bascou, Mme Angèle Nicole, Mlle Jennifer Fize, Mlle Joséphine Ruta et Mr Mustapha Zaher. Je les remercie tous d'avoir assuré une ambiance particulièrement favorable pour mener à bien mon travail.

Je dédie ce travail à mes parents, sans qui je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui, à mon frère, à mes sœurs, à mes beaux-parents et à mes amis pour leur soutien.

Il m'est bien évidemment impossible de ne pas citer la femme qui a été la plus grande chance de ma vie : mon épouse Ruba pour avoir accepté tant de sacrifices durant ces dernières années. Elle a su me donner tout ce qu'il faut pour réussir. Merci de tout mon cœur pour son amour et son appui moral. Je n'oublie pas mon petit ange Ghâis-allah qui n'a pas cessé de me

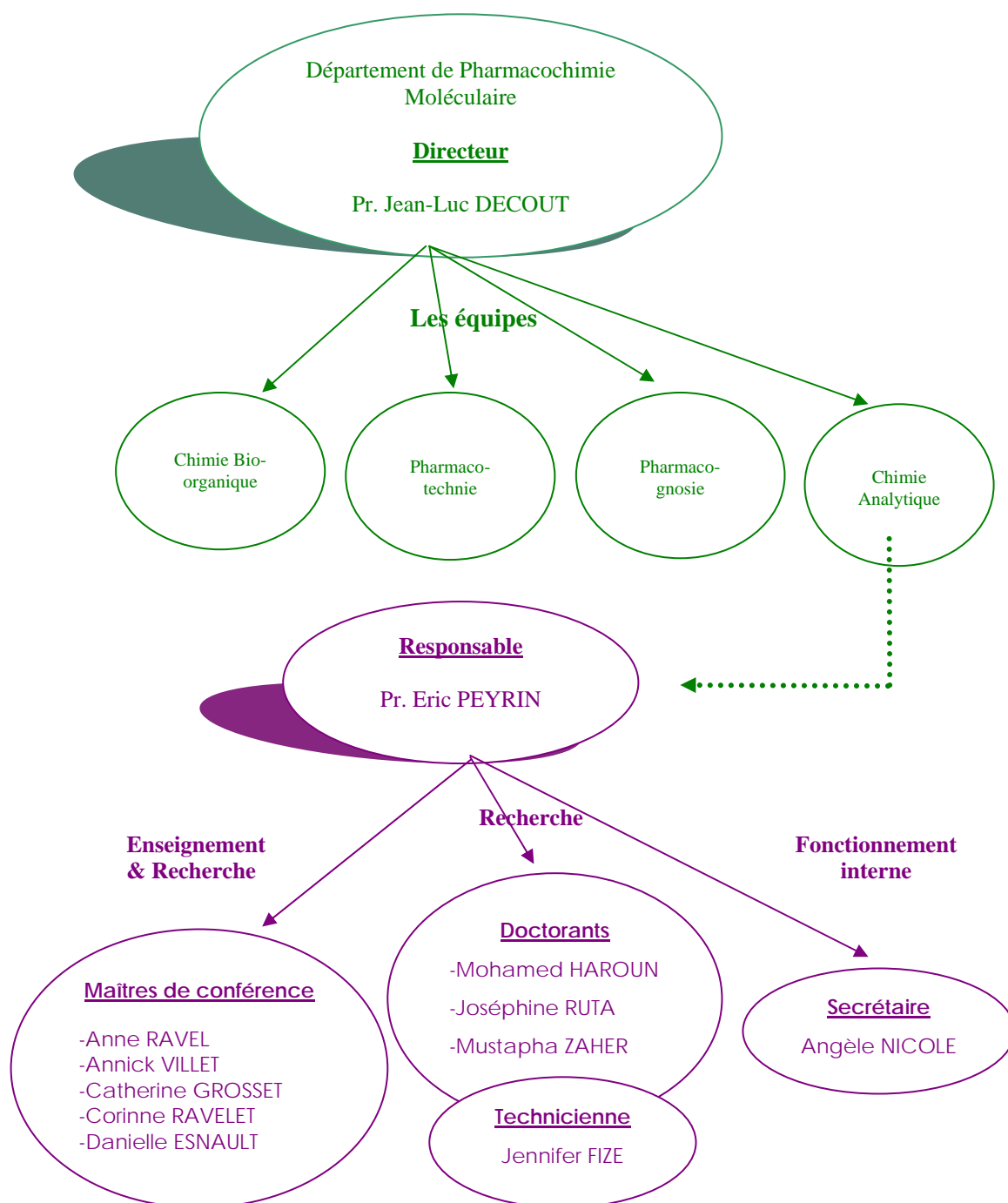
demander : «ça sera quand ta soutenance papa ?». Je suis sûr qu'il gardera de très bons souvenirs de ses années agréables passées en France.

La réalisation de cette thèse a été possible grâce à une bourse du gouvernement Syrien. Je remercie les gens qui m'ont facilité cette tâche.

Je remercie enfin toutes les personnes intéressées par mon travail, en espérant qu'elles puissent trouver dans mon rapport des explications utiles pour leurs propres travaux.

Avant propos

Cette thèse est effectuée au sein du laboratoire de chimie analytique qui fait partie du département de pharmacochimie moléculaire (DPM) UMR 5063 CNRS, institut de chimie moléculaire de Grenoble (ICMG) FR 2607, UFR de pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier (UJF). La composition du DPM et de l'équipe de chimie analytique est présentée dans l'organigramme suivant :



Le laboratoire se trouvait géographiquement à l'UFR de pharmacie à La Tronche, avant qu'il ne déménage en 2002 sur le site de Meylan, puis en mars 2007 dans de nouveaux locaux sur le campus, à Saint Martin d'Hères, afin d'établir un rapprochement entre les équipes de recherche composant l'ICMG.

L'équipe de chimie analytique travaille sur la discrimination chirale et la séparation d'énantiomères de molécules bioactives (acides aminés, médicaments, etc.) par des méthodes chromatographiques et électrophorétiques. Les travaux de l'équipe s'orientent sur la mise au point de nouveaux outils de séparation chirale. Deux stratégies sont développées. La première est liée au développement de nouvelles méthodologies de séparation (dimérisation des glycopeptides, immobilisation de la teicoplanine). L'autre approche est focalisée sur la recherche de nouvelles classes de sélecteurs chiraux conventionnels ou spécifiques d'un énantiomère cible pré-désigné (aptamères en série ADN et ARN). Ces travaux se sont soldés par 23 publications internationales depuis 2002, 4 chapitres d'ouvrage et 2 brevets.

Le laboratoire reçoit deux sortes de subvention différentes : Une partie vient de l'enseignement. L'autre partie du budget vient de la recherche (le ministère, le CNRS participe également au budget ainsi des contrats tels que ceux provenant d'une ACI "nouvelles méthodologies analytiques et capteurs"). Le laboratoire de chimie analytique a des collaborations avec l'équipe de chimie bio-organique au DPM et l'équipe de biochimie de l'évolution, institut J. Monod - Université Paris VI.

Mes travaux de thèse ont commencé en novembre 2003 sous la direction du Pr. Eric Peyrin et de Corinne Ravelet. Ces travaux ont donné lieu à 2 publications internationales (**cf. Annexe**), une troisième publication est prévue prochainement. Ma thèse a été financée par une bourse de gouvernement Syrien.

Abréviations

DPM : Département de pharmacochimie moléculaire.
I : lévogyre.
d : dextrogyre.
R : Rectus.
S : Sinister.
CLHP : Chromatographie liquide de haute performance.
ECC : Electrochromatographie capillaire.
CCM : Chromatographie sur couche mince.
CPS : Chromatographie en phase supercritique.
CPG : Chromatographie en phase gazeuse.
ECZ : Electrophorèse capillaire de zone.
CMEC : Chromatographie micellaire électrocinétique.
EC : Electrophorèse capillaire.
CEL : Chromatographie d'échange de ligands.
CCEL : Chromatographie chirale d'échange de ligands.
PSCs : Phases stationnaires chirales.
DMSO : Diméthyl sulfoxyde.
DMF : Diméthyl formamide.
UV : Ultra violet.
SELEX : Systematic evolution of ligand by exponential enrichment.
ARN : Acide ribonucléique.
ADN : Acide désoxyribonucléique.
T : Teicoplanine.
TAG : Teicoplanine aglycone.
TAGM : Teicoplanine aglycone méthylée.
RMN : Résonance magnétique nucléaire.
ACPM : Additif chiral de la phase mobile.
d.i : Diamètre interne.
HEPT : Hauteur équivalente à un plateau théorique.
Eq : Equation.
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise.

Table des matières

I- Introduction	11
II- Stéréochimie et chiralité	15
II-1 Rappel historique	16
II-2 Définitions et concepts	16
II-3 Propriétés physico-chimiques des énantiomères	19
III- Chiralité et incidences	21
III-1 La chiralité et la vie	22
III-2 Incidences de la chiralité dans le domaine thérapeutique	25
III-2-1 Introduction	25
III-2-2 Chiralité et médicaments	25
III-2-2-1 Médicaments ayant un centre de chiralité	25
III-2-2-2 Médicaments ayant plus d'un centre de chiralité	27
III-2-3 Chiralité et propriétés pharmacocinétiques	27
III-2-4 Chiralité et affaires réglementaires	28
III-2-5 Chiralité et intérêt économique	29
IV- Obtention d'énantiomères et discrimination chirale	31
IV-1 La synthèse asymétrique	32
IV-2 Les biotransformations	33
IV-3 La cristallisation	33
IV-4 Les membranes	34
IV-5 Les biocapteurs	35
IV-6 Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques.....	36
IV-6-1 Les sélecteurs chiraux conventionnels	41
IV-6-1-1 Les sélecteurs de type Pirkle et analogues	41
IV-6-1-1-1 Les sélecteurs de type Pirkle	41
IV-6-1-1-2 Les sélecteurs basés sur la formation de liaisons hydrogène ...	42
IV-6-1-2 Les homopolymères à cavités	42
IV-6-1-2-1 Les cyclodextrines.....	42

IV-6-1-2-2 Les éthers couronnes.....	44
IV-6-1-2-3 Les polymères synthétiques	45
IV-6-1-2-4 Les polysaccharides.....	45
IV-6-1-3 Les sélecteurs chiraux faisant intervenir l'échange de ligands.....	47
IV-6-1-4 Les protéines	47
IV-6-1-5 Les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques.....	48
IV-6-2 Les sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible pré-désigné....	49
IV-6-2-1 Les sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire.....	49
IV-6-2-2 Les anticorps énantiosélectifs.....	51
IV-6-2-3 L'approche combinatoire.....	52
IV-6-2-3-1 Les sélecteurs à faible masse moléculaire.....	52
IV-6-2-3-2 Les aptamères énantiosélectifs.....	55

V- La teicoplanine et ses dérivés en tant que sélecteurs chiraux **57**

V-1 Propriétés de la teicoplanine	58
V-1-1 Propriétés pharmacologiques	58
V-1-2 Propriétés physico-chimiques	58
V-1-3 Propriétés structurales et énantiosélectives	58
V-1-4 Propriétés morphologiques	60
V-2 Immobilisation de la teicoplanine	61
V-3 Mécanismes d'interaction teicoplanine - soluté (reconnaissance chirale)	63
V-4 La teicoplanine aglycone (TAG)	64
V-5 La teicoplanine aglycone méthylée TAGM	65
V-6 Les principales applications des PSCs de type teicoplanine et dérivés	66

VI- L'échange de ligands en séparation chirale **67**

VI-1 Principe	68
VI-2 Les sélecteurs chiraux utilisés sur le principe d'échange de ligands	68
VI-2-1 En chromatographie	69
VI-2-2 En électrophorèse capillaire	72

VII-1 Etude thermodynamique de la reconnaissance chirale du tryptophane sur des phases stationnaires de type teicoplanine et teicoplanine aglycone (TAG) 75

VII-1-1 Théorie	77
VII-1-1-1 Les isothermes d'adsorption du soluté	77
VII-1-1-2 Paramètres thermodynamiques	79
VII-1-1-3 Compensation enthalpie-entropie : Le modèle de Grunwald	80
VII-1-2 Matériel et méthodes	81
VII-1-2-1 Appareillage	81
VII-1-2-2 Réactifs	81
VII-1-2-3 Méthodes et conditions opératoires	82
VII-1-3 Résultats et discussion	83
VII-1-3-1 Rétention du D-, L-tryptophane par des PSCs de type teicoplanine et TAG	83
VII-1-3-2 Détermination des isothermes d'adsorption du D-et du L-tryptophane sur des PSCs de type teicoplanine et TAG	85
VII-1-3-3 Rétention et contributions énantiosélectives des sites à forte et à faible affinité pour des PSCs de type teicoplanine et TAG ...	88
VII-1-3-4 Analyse des propriétés de la reconnaissance chirale de la poche aglycone (site à forte affinité de fixation)	90
VII-1-3-4-1 Capacité de fixation du site à forte affinité	90
VII-1-3-4-2 Constates d'association entre le D-, L-tryptophane et le site à forte affinité	91
VII-1-3-4-3 Compensation enthalpie-entropie et analyse du mode stéréospécifique de fixation	93
VII-1-3-4-3-1 Signification de la compensation enthalpie- entropie	93
VII-1-3-4-3-2 L'analyse de la compensation enthalpie- entropie	95
VII-1-4 Conclusion	98

VII-2 Développement d'une PSC de type teicoplanine immobilisée d'une manière non covalente sur des supports chromatographiques de type C₈ et C₁₈ 99

VII-2-1 Matériel et méthodes	100
VII-2-1-1 Appareillage	100
VII-2-1-2 Réactifs	101
VII-2-1-3 Procédure d'immobilisation	101
VII-2-1-4 Conditions chromatographiques	102
VII-2-2 Résultats et discussion	103
VII-2-2-1 Propriétés chromatographiques des PSCs teicoplanine	103
VII-2-2-2 Stabilité dans le temps et régénération des supports modifiés par le sélecteur chiral de type teicoplanine	107
VII-2-3 Conclusion	109

VII-3 Dérivés de la néamine en chromatographie chirale d'échange de ligands (CCEL) .. 110

VII-3-1 Généralités sur les aminoglycosides	111
VII-3-1-1 Propriétés pharmacologiques et structurales	111
VII-3-1-2 Utilisation des aminoglycosides en séparation chirale	112
VII-3-1-3 Propriétés de complexation des cations métalliques par les aminoglycosides	113
VII-3-2 Matériel et méthodes	113
VII-3-2-1 Appareillage	113
VII-3-2-2 Réactifs	114
VII-3-2-3 Synthèse des deux dérivés lipophiles de la néamine	114
VII-3-2-4 Procédure d'immobilisation	116
VII-3-2-5 Conditions chromatographiques	117
VII-3-3 Résultats et discussion	117
VII-3-3-1 Les propriétés énantiosélectives des deux PSCs de type néamine	117
VII-3-3-2 Mécanisme de reconnaissance chirale proposé	121
VII-3-3-3 Durée de vie et régénération des supports immobilisés avec le sélecteur chiral de type néamine	123
VII-3-4 Conclusion	124

VII-3-5 Perspectives	124
<u>VIII- Conclusion</u>	126
<u>IX- Bibliographie</u>	128
<u>X- Annexe</u>	142

I- Introduction

La chiralité est une propriété géométrique qui caractérise le fait qu'un objet et son image dans un miroir ne sont pas identiques. Bien que découverte il y a près de deux siècles, la chiralité reste un sujet ouvert et passionnant, à l'interface de la chimie, de la physique et de la biologie. Elle soulève encore des interrogations fondamentales. Le rôle primordial des molécules chirales en thérapeutique a été révélé et mis en évidence suite aux événements dramatiques survenus dans les années 70, dus à l'utilisation de médicaments tels que le thalidomide. La commercialisation de médicaments sous forme racémique a été longtemps privilégiée par l'industrie pharmaceutique car elle permettait d'abaisser le coût de production, la séparation des énantiomères étant relativement onéreuse.

Actuellement, étant donné que deux énantiomères peuvent avoir des comportements totalement différents, la séparation chirale est devenue un sujet d'intérêt croissant dans de nombreux domaines tels que la pharmacie clinique, le contrôle qualité des médicaments et des aliments, l'environnement ou encore en biochimie. Par conséquent, les procédés industriels de fabrication de médicaments s'orientent aujourd'hui largement vers la commercialisation d'un principe actif énantiomériquement pur. Pour atteindre cet objectif, deux stratégies sont possibles : soit développer le médicament optiquement pur par des synthèses énantiosélectives, celles-ci restant difficiles à réaliser, soit résoudre le racémique en ses deux énantiomères par une méthode de discrimination chirale.

A l'heure actuelle, parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, la Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) représente une technique de choix pour la purification et la quantification d'énantiomères. En effet, outre le fait qu'elle allie à la fois rapidité, efficacité et sensibilité, elle permet également la séparation de composés chiraux sur des phases stationnaires chirales ou après addition de réactifs chiraux à la phase mobile (approche directe). Des séparations après dérivation en pré-colonne en diastéréoisomères sont également possibles en CLHP (approche indirecte). La séparation d'énantiomères par voie directe est devenue de plus en plus fréquente au cours des dernières années. Un grand nombre de sélecteurs chiraux ont été découverts et utilisés avec succès. Parmi ceux-ci, les phases stationnaires chirales (PSCs) à base d'antibiotiques macrocycliques sont maintenant largement utilisées.

Quelle que soit leur origine, les acides aminés sont parmi les premières molécules organiques indispensables à la vie à être apparues sur terre. Ils forment sans aucun doute l'une des plus importantes classes de molécules d'intérêt biologique en tant qu'espèces simples ou comme constituants des peptides et des protéines. La plupart d'entre eux sont chiraux. Bien que les acides aminés en série L soient prédominants, il est maintenant bien établi que de

faibles concentrations d'acides aminés en série D dans l'organisme peuvent jouer un rôle prépondérant en biochimie et en physio-pathologie humaine : par exemple, la sérine en série D fonctionne comme un neuromodulateur important, l'aspartate en série D est impliqué dans les fonctions endocriniennes et l'arginine en série D joue un rôle dans le cycle de l'urée [1]. En outre, en sciences médico-légales, la transformation non enzymatique de la forme L des acides aminés (l'acide aspartique en particulier) en forme D, après la mort de l'individu, constitue une méthode précise pour estimer l'âge au moment du décès [2]. Cette méthode peut être également appliquée en archéologie pour dater les fossiles. Une autre application concerne la détermination des excès énantiomériques d'acides aminés en série L dans les météorites. Certaines météorites carbonées, représentées typiquement par les météorites de Murchison et de Murray, renferment plusieurs acides aminés différents [31]. De plus, le rapport énantiomérique des acides aminés peut être employé comme un paramètre fiable dans le contrôle qualité d'un produit agroalimentaire afin de vérifier sa conformité et détecter d'éventuelles fraudes [3]. Afin d'analyser les acides aminés, il est nécessaire de développer des méthodologies analytiques efficaces pour séparer et quantifier leurs énantiomères et notamment les énantiomères en série D.

Dans ce manuscrit, nous présenterons tout d'abord un rappel bibliographique sur la notion de chiralité et ses incidences biologiques et thérapeutiques. Nous décrirons par la suite les caractéristiques des différents sélecteurs chiraux, ainsi que les principaux travaux précédemment effectués sur les PSCs de type teicoplanine et dérivés. Nous nous attacherons ensuite à étudier les aspects concernant l'échange de ligands et ses applications en séparation chirale.

Notre travail expérimental a pour but d'étudier la séparation chirale des acides aminés par CLHP en utilisant des PSCs à base d'antibiotiques glycopeptidiques ou d'aminoglycosides. Il portera, dans un premier temps, sur la mise en évidence du mécanisme de reconnaissance chirale de certains sélecteurs chiraux glycopeptidiques, en déterminant, via la technique dite de « perturbation », les isothermes d'adsorption des énantiomères du tryptophane sur des PSCs de type teicoplanine et TAG. Le rôle joué par les unités saccharidiques de la teicoplanine dans le processus de discrimination chirale sera analysé. Dans un deuxième temps, nous nous pencherons sur le développement de nouvelles PSCs pour la séparation des acides aminés, par l'immobilisation non-covalente de la teicoplanine sur des supports chromatographiques de type C₈ et C₁₈. Leur stabilité dans le temps sera étudiée. Pour finir, nous nous focaliserons sur le développement de nouvelles PSCs à base

d'aminoglycosides pour une utilisation en chromatographie chirale d'échange de ligands (CCEL).

II- Stéréochimie et chiralité

II-1 Rappel historique :

Ce sont les progrès conjugués de la physique et de la chimie qui ont conduit les scientifiques du XIX^{ème} siècle à la notion de chiralité.

Tout commence en 1808, quand Malus découvre la polarisation de la lumière et que plus tard, en 1825, Biot montre que l'acide tartrique a la propriété de dévier la lumière polarisée alors qu'un acide du même type appelé racémique est inactif (*racemus* : grappe de raisin) [4]. La relation entre pouvoir rotatoire et dissymétrie moléculaire est faite en 1848 quand Pasteur explique pourquoi l'acide paratartrique (forme d'acide tartrique présente de façon exceptionnelle dans le vin) ne montre aucun pouvoir rotatoire, bien qu'il ait la même composition chimique que l'acide tartrique !! En examinant attentivement cette espèce (que l'on appellerait aujourd'hui mélange racémique), Pasteur découvre qu'elle est composée de cristaux hémédriques aux facettes orientées soit à droite, soit à gauche. On dirait aujourd'hui que ces cristaux images spéculaires l'un de l'autre sont énantiomères. En les triant à la pince, Pasteur sépare les deux énantiomères et découvre que l'acide tartrique naturel possède un jumeau, dont les solutions font tourner le plan de polarisation de la lumière dans le sens opposé [4]. Il montre ainsi l'existence d'une « dissymétrie moléculaire », en posant les bases de la stéréochimie moléculaire, anticipant au préalable la notion de la chiralité.

Vingt cinq années plus tard et plus précisément, en 1874, le français Le Bel [5] et le néerlandais Van't Hoff [6] introduisent la théorie du carbone tétraédrique, créant le concept du carbone asymétrique.

Enfin, en 1898, le physicien anglais Lord Kelvin donne le nom de « **chiralité** » à la « propriété qui distingue les énantiomères d'une même molécule » [4].

II-2 Définitions et concepts :

Les **isomères** sont des composés dont la formule moléculaire est identique, mais qui diffèrent par la nature de leurs liaisons ou l'enchaînement de leurs atomes ou par l'arrangement spatial de leurs atomes. Les isomères qui se différencient par la séquence de leurs atomes sont dits isomères de constitution ou de position. Ceux pour lesquels seuls l'arrangement spatial des atomes diffèrent sont appelés **stéréoisomères**.

Deux stéréoisomères (non superposable par simple rotation) sont dits **énantiomères**, **antipodes** ou **isomères optiques** si et seulement si, ils sont images l'un par rapport à l'autre dans un miroir. La molécule est dite alors **chirale**.

Le mot **chiralité** vient du mot grec « *kheir* » qui signifie main. La chiralité peut être donc définie comme une caractéristique structurale qui fait qu'une molécule est asymétrique et non superposable à son image dans un miroir, exactement à l'image de la main gauche et de la main droite (**Figure 1**).

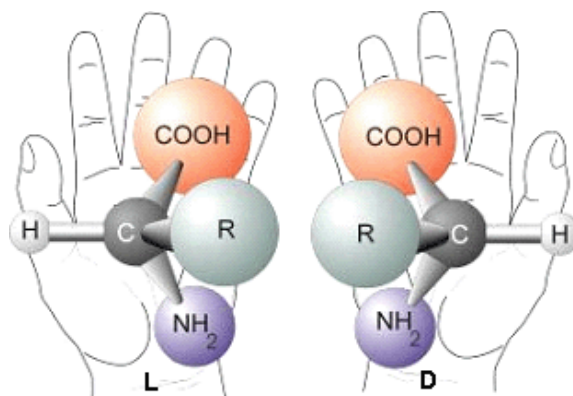


Figure 1

Le mélange équimolaire de deux énantiomères s'appelle **mélange racémique**. L'inversion d'un unique centre chiral sur une molécule en possédant plusieurs donne un stéréoisomère qui n'est pas son image dans un miroir. Un tel stéréoisomère est dit **diastéréoisomère** et l'inversion s'appelle une **épimérisation**.

Dans la majorité des cas, l'asymétrie est bâtie autour d'un atome de carbone hybridé sp^3 et comportant quatre substituants différents. Un tel carbone est dit **carbone chiral** ou **asymétrique** (**Figure 1**), mais d'autres atomes tels que le soufre, l'azote, le silicium ou le phosphore peuvent également donner naissance à des composés chiraux.

Les molécules possédant plusieurs de ces atomes asymétriques sont chirales. Le cas de l'acide tartrique (**Figure 2**) en est un exemple.

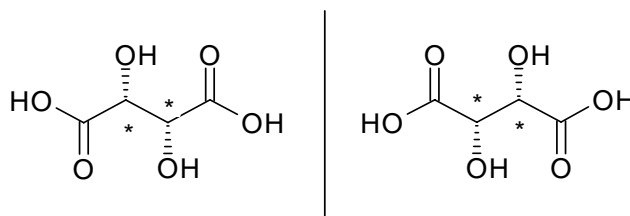


Figure 2 : Acide tartrique.

Outre la chiralité bâtie autour des atomes asymétriques, des molécules dépourvues de centres chiraux peuvent également présenter le phénomène de chiralité. Il en est ainsi pour les dérivés allènes, dans lesquels les atomes se répartissent autour d'un axe. Par ailleurs, d'autres molécules peuvent présenter une chiralité planaire. La chiralité liée à l'hélicité est un

phénomène qu'on retrouve dans certaines macromolécules telles que les protéines ou les acides nucléiques [7]. Dans ce dernier cas, les deux énantiomères correspondent aux deux sens d'enroulement de l'hélice.

Généralement, les énantiomères d'une molécule chirale sont désignés différemment (-, +, l, d, S, R, L, D). Deux énantiomères font tourner le plan de polarisation de la lumière en sens opposé l'un de l'autre. On les désigne donc par (+) ou (-) selon qu'ils dévient le plan de polarisation de la lumière vers la droite (substance dextrogyre (**d**)) ou vers la gauche (substance lévogyre (**l**)). Toutefois, le sens dans lequel le plan de polarisation est dévié ne préjuge en rien de la répartition des atomes dans l'espace, que l'on appelle configuration absolue. Aussi utilise-t-on pour les molécules contenant un atome asymétrique une nomenclature liée à la répartition spatiale des atomes, celle de Cahn-Ingold-Prelog: les atomes reliés au carbone asymétrique sont classés par valeurs décroissantes de leur numéro atomique Z, en considérant les atomes adjacents en cas d'égalité. On regarde le carbone tétraédrique dans l'axe de sa liaison avec le substituant classé en dernier. Si l'on passe des atomes a, puis b, à c ($a > b > c > d$) en effectuant une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre, l'énantiomère est noté R (du latin rectus, droit), sinon, c'est l'énantiomère S (de sinister, gauche) (**Figure 3**).

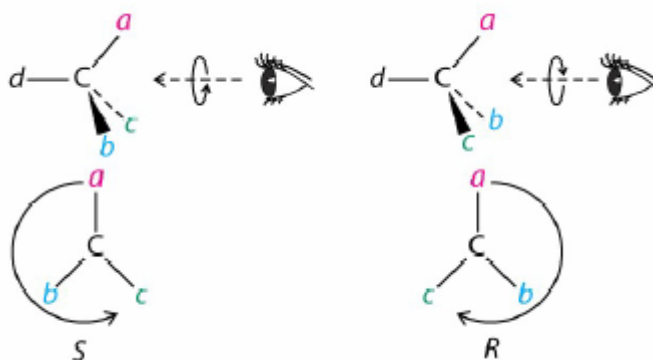


Figure 3 : Représentation de Cahn-Ingold-Prelog- descripteur R et S.

Lorsqu'une molécule possède plusieurs centres chiraux, on donne la configuration absolue de chacun d'eux. La configuration de tout groupe stéréogène par rapport à tout autre groupe stéréogène contenu dans la même entité moléculaire permet de déterminer sa configuration relative. En effet, lorsqu'une molécule possède deux atomes de carbone asymétriques, il existe au maximum quatre stéréoisomères qu'on peut grouper en deux couples d'énantiomères : un couple dont les deux énantiomères défilent dans le même sens (R,R) et

(S,S) est de configuration relative *érythro*, alors que le deux autres énantiomères (R,S) et (S,R) du deuxième couple sont *thréo*.

La nomenclature D/L est couramment utilisée en série ose. Dans la représentation de Fischer on place la chaîne carbonée la plus longue sur un axe vertical et le groupe de nombre d'oxydation le plus élevé vers le haut. Si le groupe hydroxyle latéral le plus éloigné du groupe carbonyle est porté sur la droite de l'axe comme dans le D-glycéraldéhyde, le composé est D (L s'il est à gauche comme dans le L-glycéraldéhyde) (**Figure 4**).

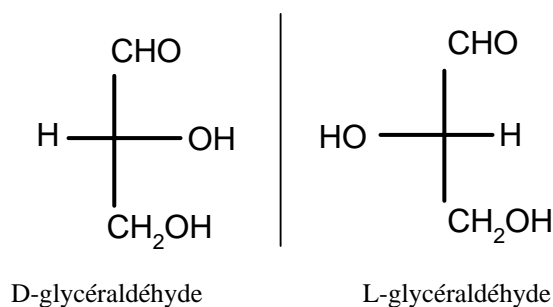


Figure 4 : D-, L-glycéraldéhyde.

La nomenclature D/L est aussi employée dans la série des acides aminés. Lorsque l'on place le groupe carboxyle vers le haut et le groupe spécifique R vers le bas, le groupe NH_2 se trouve à droite de l'axe dans la représentation de Fischer du stéréoisomère D (respectivement à gauche de l'axe dans la représentation de Fischer du stéréoisomère L) (**Figure 5**).

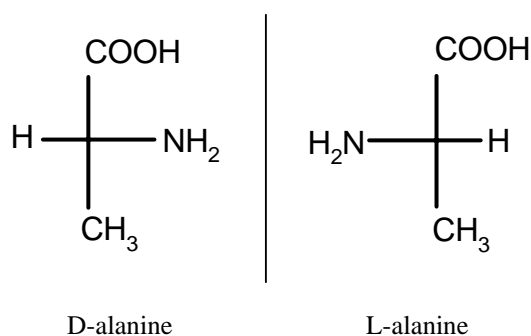


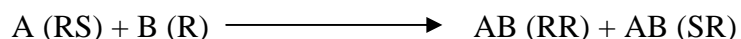
Figure 5 : D-, L-alanine.

II-3 Propriétés physico-chimiques des énantiomères :

Les énantiomères ont des propriétés physiques identiques vis à vis de phénomènes physiques non dissymétriques (fusion, ébullition, solubilité dans un solvant achiral, densité, etc.). En revanche les énantiomères ont des propriétés différentes vis à vis d'un phénomène physique dissymétrique. En particulier, les pouvoirs rotatoires spécifiques des énantiomères

sont opposés. Autrement dit, si une substance chirale est traversée par un faisceau de lumière polarisée plane, elle provoque une rotation du plan de polarisation de cette lumière. On dit qu'elle possède une **activité optique** ou un **pouvoir rotatoire**.

Les propriétés chimiques des énantiomères sont les mêmes vis à vis d'un réactif non chiral. Un mélange racémique ne peut donc être résolu dans un tel système. En revanche, les énantiomères peuvent former, en présence d'un réactif optiquement pur, deux diastéréoisomères :



Les diastéréoisomères, contrairement aux énantiomères, présentent des propriétés physico-chimiques différentes et peuvent être séparés par les méthodes d'analyse chimique classiques [8]. La résolution d'un racémique est donc basée sur cette méthodologie.

III- Chiralité et incidences

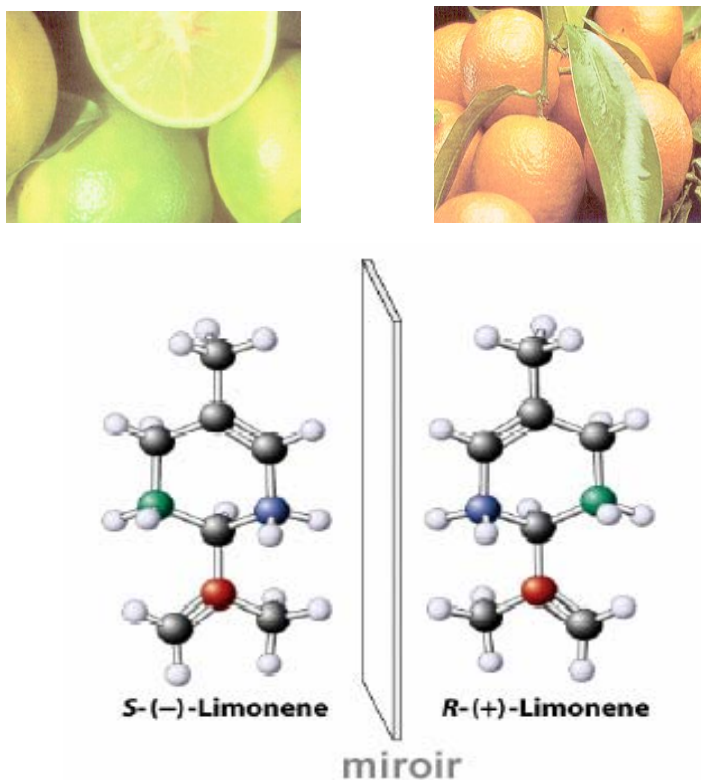
III-1 La chiralité et la vie :

En 1886, Piutti soumet à l'académie des sciences de Paris un mémoire sur la séparation des énantiomères de l'asparagine et remarque que la forme (+) a un goût sucré tandis que la forme (-) est insipide [4]. Pasteur qui présente ce travail suggère que « le tissu nerveux pourrait être lui même dissymétrique ». Cette remarque est probablement la première concernant une relation entre énantiomères et propriétés biologiques [4].

L'importance du travail de Pasteur a été de relier la dissymétrie moléculaire à la chimie du vivant et d'y voir une de ses caractéristiques essentielles. Les acides aminés, les structures hélicoïdales des protéines ou les sucres possèdent des caractéristiques chirales étroitement reliées à leur fonction et un seul de leurs énantiomères existe majoritairement dans la nature. Par conséquent, les processus métaboliques et régulateurs des systèmes biologiques sont sensibles à la stéréochimie et différentes réponses peuvent être observées en comparant les activités des énantiomères.

Dans le domaine alimentaire par exemple, les saveurs et les odeurs des énantiomères peuvent être différents. Certains récepteurs gustatifs et olfactifs sont capables de distinguer les énantiomères d'une structure moléculaire donnée. Ainsi, les papilles gustatives reconnaissent les goûts différents des diastéréoisomères de l'aspartame. L'aspartame est un dipeptide composé de deux acides aminés, l'acide aspartique et la phénylalanine. L'isomère L-L présente un goût sucré, alors que les trois autres isomères, D-D, L-D et D-L, ont un goût amer-aigre.

De même, la stéréospécificité des récepteurs olfactifs peut être illustrée par l'exemple du limonène (**Figure 6**) dont l'un des énantiomères donne l'odeur au citron et l'autre donne l'odeur à l'orange.



S(-) limonène : odeur de citron

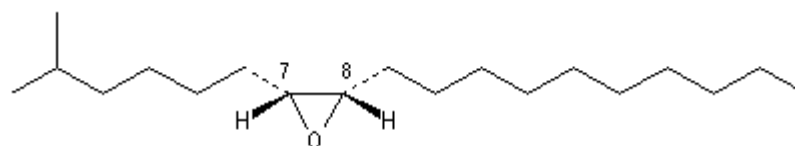
R(+) limonène : odeur d'orange

Figure 6 : Enantiomères du limonène.

Dans le monde des insectes, un certain nombre de phéromones (du grec *phrein*: transférer et *horman*: exciter) sont en effet chirales et leur activité biologique est généralement reliée à une stéréochimie bien définie [9].

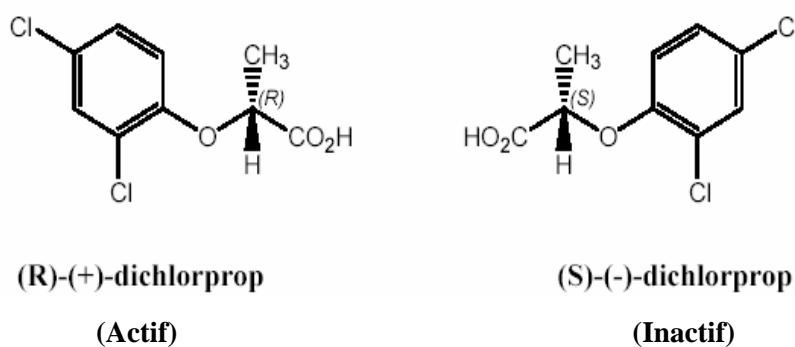
Depuis les premiers travaux d'Adolf Butenandt et de ses collaborateurs (1959) sur la phéromone du ver à soie, le *bombycol* [10], les chimistes ont appris à isoler ces substances qui n'existent pourtant qu'à l'état de traces, à en déterminer la structure et à en effectuer la synthèse. Celle-ci a permis d'obtenir les deux énantiomères d'un grand nombre d'entre elles, et l'on connaît maintenant les différences parfois considérables entre l'activité de l'hormone naturelle et celle de son antipode.

Le (+)-(7R, 8S)-7,8-époxy-2-méthylcotadécane ou disparlure par exemple, est une phéromone du *Bombyx disparate*. Seul l'énantiomère (+) est actif. L'énantiomère (-) n'a aucune action biochimique même si sa concentration est 10^6 fois plus grande que celle de l'énantiomère (+) [11] (**Figure 7**).

(7*R*, 8*S*)-7,8-époxy-2-méthyl-octadécane**Figure 7** : Structure de la disparlure [11].

Afin d'utiliser les phéromones sexuelles dans les programmes de lutte intégrée des espèces nuisibles d'insectes, il est essentiel d'identifier les composés chimiques phéromonaux et de comprendre de façon adéquate la biologie des espèces considérées. Cette élucidation de la structure des phéromones et leur synthèse sont à l'origine d'une méthode élégante de contrôle des populations d'insectes. Ce contrôle est très important car certains ravagent des cultures, d'autres transmettent des maladies. La technique consiste à attirer les insectes mâles avec une phéromone synthétique et à les détourner ainsi des femelles. Cette méthode entraîne beaucoup moins d'effets secondaires que l'utilisation des insecticides classiques.

Dans le domaine de l'agrochimie, l'analyse de composés chiraux trouve des applications fondamentales dans la fabrication et l'utilisation des pesticides. En effet, de nombreux pesticides sont des molécules chirales, dont le mode d'action et les effets (toxicité, effets mutagènes, etc.) dépendent de leur énantiométrie. Par exemple, le (R)-(+)-énantiomère de l'herbicide dichlorprop est l'énantiomère actif, alors que le (S)-(-)-énantiomère est inactif [12] (**Figure 8**).

**(R)-(+)-dichlorprop****(Actif)****(S)-(-)-dichlorprop****(Inactif)****Figure 8** : Enantiomères de l'herbicide dichlorprop [12].

De plus, les micro-organismes qui les dégradent semblent préférer une forme à l'autre, ce qui suggère de fabriquer des pesticides énantiopurs dégradables par les bactéries du sol [13].

L'analyse chirale présente aussi des applications intéressantes dans certains domaines comme l'industrie agroalimentaire, l'archéologie, la médecine légale, etc. (**cf. Introduction**).

III-2 Incidences de la chiralité dans le domaine thérapeutique :

III-2-1 Introduction :

La synthèse de principes actifs chiraux conduit en général à des mélanges racémiques, constitués d'une quantité égale d'énantiomères. Aujourd'hui, environ la moitié des médicaments mis sur le marché contiennent au moins un centre asymétrique. La majorité est employée sous forme diastéréoisomérique ou racémique. Mais, depuis quelques années, la commercialisation d'un énantiomère pur, de préférence au mélange racémique, a pris un grand essor.

En fait, les protéines, les enzymes et les récepteurs biologiques membranaires et nucléaires, présentent une topologie spatiale tridimensionnelle bien définie et asymétrique. Il est évident que les interactions de médicaments chiraux avec ces systèmes biologiques sont dépendants de la configuration énantiomérique.

Sur le plan thérapeutique, un **eutomère** (E) définit l'énantiomère dont l'activité biologique est la plus forte ou dont l'affinité relative de liaison (ARL) à un récepteur biologique ou une enzyme est la meilleure; par opposition, un **distomère** (D) représente un énantiomère dont l'activité biologique est la moins forte ou dont l'ARL pour un récepteur ou une enzyme est la plus faible ou nulle. Il est donc indispensable de connaître non seulement l'identité de l'énantiomère responsable de l'activité, mais aussi de s'assurer qu'il ne donne pas lieu à une énantiomérisation rendant son usage peu intéressant [14].

III-2-2 Chiralité et médicaments :

En fait, différents cas de figure peuvent se présenter au cours de l'étude des relations entre la chiralité et l'activité biologique d'un médicament ou de tout autre principe actif :

III-2-2-1 Médicaments ayant un centre de chiralité

Différentes situations peuvent se trouver, dans ce cas, quant aux propriétés pharmacologiques et toxicologiques de deux énantiomères :

- a)- Enantiomères présentant qualitativement et quantitativement la même activité.
- b)- Enantiomères possédant qualitativement le même type d'activité mais d'intensité différente.
- c)- Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est inactif.

La résolution du mélange racémique, dans ces trois situations, s'avère peu intéressante.

d)- Les deux énantiomères possèdent des activités biologiques différentes :

Lorsque deux énantiomères possèdent des propriétés pharmacologiques différentes, l'usage du mélange racémique peut être maintenu si leurs effets sont bénéfiques sur le plan thérapeutique.

e)- Un des deux énantiomères est l'eutomère tandis que l'autre est toxique :

Une telle situation nécessite une attention toute particulière et ne devrait théoriquement plus se représenter en raison de sa gravité potentielle. En effet, ce rapport problématique entre la structure et les propriétés biologiques des énantiomères a surgi de façon dramatique en 1962, lorsque l'on s'est aperçu de l'apparition de diverses malformations et de phocomélie (anomalies au niveau des membres) chez les nouveaux-nés de mères ayant utilisé comme sédatif le thalidomide racémique au cours de leur grossesse. Les travaux ultérieurs ont permis de séparer les deux énantiomères de ce dérivé [15] et d'étudier leurs propriétés biologiques ainsi que celles de leurs métabolites. Ils ont conduit à attribuer initialement l'effet tératogène de cette substance à l'isomère (S)-(-) et non à l'énantiomère (R)-(+) [16] et par la suite plus précisément au métabolite hydroxylé de l'énantiomère (S)-(-) [17] (**Figure 9**). Des études plus récentes indiquent toutefois que le thalidomide se racémise aisément dans le sang, ce qui montre que même l'emploi thérapeutique du (R)-thalidomide était voué à l'échec [18].

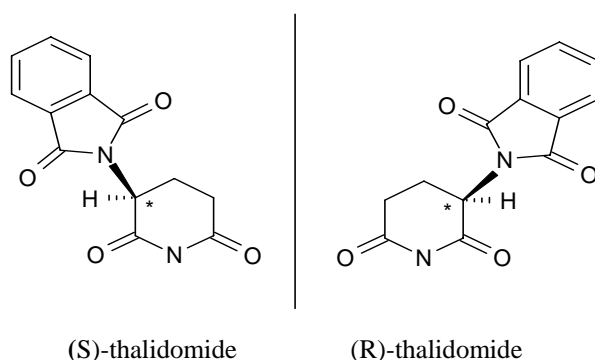


Figure 9 : Enantiomères du thalidomide.

Lorsque l'un des deux antipodes est toxique, la séparation des énantiomères s'avère obligatoire pour ne retenir que l'énantiomère actif non toxique, grâce à la mise en œuvre du dédoublement du racémique (résolution) ou par une méthode de préparation énantiosélective et de purification appropriée. Cependant, même en cas d'utilisation d'un énantiomère pur, il convient d'être toujours prudent et d'exclure la possibilité d'une racémisation métabolique possible, se traduisant par l'apparition éventuelle d'une toxicité ou d'effets secondaires inattendus.

III-2-2-2 Médicaments ayant plus d'un centre de chiralité

La présence de n centres de chiralité conduit à un maximum de 2^n isomères possibles. Ainsi, la présence de deux atomes de carbone asymétriques conduit à quatre isomères optiques dont les configurations sont RR, SS, RS et SR.

Par exemple, des quatre isomères connus, seuls ceux correspondant au propoxyphène (**Figure 10**) présentent une activité thérapeutique : le (2S, 3S)-(+), ou dextropropoxyphène est un analgésique alors que le (2S, 3R)-(-), ou lévopropoxyphène est un antitussif [19].

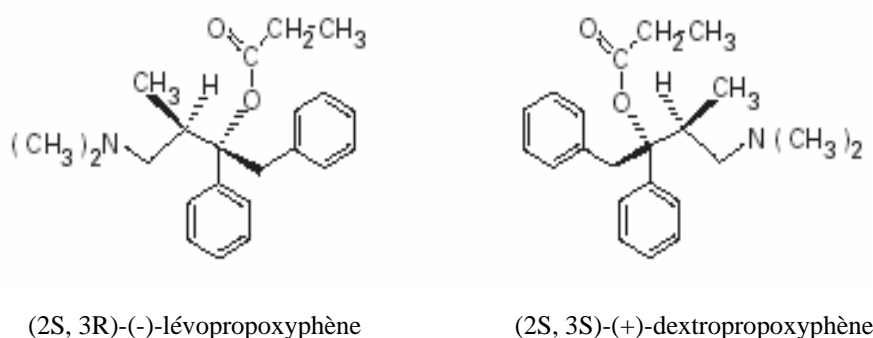


Figure 10 : Isomères actifs du propoxyphène [19].

Dans ces conditions, leur séparation s'avère intéressante puisqu'elle permet d'accéder à deux médicaments distincts ayant des activités thérapeutiques différentes.

III-2-3 Chiralité et propriétés pharmacocinétiques :

En règle générale, la connaissance des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament est indispensable avant toute mise sur le marché.

Sachant que les acides aminés, les glucides, les lipides et les macromolécules telles que les protéines plasmatiques, les récepteurs membranaires et nucléaires sont asymétriques, leurs interactions avec des molécules chirales peuvent être énantiométriques et conduire à des paramètres pharmacocinétiques différents pour chaque énantiomère. Il en est de même pour l'action des enzymes pouvant agir différemment sur chaque énantiomère et conduire à la formation de métabolites différents.

Des différences de propriétés pharmacocinétiques des énantiomères (R) et (S) du propranolol (médicament antihypertenseur par action bloquante des récepteurs adrénergiques bêta) (**Figure 11**), d'une part, et entre l'énantiomère (S) et le racémique (R, S), d'autre part,

ont été mises en évidence [20]. La fixation aux protéines plasmatiques est plus importante pour l'énantiomère lévogyre par rapport à l'antipode dextrogyre [21].

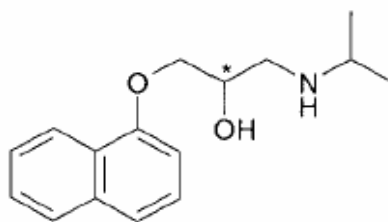


Figure 11 : Structure du propranolol [22].

Le métabolisme du (S)-(-)-propranolol, conduisant à la formation d'un glucuronide et à l'oxydation de la chaîne latérale, est plus important que celui de l'antipode (R)-(+)[23]. Par ailleurs, l'administration de quinidine réduit davantage la clairance du (R)-(+)-propranolol que celui de l'énantiomère (S)-(-) en raison d'une baisse importante de la réaction d'hydroxylation [24]. Ce type d'interaction se retrouve chez de très nombreux médicaments et montre que la clairance d'un médicament dépend aussi de celle de son ou de ses métabolites et incite à beaucoup de prudence en cas d'associations médicamenteuses. La détermination préalable des activités biologiques, toxicologiques et pharmacocinétiques de chaque isomère optique d'un racémique constitue donc une étape déterminante avant toute commercialisation d'une spécialité pharmaceutique.

III-2-4 Chiralité et affaires réglementaires :

Il serait fastidieux de vouloir présenter de façon exhaustive les directives concernant la mise sur le marché de médicaments chiraux et qui sont propres à chaque pays.

Différentes réunions consacrées à ce sujet ont été mises en œuvre afin de dégager, dans la mesure du possible, un consensus général [25]. Une documentation exhaustive concernant les médicaments chiraux sont disponibles plus particulièrement pour l'Europe [26], les Etats-Unis [27] et le Japon [28].

En tout état de cause, les règles établies pour les principes actifs non chiraux s'appliquent également aux énantiomères. Par ailleurs, des indications doivent être fournies sur les propriétés pharmacologiques, pharmacocinétiques et toxicologiques pour chaque énantiomère et pour le racémique, l'inversion chirale éventuelle de l'énantiomère d'une forme à l'autre doit être également étudiée *in vitro* et *in vivo*. Dans tous les cas, l'industriel doit justifier l'intérêt de l'emploi du racémique ou de l'un de ses énantiomères.

II-2-5 Chiralité et intérêt économique :

Sur la base des observations mentionnées précédemment, l'industrie pharmaceutique s'intéresse très fortement aux médicaments énantiopurs.

D'un point de vue économique, cette approche présente aussi un grand intérêt pour l'industriel, dans la mesure où un médicament comportant un seul énantiomère en lieu et place du racémique est considéré comme un principe actif nouveau, prolongeant la durée de vie du brevet d'exploitation [29]. Par exemple, l'oméprazole, Mopral[®] (Astra), est un antiulcéreux qui s'est longtemps placé dans le peloton de tête des ventes mondiales des médicaments. La société Astra-Zeneca a lancé en 2001 l'ésoméprazole, Inexium[®], qui est l'énantiomère possédant l'essentiel de l'activité biologique de l'oméprazole racémique. Un médicament ténor arrivé en fin de protection de brevet sera donc sans doute relayé ou remplacé par un médicament quasi-identique [18]. De plus, les médicaments énantiopurs permettent aussi de diminuer (et « d'économiser ») la quantité de matière première administrée.

Une poussée économique spectaculaire a été observée. Elle s'est traduite par un pourcentage de plus en plus important de médicaments commercialisés sous forme énantiomériquement pure, une augmentation de l'ordre de 100% étant enregistrée entre 1989 et 2000 (**Figure 12**) [30]. En 1989, le marché total de la chiralité était estimé aux Etats-Unis à 464,8 millions de dollars, les applications pharmaceutiques représentant 80% de ce marché.

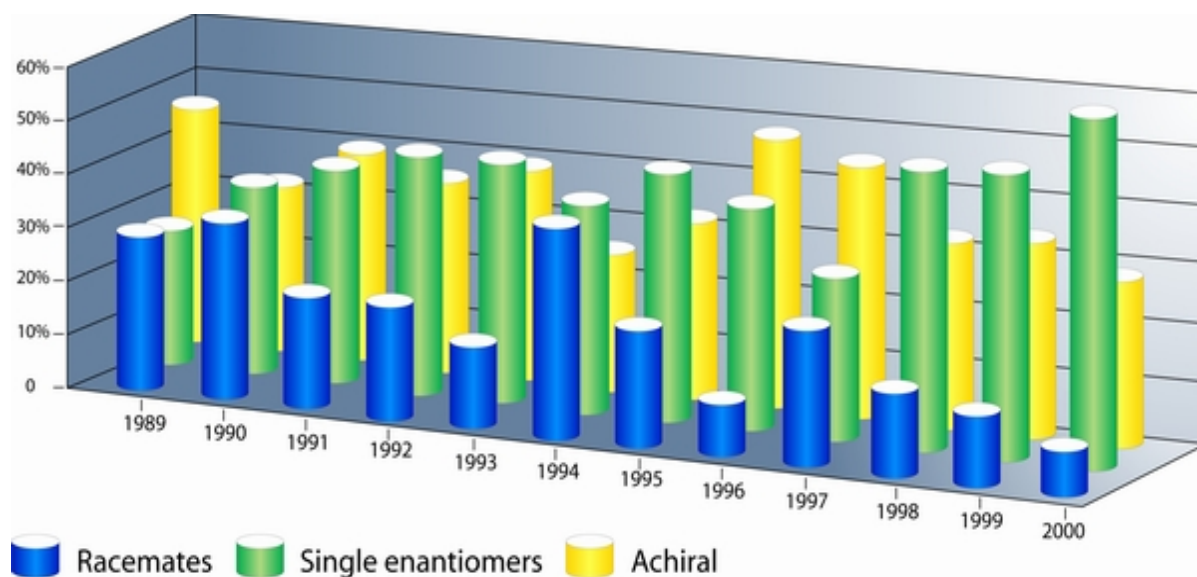


Figure 12 : Distribution annuelle des médicaments à travers le monde entre 1989 et 2000 [30].

En conclusion, dans le domaine pharmaceutique, tout au moins, la chiralité revêt donc une importance considérable tant au point de vue thérapeutique que réglementaire ou économique. L'augmentation de la demande de composés énantiopurs dans l'industrie pharmaceutique a stimulé ainsi le développement de nouvelles sociétés qui sont spécialisées dans la synthèse asymétrique [32] et elle a aussi favorisé le développement de nouvelles méthodes de séparation des énantiomères parce qu'il est indispensable dans ce contexte de disposer d'outils performants pour séparer ou évaluer les isomères optiques. Des avancées remarquables dans les techniques de séparation ont été réalisées au cours des vingt dernières années. Dans le chapitre suivant nous exposerons rapidement, les différentes techniques utilisées pour l'obtention et la séparation d'énantiomères.

*IV- Obtention d'énantiomères et
discrimination chirale*

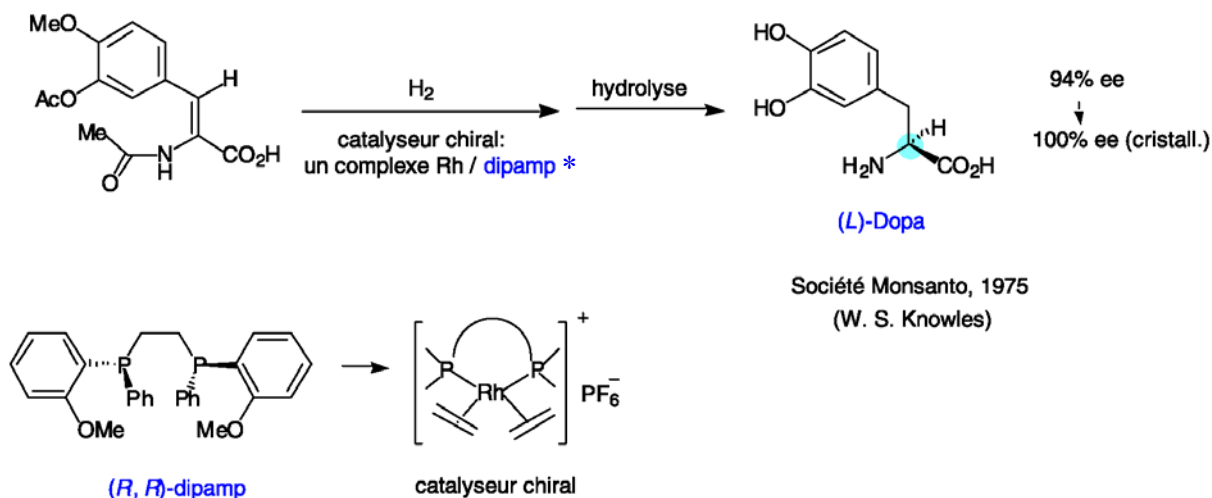
Pour obtenir une substance optiquement pure ou discriminer deux énantiomères, plusieurs méthodes ont été développées.

IV-1 La synthèse asymétrique :

La chimie organique fournit presque toujours le racémique. Les conditions habituelles de température (chauffage prolongé), de pression (parfois très réduite) favorisent la racémisation des antipodes optiques.

La synthèse asymétrique consiste à préparer un produit sous forme d'un énantiomère en partant d'une matière première achirale. Cette transformation nécessite l'aide d'un auxiliaire chirale qui est temporairement lié au substrat, à un réactif ou à un catalyseur [33].

La première synthèse asymétrique industrielle a été la préparation de la L-Dopa chez Monsanto en 1975 par W.S. Knowles (prix Nobel 2001) en utilisant un catalyseur chirale. La L-Dopa préparée chez Monsanto était ensuite commercialisée par la société Hoffmann-La Roche comme médicament anti-Parkinsonien [18] (Figure 13).



* **dipamp** (di méthylphenyl-*o*-anisylphosphane)

Figure 13 : Synthèse asymétrique industrielle de la L-Dopa [18].

La synthèse asymétrique a connu au cours de ces dernières années, un développement considérable et a donné lieu à de nombreuses applications industrielles telles que la synthèse des acides aminés, des antibiotiques, des phéromones, du menthol, etc. [18]. Les parfums ou les composés agrochimiques sont aussi des cibles intéressantes pour ce type de synthèse.

La synthèse asymétrique (stœchiométrique ou catalytique) est de plus en plus utilisée sur le plan académique lors de l'élaboration de molécules complexes. Elle rend aussi de réels services dans l'industrie pharmaceutique pour la préparation rapide d'échantillons des deux énantiomères nécessaires aux premiers essais biologiques (quantités jusqu'à 100 g). Par contre, les synthèses asymétriques sont généralement délicates à mettre au point.

IV-2 Les biotransformations :

Les méthodes de résolution enzymatique (utilisant l'enzyme comme catalyseur chiral) ont attiré l'attention des chercheurs grâce à la simplicité de leur mise en œuvre.

Dérivant des acides aminés naturels en série L, les enzymes sont des composés optiquement purs. Elles constituent un groupe particulièrement important de catalyseurs chiraux. L'atout majeur de la catalyse enzymatique est son extrême sélectivité. En effet, une enzyme ne peut effectuer qu'un seul type de réaction. Cette réaction peut être énantiosélective et donc utilisable pour résoudre un mélange racémique avec des excès énantiomériques très élevés. Les enzymes disponibles les plus utilisées sont celles qui catalysent l'hydrolyse des esters et des amides (estérases, lipases, peptidases, acylases) et celles qui favorisent l'oxydation des alcools en cétones ou en aldéhydes (déshydrogénases). Dans certains cas, la réaction se déroule dans un incubateur, contenant un micro-organisme qui produit l'enzyme appropriée durant une fermentation [34].

Tonon et al. [35] ont montré qu'en laissant fermenter la levure de bière, de vin ou autre, en présence de sucres et d'acides aminés en mélange racémique, la levure consomme les acides aminés naturels (configuration L) et ne touche pas à leurs énantiomères (configuration D). Plus récemment, des travaux ont démontré les performances d'une nouvelle lipase B de la levure *Candida antarctica* pour le dédoublement des hétéroarylamines bicycliques [36] et de la (R,S)-2-(1-aminoéthyl)-3-chloro-5-bromopyridine [37]. Les énantiomères (S) sont obtenus pour chaque molécule avec une pureté énantiomérique très élevée. Elle est également capable de reconnaître spécifiquement les énantiomères de l'ibuprofène [38].

IV-3 La cristallisation :

Cette méthode, employée initialement par Pasteur, consiste à résoudre les mélanges racémiques par cristallisation fractionnée d'un dérivé diastéréoisomère, formé par réaction entre l'énantiomère et un réactif optiquement actif. En effet, et contrairement aux

énantiomères, les diastéréoisomères possèdent des propriétés physico-chimiques différentes et peuvent donc cristalliser sélectivement [39].

Le dédoublement par cristallisation est adapté à un très grand nombre de molécules et offre un très bon rendement, une bonne pureté, une excellente reproductibilité et une capacité à résoudre des grandes quantités. Ces avantages remarquables ouvrent la voie à de larges applications industrielles basées sur la cristallisation.

Parmi les exemples les plus significatifs d'utilisation de ce procédé, citons les dédoublements de la phénylglycine [40] et du naproxène [41]. Pour ces deux molécules l'énantiomère non désiré est cristallisé et séparé du mélange racémique afin d'obtenir le (S)-2-phénylglycine ou le (S)-naproxène avec une grande pureté énantiomérique.

Malheureusement, cette technique présente trois inconvénients majeurs : la nécessité de posséder un réactif de très grande pureté énantiomérique, la racémisation possible du centre chiral (soit au niveau du composé lui-même, soit au niveau du réactif) et enfin des problèmes de cinétique. De plus, le composé chiral doit posséder un groupement fonctionnel permettant la dérivation [42]. C'est pourquoi les analystes se sont tournés vers des techniques et des approches de discrimination chirale fondées sur les membranes, les biocapteurs, la chromatographie et l'électrophorèse capillaire.

IV-4 Les membranes :

La technique des membranes a été mise en place à partir du milieu des années 70, mais c'est tout récemment qu'elle a été explorée plus largement, en utilisant les membranes pour la résolution des racémiques [43 - 45].

Son principe est fondé sur la différence de la concentration énantiomérique dans les solutions organiques localisées des deux côtés d'une membrane qui empêche les deux phases organiques de se mélanger. Cependant, la membrane reste perméable à l'isomère optique adéquat.

Dans les phases mobiles situées des deux côtés de la membrane, des agents optiquement purs permettent le passage sélectif d'un énantiomère (ou le passage sélectif de deux énantiomères dans des directions opposées), aboutissant à l'augmentation de la concentration d'un énantiomère donné dans un compartiment donné et, ainsi, à la résolution du mélange racémique initialement présent dans un compartiment.

On distingue plusieurs types de membranes, les polymères énantiosélectifs (directs) [46], les membranes liquides sur supports solides ou les membranes liquides en émulsion [44, 45]. Parmi les nombreux racémiques qui ont été résolus sur ces différents types de

membranes, citons sans être exhaustifs, l'ibuprofène [43], le propranolol [43] et les acides aminés [44]. Selon Pirkle et al. [47], la technique des membranes pourrait être capable de résoudre une quantité de plus d'une tonne de mélange racémique et permettrait d'obtenir des énantiomères avec une grande pureté optique. Cette approche présente donc un grand intérêt industriel puisqu'elle permet la séparation des énantiomères sur une grande échelle.

IV-5 Les biocapteurs :

Ce n'est que très récemment que l'application des biocapteurs dans la discrimination chirale des composés a été étudiée. Les biocapteurs possèdent un champ d'applications extrêmement large qui va du domaine biomédical au domaine environnemental en passant par la biotechnologie et l'agroalimentaire [48].

Généralement, un biocapteur est constitué d'une membrane (couche active) qui comprend une espèce biologique (enzyme, anticorps, récepteur, etc.) permettant la reconnaissance moléculaire et d'un transducteur chargé de convertir le signal biologique de l'événement de la reconnaissance (fixation d'un ligand sur le récepteur) en un signal physique (électrique, lumineux, etc.) mesurable et aisément exploitable (**Figure 14**).

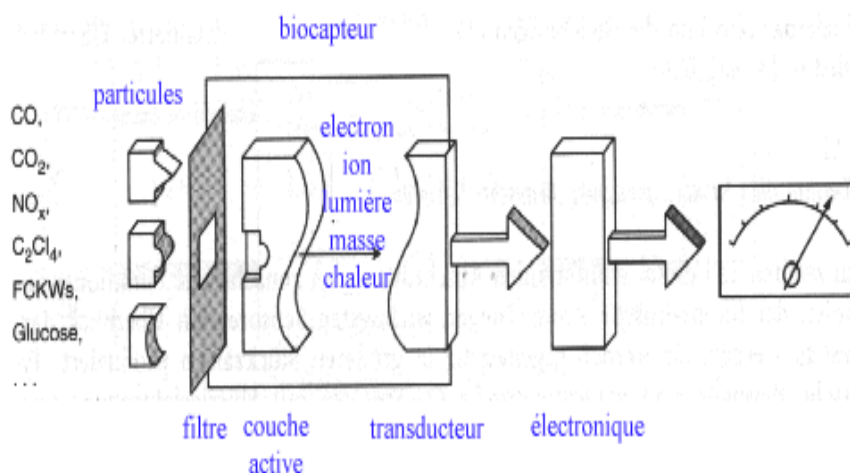


Figure 14 : Principe d'un biocapteur.

Les biocapteurs qui ont connu l'essor le plus important sont les biocapteurs électrochimiques. Un biocapteur électrochimique, dans lequel le transducteur est de type potentiométrique ou ampérométrique, est une électrode sur laquelle va se produire une réaction d'oxydo-réduction entre l'espèce à détecter et le constituant de surface de l'électrode (la membrane).

Dans la littérature, de nombreux exemples ont été cités concernant l'application des biocapteurs électrochimiques en analyse énantiosélective. Par exemple, Stefan et al. [48, 49] ont montré que les biocapteurs à détection potentiométrique ou ampérométrique à base de maltodextrine et les biocapteurs potentiométriques utilisant les éthers couronnes et la β -cyclodextrine comme sélecteurs ont pu discriminer avec succès l'énantiomère S du captopril de son énantiomère R. Récemment, Rat'ko et al. [50, 51] ont démontré pour leur part l'efficacité d'un biocapteur à base d'antibiotique macrocyclique pour la reconnaissance de l'énantiomère L de la carnitine [50] et de l'énantiomère D de l'acide pipecolique [51].

Les biocapteurs ont été également employés avec succès pour l'analyse de molécules volatiles en utilisant un capteur de masse ou un capteur optique. Des résultats satisfaisants ont été obtenus dans la résolution des mélanges racémiques de dérivés d'acide aminés volatils ou des molécules médicamenteuses volatiles telles que l'enflurane, l'isoflurane et le desflurane [52, 53].

IV-6 Les méthodes chromatographiques et électrophorétiques :

A l'heure actuelle, les méthodes chromatographiques et électrophorétiques sont les techniques qui recueillent le plus de succès dans le domaine de la séparation énantiomérique. Elles allient à la fois rapidité, efficacité et sensibilité. Elles permettent un large éventail d'énantioséparation de molécules d'intérêt biologique ou pharmaceutique.

Parmi les différentes méthodes chromatographiques existantes, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est sans aucun doute la méthode la plus utilisée pour les séparations chirales. Elle n'est cependant pas la seule : la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase supercritique (CPS) ou encore la chromatographie en phase gazeuse (CPG) sont également employées, avec plus ou moins de succès.

Les méthodes électrophorétiques les plus utilisées en séparation chirale sont l'électrophorèse capillaire de zone (ECZ) et la chromatographie micellaire électrocinétique (CMEC). Plus récemment, l'électrochromatographie capillaire (ECC) a été développée. Elle se présente sous forme d'une combinaison entre l'électrophorèse capillaire de zone et la chromatographie liquide. Cette technique nécessite l'utilisation de capillaires remplis par des phases stationnaires chirales ou achirales.

Deux approches distinctes de séparation stéréosélective peuvent être utilisées en chromatographie ou électrophorèse chirale : une approche indirecte et une approche directe.

L'**approche indirecte** est fondée sur la séparation après dérivation en diastéréoisomères (**Figure 15**). Le principe de cette technique consiste à modifier la molécule

chirale à analyser en la faisant réagir avec un réactif optiquement pur de façon à former deux diastéréoisomères.

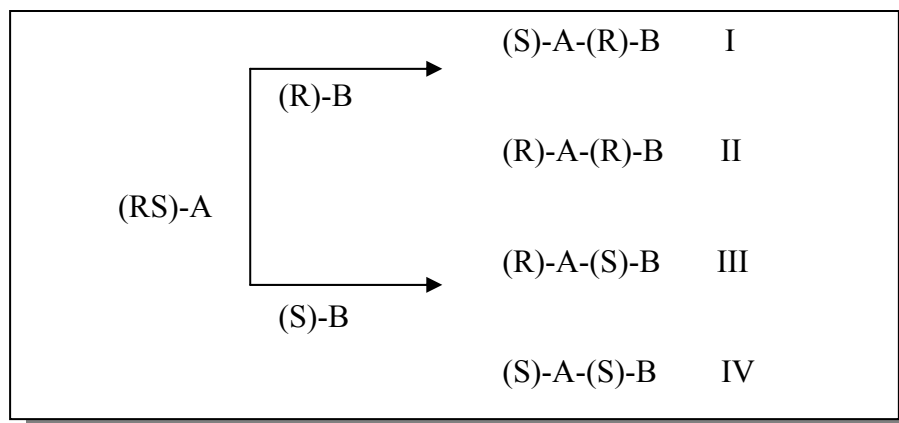


Figure 15 : Formation des diastéréoisomères par l'approche indirecte (dérivation).

Ces deux nouveaux produits possèdent des propriétés physico-chimiques différentes et sont donc séparables dans un environnement achiral avec des phases stationnaires et mobiles classiques. Cette méthode est toutefois limitée aux molécules ayant des groupements réactionnels (amine, hydroxyle, carboxylique, etc.) et exige soit une grande pureté énantiomérique du réactif chiral, soit que le degré de pureté soit connu. D'ailleurs, la réaction de dérivation doit être rapide et quantitative.

Les méthodes indirectes de séparation chirale sont donc plus restrictives et moins élégantes que les séparations par approche directe [42]. Cependant, pour certaines applications, telles que les séparations des acides aminés ou des peptides, elles restent une approche intéressante. Elles permettent parfois d'améliorer parallèlement la sensibilité d'une méthode en ajoutant un groupement qui améliore la détection du composé ou qui permet une détection d'un autre type (par fluorimétrie par exemple) [54].

Parmi les nombreux réactifs de dérivation chirale, utilisés dans différentes méthodes chromatographiques et électrophorétiques, citons notamment l'isothiocyanate (1R,2R) de 1,3-diacetoxy-1-4-nitrophényl-2-propyle ((R,R)-DANI) [55], l'ester méthoxyéthylique de la (S)-N-4-nitrophénoxy-carbonyl-phénylalanine ((S)-NIPE) [56], le chloroformiate de (+)-1-éthyl-fluorényle (FLEC) [57, 58] ou encore l'acide (S)-trifluorolactique [59].

La séparation d'énantiomère par **approche directe**, c.-à-d. sans dérivation au préalable, est devenue de plus en plus fréquente au cours de ces dernières années. L'approche directe permet la séparation directe des composés chiraux selon deux voies distinctes :

La première voie consiste en la séparation chirale après addition de sélecteurs chiraux à la phase mobile (phase mobile chirale) dans les méthodes chromatographiques, ou au

tampon de migration dans les méthodes électrophorétiques, tandis que la deuxième voie repose sur la séparation au moyen de sélecteurs chiraux immobilisés (phases stationnaires chirales).

La séparation chirale selon la première voie consiste en la formation de diastéréoisomères labiles par l'addition d'un réactif chiral dans la phase mobile ou dans le tampon de migration. En chromatographie et en électrochromatographie capillaire, les phases stationnaires utilisées sont en général achirales. De tels systèmes nécessitent un temps d'équilibre et un contrôle minutieux des différents paramètres afin d'obtenir les séparations de manière répétable et reproductible. La nature de la phase stationnaire, le pH, la température, la concentration en solvant organique dans la phase mobile ou dans le tampon de migration et, bien sûr, la nature et la concentration du sélecteur chiral sont autant de facteurs qui influencent la séparation des énantiomères. Toutefois, la nécessité d'ajouter des grandes quantités de sélecteurs chiraux dans la phase mobile et dans le tampon de migration peut constituer l'élément restrictif de cette technique. De plus, elle n'est pas applicable à la CPG, à cause de l'incompatibilité des additifs chiraux avec la phase mobile. Les chromatographies d'adsorption, de partage en polarité de phase inversée, d'échange de ligands et de paires d'ions sont principalement utilisées [60].

La deuxième voie de l'approche directe de séparation énantiomérique repose sur la formation de diastéréoisomères labiles à la surface de PSCs. Cette voie est de loin la plus importante. Elle peut être utilisée en chromatographie préparative et analytique.

Les PSCs ont fait la preuve de leur efficacité dans le domaine de la séparation des énantiomères par les méthodes chromatographiques ou électrophorétiques et, aujourd'hui, elles représentent la meilleure alternative pour la majorité des applications biochimiques, pharmaceutiques ou pharmacologiques. Les PSCs les plus importantes et les plus utilisées sont disponibles sous forme de plaques, de colonnes ou de capillaires.

Le nombre de PSCs disponibles actuellement est assez impressionnant. Néanmoins, il n'existe pas de phase stationnaire universelle. Il est donc nécessaire de choisir, parmi l'éventail des sélecteurs chiraux, celui qui convient le mieux à la séparation souhaitée.

De nombreux composés optiquement actifs (naturels, semi-synthétiques ou synthétiques) [22] ont été utilisés comme sélecteurs chiraux en tant que phases stationnaires ou comme additifs à la phase mobile et au tampon de migration pour la séparation stéréosélective des énantiomères [Tableau 1].

Source	Type	Exemples de sélecteurs chiraux	Techniques	Echelle
Naturelle	Protéines	Albumine α_1 -glycoprotéine acide Ovomucoïde Cellobiohydrolase I Avidine Anticorps Chymotrypsine Ovotransferrine	CLHP, EC, ECC	A*
	Oligosaccharides	α -, β - et γ -cyclodextrine	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P**
	Polysaccharides	Cellulose Amylose Dextrine Héparine	CLHP CLHP, EC	A/P
	Antibiotiques	Vancomycine Teicoplanine Ristocétine A Avoparcine	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Molécules à faible masse moléculaire	Acides aminés et dérivés peptides Acide tartrique et dérivés Acide colique et dérivés Alcaloïdes	CLHP, EC, CPS	A/P
Semi-synthétiques	Dérivés d'oligosaccharides	Dérivés de cyclodextrines Polymères de cyclodextrines	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Dérivés de polysaccharides	Dérivés de type : Carbamate Triacétate Benzoate	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Sélecteurs de type échange de ligand	Complexes : cation-dérivés de valine cation-dérivés de proline cation-dérivés de phénylalanine	CLHP, CPG, CPS, EC, CCM	A/P
Synthétiques	Polymères	Polymères à empreinte moléculaire	CLHP, CPG, CPS, CCM, EC, ECC	A/P
	Polymères hélicoïdaux	Polyacrylamide polyméthacrylate polyacrylate	CLHP, CPS, EC	A/P
	Oligonucléotides	Aptamères en série ARN Aptamères en série ADN	CLHP	A

Tableau 1 : Classification de certains sélecteurs chiraux selon leur source et leur application.

*A : analytique ** P : préparative

Toutefois, pour qu'un sélecteur chiral soit efficace, il doit satisfaire aux conditions suivantes :

- (a) Il doit posséder suffisamment de groupes, d'atomes et de cavités pour lui permettre de former des complexes diastéréoisomères avec les énantiomères du soluté.
- (b) Il doit être soluble et chimiquement stable dans la phase mobile ou dans le tampon de migration s'il est utilisé en tant qu'additif.

- (c) Il ne doit pas interférer avec la détection des analytes s'il est utilisé comme additif.
- (d) Il doit être commercialement disponible (ou facilement synthétisable ou « extractible ») et peu coûteux.

Le premier modèle de reconnaissance chirale a été proposé par Dalglish [61]. Il suppose, d'une part, l'existence d'interactions (liaisons hydrogène, interaction de type π - π , interactions dipôle-dipôle, etc.) entre soluté et sélecteur et, d'autre part, un minimum de trois points d'interaction entre ces deux protagonistes. Si le sélecteur interagit avec trois groupements fonctionnels différents au voisinage du centre d'asymétrie du soluté, il sera capable de différencier les deux énantiomères : un énantiomère maintient trois interactions avec le sélecteur tandis que l'autre énantiomère n'interagit qu'avec deux groupements du sélecteur (**Figure 16**) [62]. De plus, la meilleure énantiosélectivité sera obtenue si les trois éléments interagissants sont proches du centre de chiralité [63].

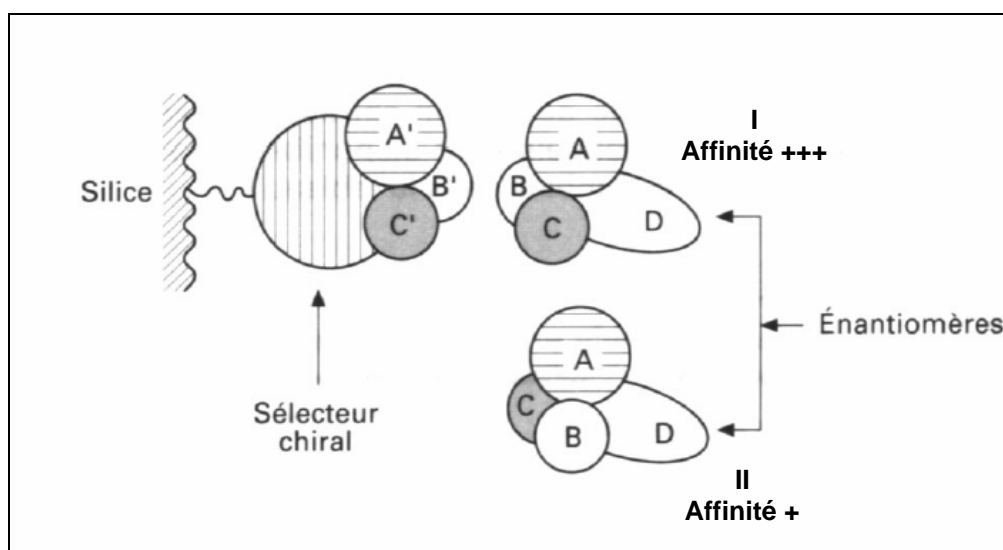


Figure 16 : Modèle de reconnaissance chirale : concept des trois points d'interaction d'après Dalglish [61].

Ce modèle a le mérite d'être simple mais malheureusement il ne peut pas expliquer le fonctionnement de tous les sélecteurs chiraux. En effet, quand la PSC est un polymère, il convient d'ajouter aux interactions classiques, un phénomène de reconnaissance qui met en jeu la géométrie globale du soluté (comparable aux processus de reconnaissance enzymatique de type clef-serrure) [61].

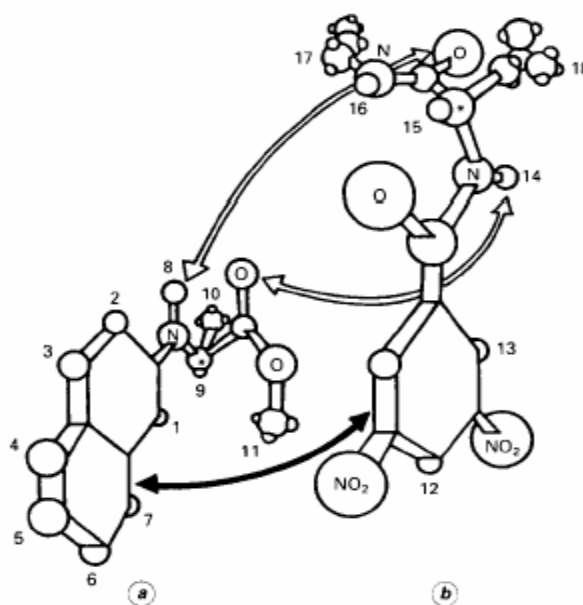
La classification des sélecteurs chiraux peut être basée aussi sur leur structure et sur les interactions mises en jeu lors du processus de la reconnaissance chirale. On peut distinguer deux types de sélecteurs chiraux : le premier type est celui des sélecteurs dits « conventionnels ». Le deuxième type est celui des sélecteurs dits « sur mesure », spécifiques d'un couple d'énantiomère donné.

IV-6-1 Les sélecteurs chiraux conventionnels :

IV-6-1-1 Les sélecteurs de type Pirkle et analogues :

IV-6-1-1-1 Les sélecteurs de type Pirkle :

Ces sélecteurs ont été développés par Pirkle et al. [64]. Ils sont constitués de dérivés de type (R) ou (S) N-3,5-dinitrobenzoyl-phénylglycine, N-3,5-dinitrobenzoyl-leucine, N-naphtyl-alanine ou N-naphtyl-valine. Tous ces sélecteurs ont en commun de posséder un noyau aromatique. Pour les dérivés de type 3,5-dinitrobenzoyl, ce noyau aromatique est à caractère accepteur (π -acide) tandis que pour les dérivés de type naphtyle, il est à caractère donneur d'électron (π -basique). Le mécanisme de reconnaissance chirale proposé par Pirkle est basé sur la formation de diastéréoisomères de stabilité différente entre soluté et sélecteur chiral, mettant en jeu une interaction de type π - π (transfert de charge), des interactions par formation de liaison hydrogène et /ou empilement de dipôles (**Figure 17**) [42, 60].



On considère une interaction π - π entre les noyaux aromatiques, une liaison hydrogène entre l'atome d'hydrogène du groupement dinitrobenzamide H14 de (b) et l'oxygène du carbonyle de (a), et une seconde liaison hydrogène entre l'hydrogène amidique de (a) et l'oxygène du carbonyle terminal de (b). La numérotation des protons se réfère aux données de la RMN ^1H .

Figure 17 : Modèle de reconnaissance chirale montrant l'établissement de trois interactions concomitantes entre le (S) N-2-naphtyl-alaninate de méthyle (a) et le (S) N-3,5-dinitrobenzoyl-leucine N-propylamide (b) [60].*

** Il est à noter que le modèle de reconnaissance chirale proposé par les auteurs dans cette figure n'est pas correcte, à notre avis, car deux interactions entre le soluté et le sélecteur chirale sont représentées sur un même motif fixé au carbone asymétrique.*

Bien que récemment utilisés comme additifs chiraux en électrophorèse capillaire [65], les sélecteurs chiraux de type Pirkle sont généralement utilisés comme phases stationnaires en chromatographie liquide. Ces phases stationnaires chirales sont classiquement utilisées en phase normale (mélanges d'hexane et d'alcool).

Bien que certains médicaments aient été séparés directement sur ce genre de PSC, la dérivation du soluté est souvent nécessaire car ces phases imposent des caractéristiques structurales strictes. Les amines sont alors converties en amides ou en carbamates et les fonctions carboxyliques en esters ou en amides. De plus, pour optimiser les interactions π - π entre PSC et soluté chiral, les réactifs de dérivation contiennent des groupements naphthyle ou 3,5-dinitrobenzoyle, selon la phase utilisée [42]. Le nombre de composés chiraux pouvant être séparés sur de telles phases est très important. Citons par exemple les alcools aminés [66, 67], les acides aminés [67], un grand nombre de β -bloquants [68, 69], les sulfoxides [65], etc.

IV-6-1-1-2 Les sélecteurs basés sur la formation de liaisons hydrogène :

Des sélecteurs semblables à ceux développés par l'équipe de Pirkle ont été conçus par Dobashi et al. [70]. La différence fondamentale entre ces sélecteurs et les sélecteurs de type Pirkle réside dans le fait qu'ils ne possèdent pas de noyau aromatique mais généralement deux fonctions de type amide. Ces groupements présentent la caractéristique d'être simultanément donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène.

IV-6-1-2 Les homopolymères à cavités :

Cette classe rassemble différents sélecteurs qui font intervenir un phénomène d'inclusion de la molécule chirale dans les cavités du sélecteur. Les principaux sélecteurs chiraux employés sont les cyclodextrines, les dérivés de la cellulose ou de l'amylose, les éthers couronnes et les polymères synthétiques.

IV-6-1-2-1 Les cyclodextrines :

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides de structure cyclique obtenus à partir du maïs. Ils sont constitués de plusieurs unités de D-glucose (glucopyranose), en conformation chaise, liées par des liaisons α -1,4. Les cyclodextrines naturelles α , β et γ comportent respectivement 6, 7 et 8 unités de glucose. L'arrangement spatial des unités de glucose donne à la molécule une forme toroïdale conique. Les groupes hydroxyles secondaires sont localisés du côté le plus ouvert tandis que les groupes hydroxyles primaires sont du côté le plus étroit.

Cette disposition des groupes -OH confère à l'extérieur de la molécule un caractère hydrophile tandis que les groupes -CH-, localisés à l'intérieur de la cavité, déterminent le caractère hydrophobe de la cyclodextrine (**Figure 18**) [71].

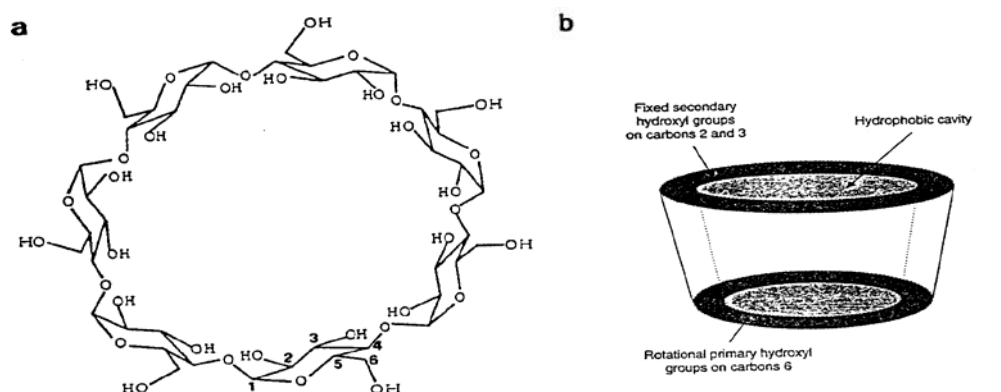


Figure 18 : Structure de la β -cyclodextrine (a) et représentation de la cyclodextrine dans l'espace (b) [72].

Une des propriétés remarquables des cyclodextrines est leur aptitude à former des complexes d'inclusion (**Figure 19**) avec une grande variété de molécules [73, 74]. La stabilité de ces complexes d'inclusion est déterminée par les caractéristiques moléculaires de la molécule invitée et est contrôlée par plusieurs phénomènes notamment l'effet hydrophobe, les liaisons hydrogène et les interactions de Van Der Waals.

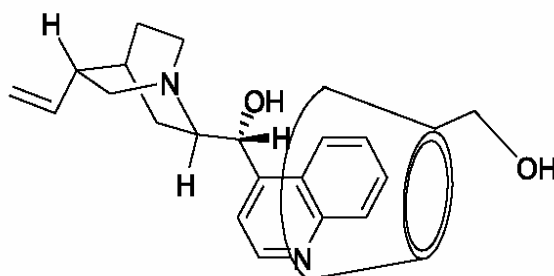


Figure 19 : Modèle d'un complexe d'inclusion entre la cinchonine et la β -cyclodextrine [75].

Les cyclodextrines ont été utilisées dans le domaine de la séparation chirale à partir de 1980 [76]. A présent, leur utilisation en chromatographie (CLHP, CPG, CPS et CCM) et en électrophorèse capillaire (EC et ECC) est devenue très courante [77 - 81]. Elles sont utilisées comme phases stationnaires [82, 83] ou comme additifs de la phase mobile et du tampon de migration [77, 78, 81, 84, 85].

Les cyclodextrines natives présentent certains inconvénients tels que des problèmes de solubilité et des contraintes de faible interaction avec l'analyte. La β -cyclodextrine, qui est la cyclodextrine la plus utilisée (elle représente 95% des cyclodextrines utilisées) a une faible

solubilité dans l'eau ($C_{\text{sat}} = 1,6 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ [86]). L'ajout de solvants organiques (tels que l'acétonitrile ou le DMSO) [87] ou l'urée [88] dans le milieu aqueux (phase mobile ou tampon de migration) permet d'accroître la concentration de cyclodextrine dans l'éluant ou le tampon de migration. Une autre alternative est l'utilisation d'une cyclodextrine modifiée. Les cyclodextrines natives ont été modifiées par substitution de l'atome d'hydrogène du groupe hydroxyle [89] par divers groupements (alkyle, hydroxyalkyle, diméthylphenylcarbamate, amino, thio, sulfate, sulfoalkyle, glucosyle, maltosyle, méthyle, hydroxyethyle, hydroxypropyle, acétyle, etc.) [90]. Ces cyclodextrines modifiées sont employées en tant qu'additifs de phase mobile et de tampon de migration ou comme phases stationnaires chirales. Les phases stationnaires cyclodextrines natives et modifiées sont utilisées en polarité de phase normale, en polarité de phase inversée, ou encore en mode organique polaire [90].

Parmi les nombreuses molécules qui ont été résolues avec les cyclodextrines, citons sans être exhaustif les benzodiazépines [91], les dérivés d'imidazole [92], les β -bloquants [84] [93], les anti-inflammatoires non stéroïdiens [94], la warfarine [84, 95], les alcaloïdes [96], les barbituriques [97], les dérivés d'acides aminés [98], etc.

IV-6-1-2-2 Les éthers couronnes :

Les éthers couronnes sont des macrocycliques répétant l'unité $(-X-C_2H_4-)$, X correspondant à un hétéroatome tel que l'oxygène, le soufre ou l'azote. Ces éthers cycliques ont été synthétisés pour la première fois par Pedersen [99]. L'utilisation d'un éther couronne comme sélecteur chirale en chromatographie et en électrophorèse capillaire a été rapportée dans la littérature [100 - 102].

Le mécanisme de reconnaissance chirale repose sur la formation de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques entre une fonction aminée du composé chirale et les hétéroatomes de l'éther couronne (**Figure 20**). Les interactions secondaires entre les groupes carboxyliques de l'éther couronne et des groupes situés à proximité du centre chirale de l'analyte sont essentielles pour la reconnaissance chirale [100].

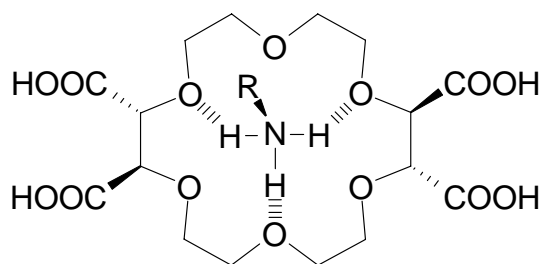


Figure 20 : Modèle d'un complexe entre une amine primaire et un éther couronne tétracarboxylé [80].

Les phases mobiles ou tampons de migration préconisés sont généralement constitués de solutions aqueuses d'acide perchlorique (pH = 1-2). Une faible quantité de méthanol est parfois ajoutée.

Les éthers couronnes ont été utilisés avec succès pour la reconnaissance chirale des amines aromatiques (1-naphthyl-ethyl-amine, 1-phényl-ethyl-amine, etc.) et des amino-alcools (norephedrine, noradrenaline, 2-amino-1,2-diphenyl-éthanol) [103]. Cependant, la séparation des acides aminés et dérivés constitue la cible majeure de ce sélecteur [80].

IV-6-1-2-3 Les polymères synthétiques :

Ce type de sélecteur chirale a été introduit par Blaschke et al. [104, 105]. Il est préparé par polymérisation de monomères chiraux. Il représente une classe intéressante de part ses propriétés stéréosélectives dues à la structure hélicoïdale particulière du polymère et aux cavités asymétriques. L'inclusion des énantiomères dans ces cavités constituerait le mécanisme principal de la reconnaissance chirale [106, 107]. Les chaînes polymériques elles-mêmes possèdent de multiples centres chiraux, provenant des monomères, qui interviennent également dans la discrimination chirale [108 - 110].

De nombreux polymères d'origine synthétique ont été utilisés en tant que sélecteurs chiraux. Citons les molécules de polyméthacrylate, de polyacrylamide, de polyméthacrylamide et les dérivés du polystyrène, du polyoléfine, d'éther de polyvinyle, du polychlorure, du polyisocyanide, du polyacétylène, du polyéther, du polyamide, du polyuréthane, etc. [111].

Ces sélecteurs chiraux ont été principalement utilisés comme phases stationnaires en chromatographie. Leur utilisation à l'échelle préparative connaît un grand succès [105]. Plus de 200 composés chiraux ont été résolus sur ce type de sélecteur chirale [112, 113]. Citons à titre d'exemple la nilvadipine [114], les dérivés de prostaglandines [115], les dérivés de calixarènes [116] et le thalidomide [117].

IV-6-1-2-4 Les polysaccharides :

Les polysaccharides tels que la cellulose et l'amylose possèdent un fort potentiel d'application en séparation chirale. En effet, ces polysaccharides ont une structure hélicoïdale asymétrique composée de n unités de D-(+)-glucose reliées par des ponts β (1-4) pour la cellulose et par des ponts α (1-4) pour l'amylose. Chacune de ces unités contribue à la reconnaissance chirale des solutés avec lesquels elle interagit.

Les résolutions obtenues par ces deux polymères naturels sont généralement faibles. Afin d'améliorer leur énantiosélectivité, la cellulose et l'amylose ont été modifiées par dérivation des fonctions -OH libres (**Figure 21**).

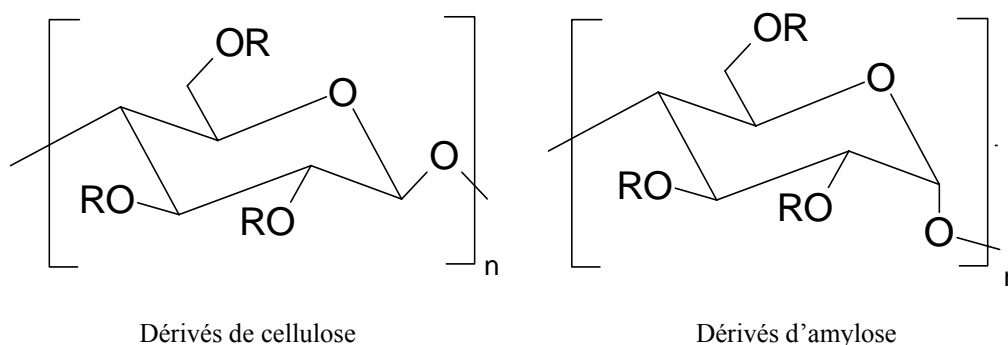


Figure 21 : Structure chimique de dérivés de la cellulose et de l'amylose.

La dérivation de ces groupements -OH permet à la fois de conserver la structure hélicoïdale de la molécule et de favoriser l'apparition de cavités chirales capables d'inclure stéréosélectivement des molécules. La reconnaissance de ces molécules implique donc des phénomènes d'inclusion, des interactions de type π - π , des liaisons hydrogène, des interactions dipôle-dipôle et des interactions électrostatiques [118 - 120].

Certains des polysaccharides modifiés tels que les dérivés de la cellulose carboxyméthylés, méthylés et hydroxypropylés, ont été utilisés récemment en électrophorèse capillaire en tant qu'additif chiral dans le tampon de migration [121, 118, 122]. Mais généralement, les dérivés polysaccharidiques sont utilisés, avec un grand succès, en tant que phase stationnaire en chromatographie liquide haute performance [123 - 125]. Les phases stationnaires cellulosiques ou amylosiques sont utilisées en polarité de phase normale ou inversée [120, 126].

Le domaine d'application des sélecteurs chiraux composés de dérivés de cellulose ou d'amylose est un des plus vastes. En effet, de nombreux médicaments chiraux à caractère acide, neutre ou basique, présentant un noyau aromatique et un groupement polaire (carbonyle, hydroxyle, sulfoxyde, nitrile, etc.) près du centre d'asymétrie, ont été résolus sur ce type de sélecteur chiral. Citons, sans être exhaustif, les alcaloïdes, les dérivés atropiniques, les β -bloquants, les anti-histaminiques, les anti-inflammatoires, etc. [106, 127, 128].

De plus, ces sélecteurs chiraux sont très utilisés à l'échelle préparative, car ils sont obtenus en grandes quantités à partir de leurs sources naturelles et possèdent une capacité de fixation des solutés très importante [128].

IV-6-1-3 Les sélecteurs chiraux faisant intervenir l'échange de ligands :

Le principe et l'application d'échange de ligands en séparation chirale, ainsi que les différents sélecteurs chiraux utilisés, en chromatographie et en électrophorèse capillaire, seront développés dans le **chapitre VI**.

IV-6-1-4 Les protéines :

De nombreuses protéines ont été utilisées en séparation chirale. Citons notamment l'albumine humaine [129, 130], l'albumine bovine [131, 132], les glycoprotéines telles que l' α_1 -glycoprotéine acide [133], l'ovomucoïde du blanc d'œuf du poulet [134], l'ovoglycoprotéine du blanc d'œuf du poulet [134], l'avidine [135], la flavoprotéine [136], l'ovotransferrine (ou conalbumine) [137] et la β -lactoglobuline [138], les enzymes comme la trypsine [135], l' α -chymotrypsine [135], la cellobiohydrolase I (CBHI) [135], la cellulase [135], la pepsine [139], le lysozyme [140].

Ces protéines ont été principalement utilisées en tant que phase stationnaire en chromatographie liquide haute performance (CLHP). Elles sont très peu utilisées comme additifs chiraux dans la phase mobile [141]. Toutefois, la plupart de ces protéines sont utilisées comme sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire ou en tant que sélecteurs immobilisés en électrochromatographie [142].

Les propriétés énantiosélectives des protéines varient d'une protéine à l'autre. En effet, les mécanismes de reconnaissance chirale semblent être dus à la structure particulière de la protéine (structure tertiaire, en feuilletts plissés, etc.) et à la formation de cavités capables de reconnaître des molécules chirales. Des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène et l'effet hydrophobe semblent en général être impliqués dans l'association stéréosélective [135].

Les phases mobiles et les tampons de migration habituellement utilisés avec un sélecteur protéique sont composés d'une solution aqueuse tamponnée, additionnée d'un solvant organique polaire (éthanol, méthanol, acétonitrile, etc.) [143]. L'addition d'un solvant chargé (anionique ou cationique) comme le bromure de tétrapropylammonium ou la N,N-diméthyl-octylamine influence l'énantiosélectivité des solutés et a également donné lieu à des résolutions spectaculaires [142, 144].

Les sélecteurs chiraux protéiques présentent un large éventail de résolution de mélanges racémiques. Ainsi, des énantiomères de médicaments acides, neutres ou basiques ont été séparés sur les différents sélecteurs protéiques utilisés en chromatographie liquide haute performance ou en électrophorèse capillaire. Citons notamment les énantiomères du propranolol [145], de l'aténolol [146], de l'ibuprofène [147] ou de la warfarine [148].

IV-6-1-5 Les sélecteurs chiraux à base d'antibiotiques macrocycliques :

L'utilisation d'antibiotiques macrocycliques en tant que sélecteurs chiraux a été introduite par Armstrong et al. en 1994 [149, 150]. Depuis, ces sélecteurs ont été utilisés en CLHP, CCM, CPG, CPS, EC et ECC. Ils sont utilisés en tant qu'additifs chiraux dans les phases mobiles ou les tampons de migration et comme phases stationnaires [80, 151, 152, 153, 154].

Les antibiotiques macrocycliques les plus utilisés sont les glycopeptides (vancomycine et dérivés, ristocétine A, teicoplanine et dérivés, avopracine et plus récemment eremomycine [325]), les ansamycines (rifamicine B et rifamicine SV) et un polypeptide aminoglycosidique tel que le thiostrepton [151].

Les antibiotiques macrocycliques possèdent plusieurs centres stéréogéniques, des cavités d'inclusion et des groupes ionisables tels que les groupes de type amino, aminosaccharide, carboxylique et phénol [153]. Ces molécules ont des masses moléculaires comprises entre 600 et 2200. Certaines ont des absorbances dans le domaine UV élevées et d'autres ont des absorbances beaucoup plus faibles [150, 151].

Les mécanismes de reconnaissance chirale des antibiotiques macrocycliques ne sont pas clairement élucidés. Ils semblent être basés sur un phénomène d'inclusion, des interactions dipôle-dipôle et de type π - π , des liaisons hydrogène ainsi que sur la répulsion stérique [155, 156]. Une des interactions les plus importantes semble être d'origine électrostatique [157, 158]. Ces sélecteurs peuvent interagir énantiosélectivement avec un grand nombre de solutés de structure différente [150, 155, 156 - 162].

Les propriétés des sélecteurs d'antibiotiques macrocycliques se rapprochent de celles des sélecteurs chiraux de type cyclodextrine par le rôle des cavités hydrophobes et de celles des sélecteurs chiraux de type protéine par les interactions mises en jeu. Ils présentent néanmoins une meilleure capacité de fixation et une plus grande stabilité que les protéines [151]. Les phases stationnaires chirales à base d'antibiotiques macrocycliques peuvent être indifféremment utilisées en polarité de phase normale ou inversée. Il est même possible d'utiliser des phases mobiles relativement polaires, composées de mélanges purement

organiques [150, 151]. Les sélecteurs chiraux de type antibiotiques macrocycliques peuvent être utilisés à l'échelle préparative [151].

Parmi les racémiques qui ont été résolus au moyen de ces PSCs de type antibiotiques macrocycliques, citons la warfarine [161], le coumachlor [162], le derinol [162], les anti-inflammatoires non stéroïdiens [150, 162], les acides aminés et leurs dérivés [160], l'althiazide [160], l'oxprenolol [150, 158], le propranolol [158], etc.

Nous étudierons en détails la structure, les différents paramètres et mécanismes responsables de la reconnaissance chirale de sélecteurs chiraux de type teicoplanine et dérivés qui font l'objet de l'étude d'une partie de notre travail (cf. chapitre V).

IV-6-2 Les sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère cible pré-désigné :

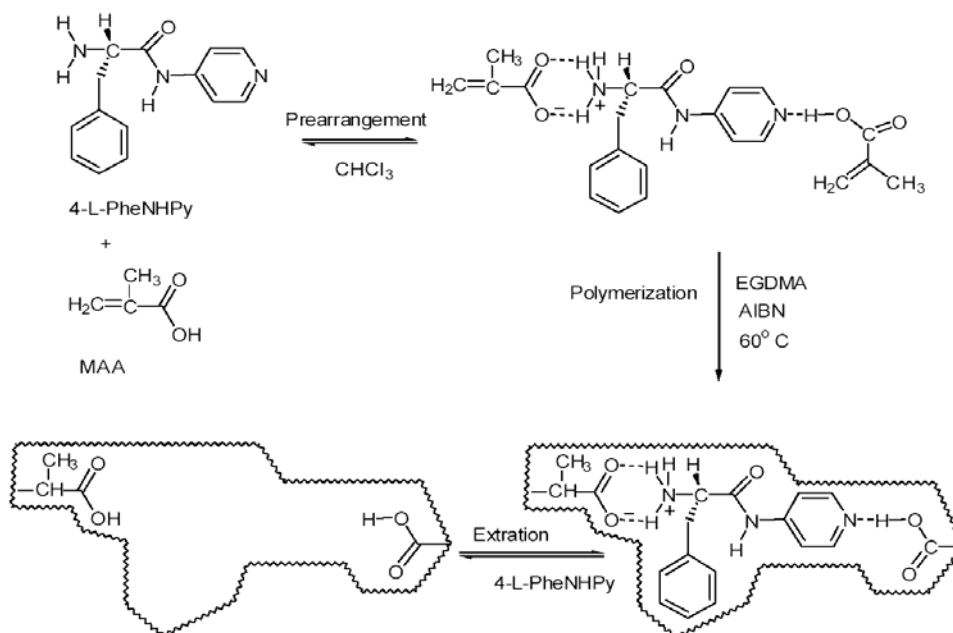
Les sélecteurs conventionnels ne sont pas dirigés spécifiquement contre une cible pré-désignée. Ceci oblige à faire un screening des sélecteurs disponibles afin de développer une méthode de séparation de deux énantiomères. D'autre part, l'ordre d'élution des énantiomères n'est pas défini a priori. Des recherches ont été menées dans le but de développer des sélecteurs chiraux, spécifiques d'un énantiomère cible prédéterminé.

Dans cette optique, trois stratégies ont été étudiées : la formation de polymères à empreinte moléculaire, le développement d'anticorps et l'approche combinatoire.

IV-6-2-1 Les sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire :

L'empreinte moléculaire constitue une technique très efficace pour créer des polymères synthétiques doués d'une forte capacité de reconnaissance chirale pour une molécule donnée [163 - 165].

L'empreinte moléculaire est un procédé qui permet à des monomères fonctionnels de s'auto-assembler autour d'une molécule cible. La molécule cible est ainsi insérée dans un polymère, en trois dimensions. Elle est ensuite extraite laissant derrière elle un matériau qui possède des cavités dans lesquelles les molécules cibles peuvent venir s'imbriquer, à la manière d'une sculpture et de son moule (**Figure 22**). L'empreinte fonctionne comme un cadenas qui n'est compatible qu'avec la bonne combinaison.



MAA : acide méthacrylique, EGDMA : éthylène glycol diméthacrylate, AIBN : 2,2-azobisisobutyronitrile

Figure 22 : Procédure de préparation du polymère à empreinte dirigé contre la 4-L-phénylalaninylamino-pyridine (4-L-PheNHPy) [166].

Les monomères fonctionnels (acide méthacrylique, acide trifluorométhyle acrylique, vinylpyridine, méthacrylamide et même une combinaison de ces monomères [167]) sont choisis en fonction de leur capacité à mettre en jeu des liaisons covalentes ou non covalentes avec la molécule cible. Généralement, les liaisons non covalentes de type liaisons hydrogène ou interactions électrostatiques sont les plus utilisées [168].

Ces polymères sont faciles à préparer, peu coûteux et possèdent une excellente stabilité chimique, physique et mécanique. Ils résistent à des températures et des pressions élevées et sont inertes envers les acides, les bases, les ions métalliques et les solvants organiques [169].

De ce fait, les sélecteurs à empreinte moléculaire ont été utilisés comme phases stationnaires en chromatographie et en électrochromatographie [168, 170, 171]. Ainsi, Suedee et al. [172] ont utilisé la (-)-norphédrine pour préparer un polymère à empreinte moléculaire pour la séparation des énantiomères par CCM. König et al. [173] ont synthétisé une phase stationnaire à empreinte moléculaire capable de séparer également ces énantiomères en CPG.

Plusieurs applications de séparation chirale en CLHP ont été rapportées [171, 174, 175]. Généralement, ces phases stationnaires utilisent des phases mobiles peu polaires étant donné que le mécanisme de reconnaissance est essentiellement basé sur la formation de liaisons hydrogène entre le polymère à empreinte moléculaire et les parties polaires de la

molécule [169]. Toutefois, quand la sélectivité dépend de l'effet hydrophobe, les phases mobiles aqueuses sont recommandées [176, 177].

L'utilisation de ce type de sélecteur en CLHP est toutefois limitée par la faible efficacité chromatographique (pic asymétrique, faible capacité) du fait d'une population hétérogène des sites d'interaction et de l'irrégularité des particules de phase stationnaire. De meilleurs résultats sont observés en utilisant les sélecteurs à empreinte moléculaire en électrochromatographie [167] ou comme additifs dans le tampon de migration en électrophorèses capillaire (EC) [178].

Les sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire ont permis de séparer notamment les énantiomères de dérivés d'acides aminés [179], de peptides [180], de β -bloquants [181], d'anti-inflammatoires non stéroïdiens [182] et d'antibiotiques [183].

IV-6-2-2 Les anticorps énantiosélectifs :

Les anticorps sont des molécules complexes, appartenant à la famille des immunoglobulines (Ig), communes à tous les vertébrés. Les anticorps ont une seule fonction : reconnaître et se fixer de façon spécifique à une molécule appelée antigène. Ainsi, les anticorps reconnaissent une zone précise sur l'antigène, nommée épitope [184]. Les mécanismes de reconnaissance biologique des anticorps présagent de leur capacité à reconnaître sélectivement les énantiomères de substances chirales.

L'utilisation des anticorps comme sélecteurs chiraux pour la résolution des racémiques en CLHP a été rapportée récemment. Les anticorps sont utilisés comme phases stationnaires [185 - 187]. L'association anticorps-analyte semble être basée sur des interactions électrostatiques, l'effet hydrophobe, des liaisons hydrogène et des interactions de Van Der Waals [188]. Les phases stationnaires chirales à base d'anticorps sont utilisées en polarité de phase inversée. Une concentration assez élevée de solvants organiques risque d'entraîner la dénaturation des anticorps [185].

Ce type de sélecteur peut permettre de résoudre diverses molécules chirales, y compris des médicaments [189]. Toutefois, il présente trois grands inconvénients. D'abord, les anticorps spécifiques à un énantiomère donné sont obtenus dans des systèmes *in vivo*, d'où une mauvaise reproductibilité d'obtention. De plus, les capacités d'immobilisation sur support chromatographique sont limitées à cause de la taille importante des anticorps. Enfin, et en règle générale, les petites molécules sont faiblement immunogéniques [190].

IV-6-2-3 L'approche combinatoire :

IV-6-2-3-1 Les sélecteurs à faible masse moléculaire :

L'évolution dans la conception et la synthèse de nouveaux sélecteurs chiraux a conduit à l'apparition des sélecteurs chiraux à faible masse moléculaire, appartenant à la famille des acides aminés, des peptides, des acides coliques ou des alcaloïdes et possédant des propriétés énantiosélectives très élevées [191]. En parallèle, et afin de développer de nouveaux sélecteurs chiraux à cible prédéterminée, des recherches basées sur la stratégie combinatoire ont été effectuées et semblent être très prometteuses. Cette stratégie a été appliquée selon différentes approches, en utilisant des méthodes rapides.

La première approche applique le principe de réciprocité introduit par Pirkle et al. [192]. Un énantiomère du racémique cible est fixé sur un support chromatographique. Un « screening » est ensuite effectué portant sur une banque de composés racémiques à faibles masses moléculaires et susceptibles d'être séparés sur cette phase stationnaire. Le racémique le mieux résolu est alors préparé sous une forme énantiomériquement pure et fixé par la suite sur un support chromatographique (Figure 23). La phase stationnaire ainsi obtenue permet alors une très bonne résolution du racémique cible [193].

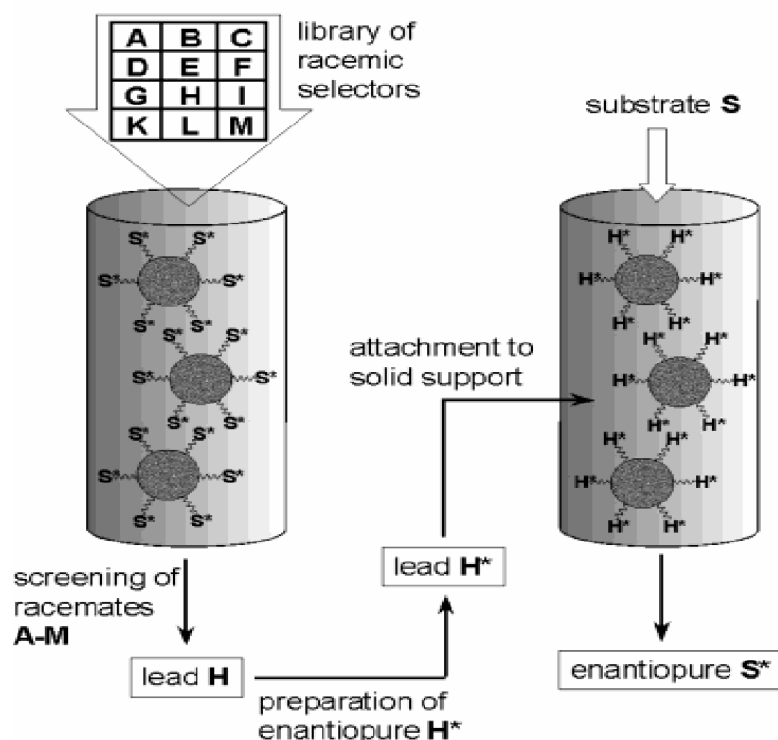


Figure 23 : Concept de criblage réciproque pour l'identification d'un sélecteur spécifique pour la préparation d'une phase stationnaire chirale [193].

De nombreux travaux ont été effectués en suivant cette approche. Par exemple, à partir d'une banque de dihydropyrimidines, Lewandowski et al. [194] ont identifié le sélecteur chiral optimal capable de séparer des acides aminés dérivés.

Une deuxième approche combinatoire consiste à faire appel à une large bibliothèque de sélecteurs chiraux potentiels, énantiomériquement purs. Tous ces sélecteurs sont fixés sur un support chromatographique et testés par un protocole de criblage pour évaluer la séparation des énantiomères de l'analyte cible. Des sous-banques de colonnes contenant les sélecteurs chiraux les plus énantiosélectifs de la colonne, sont ensuite préparés afin d'identifier le sélecteur optimal (**Figure 24**). Cette approche possède l'avantage du « parallélisme » : le nombre de colonnes à évaluer au cours du processus de l'identification du meilleur sélecteur est largement plus faible que le nombre total de sélecteurs de la banque [195].

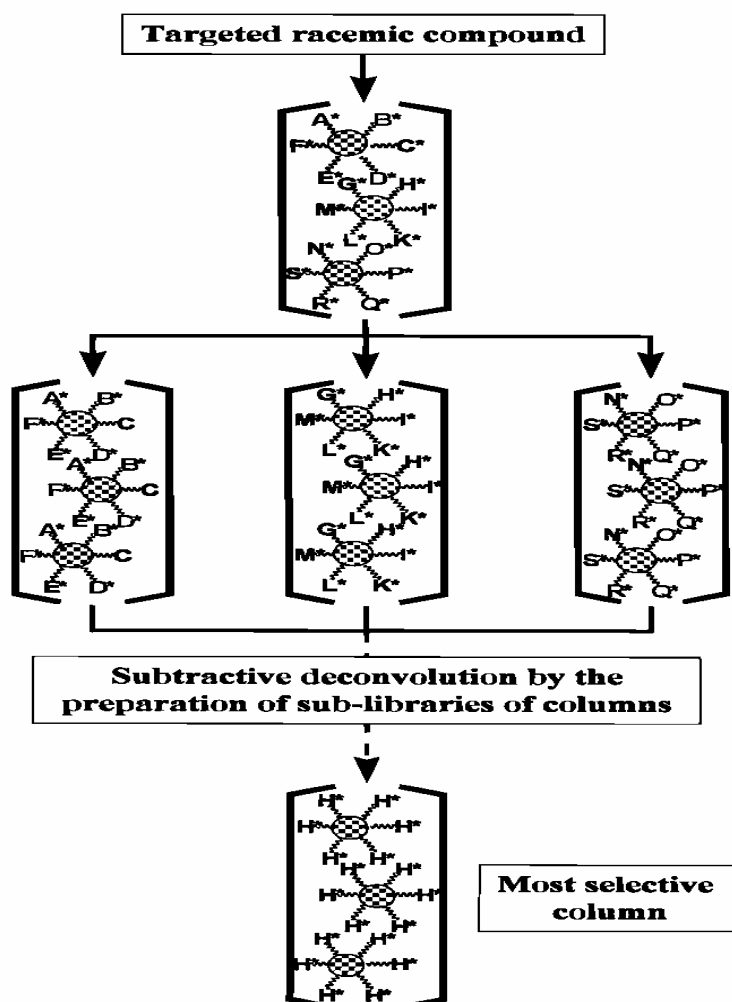


Figure 24 : Concept de criblage en greffant une large bibliothèque de sélecteurs potentiels [174].

En suivant cette approche, Welch et al. [196, 197] ont synthétisé une large banque de dérivés d'oligopeptides dinitrobenzoylés qu'ils ont fixés sur un support chromatographique afin d'identifier les sélecteurs spécifiques d'analytes à caractère π -basique. De même, Chiari et al. [198] ont utilisé une banque contenant plus de 8000 cyclohexapeptides comme sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire afin de séparer les dérivés des acides aminés.

Enfin, une troisième approche combinatoire élégante a été présentée par Weingarten et al. [199]. Cette approche est basée sur la préparation d'un support solide contenant 60 membres d'une banque d'amines chirales, qui sont principalement des macrocycles, des diamines et différents acides aminés (**Figure 25**). Le protocole de criblage pour évaluer les propriétés énantiosélectives de sélecteurs chiraux s'effectue en incubant ce support avec l'analyte cible, dont les deux énantiomères sont marqués par des chromophores absorbant dans le visible à des longueurs d'ondes différentes. L'association énantiosélective entre l'analyte et les sélecteurs peut donc être observée visuellement pour chaque énantiomère. Ainsi, les molécules les plus intensivement colorées sont identifiées en tant que sélecteurs chiraux prometteurs, spécifiques du composé cible [22]. Cette approche a été appliquée par ces auteurs pour identifier les sélecteurs spécifiques d'esters d'acides aminés [199].

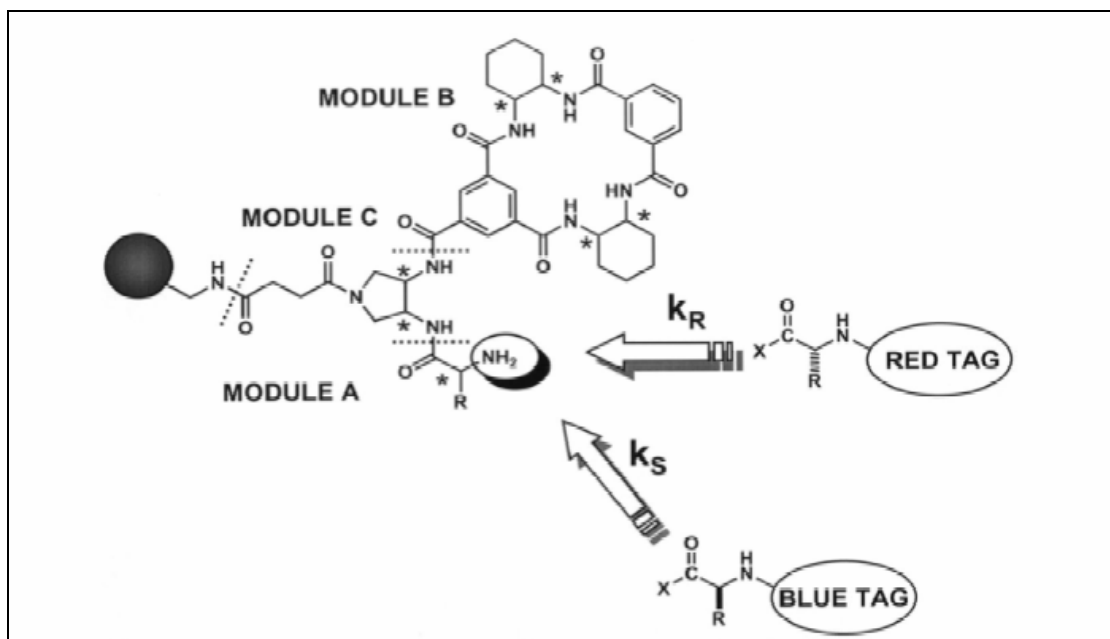


Figure 25 : Approche combinatoire par inspection visuelle [22].

Le développement des phases stationnaires chirales à base de sélecteurs à faible masse moléculaire est en plein essor. Elles peuvent être utilisées à l'échelle analytique et préparative en électrophorèse capillaire et en chromatographie liquide [195].

IV-2-5-2-3-2 Les aptamères énantiosélectifs :

Les aptamères sont des oligonucléotides, souvent simple-brin, en série ADN ou ARN. Ils sont produits en général par synthèse chimique, avec une bonne reproductibilité et un degré de pureté élevé et sont caractérisés par une forte affinité et spécificité vis à vis d'une cible prédéfinie. Cette spécificité découle de la méthode de sélection utilisée (méthode SELEX : Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment) (**Figure 26**) [200].

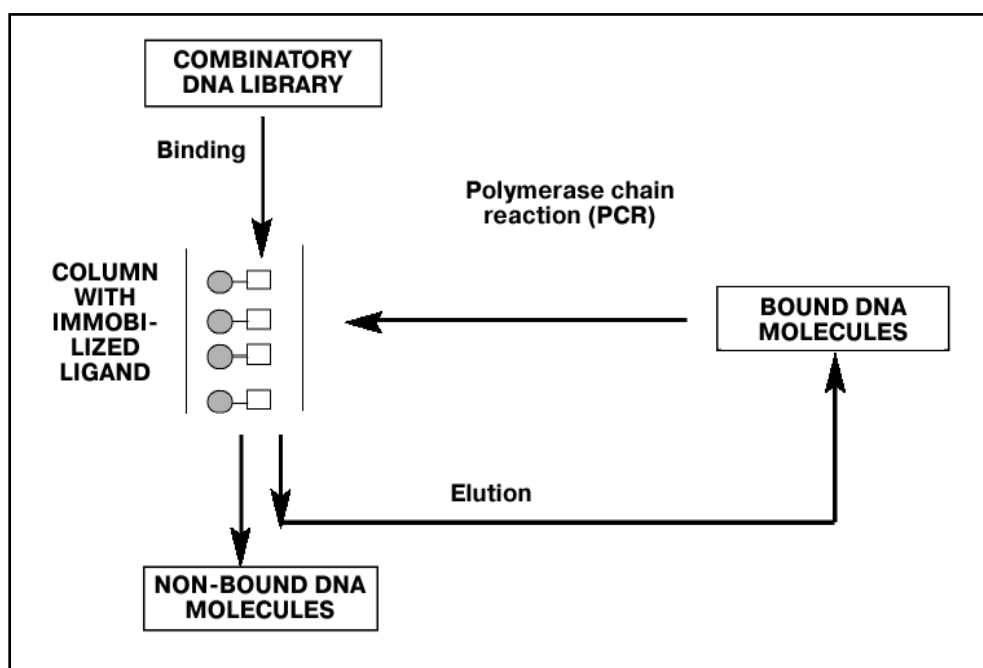


Figure 26 : Méthode SELEX [200].

Les aptamères en série ARN ou ADN présentent la particularité de pouvoir se fixer à de très nombreuses classes d'espèces : les ions métalliques [201], les colorants organiques [202], les peptides [203], les protéines [204], les acides aminés [205], les nucléotides [206] ou encore les médicaments [207].

Pour les composés chiraux, un contrôle efficace de la technique de sélection de l'aptamère aboutit à une forte stéréospécificité, ce qui permet à l'aptamère de reconnaître énantiosélectivement sa cible [208].

Grâce à la sélectivité et l'affinité de ces aptamères pour leur énantiomère cible, ils ont récemment été utilisés en tant que sélecteurs chiraux pour la séparation d'énantiomères en CLHP [209, 210].

Les phases stationnaires ont été préparées en fixant l'aptamère biotinylé en 5' sur un support chromatographique streptavidine. Les phases stationnaires aptamères ont des

propriétés intéressantes. En effet, l'énantiosélectivité est supérieure à celle obtenue avec les sélecteurs chiraux à empreinte et équivalente à celle observée avec les anticorps monoclonaux stéréosélectifs. De plus, les colonnes contenant des sélecteurs chiraux aptamères en série ADN montrent une stabilité satisfaisante sur une longue période. Ces phases stationnaires ne sont utilisées qu'en polarité de phase inversée, les éluants en polarité de phase normale risquant d'altérer les oligonucléotides. Les mécanismes d'interaction de ce type de phases stationnaires semble être basé sur des interactions électrostatiques, un effet hydrophobe et un changement conformationnel [209, 210].

Les aptamères en série ADN ont été utilisés avec succès pour la séparation énantiomérique de la vasopressine (oligopeptide) [209], de l'adénosine (nucléoside) et du tyrosinamide (dérivé d'acide aminé) [210].

Plus récemment, des aptamères en série ARN ont été utilisés aussi pour séparer les énantiomères de l'arginine [211], de l'histidine [224] et du tryptophane [212]. De plus, les énantiomères de la tyrosine et ses analogues (11 paires énantiomériques) ont été séparés également en utilisant un aptamère L-ARN anti D-tyrosine immobilisé comme PSC. Il s'est avéré que les groupements carboxyle et amine ainsi que la chaîne latérale aromatique de l'acide aminé contrôlent la reconnaissance stéréospécifique. Il a été montré que l'aptamère ARN immobilisé pouvait être employé avec une phase mobile hydroorganique sans qu'il y ait un changement de sa stabilité [212].

Afin d'obtenir des PSCs aptamères en série ARN résistantes à la dégradation enzymatique par les RNases, l'approche « image dans le miroir » a été évaluée. L'utilisation de L-ARN immobilisé sur le support chromatographique a permis de générer des phases stationnaires stables dans le temps pendant plus de trois mois [211].

Notre équipe a également utilisé les sélecteurs chiraux de type aptamères en électrophorèse capillaire. L'utilisation d'une méthode de remplissage partiel d'un capillaire en silice fondue a permis de séparer les énantiomères de l'arginine avec un aptamère L-ARN anti D-arginine [213]. La résolution chirale a été réalisée entre 50 et 60°C, à 15 kV.

*V- La teicoplanine et ses dérivés en
tant que sélecteurs chiraux*

V-1 Propriétés de la teicoplanine :

V-1-1 Propriétés pharmacologiques :

La teicoplanine (teicomycin), Targocid[®] (Aventis), est un glycopeptide amphotère analogue à la vancomycine, produit naturellement par *actinoplanes teichomyceticus*. Elle est active contre les bactéries aérobies et anaérobies Gram+ par l'inhibition de la synthèse des parois bactériennes en agissant sur les résidus aminés acetyl-D-alanyl-D-alanine [159]. Elle est réservée au traitement hospitalier des infections à staphylocoque résistant à la méticilline et en cas d'impossibilité d'utilisation de la vancomycine.

V-1-2 Propriétés physico – chimiques :

La teicoplanine est une poudre blanche jaune soluble dans l'eau et dans les solutions aqueuses acides. Elle est moins soluble dans les solutions à pH neutre, soluble modérément dans des solvants polaires aprotiques (DMSO, DMF). Elle est par contre insoluble dans la majorité des solvants organiques non polaires [215, 216]. Le spectre UV-visible de la teicoplanine donne une faible absorbance entre 250 et 310 nm avec un maximum vers 280 nm, au delà de 310 nm cette absorbance est négligeable [217]. Le phénomène d'aggregation de la teicoplanine influence apparemment son énantiosélectivité et son comportement dans les solutions [217]. La valeur du point isoélectrique *pI* de la teicoplanine est située entre 4.2 et 6.5. Elle a été déterminée en utilisant une solution de cet antibiotique dans un tampon phosphate à 0.1 M [217].

V-1-3 Propriétés structurales et énantiosélectives :

Cinq analogues de teicoplanine ont été identifiés; la plus utilisée est la teicoplanine A_{2.2} ayant une masse moléculaire de 1877 g/mol [218] (Figure 27).

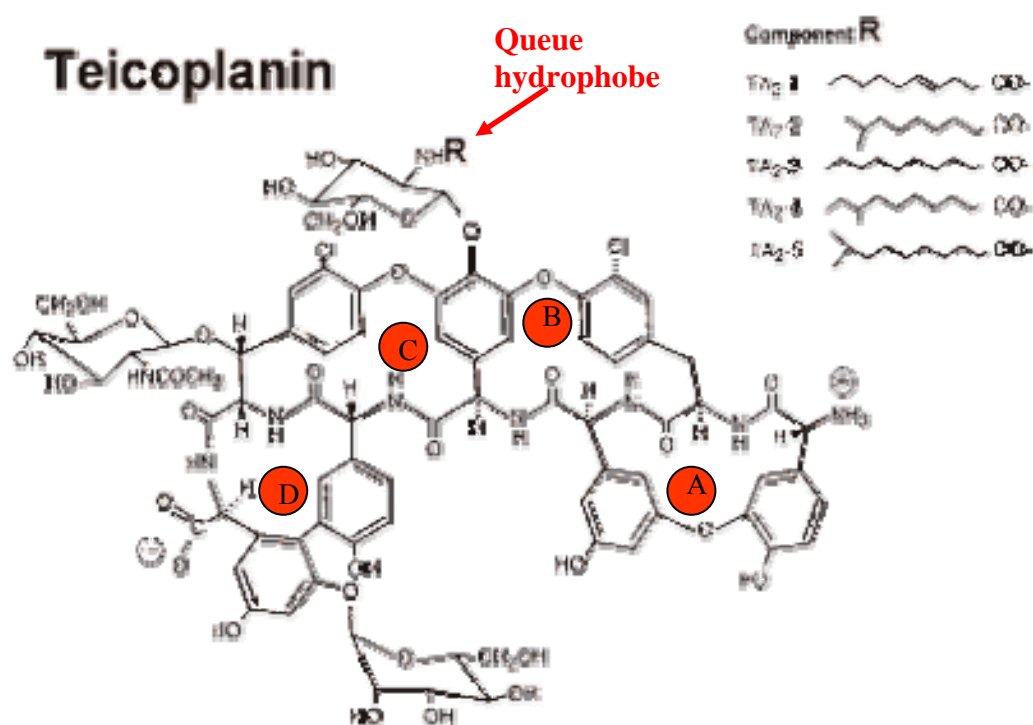


Figure 27 : Structure générale de la teicoplanine et ses cinq analogues [218].

La teicoplanine est une molécule intéressante, elle contient vingt trois centres chiraux et quatre cycles. La partie aglycone présente sept noyaux aromatiques, deux parmi eux sont monosubstitués par le chlore et quatre portent des fonctions -OH. On trouve quatorze groupements -OH en totale, huit groupements amido, un groupement carboxylique (pK ~2.5) et un autre groupement amine (pK ~9.2). La portion aglycone a la forme d'un «panier» semi rigide avec quatre macrocycles. Le centre du panier est occupé par trois unités saccharidiques constituées de D-glucosamine et de D-mannose.

La teicoplanine est le seul glycopeptide qui possède dans sa structure une chaîne hydrocarbonée C₁₁ attachée au niveau du groupement glucopyranosyl, cette chaîne lui confère un caractère plus hydrophobe par rapport aux autres glycopeptides et est responsable de la formation de micelles et de propriétés pharmacologiques spécifiques de cet antibiotique [219].

Cette complexité et ce type d'arrangement est très favorable pour un grand nombre de séparations énantiomériques via de nombreuses interactions potentielles entre le soluté et la PSC teicoplanine [220].

V-1-4 Propriétés morphologiques :

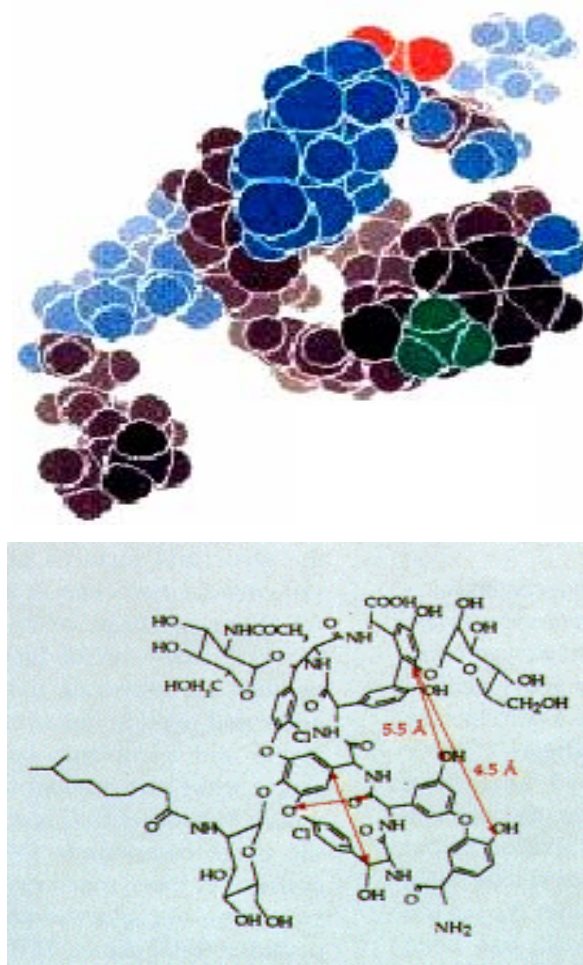


Figure 28 : Modèle tridimensionnel de la teicoplanine proposé par Gasper et al. [217].

La structure tridimensionnelle de la teicoplanine (**Figure 28**), ainsi que les couleurs données à ses groupements fonctionnels principaux peuvent nous aider à mieux comprendre sa forme dans l'espace.

Les régions colorées sont les groupements hydrophiles (les groupements hydroxyles sont en bleu, le groupement ammonium est en vert et le groupement carboxyle est en rouge). Les zones en noir sont les régions les plus hydrophobes qui contiennent les liaisons amido, les noyaux aromatiques et les liaisons de C-C.

La taille du sélecteur chiral, sa forme et l'arrangement géométrique de ses groupements fonctionnels aident à déterminer ses propriétés énantiosélectives [217].

Un simple regard sur le modèle tridimensionnel de la teicoplanine (**Figure 28**) peut montrer que la poche aglycone a une forme de « C », tout comme l'aglycone des autres glycopeptides macrocycliques de type vancomycine et ristocétine A par exemple (**Figure 29**).

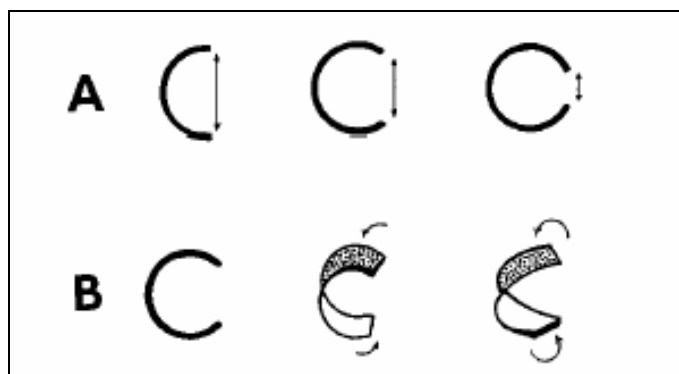


Figure 29 : Forme « C » de la poche aglycone d'antibiotiques glycopeptidiques [217].

Parmi les différentes caractéristiques morphologiques du glycopeptide, il y en a deux qui sont très importantes :

- 1- Le degré d'ouverture de la forme « C », ou autrement dit la distance mesurée entre les deux extrémités de la partie aglycone qui rend la poche plus ou moins accessible pour les solutés (**Figure 29 A**).
- 2- Le degré de torsion hélicoïdale qui est un facteur important pouvant affecter la forme des cycles qui forment la partie aglycone et aussi la distance entre les deux extrémités de la forme « C », et donc donner à la molécule sa forme presque fermée ou allongée (**Figure 29 B**).

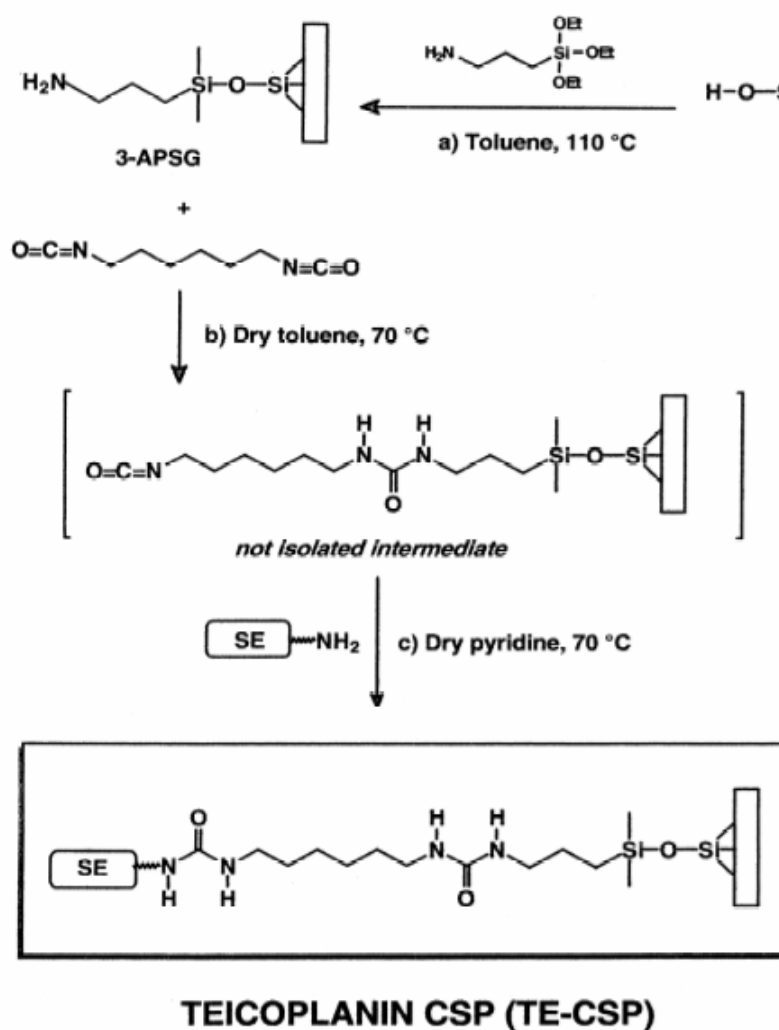
La teicoplanine possède la poche aglycone la plus petite par rapport à la vancomycine et à la ristocétine A avec une distance entre ses deux extrémités qui varie de 4.5 à 5.5 Å (**Figure 28**) [217]. Par contre la torsion hélicoïdale est plus difficile à mesurer, mais le rapport axial est ~ 1.38 - 1.42 [217].

V-2 Immobilisation de la teicoplanine :

Les antibiotiques macrocycliques contenant un groupement amine, hydroxyle ou carboxylique peuvent être liés de manière covalente à un gel de silice par différents moyens. On greffe d'abord un bras espaceur d'organosilane terminé par un groupement carboxyle (exemple : 2-carbomethoxyethyl-methyl-dichlorosilane), amine (exemple : 3-aminopropyl-dimethylethoxysilane), isocyanate (exemple : 3-isocyanatopropyl-triethoxysilane), époxy ou

autres sur silice CLHP anhydre, puis on attache de la molécule antibiotique sur la fonctionnalité du bras espaceur par réaction de déshydratation [150].

La teicoplanine (cf. **Figure 27**) peut être immobilisée de la même manière que les autres antibiotiques macrocycliques [232]. La méthode d'immobilisation de la teicoplanine pour la colonne Chirobiotic T[®] (utilisée dans ce travail cf. **VII-1**) n'est pas divulguée par le fabricant (Astec). Par contre, une procédure détaillée d'immobilisation covalente de teicoplanine sur gel de silice a été publiée par D'Acquarica et al. [221] (**Figure 30**).



SE = SELECTOR = Teicoplanin complex ($A_2-2 > 85\%$)

3-APSG (3-amino-propyl silica gel)

Figure 30 : Immobilisation de la teicoplanine [221].

En fait, la teicoplanine a été fixée d'une manière covalente sur un support de silice par trois étapes :

- a)- Introduction du groupement 3-aminopropyle sur la surface de silice par une silanisation standard avec le 3-aminopropyl-tri-ethoxysilane.
- b)- Activation de la silice aminopropylée avec le 1,6-diisocyanatohexane pour donner un composé intermédiaire monoureidique - monoisocyanate.
- c)- Fixation de la teicoplanine sur le gel de silice par la création d'une liaison ureidique stable entre le groupement amine libre de la teicoplanine et le groupement isocyanate de la silice.

On obtient ainsi, une PSC de type teicoplanine macrocyclique liée à la silice aminopropylée via deux liaisons ureidiques très stables et un bras espaceur à six atomes de carbone.

V-3 Mécanismes d'interaction teicoplanine – soluté (reconnaissance chirale) :

La structure de la teicoplanine est caractérisée par une grande variété de sites de fixation. Plusieurs interactions peuvent être impliquées dans l'association ligand-teicoplanine telles que des interactions charge-charge, des liaisons hydrogène, des interactions dipolaires, des interactions π - π , des effets hydrophobe et stérique, etc. [220]. La phase mobile (en particulier le pH, le type et la proportion de solvant organique) joue aussi un rôle de base dans le processus complexe de la séparation chirale.

Le travail de Cavazzini et al. [220] sur les mécanismes de la reconnaissance énantiosélective entre les acides aminés et la teicoplanine, a été mené en comparant le comportement d'acides aminés natifs avec celui d'acides aminés modifiés, en différentes conditions de phase mobile. L'effet du type de solvant organique et de la force ionique du milieu ont été étudiés. Cavazzini et al. ont montré, que le groupement carboxylique du soluté est très important dans le processus d'interaction entre les molécules et la PSC teicoplanine. Les composés capables de s'inclure dans la poche aglycone peuvent créer plusieurs liaisons hydrogène avec les différents groupements de l'aglycone. L'estérification du groupement carboxylique a des effets dramatiques sur la séparation des énantiomères, provoquant la perte complète de l'énantiosélectivité apparente. D'autre part, l'acétylation du groupement amine du soluté conduit à des résultats inattendus. Les énantiomères en série L sont exclus par le sélecteur chiral, alors que les énantiomères en série D correspondants sont fortement retenus. L'explication de ce phénomène est liée à la présence de forces ioniques répulsives qui proviennent du fait que les molécules et la PSC teicoplanine sont chargées négativement. Les

énantiomères en série L ne peuvent pas pénétrer dans la poche aglycone à cause de la répulsion électrostatique. Par contre les énantiomères en série D sont capables de pénétrer dans la cavité où ils sont fortement stabilisés par la création de liaisons hydrogène.

Notre équipe [222] a testé l'influence de la force ionique sur les mécanismes de la séparation chirale des acides aminés dansylés sur une colonne de type teicoplanine. Les résultats de l'étude ont révélé une double influence du tampon citrate sur les mécanismes de la reconnaissance chirale en fonction des concentrations de celui-ci, prouvant ainsi l'importance de l'effet hydrophobe et des liaisons hydrogène impliquées dans le processus de la discrimination chirale.

L'équipe, via la technique de perturbation, a également mentionné que le mécanisme d'appariement d'ions joue un rôle dans la rétention et la séparation chirale du D/L tryptophane sur la PSC de type teicoplanine [223].

V-4 La teicoplanine aglycone TAG :

La teicoplanine aglycone TAG est une variante de la teicoplanine. On peut la considérer comme une nouvelle génération de sélecteurs chiraux macrocycliques. Les trois unités saccharidiques et la chaîne alkyle attachée à une d'entre elles sont éliminées de la teicoplanine pour produire une structure aglycone (**Figure 31**).

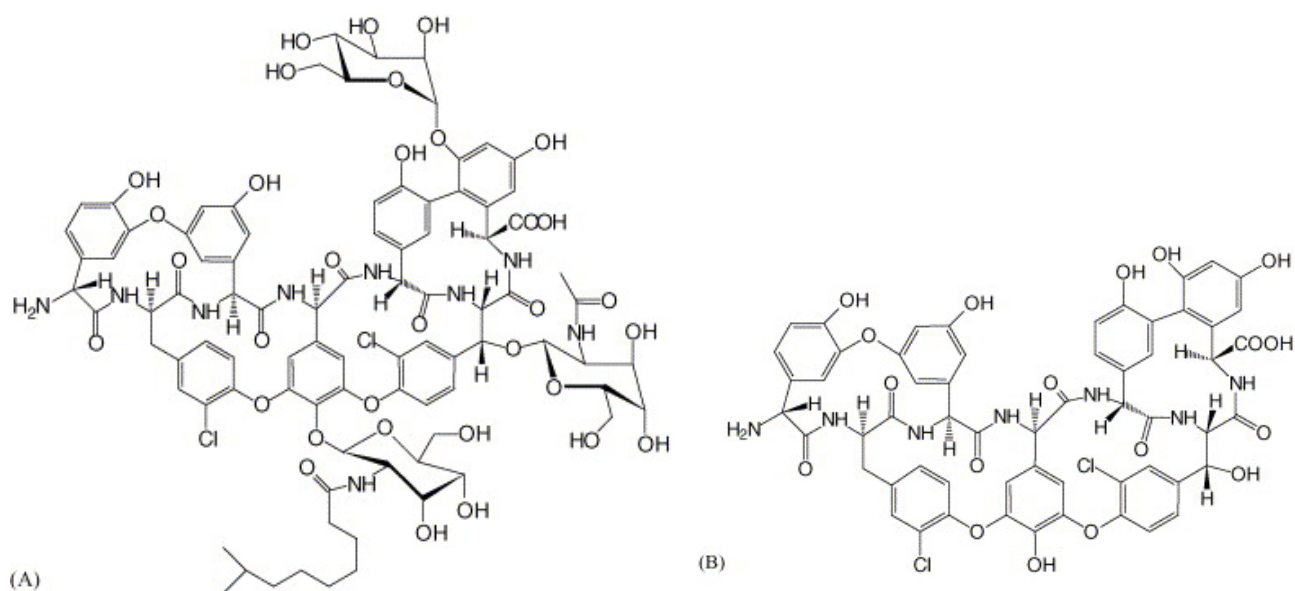


Figure 31 : Comparaison entre la structure T (A) et TAG (B) [225].

Les effets stériques des sucres disparaissent et ainsi l'aglycone devient plus accessible pour certains analytes. En outre, trois nouveaux groupements -OH sont présents sur l'aglycone où les trois sucres ont été éliminés. Ceci permet des interactions plus fortes entre l'analyte et l'aglycone en rendant le sélecteur chiral plus intéressant dans l'énantiorésolution de quelques types d'analytes comme les acides aminés et la carnitine par exemple [226 - 230]. Par contre, il a été observé que les séparations réalisées avec la PSC TAG montrent, pour certains acides aminés et dérivés, des efficacités réduites par rapport à celles obtenues avec la PSC teicoplanine dans des conditions identiques de phase mobile. Un facteur possible, contribuant à l'élargissement du pic, pourrait être un transfert de masse plus faible entre les phases stationnaire et mobile si le soluté a des interactions plus fortes avec l'aglycone [241, 231].

V-5 La teicoplanine aglycone méthylée TAGM :

Plus récemment, une nouvelle phase stationnaire de teicoplanine aglycone méthylée (TAGM) a été synthétisée (**Figure 32**) et employée, essentiellement, afin d'examiner l'importance des différents types d'interactions impliqués dans la reconnaissance chirale. Une comparaison des trois phases stationnaires (T, TAG et TAGM) a été réalisée [225, 231].

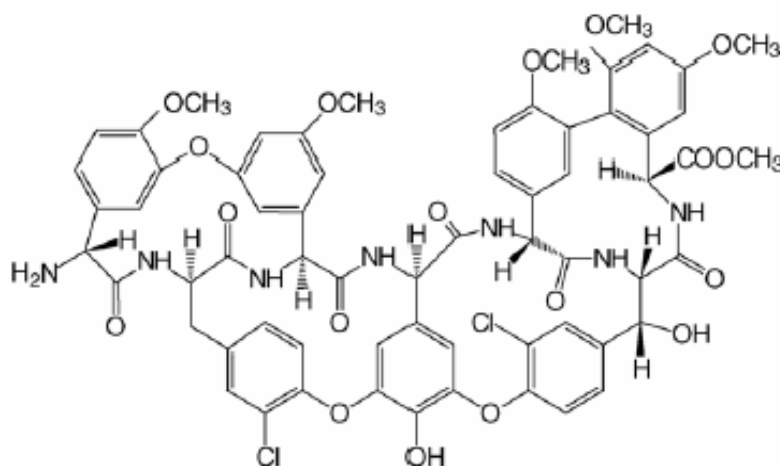


Figure 32 : Structure de la teicoplanine aglycone méthylée (TAGM) [225].

En fait, la méthylation de quelques groupements hydroxyyles de la TAG réduit la possibilité de former de liaisons hydrogène et rend la molécule plus hydrophobe [225, 231].

Xiao et al. [231] ont montré que la séparation de certaines molécules (acides aminés et dérivés, médicaments et autres) avec la PSC TAGM utilisée en polarité de phase inversée était

améliorée par rapport à la TAG. Du plus, la TAGM montre une efficacité plus élevée pour quelques analytes contenant un groupement carboxylique.

V-6 Les principales applications des PSCs de type teicoplanine et dérivés :

La PSC de type teicoplanine développée par Armstrong [232] a montré une excellente aptitude à résoudre différents classes de composés comme les acides aminés natifs, les imino acides, les peptides, les α -hydroxycarboxyliques acides, etc. [220, 232-234]. Dans la plupart des séparations d'acides aminés naturels et non naturels, les énantiomères en série L sont élués avant les énantiomères en série D [240].

De nombreux articles publiés indiquent que la teicoplanine utilisée comme PSC a permis aussi une résolution rapide de médicaments racémiques basiques et acides (baclofen, méthotrexate, thiazide, etc.) [50, 235, 236]. De plus, la PSC teicoplanine peut être utilisée en CLHP en différents modes de phase mobile (en phase inversée, en phase normale et en phase organique polaire) [232].

Outre la CLHP, cet antibiotique peut être également utilisé avec succès en tant que sélecteur chiral en électrophorèse capillaire [217, 237], en électrochromatographie capillaire [238] et en micro-CLHP [239] et plus récemment pour créer des capteurs énantiosélectifs [50].

Péter et al. [240, 241] ont fait une étude comparative des PSCs de type teicoplanine et TAG par CLHP en utilisant des imino acides et des acides aminés non naturels comme molécules à séparer. Une excellente séparation est observée pour la plupart de ces composés avec la TAG par rapport à la teicoplanine. Les trois unités saccharidiques de la teicoplanine jouent un rôle négatif dans la séparation, diminuant ainsi l'énantiorésolution des composés testés.

Berthod et al. [226] ont trouvé que la différence d'énergie libre énantiosélective entre la TAG et la teicoplanine (T) est située entre 0.3 et 1 kcal/mol pour l'énantioséparation des acides aminés. Le facteur de résolution est 2 à 5 fois plus élevé avec la TAG. Par conséquent, ils ont conclu que les trois unités saccharidiques de la teicoplanine ne sont pas nécessaires pour la discrimination chirale des acides aminés communs. Par contre, certains composés (neutres ou avec un groupement amine) sont mieux résolus, ou résolus uniquement avec la teicoplanine. Une autre étude réalisée par Schmid et al. [242] sur la séparation des dipeptides et tripeptides par micro-CLHP, a montré que la teicoplanine est plus avantageuse que la TAG en terme de temps d'analyse. Cependant, la TAG montre une résolution plus élevée.

*VI- L'échange de ligands en
séparation chirale*

VI-1 Principe :

La chromatographie d'échange de ligands (CEL) a été mise au point au début des années 70s par Davankov et al. [243]. C'est la première méthode chromatographique en phase liquide qui a permis de réaliser la séparation d'isomères optiques de nombreuses classes de composés, naturels ou synthétiques [244].

Le mécanisme de la séparation est fondé sur la formation de complexes entre un soluté donneur de doublets électroniques et un cation métallique présentant des orbitales vacantes. Ces complexes diastéréoisomériques ont différentes stabilités et/ou différentes affinités pour la colonne. Les cations métalliques utilisés sont principalement des métaux de transition : Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} qui donnent des complexes stables avec des ligands très variés.

On distingue, en chromatographie d'échange de ligands, les modes :

— Dynamique : la formation des complexes a lieu dans la phase mobile et la séparation est fondée sur les différences de distribution de ces complexes entre les phases mobile et stationnaire.

— Statique : le cation métallique est fixé sur la phase stationnaire et la formation des complexes a lieu dans la phase stationnaire. Le mode statique est généralement le plus utilisé.

VI-2 Les sélecteurs chiraux utilisés sur le principe d'échange de ligands :

La séparation chirale utilisant l'échange de ligands à été adoptée par différentes techniques chromatographiques (CCM [245], CPG [246], CPS [247], CLHP [248]), en électrophorèse capillaire [249] et en électrochromatographie [250]. Les sélecteurs chiraux sont constitués d'agents chélateurs chiraux complexés par des ions métalliques. La séparation énantiomérique sur ce genre de sélecteur est basée sur la formation d'un complexe diastéréoisomérique composé de l'énantiomère, de l'acide aminé et du cation métallique, en exigeant la présence d'au moins deux groupements de type $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ pour former un complexe bi-denté (**Figure 33**).

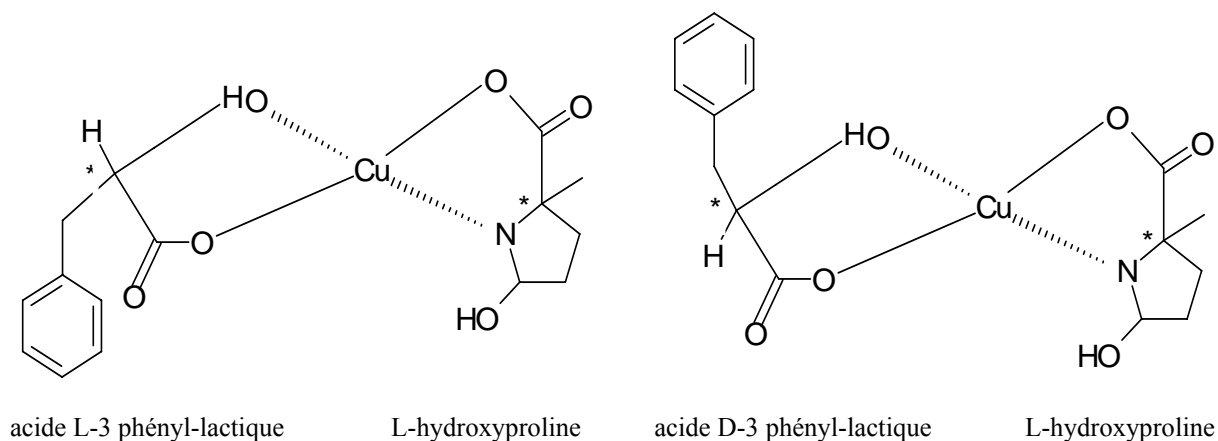


Figure 33 : Complexes entre les énantiomères de l'acide 3-phényl-lactique et la L-hydroxyproline [80].

Ces sélecteurs chiraux sont utilisés en tant que phases stationnaires ou comme additifs chiraux dans la phase mobile ou dans le tampon de migration [244].

VI-2-1 En chromatographie :

Les premières phases stationnaires étaient constituées de polymères de type polystyrène ou polyacrylamide qui contenaient ces sélecteurs chiraux. Par la suite, Gübitz et al. [251, 252] ont réussi à fixer des acides aminés (proline, histidine, phénylalanine ou valine en série L) à la silice par une liaison covalente (**Figure 34**).

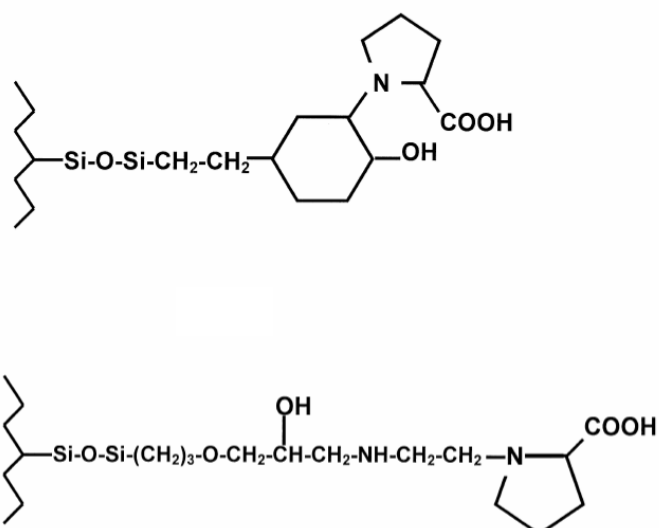


Figure 34 : Structure de deux PSCs L-proline préparées par Gübitz et al. [252].

Ces phases stationnaires nécessitent une phase mobile aqueuse contenant l'ion nécessaire à la formation du complexe. Le plus souvent, une solution de CuSO_4 0.25 mM est utilisée. Toutefois l'addition d'un solvant organique (méthanol, acétonitrile, tétrahydrofurane) est admise. Grâce à ce type de PSCs, Gübitz et al. ont résolu par CCEL de nombreux composés chiraux, dont des barbiturates.

Un autre type de PSC où le ligand est adsorbé dynamiquement sur un support solide de type C_{18} a été développé avec succès par plusieurs auteurs [253, 254, 255] (Figure 35). Ces PSCs ont montré une stabilité satisfaisante dans le temps.

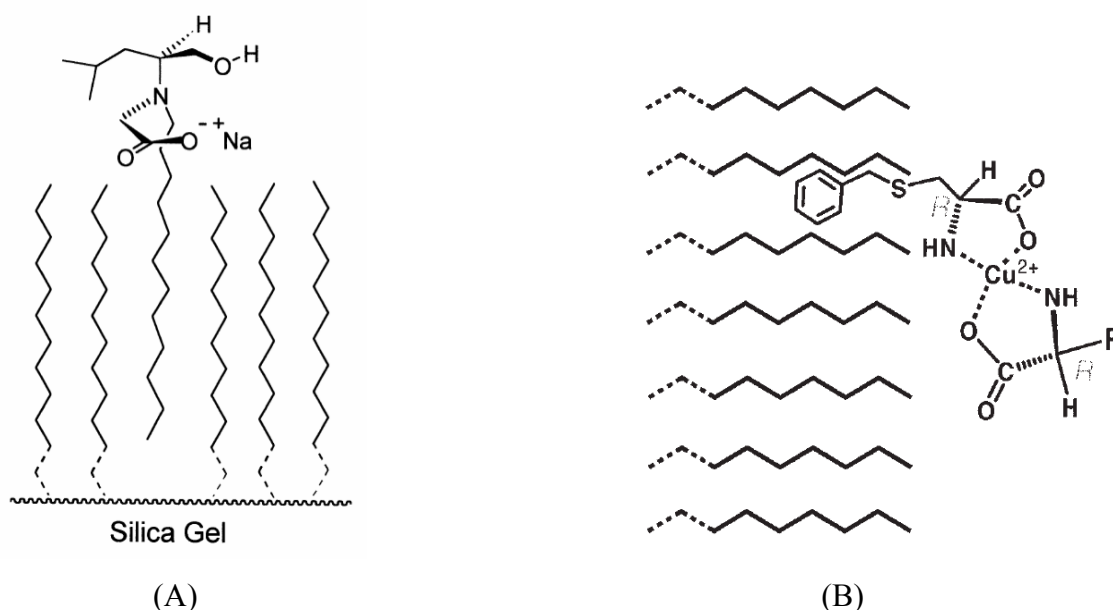


Figure 35 : Deux types de PSCs développées par Hyun et al. (A) [253], Natalini et al. (B) [254].

La sélectivité ainsi que l'ordre d'éluion peuvent-être gouvernés par les substituants du selecteur. Ślewka et al. [256] ont développé six PSCs à partir de dérivés du (S)-phénylglycinoles (Figure 36) fixés dynamiquement sur une colonne de type C_{18} . L'effet de six substituants alkylés (C_7 , C_9 , C_{12}) et arylés (méthoxybenzylé, naphthylméthylé, anthrylméthylé) sur la rétention et l'énantiosélectivité d' α -acides aminés a été étudié par CCEL. L'ordre d'éluion des α -acides aminés est ($\text{R}<\text{S}$) sur les colonnes de type N- C_{12} -(S)-phénylglycinoles et toutes les colonnes de type N-aryl-(S)-phénylglycinoles. Par contre, un ordre d'éluion inversé ($\text{S}<\text{R}$) a été observé avec les phases de type N- C_7 - et N- C_9 -(S)-phénylglycinoles.

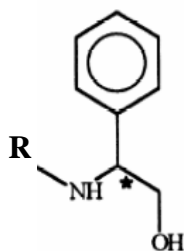


Figure 36 : Structure du (S)-phénylglycinole N-substitué [256].

De nombreux travaux publiés dans ce domaine, ont étudié l'influence de différents types de cations (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , etc.), le type, ainsi que la concentration des anions (chlorate, nitrate, sulfate, acétate, etc.) sur les différents paramètres chromatographiques (rétention, énantiosélectivité, résolution, etc.). Les meilleures séparations sont, généralement, obtenues avec une solution de CuSO_4 [254, 255]. Une augmentation de la concentration en cuivre dans la phase mobile entraîne une diminution de la rétention du soluté avec des conséquences négatives sur la sélectivité [253].

Les effets du solvant, du pH, de la température et du débit sur l'énantiosélectivité ont été également étudiés pour mieux comprendre le mécanisme de reconnaissance chirale. Kurganov a mentionné dans une revue [257] que l'addition d'un solvant organique dans la phase mobile aqueuse diminue la rétention du soluté et affecte la stabilité de la colonne par désorption probable du sélecteur chiral. Le pH de la phase mobile est également un des paramètres les plus importants régissant la rétention du soluté [255]. Celle-ci augmente à mesure que le pH croît. Par contre, la sélectivité n'est que très légèrement affectée par des changements de pH. Une augmentation de la température entraîne une diminution de la rétention de la plupart des solutés [255]. La sélectivité est invariablement réduite par une augmentation de la température, alors que l'efficacité de colonne est toujours améliorée lorsque la température augmente.

De nombreux sélecteurs chiraux pour l'échange de ligands ont été développés. Citons notamment les complexes Cu(II) -L-prolinamide [258], Cu(II) -L-lysine [259], Cu(II) -L-leucinol [260], Cu(II) -D-penicillamine [248], Cu(II) -S-benzyl-(R)-cystéine [254]. Ces sélecteurs chiraux ont permis la résolution de mélanges racémiques d'acides aminés et de leurs dérivés [258, 259, 261], d'acides α -hydroxycarboxyliques [262], d'amino-alcools [263] et de composés possédant une fonction imide. Les énantiomères d'hormones thyroïdiennes, de β -bloquants [262] et de dipeptides [264] ont également été séparés en utilisant ce type de sélecteur chiral.

VI-2-2 En électrophorèse capillaire (EC) :

L'échange de ligands a été la première technique de séparation énantiosélective utilisée en EC. Dès l'année 1985, Gassman et al. [249] ont publié l'utilisation d'un sélecteur chiral de type Cu(II)-L-histidine (2,5 mM) dans un tampon de 10 mM d'acétate d'ammonium pour séparer avec succès douze acides aminés dansylés. Par la suite, le phénomène de séparation chirale par échange de ligands en EC a été appliqué en utilisant, comme additifs, les complexes de type Cu(II)-L-proline, Cu(II)-L-hydroxyproline, Cu(II)-HO-L-hydroxyproline Cu(II)-L-isoleucine et Cu(II)-aspartame, etc. [244]. Outre les acides aminés et dérivés, un autre groupe de sélecteurs chiraux mérite d'être mentionné, à savoir les α -hydroxyacides. Kodama et al. [265] ont réussi à séparer les énantiomères de l'acide malique (présents dans le jus de pomme) au moyen du complexe Cu(II)-L-tartrate.

VII- Partie expérimentale

Nous allons nous intéresser dans ce travail expérimental à étudier notamment :

- Le mécanisme de la reconnaissance chirale entre la teicoplanine et les acides aminés, en prenant le tryptophane comme molécule test. Le rôle des trois unités saccharidiques de la teicoplanine sur la discrimination énantiomérique sera clarifié par une étude thermodynamique comparative entre la teicoplanine et la TAG à différentes températures de colonne.
- L'immobilisation non covalente par adsorption dynamique de la teicoplanine sur des supports chromatographiques apolaires de type C₈ et C₁₈. L'utilisation de ces nouvelles PSCs pour la séparation chirale d'acides aminés et dérivés ainsi que leurs stabilités dans le temps seront déterminées dans le deuxième chapitre.
- L'utilisation de deux dérivés lipophiles de la néamine, immobilisés dynamiquement sur un support chromatographique C₁₈, en tant que nouvelles PSCs pour la séparation énantiomérique d'acides aminés par CCEL. L'effet de la position de la chaîne C₁₈ attachée à la néamine (en 5 ou en 4') sur les propriétés énantiosélectives de ces nouvelles PSCs sera mis en évidence.

*VII-1 Etude thermodynamique de la reconnaissance
chirale du tryptophane sur des phases stationnaires de
type teicoplanine et teicoplanine aglycone (TAG)*

La teicoplanine évoquée précédemment au **chapitre V**, a réussi à s'imposer comme une PSC capable de résoudre de nombreuses molécules bio-actives. Toutefois, le rôle des groupements localisés autour de la poche aglycone, tels que les groupements saccharidiques, n'est pas encore clairement défini.

En comparant les données chromatographiques sur les PSCs de type teicoplanine aglycone TAG ou A-40,926 et celles sur la PSC de type teicoplanine, Armstrong et al. ont prouvé que les unités saccharidiques réduisaient les propriétés stéréosélectives de la teicoplanine pour les acides aminés [226, 241, 266]. Cependant, leur influence exacte sur le mécanisme de reconnaissance chirale est peu connu.

Diverses hypothèses ont été formulées : (i) les unités saccharidiques pourraient constituer des sites non spécifiques qui diminueraient, au moins en partie, l'énantiosélectivité apparente [226] (ii) la présence des unités saccharidiques empêcherait les interactions énantiosélectives dues à la poche aglycone. Ce mécanisme d'encombrement peut être provoqué par plusieurs phénomènes impliquant par exemple, des effets stériques [226], le blocage direct des régions énantiosélectives [226] ou quelques contraintes conformationnelles défavorables (iii) une combinaison des deux phénomènes énumérés ci-dessous.

Le manque d'informations précises sur le rôle de ces groupements est dû au fait que toutes les études précédentes [226, 241, 266] ont été réalisées en élution de zone, méthode qui fournit seulement des données globales sur la rétention et l'énantiosélectivité. Pour un site donné, il n'est pas possible d'analyser leur influence sur le mécanisme de reconnaissance chirale réel puisque la constante d'adsorption et la capacité de fixation des sites ne peuvent être dissociées à partir de ce type d'étude.

Le but de ce travail est d'étudier d'une manière détaillée l'influence des unités saccharidiques sur la reconnaissance chirale des énantiomères d'un acide aminé test, le tryptophane.

La rétention et les propriétés énantiosélectives des PSCs de type teicoplanine et teicoplanine aglycone TAG sont comparées via la détermination des isothermes de distribution du soluté (technique de perturbation). Cette approche nous permet d'examiner, les contributions des unités saccharidiques sur les propriétés de rétention et d'énantiosélectivité des sites à faible affinité et de la poche aglycone spécifique de l'acide aminé. Une étude sur l'effet de la température est réalisée pour analyser l'influence des groupements saccharidiques sur le mécanisme de discrimination chirale du site à forte spécificité. Une analyse de la compensation enthalpie-entropie, basée sur le modèle de Grunwald, est effectuée et le rôle du solvant sur la fixation du soluté et les processus énantiosélectifs est étudié.

VII-1-1 Théorie :

VII-1-1-1 Les isothermes d'adsorption du soluté :

Plusieurs modèles d'isotherme d'adsorption ont été proposés et validés pour décrire la distribution des composés entre diverses PSCs et phases mobiles [267-269].

Guiochon et al. [270, 271] ont proposé de diviser les PSCs en deux classes selon les comportements d'adsorption du soluté. Les PSCs de classe I sont caractérisées par des sites énantiosélectifs d'adsorption à forte affinité (avec une distribution étroite d'énergie d'adsorption et une faible capacité de fixation) et des sites non énantiosélectifs à faible affinité (avec une large distribution d'énergie et une capacité de fixation élevée). Les PSCs de classe II sont caractérisées par des sites énantiosélectifs ayant une distribution beaucoup plus large d'énergie d'adsorption avec une capacité de fixation plus élevée.

Les sélecteurs chiraux de classe I comprennent les polymères à empreinte, les protéines, les PSCs de type Pirkle ou les PSCs de type quinidine, tandis que les PSCs de classe II sont principalement les dérivés de la cellulose ou de l'amylose.

Des études précédentes ont prouvé que les modèles d'isotherme de type Langmuir et bi-Langmuir sont bien adaptés aux données expérimentales pour les énantiomères adsorbés sur les PSCs de classe I [270 - 272].

Les PSCs à base d'antibiotiques macrocycliques sont caractérisées par un site énantiosélectif à forte affinité clairement défini et localisé à l'intérieur de la poche aglycone [218, 220]. Il est estimé que de tels sélecteurs chiraux appartiennent aux PSCs de classe I. D'ailleurs, certains auteurs ont montré que la rétention du soluté sur la PSC de type teicoplanine pouvait être correctement décrite par les modèles de type Langmuir ou bi-Langmuir, selon les analytes étudiés et les conditions opératoires [223, 233, 273]. Par conséquent, ces deux modèles d'isotherme d'adsorption ont été étudiés dans ce travail.

Dans cette étude, les paramètres d'adsorption sont dérivés d'un système à un seul soluté. L'isotherme de Langmuir pour un seul composé est décrite comme suit :

$$Q = \frac{q_s K c}{(1 + K c)} \quad (1)$$

Q est la concentration du composé de l'échantillon dans la phase stationnaire et c est sa concentration dans la phase mobile, q_s (mole/L) représente la capacité de fixation de la colonne et K est la constante d'équilibre entre le soluté et le ligand.

Pour cette étude, les données de l'isotherme d'adsorption sont mesurées par la technique dite de perturbation (cf. partie "matériel et méthodes"). Dans ce cas, le facteur de rétention du soluté est directement proportionnel à la dérivée première de l'isotherme d'adsorption du composé. Pour une isotherme de Langmuir, la relation suivante peut être obtenue [233] :

$$k = \frac{t_R}{t_0} - 1 = \phi \frac{dQ}{dc} = \phi \left(\frac{q_s K}{(1 + Kc)^2} \right) \quad (2)$$

t_R représente le temps de rétention du soluté, t_0 est le temps mort de la colonne, c.-à-d. le temps d'élution d'un composé non-retenu. ϕ est le rapport de phase égal à $(1-\varepsilon) / \varepsilon$ (ε étant la porosité totale de la colonne).

Si un composé peut être adsorbé sur deux sites d'adsorption différents, site 1 (nonsélectif) et site 2 (énantiosélectif), la distribution peut être décrite de façon adéquate par le modèle de type bi-Langmuir avec différentes constantes d'adsorption K_1 et K_2 et différentes capacités de fixation q_{s1} et q_{s2} pour deux régions d'adsorption 1 et 2 [233] :

$$Q = \frac{q_{s1} K_1 c}{(1 + K_1 c)} + \frac{q_{s2} K_2 c}{(1 + K_2 c)} \quad (3)$$

Le modèle suppose que chaque région différente de fixation sur le récepteur a des affinités indépendantes pour le soluté, c.-à-d. que la valeur de K_1 n'est pas affectée par la fixation du soluté sur les régions secondaires de fixation du récepteur.

Dans le cas d'un soluté injecté dans une colonne contenant un récepteur avec deux sites de fixation R_1 et R_2 , la relation suivante peut être employée :

$$k = \frac{t_R}{t_0} - 1 = \phi \frac{dQ}{dc} = \phi \left(\frac{q_{s1} K_1}{(1 + K_1 c)^2} + \frac{q_{s2} K_2}{(1 + K_2 c)^2} \right) \quad (4)$$

Il est possible de déterminer les constantes d'adsorption K_1 et K_2 , les capacités de saturation des deux centres d'adsorption 1 et 2, ainsi que les facteurs de rétention, $k_1 = \phi q_{s1} K_1$, $k_2 = \phi q_{s2} K_2$ (correspondant aux contributions de rétention des deux sortes de sites, pour des conditions linéaires) et le facteur global de rétention $k_T = k_1 + k_2$.

L'énantiosélectivité apparente (α_T) peut être définie comme suit :

$$\alpha_T = \frac{k_{TD}}{k_{TL}} \quad (5)$$

Comme il a été précédemment démontré [270, 274], ce paramètre global ne décrit pas de manière adéquate les mécanismes de discrimination chirale du sélecteur pour le soluté qui interagit avec deux régions du sélecteur. Un paramètre plus détaillé est nécessaire pour représenter l'énantiosélectivité "vraie". Pour un site énantiosélectif, la valeur α_{1ou2} est décrite comme suit :

$$\alpha_{1ou2} = \frac{k_{1ou2D}}{k_{1ou2L}} = \frac{q_{s1ou2D}}{q_{s1ou2L}} \times \frac{K_{1ou2D}}{K_{1ou2L}} \quad (6)$$

En utilisant les équations (5) et (6), il est possible d'étudier les contributions énantiosélectives des deux types de sites de fixation sur l'énantiosélectivité apparente globale. De plus, si les énantiomères se fixent sur un même site, les rapports de K et de q_s peuvent être employés pour obtenir des informations supplémentaires sur le véritable mécanisme énantiosélectif de chaque site.

La régression non linéaire est établie à l'aide du logiciel Table curve 2D (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Allemagne).

VII-1-1-2 Paramètres thermodynamiques :

Pour l'analyse thermodynamique, la température de la colonne est modifiée de 25 à 37°C. La constante d'association K en fonction de la température est :

$$\ln K = \frac{-\Delta G}{RT} = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (7)$$

ΔG , ΔH et ΔS représentent respectivement l'énergie libre, l'enthalpie et l'entropie du soluté pour un site particulier, T est la température absolue et R est la constante des gaz parfaits. Si ΔH et ΔS sont indépendantes de la température, une variation de van't Hoff linéaire est obtenue.

Le rapport K_D/K_L en fonction de la température est donné par la relation suivante :

$$\ln \frac{K_D}{K_L} = \frac{-\Delta\Delta G_{D/L}}{RT} = -\frac{\Delta\Delta H_{D/L}}{RT} + \frac{\Delta\Delta S_{D/L}}{R} \quad (8)$$

$\Delta\Delta G_{D/L}$, $\Delta\Delta H_{D/L}$, et $\Delta\Delta S_{D/L}$ sont respectivement la différence d'énergie libre, d'enthalpie et d'entropie de fixation de l'énantiomère. Si $\Delta\Delta H_{D/L}$ et $\Delta\Delta S_{D/L}$ sont indépendantes de la température, une droite est obtenue.

VII-1-1-3 Compensation enthalpie-entropie : Le modèle de Grunwald :

La compensation enthalpie-entropie pour différentes associations ligand- récepteur, c.-à-d. la variation de $T\Delta S$ en fonction de ΔH , peut être étudiée selon un modèle initialement développé par Grunwald et Steel [275].

Il est actuellement établi que la réorganisation des molécules de solvant [275 - 278] et la diminution des mouvements des espèces lors de la formation d'un complexe [279, 280] est responsable des effets de compensation.

Le modèle est basé sur la séparation des paramètres thermodynamiques de complexation en deux termes : la partie nominale associée à la complexation de la molécule "hôte" solvatée avec la molécule "invitée" solvatée et la partie environnementale associée aux molécules de solvant qui sont impliquées dans le processus de solvation/désolvation lors de la complexation. Ceci peut être décrit de la manière suivante [275] :

$$\Delta H = \Delta H_{nom} + \Delta H_{env} \quad (9)$$

$$T\Delta S = T\Delta S_{nom} + T\Delta S_{env} \quad (10)$$

Ainsi, si les termes enthalpiques et entropiques ($\Delta\Delta H$ et $\Delta\Delta S$) sont modifiés par divers facteurs, la relation suivante peut être écrite :

$$\Delta\Delta H = \Delta\Delta H_{nom} + \Delta\Delta H_{env} \quad (11)$$

$$T\Delta\Delta S = T\Delta\Delta S_{nom} + T\Delta\Delta S_{env} \quad (12)$$

Comme il a été démontré que $\Delta H_{env} = T\Delta S_{env}$, ($\Delta G_{env} = 0$), les termes relatifs à la réorganisation des molécules de solvant sont sujets à la compensation exacte (complète) d'enthalpie-entropie ($\Delta\Delta H_{env} = T\Delta\Delta S_{env}$) [275, 276]. Par conséquent, si les processus de solvation/désolvation dominant dans la variation contrôlant ΔH et ΔS ($|\Delta\Delta H_{nom}| \ll$

$|\Delta\Delta H_{env}|$ et $|\Delta\Delta S_{nom}| \ll |\Delta\Delta S_{env}|$), alors $T\Delta\Delta S \approx \Delta\Delta H$. La variation de $T\Delta S$ en fonction de ΔH devrait être linéaire avec une pente σ proche de l'unité et $\Delta\Delta G \ll \Delta\Delta H$. Dans ce cas, bien que la réorganisation des molécules de solvant ne contribuent pas au changement d'énergie libre global ($\Delta G_{env} = 0$), elles constituent l'origine physique de la compensation enthalpie-entropie [275, 276]. La compensation enthalpie-entropie peut également provenir des parties nominales de la complexation [275 - 277]. Cependant, si la compensation se produit, le processus est incomplet dans ce cas [275, 281]. Typiquement, l'augmentation du bénéfice enthalpique d'une fixation étroite est seulement partiellement compensée par les coûts entropiques de la restriction du mouvement des espèces lors de l'association [275, 281]. Ainsi, ΔH_{nom} diminue plus que $T\Delta S_{nom}$ ($T\Delta\Delta S_{nom} < \Delta\Delta H_{nom}$). Si la contribution nominale de complexation joue un rôle significatif dans la variation de ΔH et ΔS , $|\Delta\Delta G|$ n'est pas négligeable comparé à $|\Delta\Delta H|$. La courbe $T\Delta S$ fonction de ΔH devrait avoir une pente plus faible que l'unité.

Un autre paramètre significatif lié au rôle du solvant dans la complexation peut être extrait à partir de la variation de $T\Delta S$ en fonction de ΔH . L'ordonnée à l'origine de cette variation (appelée $T\Delta S_0$) [281] représente la stabilité du complexe inhérente obtenue en l'absence de gain enthalpique (à $\Delta H = 0$). Comme défini par Inoue et Rekharsky [282], $T\Delta S_0$ peut être un marqueur de la désolvatation se produisant lors de l'association ligand-récepteur.

VII-1-2 Matériel et méthodes :

VII-1-2-1 Appareillage :

Le système de (CLHP) est composé d'une pompe LC Shimadzu[®] 10AT (Sarreguemines, France), d'une vanne d'injection Rhéodyne[®] modèle 7125 (Interchim, Montluçon, la France) équipée d'une boucle d'échantillonnage de 20 μ l, d'un détecteur UV-visible Shimadzu[®] SPD-10A ($\lambda = 254$ nm ou 310 nm).

VII-1-2-2 Réactifs :

Les énantiomères du tryptophane ainsi que l'alanine en série D, N-acétylée (N-Ac-D-Ala) sont fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Le phosphate de sodium monobasique et le phosphate de sodium dibasique sont fournis par Merck (Fontenay-

sous-Bois, France). L'eau est obtenue à partir d'un système de purification d'eau Elgastat option (Odil, Talant, France) équipé d'une cartouche d'osmose inverse.

VII-1-2-3 Méthodes et conditions opératoires :

Les deux colonnes étudiées (100 mm x 2.0 mm d.i) sont constituées d'une phase stationnaire de gel de silice de 5 μm sur laquelle est greffée chimiquement le sélecteur teicoplanine ou le sélecteur teicoplanine aglycone [Astec (Whippany, Etats-Unis) Chirobiotic T et TAG]. La phase mobile utilisée est constituée d'une solution de tampon phosphate 5 mM à (pH 7.0). Le débit de la phase mobile est de 0.1 ml/min. La température est contrôlée par un four Igloocil (Interchim). Les échantillons du soluté sont préparés dans la phase mobile et injectés (20 μl) au moins trois fois. La solubilité du D- et L-tryptophane (mélange racémique) dans la phase mobile est mesurée empiriquement à température ambiante et estimée à environ 10 mM. Les conditions linéaires d'élution sont examinées et définies en injectant les solutés à plusieurs concentrations variant de 3.125 μM à 1 mM.

La mesure précise du t_R (le premier moment du pic) est obtenue en utilisant les relations précédemment développées par Foley et Dorsey [283]. Le temps mort t_0 est déterminé expérimentalement en utilisant le nitrate de sodium. Les valeurs de t_R et t_0 sont corrigées par le volume mort sans colonne.

La porosité totale des colonnes est évaluée à partir de la valeur moyenne du volume mort. Les valeurs sont très semblables pour les deux colonnes, elles varient de 0.500 ± 0.015 pour la colonne TAG à 0.522 ± 0.002 pour la colonne teicoplanine. Ces valeurs sont inférieures aux valeurs de porosité obtenues précédemment par Cavazzini et al. [220] pour la teicoplanine immobilisée ($0.589 - 0.637 \pm 0.032$). Ceci peut être expliqué, au moins en partie, par le fait que différentes conditions opératoires (eau-solvant organique de la phase mobile) ainsi que différents marqueurs du temps mort (méthanol ou acétonitrile) ont été employés [220]. Néanmoins, les valeurs de porosité rapportées ici sont comprises dans l'intervalle des valeurs de porosité (0.50 - 0.70) classiquement obtenues pour les colonnes remplies [284]. Pour l'énantiomère le plus retenu (D-tryptophane), la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) est d'environ 0.25 mm pour la PSC teicoplanine et de 0.58 mm pour la PSC TAG à 25°C. Ces valeurs relativement élevées de HEPT sont toutefois conformes aux données d'efficacité décrites dans la littérature pour les PSCs teicoplanine ou TAG pour différents acides aminés [226].

Les expériences de compétition sont effectuées en utilisant le N-Ac-D-Ala en tant qu'agent de compétition rajouté dans la phase mobile (de 0 à 20 mM) [285].

Les isothermes de distribution sont déterminées en utilisant la technique de perturbation à un seul soluté décrite précédemment [223, 233]. Brièvement, elle consiste à mesurer les temps de rétention de petites quantités d'échantillon injectées dans une colonne équilibrée avec l'échantillon à différentes concentrations (c varie de 10 μM à 3.2 mM, dix niveaux de concentration sont étudiés). Un échantillon de 20 μL de (D ou L) tryptophane à une concentration plus forte que celle du plateau est injectée en triplicat sur la colonne et les temps de rétention sont mesurés [283]. Etant donné que les solutions injectées sont plus concentrées que celles de la phase mobile, les pics chromatographiques sont donc "positifs". Pour la détermination des paramètres thermodynamiques, les expériences de perturbation sont effectuées à différentes températures (25 à 37°C).

VII-1-3 Résultats et discussion :

VII-1-3-1 Rétention du D-, L-tryptophane par des PSCs de type teicoplanine et TAG :

Dans la première étape de ce travail, la rétention et l'énantiosélectivité apparente du D-, L-tryptophane (**Figure 37**), sont étudiées sur des PSCs de type teicoplanine et TAG en conditions linéaires d'élution. Pour une comparaison significative, la rétention du soluté ainsi que l'énantiosélectivité apparente sont examinées dans des conditions chromatographiques identiques (même fournisseur de PSC, même dimension de colonne, même phase mobile et même gamme de température de colonne).

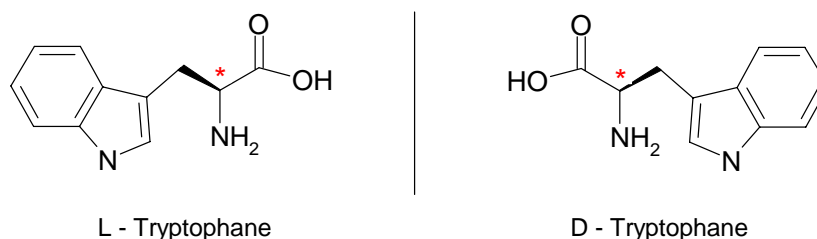


Figure 37 : Enantiomères du tryptophane.

Comme classiquement retrouvé, pour les acides aminés [218, 223, 226, 233], l'énantiomère en série L est le moins retenu par les deux PSCs à toutes les températures. De plus, les facteurs de rétention apparents et l'énantiosélectivité apparente sont plus importants pour la PSC de type TAG que pour la PSC de type teicoplanine. La **Figure 38** montre les

chromatogrammes obtenus pour une température de colonne de 25°C. Ils confirment les résultats précédents qui ont montré que la PSC TAG présente des propriétés de discrimination chirale plus importantes pour les acides aminés que la PSC teicoplanine [226, 241].

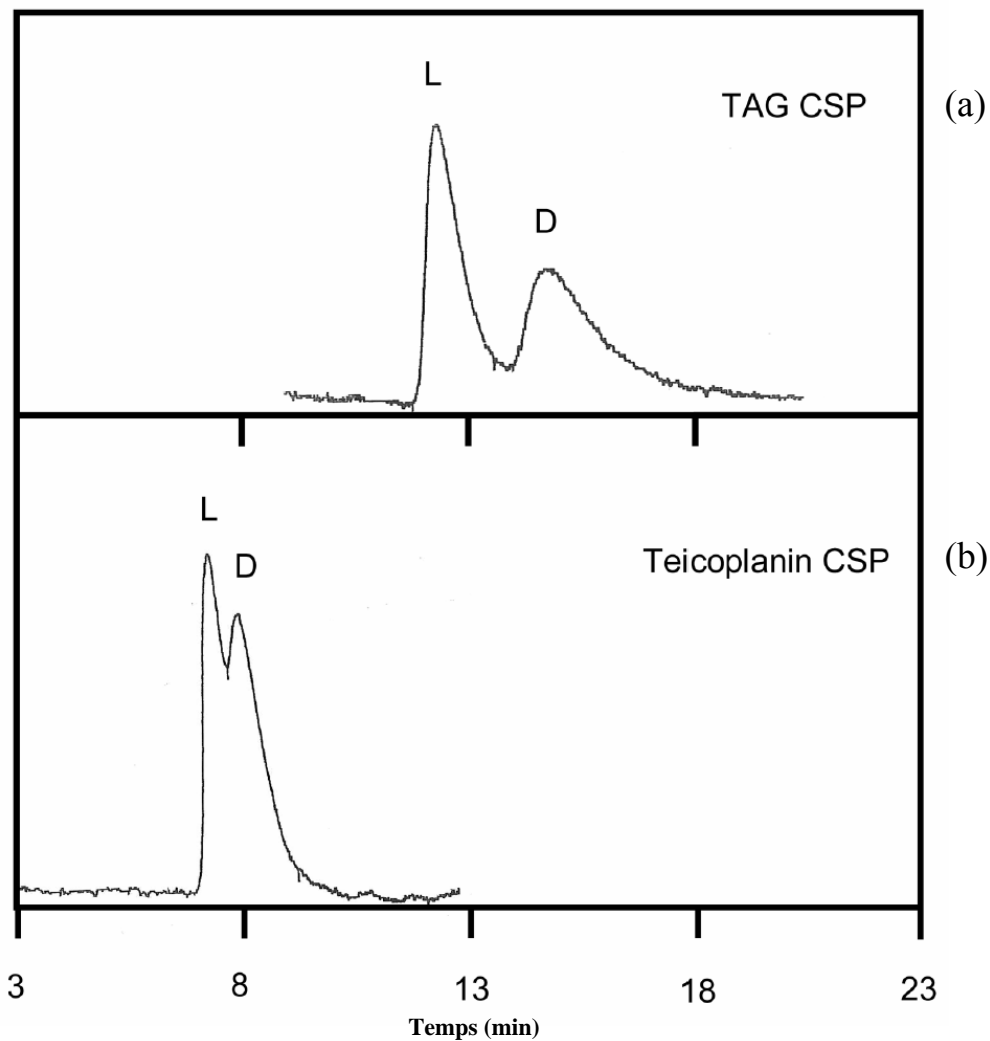


Figure 38 : Résolution du tryptophane par les PSCs TAG (a) et teicoplanine (b). Colonnes: (100 mm x 2.0 mm d.i); phase mobile: tampon phosphate 5 mM, pH 7.0; température de colonne: 25°C; concentration de D-, L- tryptophane injectée: 3.125 μ M; volume d'injection: 20 μ l; débit: 100 μ l/min; détection: 254 nm.

VII-1-3-2 Détermination des isothermes d'adsorption du D- et du L-tryptophane sur des PSCs de type teicoplanine et TAG :

Pour déterminer les isothermes d'adsorption par la technique de perturbation, les valeurs de la pente de l'isotherme sont tracées en fonction de la concentration du soluté c pour une gamme de température comprise entre 25 et 37°C.

La **Figure 39** montre ces variations pour les énantiomères du tryptophane pour les deux PSCs. Les courbes théoriques de fixation sont adaptées aux données expérimentales en utilisant les équations (2) et (4), c.-à-d. les modèles de type Langmuir et bi-Langmuir.

Le coefficient de détermination R^2 et la valeur F obtenue à partir d'un test de Fischer avec un niveau de confiance de 95% sont déterminés (**Tableau 2**).

Dans tous les cas le paramètre statistique F est plus important pour le modèle bi-Langmuir que pour le modèle Langmuir. Le modèle bi-Langmuir est donc meilleur pour décrire le comportement de rétention des deux énantiomères à chaque température de colonne.

Les paramètres d'ajustement obtenus après utilisation de l'équation (4) sont reportés dans le **Tableau 3** pour toutes les températures de colonne. Ces données indiquent que l'interaction des deux énantiomères avec le sélecteur chiral implique à la fois un site à forte affinité avec une capacité faible de saturation (site2) et un certain nombre de sites additionnels à faible affinité et une capacité de saturation élevée (site1).

Ceci confirme les données précédentes concernant la fixation de l'acide aminé sur la teicoplanine immobilisée [223, 233, 273] et est conforme aux autres études sur le comportement de rétention des énantiomères sur les différentes PSCs de classe I [270, 271].

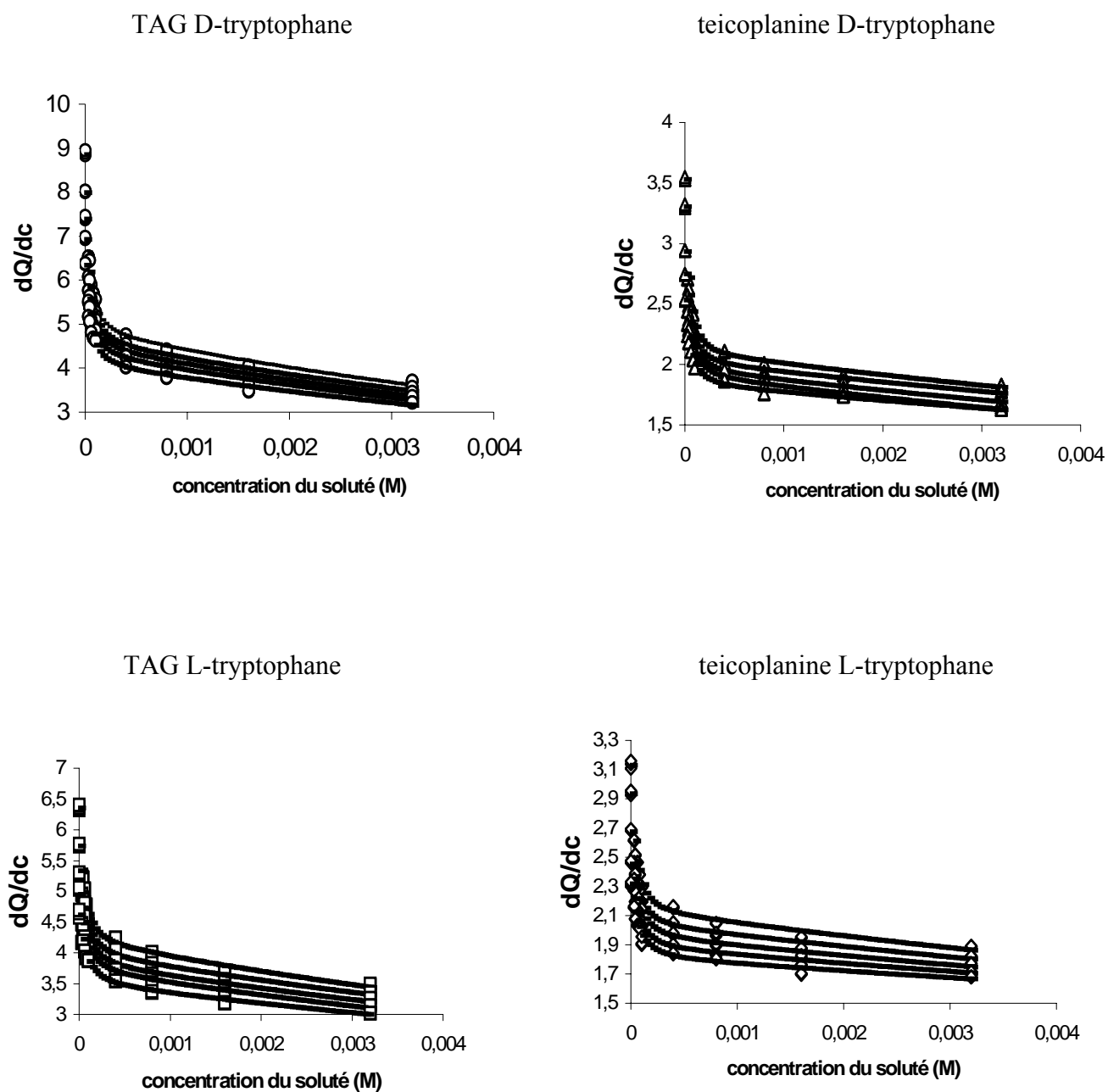


Figure 39 : Pente de l'isotherme dQ/dc en fonction de la concentration du soluté injecté c (M) pour les énantiomères du D- et L-tryptophane pour les PSCs TAG et teicoplanine. Les températures de la colonne sont comprises entre 25°C (en haut) et 37°C (en bas). Modèle bi-Langmuir utilisé (Eq. (4)).

TAG	L-tryptophan				D-tryptophan			
	bi-Langmuir		Langmuir		bi-Langmuir		Langmuir	
T [°C]	R ²	F	R ²	F	R ²	F	R ²	F
25	0.9896	821	0.6012	42	0.9949	1702	0.5583	35
28	0.9882	726	0.6439	50	0.9942	1490	0.5843	39
31	0.9839	529	0.6710	57	0.9924	1136	0.6091	43
34	0.9934	1310	0.6818	60	0.9935	1324	0.6218	46
37	0.9929	1212	0.7110	68	0.9936	1344	0.6417	50

teicoplanin	L-tryptophan				D-tryptophan			
	bi-Langmuir		Langmuir		bi-Langmuir		Langmuir	
T [°C]	R ²	F	R ²	F	R ²	F	R ²	F
25	0.9932	1261	0.5248	31	0.9962	2270	0.4549	23
28	0.9933	1293	0.5194	30	0.9972	3106	0.4513	23
31	0.9926	1166	0.5779	38	0.9967	2582	0.5384	32
34	0.9908	938	0.6091	43	0.9939	1401	0.5890	40
37	0.9817	462	0.6083	43	0.9958	2039	0.5884	40

Tableau 2 : Coefficients de régression non linéaire obtenus par l'ajustement des courbes théoriques de fixation aux données expérimentales de rétention pour les énantiomères du tryptophane pour les PSCs TAG et teicoplanine. Utilisations des Eqs. (2) et (4) (modèles Langmuir et bi-Langmuir).

T [°C]	Adsorption constant K ₂ (M ⁻¹)				Binding capacity q _{s2} (mM)			
	TAG		teicoplanin		TAG		teicoplanin	
	D	L	D	L	D	L	D	L
25	15184	11924	16066	13739	0.241	0.165	0.097	0.078
28	14148	9993	16000	13669	0.217	0.160	0.087	0.071
31	13855	8901	12815	10765	0.191	0.154	0.083	0.072
34	13394	8099	11570	9479	0.177	0.139	0.079	0.065
37	12189	7495	10541	8432	0.168	0.136	0.072	0.065

T [°C]	Adsorption constant K ₁ (M ⁻¹)				Binding capacity q _{s1} (M)			
	TAG		teicoplanin		TAG		teicoplanin	
	D	L	D	L	D	L	D	L
25	49	33	24	22	0.09	0.12	0.09	0.10
28	47	30	22	20	0.09	0.12	0.10	0.11
31	48	29	24	21	0.09	0.12	0.09	0.11
34	47	30	26	21	0.08	0.11	0.08	0.10
37	44	26	20	18	0.09	0.12	0.10	0.11

Tableau 3 : Paramètres de l'isotherme bi-Langmuir (Eq. (4)) pour les énantiomères du tryptophane à différentes températures de colonne pour les deux sites de fixation. Les CVs des différents paramètres sont compris entre 3 et 13 %.

VII-1-3-3 Rétention et contributions énantiométriques des sites à forte et à faible-affinité pour des PSCs de type teicoplanine et TAG :

L'ensemble des paramètres k_T , k_1 , k_2 , α_T , α_1 et α_2 est calculé pour les énantiomères du tryptophane à partir des résultats obtenus [Tableau 3]. A la température de 25°C, les valeurs sont les suivantes : [Tableau 4].

	TAG		teicoplanin	
	L-tryptophan	D-tryptophan	L-tryptophan	D-tryptophan
k_T	6.36	8.87	3.13	3.53
k_2	2.17	4.03	0.99	1.43
k_1	4.19	4.84	2.14	2.10
α_T	1.40		1.13	
α_2	1.86		1.44	
α_1	1.16		0.98	

Tableau 4 : Facteur de rétention apparent (k_T) et l'énantiosélectivité (α_T) pour le D- et le L-tryptophane sur les PSCs de type teicoplanine et TAG. Les contributions relatives des sites de fixation à forte (k_2 , α_2) et à faible affinité (k_1 , α_1) à T = 25°C sont calculées à partir des paramètres de l'isotherme de type bi-Langmuir.

Pour la PSC de type TAG, la contribution de la poche à forte énantiosélectivité sur le facteur global de rétention varie de 34% pour le L-tryptophane à 45% pour le D-tryptophane. Une telle "contribution spécifique" relative est de même ordre de grandeur que celle observée avec des phases stationnaires à base de protéines [270].

Bien que les sites énantiométriques secondaires soient présents sur la surface du sélecteur ($\alpha_1 = 1.16$), l'énantiosélectivité apparente ($\alpha_T = 1.40$) dépend principalement des propriétés énantiométriques de la poche spécifique ($\alpha_2 = 1.86$).

En ce qui concerne la PSC de type teicoplanine, la contribution spécifique de la poche de fixation sur le facteur global de rétention varie de 32% pour le L-tryptophane à 40% pour le D-tryptophane. Cependant, dans ce cas, seule la poche spécifique est énantiométrique ($\alpha_2 = 1.44$). Aucun site stéréospécifique secondaire n'est observé dans ces conditions ($\alpha_1 \approx 1$).

Ainsi, l'énantiosélectivité apparente, plus faible, obtenue pour la PSC teicoplanine ($\alpha_T = 1.13$) est due (i) aux propriétés énantiométriques faibles du site2 et (ii) à l'absence de sites énantiométriques secondaires. Un tel résultat montre clairement que la présence des unités saccharidiques sur la surface de la teicoplanine empêche les contacts avec quelques sites énantiométriques de fixation à faible affinité de la poche aglycone.

Les effets de la température sur les différentes données chromatographiques sont étudiés. Comme représenté sur la **Figure 40**, pour les deux énantiomères et les deux PSCs, le

facteur apparent de la rétention k_T et les contributions relatives (k_1 et k_2) diminuent de manière significative quand la température augmente. Par exemple, le facteur apparent de rétention du D-tryptophane sur les deux PSCs diminue presque de 30% quand la température varie de 25 à 37°C. Cependant, un tel comportement de rétention n'est pas associé à une diminution de l'énantiosélectivité apparente.

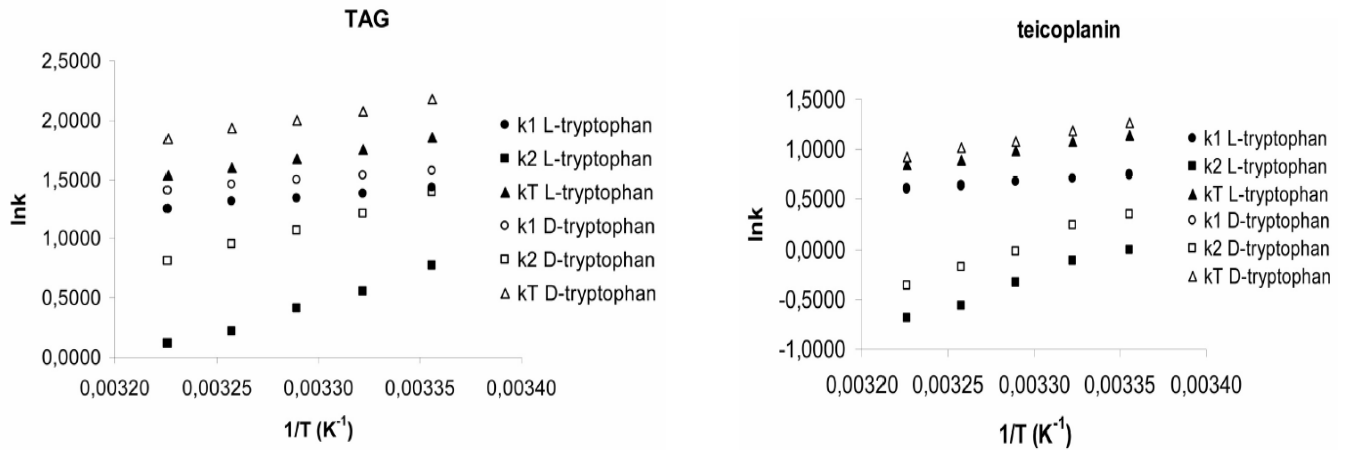


Figure 40 : Variations de k_T , k_1 , et k_2 en fonction de $1/T$ (K^{-1}) pour le D- et le L-tryptophane en utilisant des PSCs de type TAG et teicoplanine.

Dans la plupart des cas, les valeurs α_1 , α_2 et α_T pour les deux PSCs ne montrent aucun changement crucial avec la température (**Figure 41**). Seule la valeur α_2 de la PSC TAG dépend un peu de la température, augmentant de 1.86 à 2.02 entre 25 et 37°C.

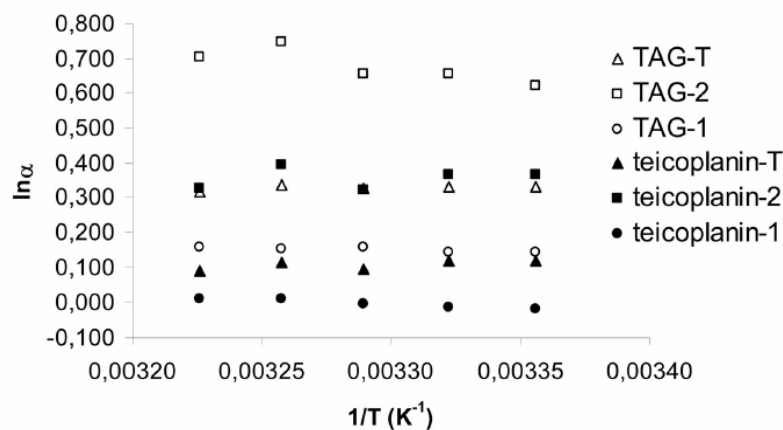


Figure 41 : Variations de $\alpha_T(T)$, $\alpha_1(1)$, et $\alpha_2(2)$ en fonction de $1/T$ (K^{-1}) pour le D- et le L-tryptophane pour les PSCs de type TAG et teicoplanine.

VII-1-3-4 Analyse des propriétés de la reconnaissance chirale de la poche aglycone (site à forte affinité de fixation) :

Afin d'évaluer l'origine de l'énantiosélectivité pour la poche de fixation à forte affinité des PSCs de type TAG et teicoplanine, les valeurs concernant les capacités de fixation et les constantes d'association ainsi que leurs variations par rapport à la température sont étudiées en détail [Tableau 3]. Une analyse similaire des contributions énantiosélectives des régions secondaires n'est pas assez précise. L'équation bi-Langmuir utilisée pour la méthode d'ajustement est fondée sur l'hypothèse d'un modèle de surface à deux-sites. Ce modèle est probablement trop simplifié dans le cas de l'interaction du tryptophane avec la phase stationnaire TAG puisque un ou des site(s) énantiosélectif(s) additionnel(s) est (sont) présent(s) à la surface de la poche aglycone. Cette surface hétérogène du sélecteur serait vraisemblablement mieux décrite par d'autres modèles tels que l'isotherme d'adsorption tri-Langmuir. Cependant, dans un tel cas, le nombre de coefficients de l'équation serait trop important pour donner des estimations précises.

VII-1-3-4-1 Capacité de fixation du site à forte affinité :

Les valeurs de capacité de fixation de la poche spécifique pour le D- et le L-tryptophane sont présentées dans le **Tableau 3** pour toutes les températures. Par exemple, à 25°C, pour la PSC TAG, q_{S2D} est autour de 45% supérieure à q_{S2L} . De telles données indiquent que l'énantiosélectivité du site2 dépend fortement de la différence de capacité de saturation (le rapport q_{S2D}/q_{S2L} est égal à 1.46 pour une valeur de α_2 de 1.86). Une telle différence pourrait être expliquée si les énantiomères du tryptophane ne se fixent pas au même site à forte affinité sur la TAG immobilisée. Par conséquent, des expériences de compétition, en utilisant le N-Ac-D-Ala [285], connu pour former spécifiquement un complexe 1:1 avec la cavité de fixation à forte affinité [286, 287], sont menées afin de déterminer si les deux énantiomères se lient à un site commun de fixation. Comme la rétention et l'énantiosélectivité apparente diminuent de manière significative quand l'agent de compétition est ajouté à la phase mobile (résultats non présentés), on peut conclure que le D- et le L-tryptophane interagissent avec la même cavité de fixation à forte affinité de l'aglycone. C'est en accord avec les données publiées préalablement par différents auteurs sur la poche énantiospécifique des acides aminés [218, 220]. Il paraît clair que la poche commune stéréospécifique est plus accessible pour le D-tryptophane que pour le L-tryptophane [288].

Pour la PSC de type teicoplanine, des tendances semblables sont observées mais à un moindre degré, puisque $q_{S_{2D}}$ est 25% plus important que $q_{S_{2L}}$. Le rapport $q_{S_{2D}}/q_{S_{2L}}$ est alors égal à 1.23 (pour un $\alpha_2 = 1.44$). Les expériences de compétition employant le N-Ac-D-Ala démontrent également que les énantiomères du tryptophane forment aussi des liaisons avec la poche aglycone spécifique de la PSC teicoplanine.

De ces observations, on peut affirmer que la différence du rapport $q_{S_{2D}}/q_{S_{2L}}$ entre les deux PSCs joue un rôle important dans la différence des propriétés énantiosélectives observées entre les poches de la TAG et de la teicoplanine ($(q_{S_{2D}}/q_{S_{2L}})_{TAG}/(q_{S_{2D}}/q_{S_{2L}})_{teicoplanine} = 1.19$). Un tel phénomène peut être facilement compris en comparant, pour un même énantiomère, les capacités de fixation du site2 des PSCs TAG et teicoplanine. Les valeurs de capacité de fixation sont largement supérieures pour la PSC TAG que pour la PSC teicoplanine (+148% pour $q_{S_{2D}}$ et + 112% pour $q_{S_{2L}}$) [Tableau 3].

Comme les PSCs TAG et teicoplanine présentent un recouvrement semblable par unité de surface chromatographique [226], un tel résultat démontre que l'accessibilité de la poche pour les deux énantiomères est largement réduite quand les unités glycosidiques sont présentes sur la surface de la teicoplanine. Ceci suggère que les unités saccharidiques sont responsables d'effets d'encombrement de la cavité de fixation de l'acide aminé.

Pour les deux sélecteurs chiraux, $q_{S_{2D}}$ diminue quand la température de la colonne augmente, tandis que $q_{S_{2L}}$ dépend peu de la température de la colonne [Tableau 3].

Des travaux sur les PSCs de type protéique ont également montré que la capacité de fixation de l'énantiomère pouvait être modifiée quand la température variait [282]. Bien que la raison exacte de ce phénomène ne soit pas connue, il peut refléter certains changements conformationnels [287] dépendants de la température (dans ou près de la poche) qui peuvent affecter principalement l'accessibilité du soluté vers la cavité. Ainsi, $q_{S_{2D}}/q_{S_{2L}}$ varie de 1.46 à 1.24 pour la PSC TAG et de 1.23 à 1.11 pour la PSC teicoplanine quand la température varie de 25 à 37°C.

VII-1-3-4-2 Constantes d'association entre le D-, L-tryptophane et le site à forte affinité :

Les constantes d'association entre les énantiomères et la poche spécifique de la teicoplanine et de la TAG sont reportées dans le **Tableau 3**. Par exemple, à 25°C, le rapport K_{2D}/K_{2L} pour la PSC TAG est égal à 1.27, démontrant que la valeur α_2 est également dépendante en grande partie de la différence des constantes d'association entre les deux énantiomères. De même, le rapport K_{2D}/K_{2L} pour la PSC teicoplanine est de 1.17 à 25°C.

Ainsi, $\alpha_{2TAG}/\alpha_{2teicoplanine}$ est également dépendant de la différence d'énergie libre énanti sélective, c.-à-d. par le rapport $(K_{2D}/K_{2L})_{TAG} / (K_{2D}/K_{2L})_{teicoplanine}$ qui est égal à 1.09 à cette température.

Quand la température augmente, les valeurs de K_{2D} et de K_{2L} diminuent [**Tableau 3**], tandis que l'énanti sélectivité vraie (K_{2D}/K_{2L}) augmente (de 1.27 à 1.63 pour la TAG et de 1.17 à 1.25 pour la teicoplanine). Cependant, un tel processus favorable est contrebalancé, au moins en partie, par la contribution défavorable des variations de la capacité de fixation. Ceci explique pourquoi la valeur α_2 n'a pas changé de manière significative pour la PSC teicoplanine et augmente légèrement pour la PSC TAG avec l'augmentation de la température.

Les courbes de van't Hoff sont déterminées pour l'ensemble des valeurs de K_{2D} et K_{2L} (**Figure 42**). A partir des droites (R est supérieur à 0.96 pour les variations de $\ln K$ en fonction de $1/T$), les valeurs de $\Delta H_{(site2)}$, $T\Delta S_{(site2)}$, $\Delta G_{(site2)}$, $\Delta\Delta H_{D/L(site2)}$, $T\Delta\Delta S_{D/L(site2)}$ et $\Delta\Delta G_{D/L(site2)}$ sont calculées à la température expérimentale moyenne [**Tableau 5**].

La fixation du ligand sur la poche de la TAG et de la teicoplanine est enthalpiquement conduite pour tous les solutés, ΔH varie de -12.6 à -34.4 kJ/mol. D'autre part, seule la fixation du D-tryptophane au site à forte affinité de la TAG est associée à une variation entropique favorable (processus conduit enthalpiquement et entropiquement), tandis que les autres associations sont caractérisées par une valeur négative de $T\Delta S_{(site2)}$ (processus conduits enthalpiquement). Dans tous les cas, les associations énanti sélectives sont régies par des variations favorables d'entropie [**Tableau 5**]. A 31°C, $\Delta\Delta G_{D/L(site2)}$ varie de -0.4 kJ/mol pour la PSC teicoplanine à -1.0 kJ/mol pour la PSC TAG. Ainsi, la différence de $\Delta\Delta G_{D/L(site2)}$ entre les deux PSCs TAG et teicoplanine, c.-à-d. $\Delta\Delta G_{D/L(site2)TAG} - \Delta\Delta G_{D/L(site2)teicoplanine}$ est égal à -0.6 kJ/mol, et $T(\Delta\Delta S_{D/L(site2)TAG} - \Delta\Delta S_{D/L(site2)teicoplanine}) = +12.5$ kJ/mol (à 31°C) avec $\Delta\Delta H_{D/L(site2)TAG} - \Delta\Delta H_{D/L(site2)teicoplanine} = +12.1$ kJ/mol.

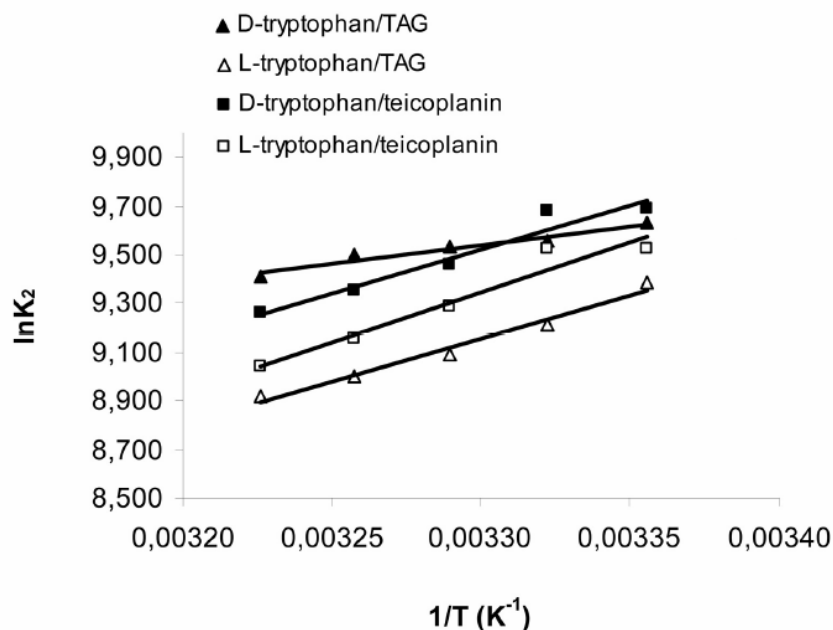


Figure 42 : Variations des courbes de Van't Hoff pour K_{2D} et L pour les PSCs de type TAG et teicoplanine.

	TAG CSP		Teicoplanin CSP	
	L-tryptophan	D-tryptophan	L-tryptophan	D-tryptophan
$\Delta H_{(\text{site}2)}$	-29.2	-12.6	-34.4	-29.9
$T\Delta S_{(\text{site}2)}^{\text{a)}}$	-6.2	+11.4	-10.8	-5.9
$\Delta G_{(\text{site}2)}^{\text{a)}}$	-23.0	-24.0	-23.6	-24.0
$\Delta\Delta H_{D/L(\text{site}2)}$	+16.6		+4.5	
$T\Delta\Delta S_{D/L(\text{site}2)}^{\text{a)}}$	+17.6		+4.9	
$\Delta\Delta G_{D/L(\text{site}2)}^{\text{a)}}$	-1.0		-0.4	

Tableau 5 : Variations d'enthalpie, d'entropie et d'énergie libre (kJ/mol) pour les processus énantiosélectifs de fixation au site à forte affinité (site2)^{a)}.

^{a)} à la température expérimentale moyenne (31°C).

VII-1-3-4-3 Compensation enthalpie-entropie et analyse du mode stéréospécifique de fixation :

VII-1-3-4-3-1 Signification de la compensation enthalpie-entropie :

Comme indiqué dans le **Tableau 5**, pour toutes les associations soluté-site2, l'enthalpie est plus favorable quand l'entropie l'est moins, et vice et versa. A la température expérimentale moyenne (31°C), le changement d'entropie $T\Delta S_{(\text{site}2)}$ est tracé en fonction du changement d'enthalpie $\Delta H_{(\text{site}2)}$ pour les deux énantiomères et les deux sélecteurs (**Figure 43**).

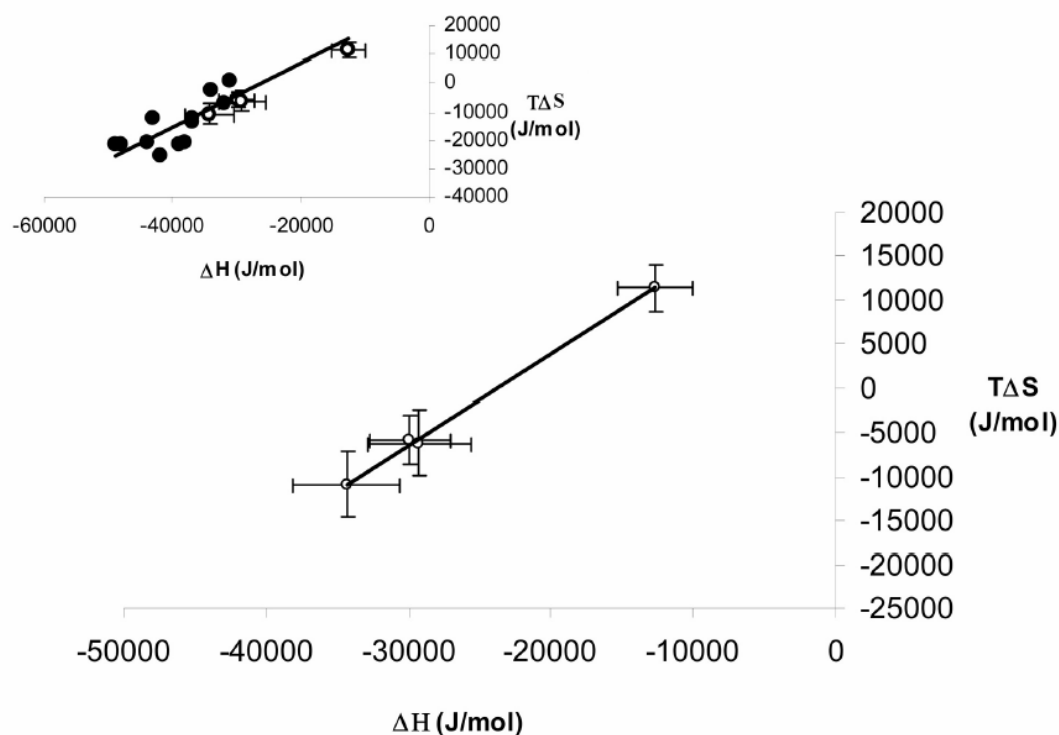


Figure 43 : Compensation enthalpie-entropie pour les paramètres thermodynamiques tryptophane-TAG et tryptophane-teicoplanine $T\Delta S_{(site2)}$ et $\Delta H_{(site2)}$ (à la température expérimentale moyenne de 31 °C). Les barres d'erreur représentent l'écart type. L'encart représente la variation de la compensation enthalpie-entropie (obtenue à partir des paramètres thermodynamiques (à 30 °C)) déterminée précédemment pour la fixation spécifique de dérivés d'acides aminés et de dipeptides (le ligand tripeptidique est exclu de la variation) sur la teicoplanine et la TAG [289] (cercles pleins). A titre de comparaison, les valeurs thermodynamiques de ce travail sont également présentées (cercles ouverts).

La variation donne une excellente relation linéaire de compensation ($R = 0.999$). L'effet de compensation et l'effet d'isoéquilibre sont la plupart du temps considérés comme équivalents, ce qui a provoqué beaucoup de débats sur la signification réelle de l'effet de compensation [290, 291].

Cependant, Liu et Guo [292] ont bien clarifié la différence entre les deux concepts. L'effet de compensation signifie seulement qu'il y a un rapport linéaire entre les changements d'enthalpie et d'entropie pour une série de réactions semblables. Un tel effet est très rarement équivalent à l'effet d'isoéquilibre qui est défini seulement par l'existence d'un point d'intersection commun pour une série de courbes de van't Hoff. Ainsi, l'analyse habituellement produite pour examiner l'exactitude et la signification de l'effet d'isoéquilibre, par exemple la variation de Krug (ΔH en fonction de ΔG) [293] n'est pas pertinente pour décrire l'effet de compensation.

Comme indiqué précédemment, l'existence d'un effet de compensation peut être examiné simplement via la détermination des barres d'erreur des changements d'enthalpie et d'entropie [292]. Les données dans la **Figure 43** recouvrent une gamme qui excède les erreurs expérimentales et peuvent donc être considérées comme significatives [292].

VII-1-3-4-3-2 L'analyse de la compensation enthalpie-entropie :

Pour la courbe de compensation, la pente σ est proche de l'unité avec une valeur $T\Delta S_0$ de ≈ 25 kJ/mol. En raison du peu de données thermodynamiques disponibles pour la fixation du tryptophane ($n = 4$), les valeurs de σ et de $T\Delta S_0$ ne peuvent être discutées quantitativement.

Cependant, les paramètres thermodynamiques du tryptophane sont bien ajustés, aux incertitudes expérimentales près, par la courbe de compensation créée en utilisant les données précédemment décrites par Arriaga et al. [289] (cf. encart dans la **Figure 43**). Dans des conditions semblables (tampon aqueux, gamme de température de 25 à 37°C), ces auteurs ont déterminé les paramètres thermodynamiques pour la fixation des dérivés spécifiques des acides aminés et des dipeptides ($n = 12$) pour la teicoplanine et la TAG. Bien que cette variation soit plus dispersée que dans notre étude, une valeur de pente de ≈ 1.1 et d'une ordonnée à l'origine de ≈ 30 kJ/mol ont été obtenues, en accord étroit avec les valeurs rapportées dans cette étude. A partir de plusieurs courbes de compensation retrouvées dans la littérature pour différents types d'associations, tels que la complexation de molécules par des éthers couronnes [275], des cryptands [275], des porphyrines [294, 295], des cyclophanes [295], des calixarènes [295], et des cyclodextrines natives ou modifiées [280, 282], et les associations molécules-protéines [275, 278, 281, 296 - 299], une variation de σ en fonction de $T\Delta S_0$ est créée et est présentée dans la **Figure 44**.

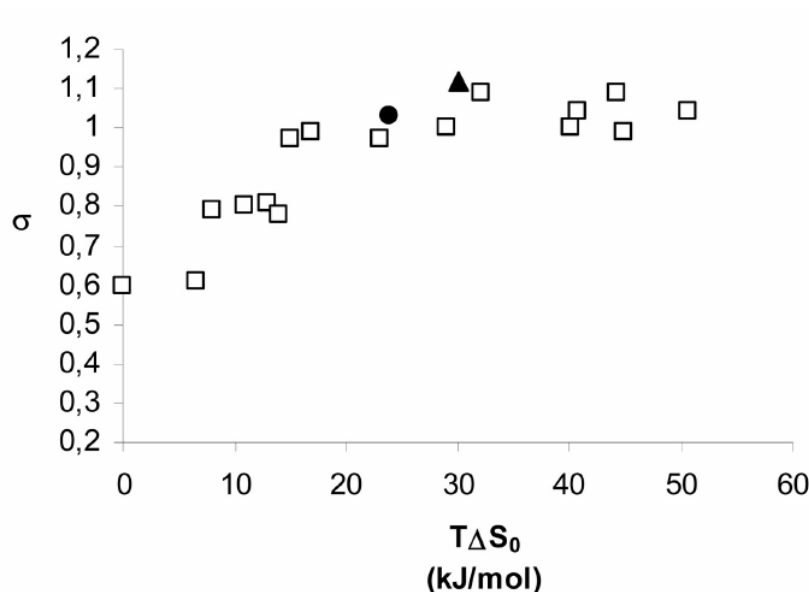


Figure 44 : Variation de σ (pente d'une variation de compensation) en fonction de $T\Delta S_0$ (ordonnée à l'origine de la courbe de compensation) créée à partir des courbes de compensation données dans la littérature pour différents systèmes organiques de fixation tels que la complexation de molécules par des éthers couronnes, cryptands, porphyrines, cyclophanes, calixarènes et cyclodextrines natives ou modifiées et les associations de la molécule-protéine (carré ouvert). Voir le texte pour les données de la littérature utilisées. Pour la comparaison, les valeurs de $\sigma/T\Delta S_0$ sont présentées pour l'association tryptophane-TAG et tryptophane-teicoplanine (cercle plein) ainsi que pour l'association ligand spécifique - teicoplanine et TAG (triangle plein) [289].

Il est important de noter que les différents paramètres thermodynamiques obtenus à partir des données de la littérature sont réalisés dans différentes conditions expérimentales avec des techniques variées d'analyse. Cependant, la tendance générale observée est conforme au modèle présenté dans la partie théorique. Quand l'étendue de la désolvatation est significative ($T\Delta S_0$ est supérieur à ≈ 15 kJ/mole), la partie "environnementale" domine la variation des termes thermodynamiques de sorte que, les valeurs de σ restent invariables, proche d'une unité. D'un autre côté, quand le phénomène de désolvatation est plus limité ($T\Delta S_0$ est inférieur à ≈ 15 kJ/mol), les contributions nominales jouent un rôle plus important en contrôlant $\Delta\Delta H$ et $T\Delta\Delta S$ ($\Delta\Delta H_{env}$ est seulement une partie du $\Delta\Delta H$ global). Dans ce cas-ci, la valeur de σ est clairement plus faible, variant de ≈ 0.6 à ≈ 0.8 .

Concernant la courbe de compensation de cette étude, la valeur relativement élevée de $T\Delta S_0$ (≈ 25 kJ/mol), est comprise dans la gamme de celles observées pour la plupart des macrocycles ou des protéines [275, 278, 281, 282, 296 - 299] (Figure 44). Ce résultat suggère que la déshydratation à l'interface est un facteur important dans le processus de fixation sur la poche de la teicoplanine et de la TAG. Ceci est en accord avec les travaux précédents sur

l'association entre les ligands spécifiques et les antibiotiques macrocycliques. En comparant les variations d'enthalpie dans H₂O et D₂O, Chervenak et Toone ont conclu que la réorganisation du solvant représente 60% de l'enthalpie de fixation observée pour l'interaction vancomycine-peptide [300]. En outre, Williams et al. ont estimé, par l'intermédiaire d'un calcul semi-quantitatif, que chaque formation d'une liaison hydrogène entre un peptide et la ristocétine A est associée à la libération de 3 à 4 molécules d'eau [287].

La pente σ d'environ 1 suggère que $|\Delta\Delta G_{(site2)}| \ll |\Delta\Delta H_{(site2)}|$, indiquant que le processus de déshydratation contrôle $T\Delta\Delta S_{(site2)}$ et $\Delta\Delta H_{(site2)}$ ($T\Delta\Delta S_{(site2)} \approx T\Delta\Delta S_{env(site2)}$). Ainsi, les changements entropiques favorables $T\Delta\Delta S_{D/L(site2)}$ et $T(\Delta\Delta S_{D/L(site2)TAG} - \Delta\Delta S_{D/L(site2)teicoplanine})$ correspondent principalement à une augmentation de la libération des molécules d'eau à l'interface du ligand/récepteur durant l'association des espèces [209]. Ceci signifie que (i) la fixation du D-tryptophane à la cavité aglycone de la TAG ou de la teicoplanine est associée à une déshydratation de l'interface plus efficace que celle du L-tryptophane et (ii) la fixation énantiosélective à la TAG est responsable d'une plus grande libération d'eau comparée à la fixation énantiosélective à la teicoplanine.

Plusieurs études ont démontré que l'entropie d'hydratation est essentiellement indépendante de la nature chimique des groupements exposés au solvant (polaire et apolaire) [301, 302]. A 25°C, il a été évalué que la contribution entropique liée à la libération d'une molécule d'eau est comprise entre ≈ 4 et ≈ 6 kJ/mol [287, 303]. A partir des valeurs de $T\Delta\Delta S_{D/L(site2)}$ observées pour les PSCs TAG et teicoplanine [Tableau 5], on peut estimer que la différence du nombre de molécules d'eau relarguées de l'interface ligand - poche du récepteur est de $\approx 3-4$ pour l'association énantiosélective à la poche de la TAG et de ≈ 1 pour l'association énantiosélective à la poche de la teicoplanine. Ainsi, une différence de ≈ 2 ou 3 molécules d'eau libérées caractérise la différence de fixation énantiosélective observée entre les PSCs TAG et teicoplanine. Il est bien connu que les molécules d'eau engagées à l'interface d'un complexe ligand - récepteur sont associées à une variation d'enthalpie négative [304]. Ainsi, les valeurs positives $\Delta\Delta H_{D/L(site2)}$ et $\Delta\Delta H_{D/L(site2)TAG} - \Delta\Delta H_{D/L(site2)teicoplanine}$ peuvent être expliquées par la différence de molécules d'eau relarguées de l'interface lors de la formation des complexes.

Bien que la libération de l'eau joue un rôle majeur dans les changements d'enthalpie et d'entropie, son influence globale sur $\Delta G_{D/L(site2)}$ et sur $\Delta\Delta G_{D/L(site2)TAG} - \Delta\Delta G_{D/L(site2)teicoplanine}$ est nul, dû à l'effet complet de la compensation enthalpie-entropie (cf. ci-dessus). Ainsi, les changements d'énergie libre pour la poche de fixation de la TAG et de la teicoplanine

dépendent strictement des parties nominales thermodynamiques. Suite à la déshydratation à l'interface, des contacts intermoléculaires étroits s'établissent entre les espèces [305]. Le processus de discrimination chirale peut être compris de la manière suivante : plus la déshydratation à l'interface est efficace, plus la surface du soluté exposée au solvant est réduite et meilleures sont les interactions stéréosélectives avec les résidus de la poche. Comme les énantiomères du tryptophane ne peuvent pas accéder facilement au niveau de la poche aglycone de la teicoplanine à cause de l'encombrement stérique dû aux unités saccharidiques (cf. ci-dessus), la déshydratation à l'interface soluté-teicoplanine est incomplète et conduit par conséquent à des contacts énantiosélectifs plus faibles.

VII-1-4 Conclusion :

Dans cette étude, nous avons analysé le rôle des unités saccharidiques sur les propriétés de la reconnaissance chirale de la teicoplanine. Ces groupements agissent de manière négative sur l'énantiosélectivité apparente via deux régions distinctes de fixation, la poche fortement énantiosélective (la cavité spécifique pour l'acide aminé) et quelques régions de fixation à faible affinité. Les effets sur la cavité de fixation à forte affinité proviennent des changements de la constante d'adsorption des énantiomères et de l'accessibilité au site.

Une autre analyse basée sur les variations des paramètres enthalpiques et entropiques nous a permis de montrer que la diminution de l'accessibilité au site dépend des groupements saccharidiques qui sont responsables d'un processus de déshydratation moins efficace, ce qui entraîne la perte de quelques contacts de discrimination chirale avec la cavité.

*VII-2 Développement d'une PSC de type teicoplanine
immobilisée d'une manière non-covalente sur des
supports chromatographiques de type C₈ et C₁₈*

Après avoir utilisé dans le chapitre précédent, une PSC teicoplanine commerciale (immobilisée classiquement d'une manière covalente sur gel de silice) pour la séparation chirale du tryptophane et après avoir étudié le mécanisme de reconnaissance chirale sur ce type de sélecteur glycopeptidique, nous nous sommes intéressés dans ce deuxième chapitre, à étudier l'influence du mode d'immobilisation de la teicoplanine sur la séparation d'acides aminés.

L'immobilisation non covalente de ligands à caractère hydrophobe sur des surfaces chromatographiques apolaires a été largement exploitée en CLHP, notamment pour la séparation des espèces ionisées par chromatographie d'échange d'ions [306] ou l'étude des interactions entre des composés bioactifs et des systèmes de type "membrane-like" [307].

Une telle approche a été également utilisée pour la séparation chirale en CLHP. Des études précédentes ont montré que les supports chromatographiques de type C₁₈ ou carbone graphite poreux, sur lesquels des sélecteurs chiraux étaient adsorbés dynamiquement, pouvaient être employés avec succès en tant que PSCs. Des dérivés apolaires d'acides aminés, de tartaramide, de lasalocide ou d'acylcarnitine ont été immobilisés par cette méthode et utilisés ensuite avec succès pour la résolution de diverses espèces racémiques [308 - 312].

La teicoplanine (**cf. section V-1-3**), se distingue des autres sélecteurs chiraux glycopeptidiques par le fait qu'elle possède une chaîne hydrophobe latérale acylée C₁₁ attachée au groupement glucopyranosyl. On s'attend donc à ce qu'une telle partie hydrophobe puisse être utilisée pour immobiliser ce sélecteur chiral sur des supports chromatographiques apolaires pour créer un nouveau type de PSC.

Deux supports chromatographiques de type C₈ et C₁₈ sont utilisés, dans ce chapitre, pour immobiliser la teicoplanine via l'adsorption dynamique. La rétention et les propriétés énantiosélectives ainsi que la stabilité dans le temps de ces phases stationnaires seront étudiés en utilisant une phase mobile aqueuse. Quelques acides aminés aromatiques seront utilisés comme solutés tests.

VII-2-1 Matériel et méthodes :

VII-2-1-1 Appareillage :

L'appareillage utilisé ici est identique à celui décrit dans la section précédente. ($\lambda = 260$ nm pour détecter les composés injectés et 310 nm pour détecter l'élution de la teicoplanine (plateau) lors de la procédure d'immobilisation).

Les colonnes de type C₁₈ (250 mm x 4.0 mm d.i) et C₈ (250 mm x 4.6 mm d.i) (taille des particules : 5 µm, taille de pore : 100Å) sont fournies respectivement par Merck (Darmstadt, Allemagne) et Macherey-Nagel (Duren, Allemagne). Ces colonnes sont utilisées à une température (25°C) contrôlée par un four Igloocil (Interchim).

VII-2-1-2 Réactifs :

Tous les énantiomères sont obtenus chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France) ou Bachem (Weil am Rhein, Allemagne). Le phosphate de sodium monobasique et le phosphate de sodium dibasique sont fournis par Sigma Aldrich. La teicoplanine est fournie par Astec (Whippany, Etats-Unis). L'acétonitrile qualité CLHP est fourni par Fischer scientifique (Leicestershire, UK). L'eau est obtenue à partir d'un système de purification d'eau d'Elgastat option (Odil, Talant, France) équipé d'une cartouche d'osmose inverse.

VII-2-1-3 Procédure d'immobilisation :

L'immobilisation du sélecteur chiral teicoplanine est effectuée in situ, sur les colonnes de type C₈ et C₁₈ (**Figure 45**).

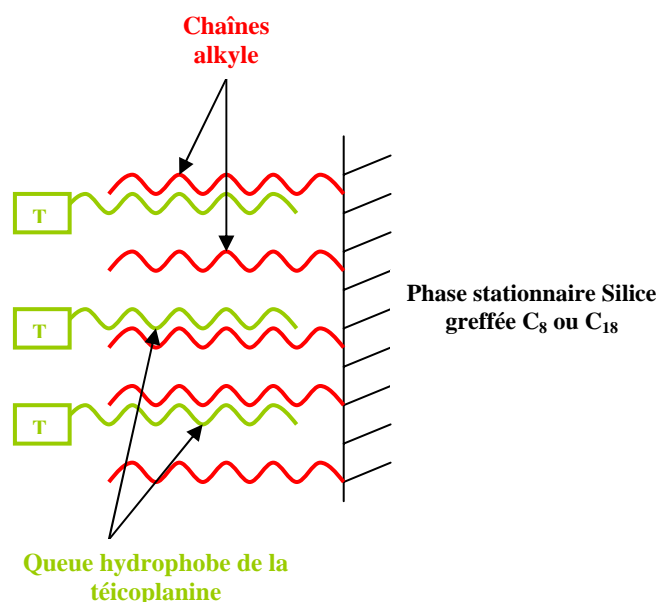


Figure 45 : Schéma d'immobilisation de la teicoplanine.

Une solution aqueuse de 1 mM de teicoplanine est utilisée comme phase mobile à un débit de 0.1 mL/min à une température de 25°C jusqu'à l'obtention d'un plateau et d'une réponse stable du détecteur à ($\lambda = 310$ nm) (**Figure 46**).

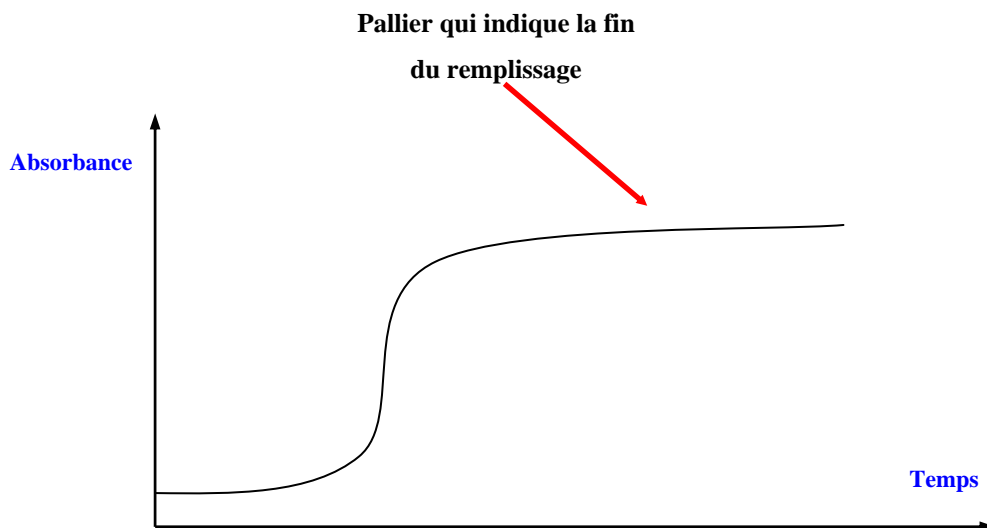


Figure 46 : Représentation du suivi de l'immobilisation de la teicoplanine.

Avant les expériences chromatographiques, les colonnes sont équilibrées avec la phase mobile aqueuse (tampon phosphate 5 mM; pH 7.0) jusqu'à l'observation d'une ligne de base stable. La quantité de teicoplanine immobilisée sur les supports chromatographiques est estimée en soustrayant l'absorbance UV de la solution de teicoplanine non fixée à celle de la solution initiale, à 280 nm. Elle est estimée à environ 150 μ moles pour chacune des deux colonnes. Quand les colonnes ne sont pas utilisées pendant une période prolongée, les colonnes sont stockées sous tampon aqueux contenant de l'azide de sodium (0.05%) afin de les protéger des contaminations microbiennes.

VII-2-1-4 Conditions chromatographiques :

- La phase mobile est composée de tampon phosphate (5 mM, pH 7.0). Le débit varie de 0.25 à 1.70 mL/min. Les échantillons sont préparés dans la phase mobile à une concentration de 2 mM. Un volume de 20 μ L est injecté et les temps de rétention sont mesurés. Les injections sont répétées 3 fois.
- Le facteur apparent de rétention k est déterminé en utilisant la relation suivante :

$$k = (t_R - t_0) / t_0$$

avec t_R , le temps de rétention de chaque énantiomère et t_0 , correspond au temps de rétention pour les espèces non retenues. Bien que cela ne soit pas l'approche la plus précise pour estimer le facteur de rétention (**cf. chapitre précédent**), le temps de rétention t_R est déterminé par le sommet du pic du soluté. Cette simplification est justifiée parce qu'aucune donnée thermodynamique ou cinétique n'est extraite à partir de ce paramètre chromatographique. t_0 est déterminé en utilisant le méthanol en tant que marqueur de temps mort. Les volumes de rétention et le volume mort de la colonne sont corrigés par le volume extra-colonne (injection du soluté dans le système chromatographique sans colonne).

- L'énantiosélectivité apparente α est calculée de la manière suivante :

$$\alpha = k_2 / k_1$$

où k_2 est le facteur de rétention pour l'énantiomère le plus retenu et k_1 est le facteur de rétention pour l'énantiomère le moins retenu.

- L'efficacité de la colonne est caractérisée en calculant le nombre de plateaux théoriques :

$$N = 5.54 (t_R / \delta)^2$$

où δ est la largeur du pic à mi-hauteur.

- La résolution R_s est calculée en utilisant la relation suivante :

$$R_s = 1.18 (t_{R2} - t_{R1}) / (\delta_2 + \delta_1)$$

- Le facteur d'asymétrie A_s est déterminé en calculant le rapport entre la partie droite et la partie gauche du pic à 10% de sa hauteur.

VII-2-2 Résultats et discussion :

VII-2-2-1 Propriétés chromatographiques des PSCs teicoplanine :

Le **Tableau 6**, présente les différents acides aminés aromatiques qui sont utilisés comme solutés tests. La rétention et les propriétés énantiosélectives des supports dynamiquement modifiés sont étudiées en utilisant une phase mobile aqueuse constituée de tampon phosphate ajusté à pH 7.0. L'addition d'un solvant organique (acétonitrile) dans

l'éluant diminue la rétention du soluté et change de manière significative les propriétés énantiométriques des deux PSCs. L'acétonitrile est probablement responsable de la désorption de la teicoplanine des supports chromatographiques. Les facteurs de rétention des solutés diminuent après l'addition du solvant organique dans la phase mobile.

À une température de colonne de 25°C, la rétention dépend, au moins en partie, du caractère hydrophobe du substituant des acides aminés [Tableau 6].

Composés	k_L	k_D	α	N_L	N_D
Support C₁₈ modifié					
tyrosine	1.12	0.90	1.24	185	270
α - méthyl-tyrosine	2.30	1.32	1.74	150	170
4-amino-phenylalanine	1.39	0.83	1.67	170	245
5-hydroxyl-tryptophane	5.82	3.64	1.60	90	160
tryptophane	17.65	11.30	1.56	140	160
1-méthyl-tryptophane	76.90	55.63	1.38	50	75
Support C₈ modifié					
tyrosine	3.26	2.78	1.17	450	785
α - méthyl-tyrosine	4.12	3.16	1.51	430	800
4-amino-phenylalanine	4.19	3.8	1.35	445	495
5-hydroxyl-tryptophane	7.89	7.89	1.00	335	335
tryptophane	13.99	11.65	1.20	365	410
1-méthyl-tryptophane	34.69	34.69	1.00	245	245

[Tableau 6] : Données chromatographiques pour quelques acides aminés aromatiques et dérivés sur les supports C₁₈ et C₈ modifiés par l'adsorption du sélecteur chiral teicoplanine. Le CV des facteurs de rétention du soluté est inférieur à 1%; phase mobile: tampon phosphate (5mM, pH 7.0); débit: 1.7 mL/min; concentration d'échantillon: 2 mM.

Pour un débit de 1 mL/min, les composés possédant les groupements R les plus hydrophiles (tyrosine, α -méthyl-tyrosine, 4-amino-phenylalanine et 5-hydroxyl-tryptophane) montrent des temps de rétention relativement faibles, tandis que les composés possédant les substituants les plus hydrophobes tels que le tryptophane et le 1-méthyl-tryptophane montrent

un temps de rétention élevé. Les expériences sont donc effectuées à un débit relativement élevé de 1.7 mL/min pour permettre une comparaison succincte du facteur de rétention et de l'énantiosélectivité des différents composés étudiés.

Du point de vue de la reconnaissance chirale, les énantiomères en série D sont élués avant les énantiomères en série L sur les deux colonnes [Tableau 6].

Un tel résultat est tout à fait étonnant. Il est bien établi que les acides aminés, ont un ordre d'élution inversé ($D > L$) lorsqu'ils sont analysés sur des PSCs teicoplanine "conventionnelles", commercialisées [218, 223, 313], c.-à-d. lorsque le sélecteur chiral est immobilisé d'une manière covalente sur un support de gel de silice. (cf. **étude expérimentale précédente**). Ceci peut refléter quelques changements d'orientation ou de conformation du sélecteur chiral quand la queue hydrophobe de la teicoplanine est enchâssée dans les chaînes alkyle de la phase stationnaire. Une étude précédente a prouvé que l'ordre d'élution des acides aminés sur le carbone graphite poreux modifié par des dérivés de type N-alkyl-L-phénylalanine était $L > D$ tandis qu'un ordre d'élution inversé ($D > L$) a été obtenu avec des phases modifiées par des dérivés de type N-aryl-L-phénylalanine [308]. Pour expliquer ce comportement, les auteurs ont proposé un modèle stéréosélectif de fixation basé sur deux orientations spatiales distinctes des sélecteurs chiraux sur la surface chromatographique.

Un tel comportement présente un grand intérêt pratique puisqu'il permet d'inverser facilement l'ordre d'élution des énantiomères du soluté par rapport à l'ordre d'élution obtenu avec une PSC teicoplanine classique.

Quelques différences sont observées entre les supports C_8 et C_{18} modifiés [Tableau 6]. Une énantiosélectivité apparente inférieure est obtenue avec le support C_8 modifié pour tous les composés. D'ailleurs, le mélange racémique du 5-hydroxyl-tryptophane et du 1-méthyl-tryptophane est résolu sur le support C_{18} modifié, tandis qu'aucune séparation énantiomérique n'est obtenue sur le support C_8 modifié. Ceci peut être expliqué, au moins en partie, par le fait que le nombre de moles de teicoplanine immobilisées par volume de colonne est plus élevé pour la colonne C_{18} modifiée que pour la colonne C_8 modifiée ($\approx 48 \mu\text{mol/mL}$ contre $\approx 36 \mu\text{mol/mL}$).

Bien que, dans la plupart des cas, des valeurs d'énantiosélectivité apparente relativement élevées soient observées [Tableau 6], aucune résolution complète des mélanges racémiques n'est remarquée sur les deux phases stationnaires chirales à un débit de 1.7 mL/min. Ceci s'explique par la faible efficacité et la traînée prononcée des pics obtenus à ce débit. Pour les énantiomères élués en dernier, N varie de 50 à 450 selon les composés analysés et la nature du support employé [Tableau 6]. Ces valeurs sont globalement inférieures aux

valeurs d'efficacité observées pour les acides aminés dans des conditions de polarité en phase inversée avec une PSC conventionnelle teicoplanine (N varie de 180 à 1300) [226]. La valeur de A_s pour les énantiomères en série L est comprise entre 1.5 et 3.5, ce qui est en accord avec les facteurs d'asymétrie reportés par Cavazzini et al. pour les acides aminés séparés sur une PSCs teicoplanine conventionnelle [220].

Afin d'améliorer la résolution, le débit est diminué, excepté pour les composés les plus hydrophobes (tryptophane et 1-méthyl-tryptophane). Dans tous les cas, une amélioration significative de la résolution est observée. Par exemple, la résolution du 5-hydroxyl-tryptophane sur le support C_{18} modifié varie de 0.98 à 1.7 mL/min à 1.44 à 0.7 mL/min (**Figure 47**). L'amélioration de la résolution dépend classiquement de l'augmentation de l'efficacité quand le débit diminue.

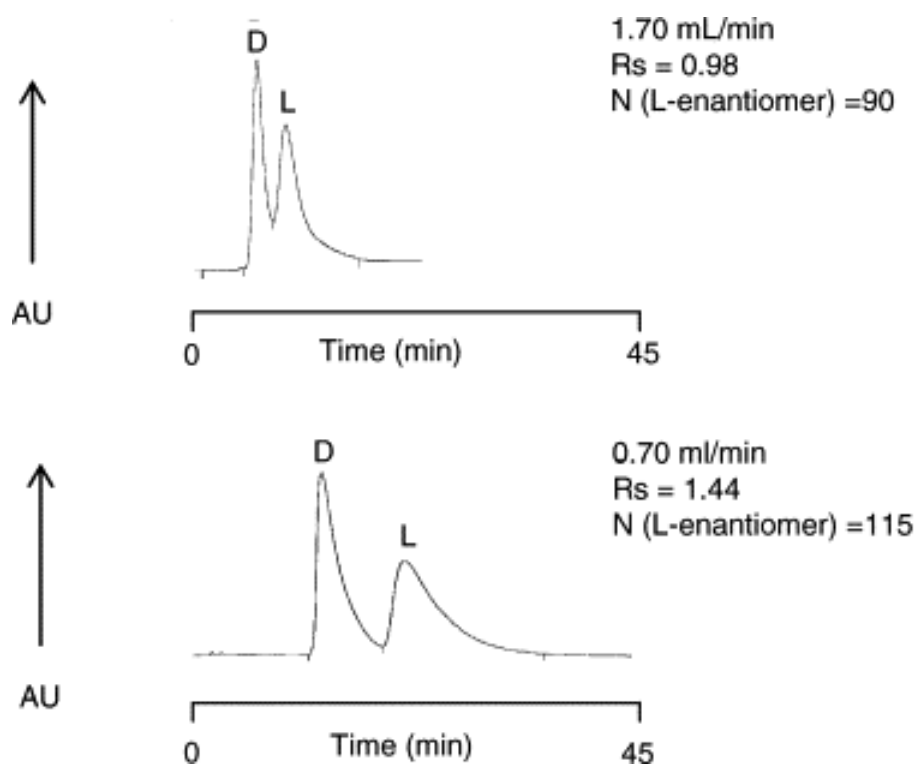


Figure 47 : Résolution chromatographique du 5-hydroxyl-tryptophane avec la phase stationnaire C_{18} modifiée. Colonne: (250 mm x 4.0 mm d.i); phase mobile: solution de tampon phosphate 5 mM à pH 7.0; température de colonne: 25°C; concentration injectée: 2 mM; volume d'injection: 20 μ l; détection: 260 nm.

Cependant, l'augmentation de R_s est également due à une augmentation de l'énantiosélectivité apparente quand le débit diminue (de 1.60 à 1.78). De telles données indiquent que le débit de 1.7 mL/min est trop élevé pour établir les conditions locales

d'équilibre dans la colonne. Il est également intéressant de noter que l'efficacité la plus élevée, pour un même composé, est obtenue en utilisant la colonne C₈ modifiée. Par exemple, bien que l'énantiosélectivité apparente du 4-amino-phenylalanine soit plus élevée avec la colonne C₁₈ [Tableau 6], une meilleure résolution est obtenue avec la colonne C₈, même à un débit plus élevé (Figure 48).

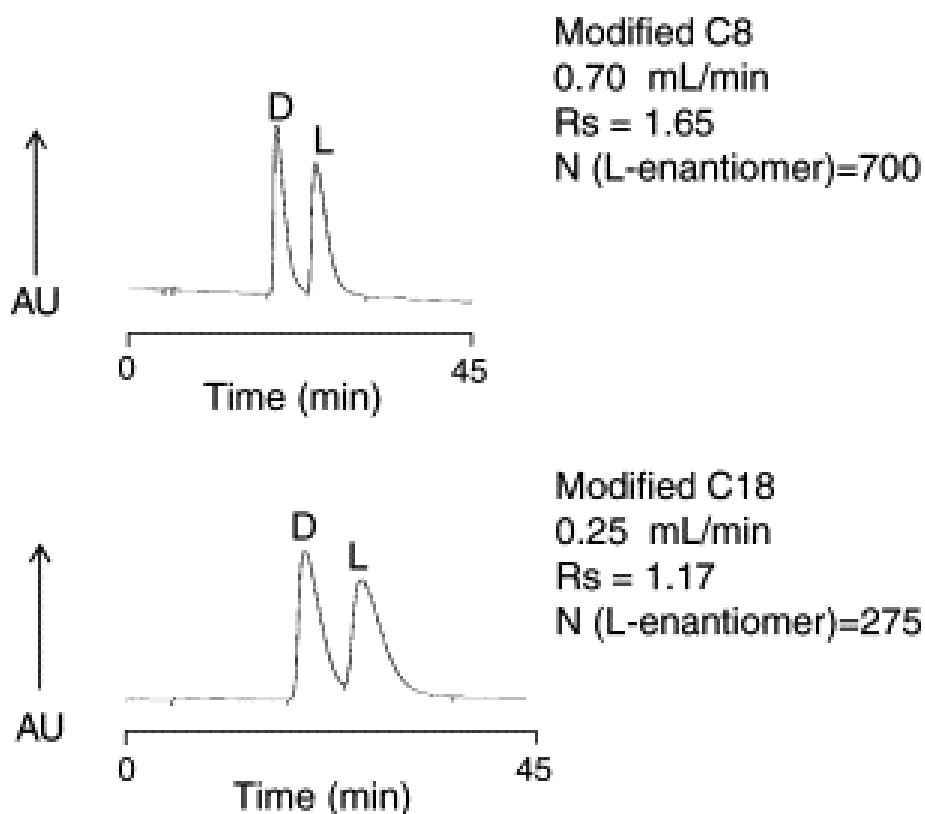


Figure 48 : Résolution chromatographique du 4-amino-phenylalanine avec les phases stationnaires C₈ et C₁₈ modifiées. Colonnes: (250 mm x 4.0 mm ou 4.6 mm d.i); phase mobile: solution de tampon phosphate 5 mM à pH 7.0; température de colonne: 25°C; concentration injectée: 2 mM; volume d'injection: 20 µl; détection: 260 nm.

VII-2-2-2 Stabilité dans le temps et régénération des supports modifiés par le sélecteur chiral de type teicoplanine :

Afin d'étudier l'utilisation pratique d'un tel support modifié, la stabilité au cours du temps des colonnes C₈ et C₁₈ modifiées est évaluée. La stabilité est étudiée en comparant le facteur de rétention du tryptophane et l'énantiosélectivité pendant une période prolongée dans des conditions identiques de phase mobile et à une température de colonne de 25°C.

Bien que l'on observe une légère augmentation des facteurs de rétention des solutés, la valeur de α pour le tryptophane n'est pas changée après le passage d'une quantité de phase mobile qui correspond à environ 2000 volumes de colonne (**Figure 49**).

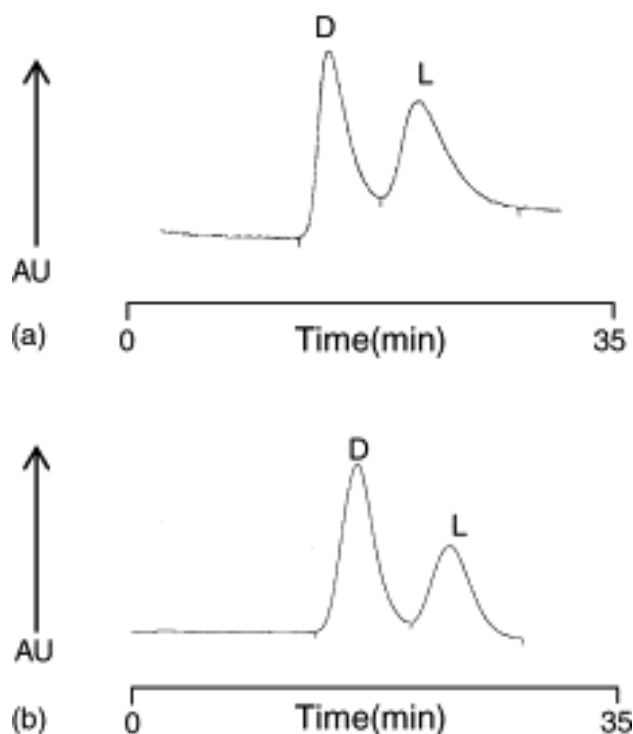


Figure 49 : Résolution chromatographique du tryptophane en utilisant la phase stationnaire C_{18} modifiée. Dans les conditions initiales (a) et après le passage d'environ 2000 volumes de colonne en phase mobile (b). Colonne: (250 mm x 4.0 mm d.i); phase mobile: solution de tampon phosphate 5 mM à pH 7.0; température de colonne: 25°C; concentration injectée: 2 mM; volume d'injection: 20 μ l; détection: 260 nm.

Après une utilisation intensive des colonnes pendant plus de deux mois, une certaine perte de l'énantiosélectivité apparente est observée. Cependant, elle reste inférieure à 20%. Dans ce cas, les colonnes sont soumises à une étape de régénération en réutilisant la solution initiale de chargement des colonnes (cf. VII-2-1-3). Une telle régénération permet la restauration complète des caractéristiques originales de la rétention et de l'énantiosélectivité, ce qui indique que ce procédé est efficace.

En outre, les effets d'un stockage à long terme sous la phase mobile contenant l'azide de sodium (0.05%) sont évalués pendant environ trois mois. Ce stockage n'affecte pas de manière significative les propriétés énantiométriques et la rétention des deux colonnes (différence de moins de 5% des données chromatographiques).

VII-2-3 Conclusion :

Dans ce travail, une méthode simple d'immobilisation de la teicoplanine sur des supports apolaires, est décrite. Cette méthodologie semble être d'intérêt puisque les supports modifiés montrent une stabilité correcte au cours du temps et peuvent être facilement régénérés sans perte notable d'énantiosélectivité. En outre, ce nouveau type d'immobilisation de la teicoplanine permet l'inversion de l'ordre d'élution des énantiomères par rapport à ce qui est observé avec une PSC conventionnelle où la teicoplanine est immobilisée d'une manière covalente. Un tel comportement pourrait être le résultat de certains changements d'orientation ou de conformation du sélecteur chiral quand la partie hydrophobe de la teicoplanine est insérée dans les chaînes alkyle du support chromatographique.

*VII-3 Dérivés de la néamine en chromatographie
chirale d'échange de ligands (CCEL)*

Les antibiotiques de type aminoglycosides (la néamine en particulier) sont capables de complexer les cations métalliques avec une forte affinité [314]. Cette propriété permet d'envisager l'utilisation d'aminoglycosides en chromatographie chirale d'échange de ligands.

Une chaîne latérale hydrophobe C₁₈ a été fixée sur la néamine en deux positions différentes 4' ou 5 (**Figure 53**) [molécules synthétisées par l'équipe de chimie bio-organique au sein du DPM (département de pharmacochimie moléculaire)]. Ces dérivés lipophiles de la néamine ont été adsorbés sur une phase stationnaire de type C₁₈ et utilisés en CCEL pour séparer les énantiomères d'acides aminés, nucléosides et dipeptides grâce à la formation de complexes diastéréoisomériques néamine-Cu(II)-soluté.

Une comparaison de ces deux nouvelles PSCs est menée afin d'étudier l'influence de la position de la chaîne C₁₈ greffée sur la néamine sur les propriétés stéréosélectives. Un modèle d'interaction entre les composés et les PSCs est proposé pour expliquer les mécanismes de la reconnaissance chirale. Les perspectives de ce travail seront également abordées.

VII 3-1 Généralités sur les aminoglycosides :

VII 3-1-1 Propriétés pharmacologiques et structurales :

Les aminoglycosides sont des bases faibles, cationiques à pH physiologique et solubles dans l'eau. Ils contiennent un cycle à 6 atomes de carbone de type aminocyclitol relié par des liaisons glycosidiques à un ou plusieurs dérivés de sucres [315].

Les aminoglycosides présentent l'avantage d'être des antibiotiques à large spectre, efficaces aussi bien contre des bactéries Gram+ que Gram-. Ils sont essentiellement utilisés dans le cas d'infections dues à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Staphylococcus aureus* [316]. De nombreux aminoglycosides (apramycine, hygromycine B, neomycine, etc.) se fixent au niveau de l'ARN ribosomal 16S, sur le site de décodage de l'ARN de transfert aminoacylé (site A). Cette fixation perturbe la synthèse des protéines provoquant ainsi un effet bactéricide [317]. Cependant, la forte toxicité au niveau du rein (nephrotoxicité) et de l'oreille (ototoxicité), l'apparition rapide de résistance, la mauvaise biodisponibilité orale et l'instabilité de ces antibiotiques ont limité leur utilisation [318].

La plupart des aminoglycosides naturels (néomycine B, ribostamycine, kanamycine B, etc.) présentent dans leur structure un pseudodisaccharide hydrophile possédant plusieurs fonctions aminées. Cette partie est appelée néamine ($C_{12}H_{26}N_4O_6$) [318] (Figure 50).

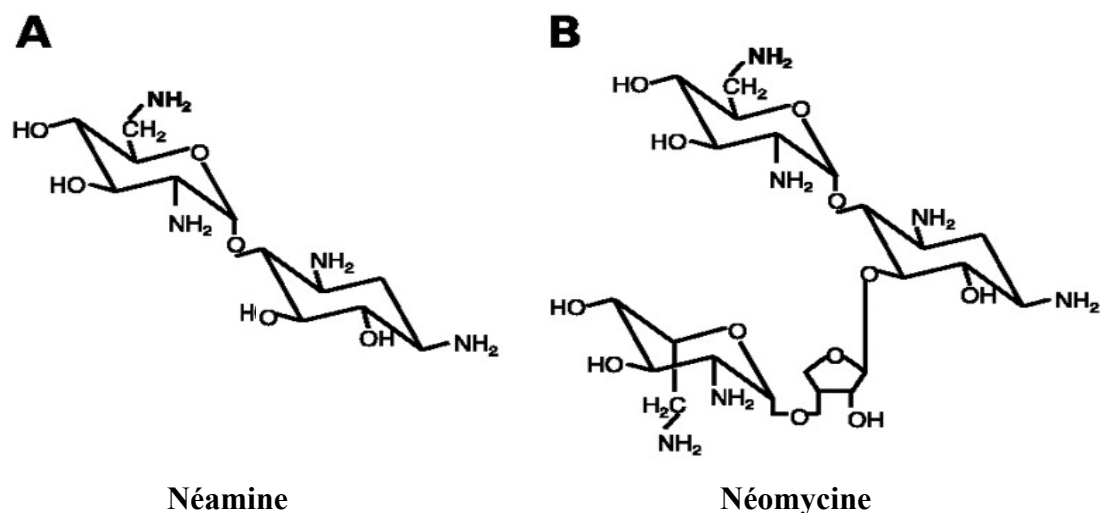


Figure 50 : Structures de la néamine (A) et de la néomycine (B) [319].

La néamine est également un antibiotique 20 fois moins toxique que la néomycine, mais de plus faible affinité pour le site A et de moindre efficacité [319]. Plus récemment, Il a été découvert que la néamine et ses dérivés présentent aussi, *in vitro*, un effet contre le virus du VIH-1 [320, 321].

VII 3-1-2 Utilisation des aminoglycosides en séparation chirale :

L'utilisation des aminoglycosides en séparation chirale est très rare. Une seule référence a été trouvée dans la littérature. Nishi et al. [324] ont utilisé trois aminoglycosides, caractérisés par leur faible masse moléculaire et leur faible absorbance UV (sulfate de fradiomycine, sulfate de kanamycine et sulfate de streptomycine), comme agents de résolution chirale en électrophorèse capillaire (EC) (conditions opératoires sans cuivre). L'utilisation de ces antibiotiques aminoglycosidiques en EC a permis de séparer les énantiomères de plusieurs molécules chirales telles que le 1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogenphosphate, l'acide 1,1'-binaphthyl-2,2'-dicarboxylique et un intermédiaire de synthèse du clentiazem. Cependant, leur énantiosélectivité réduite et leur forte adsorption sur les parois du capillaire ont limité leur

utilisation. Nishi et al. ont montré, par contre, que l'ajout du méthanol au tampon de migration améliorerait la forme du pic et l'énantiorésolution.

VII 3-1-3 Propriétés de complexation des cations métalliques par les aminoglycosides :

Depuis la découverte du phénomène d'échange de ligands dans les années 70 et jusqu'à l'heure actuelle, les acides aminés et leurs dérivés sont les ligands les plus utilisés pour la séparation d'énantiomères par CCEL.

Sreedhara et al. [314] ont montré que les aminoglycosides de type néamine et kanamycine sont capables de complexer avec de fortes affinités des cations métalliques tels que Cu(II) (Figure 51).

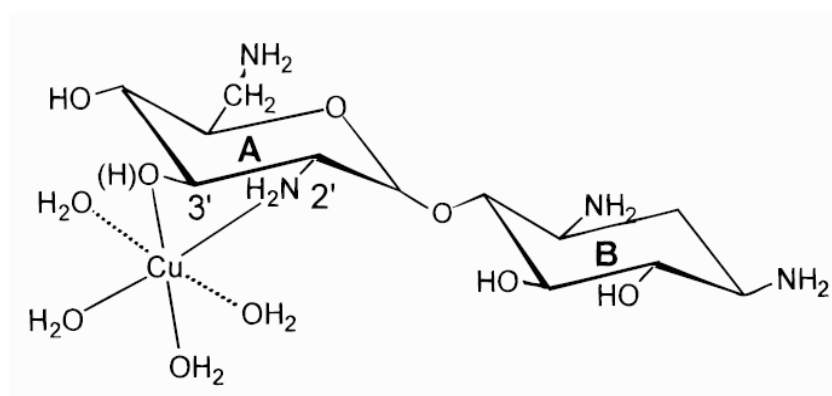


Figure 51 : Le complexe néamine - Cu(II) [314].

Sur la base de cette observation, nous avons cherché à prouver que la néamine pouvait être utilisée en CCEL.

VII-3-2 Matériel et méthodes :

VII-3-2-1 Appareillage :

Les études sont réalisées sur deux postes de micro-CLHP. Les différents modules qui composent ces installations sont :

- ✓ Une pompe Shimadzu[®] LC 10 AT (dans les deux cas).
- ✓ Un système automatique d'injection Shimadzu[®] SIL-10AD ou un système d'injection manuel, vanne d'injection Cheminert[™] CN2-4346.

- ✓ Un détecteur UV-Visible SPD-10A ($\lambda = 192$ nm pour la procédure d'immobilisation de la néamine et 236 nm pour détecter la plupart des composés injectés), volume de cellule 140 nL.
- ✓ Un système de commande et de contrôle (Shimadzu[®] SCL-10A ou Shimadzu[®] CBM-20A) qui permet de gérer les différents modules.
- ✓ Un logiciel d'exploitation (Shimadzu[®] Class-VP ou Shimadzu[®] LC solution) pour enregistrer et traiter les chromatogrammes.

La phase mobile et les échantillons injectés sont préalablement filtrés (0.45 μ m) et dégazés aux ultrasons. Les deux colonnes C₁₈ (150 mm x 0.3 mm d.i) (taille des particules : 3 μ m) fournies par Dionex[®] (Amsterdam, Hollande), sont utilisées à une température contrôlée par un four Igloocil (Interchim).

VII-3-2-2 Réactifs :

Tous les énantiomères des quatorze acides aminés et dérivés injectés (valine, méthionine, tyrosine, isoleucine, acide glutamique, acide aspartique, α -méthyl-tyrosine, leucine, serine, cystéine, alanine, proline, glutamine, acide leucique) sont obtenus chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France) ou chez Fluka chemie (GmbH, Steinheim, Germany).

Les énantiomères de nucléosides (guanosine et deoxy guanosine) sont fournis par ChemGenes (Wilmington - U.S.A). Les énantiomères du dipeptide glycine-tyrosine (gly-tyr) sont fournis par Bachem AG (Bubendorf - Switzerland). Le sulfate de cuivre est fourni par Prolabo (Rhône-Poulenc - France). La néamine 4'-mono C₁₈ et la néamine 5-mono C₁₈ utilisées pour la préparation des PSCs ont été synthétisées par l'équipe de chimie bio-organique du DPM. Le méthanol de pureté CLHP est fourni par Fischer scientifique (Leicestershire, UK), l'eau CLHP est obtenue à partir d'un système de purification d'eau d'Elgastat option (Odil, Talant, France) équipé d'une cartouche d'osmose inverse.

VII-3-2-3 Synthèse des deux dérivés lipophiles de la néamine :

La néamine s'obtient facilement, à l'échelle de plusieurs dizaines de grammes, par méthanolyse acide de la néomycine, un puissant antibiotique pseudo-polysaccharidique-polyaminé sécrété par les bactéries Gram+ [319].

Les dérivés de la néamine, comportant une chaîne lipophile C₁₈ en position 5 ou en position 4', ont été obtenus par alkylation sélective de la néamine selon une méthodologie

développée au laboratoire dans l'équipe de chimie bio-organique du DPM [322, 323] (Figure 52).

Protections des fonctions amines et alcool de la néamine :

Les fonctions amines sont protégées par des groupements trityles acido labiles pour donner le composé tetratrylé **1** avec 76 % de rendement. Une protection sélective des alcools de **1** par le groupement 4-méthoxy benzyle, acido labile comme le trityle, permet d'obtenir le produit **2** dibenzylé en position 3' et 6 ainsi que le produit **3** tribenzylé en 3', 4' et 6 avec des rendements respectifs de 32 % et 40 %.

Introduction des chaînes C₁₈ et obtention des produits finaux :

Le produit **5** alkylé en position 5 est obtenu en effectuant une alkylation sur le composé **3** avec du bromooctadécane en large excès en présence d'hydrure de sodium à 70°C, suivie d'une déprotection des fonctions amine et alcool avec de l'acide trifluoroacétique.

La même séquence de réaction est appliquée au composé **2** pour obtenir le produit **4**. Dans ce cas, pour alkyler sélectivement la position 4' et éviter la dialkylation, il faut limiter la quantité d'agent alkylant à 1.5 équivalent.

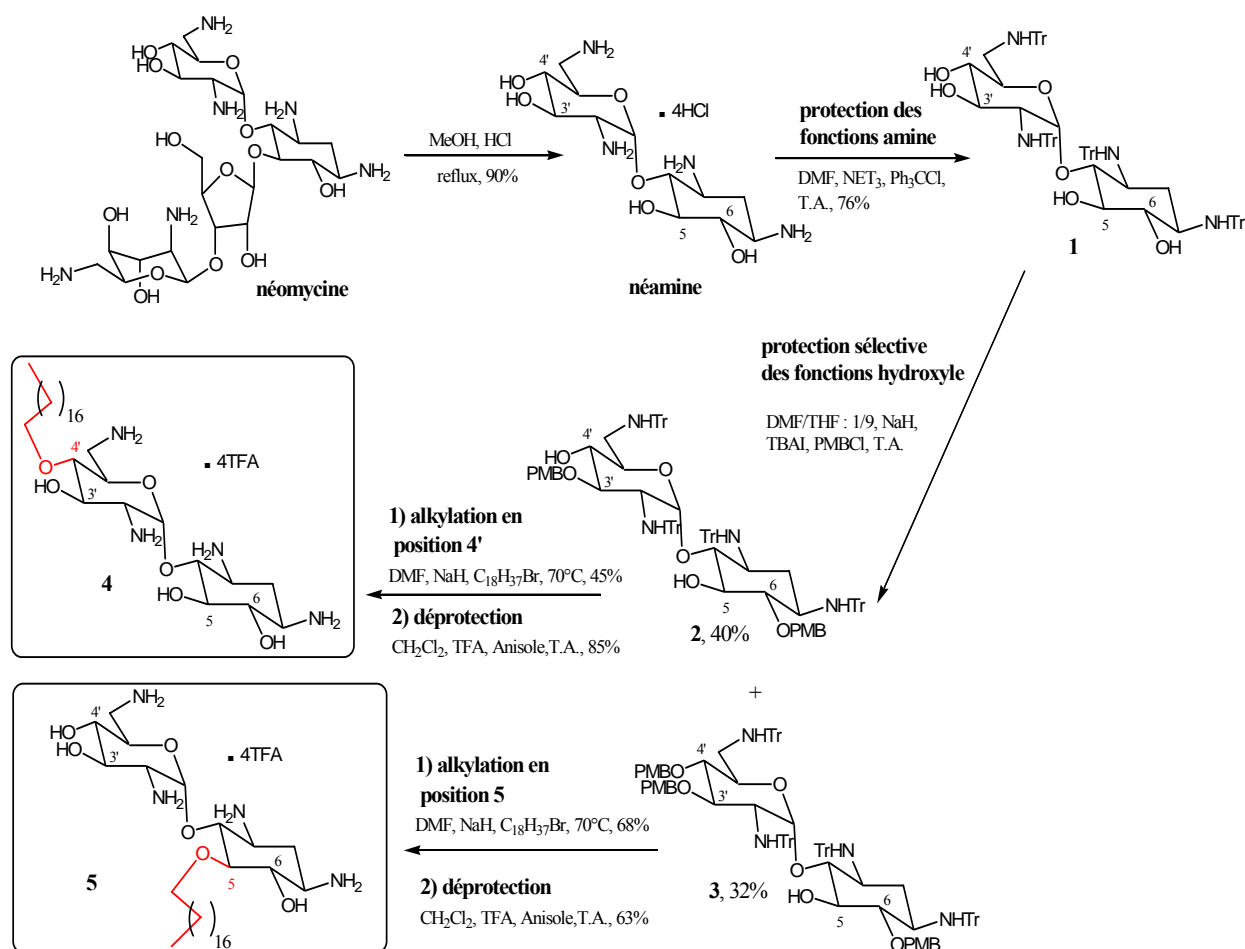


Figure 52 : Schéma de synthèse des deux dérivés 4' et 5-mono C₁₈ de la néamine.

VII-3-2-4 Procédure d'immobilisation :

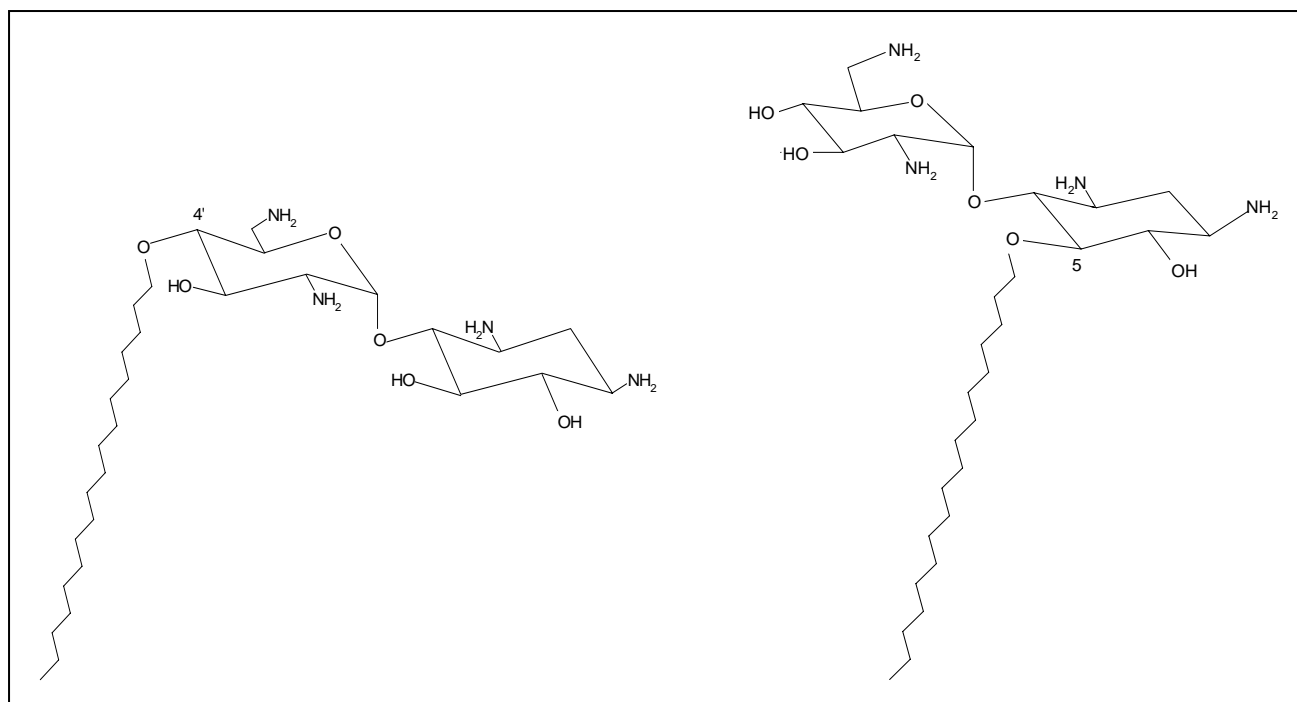


Figure 53 : Ligands à immobiliser (néamine 4'-mono C₁₈ et néamine 5-mono C₁₈).

La chaîne hydrophobe greffée sur la néamine (**Figure 53**) va permettre de fixer le ligand sur un support chromatographique de type C₁₈ par adsorption dynamique afin de créer deux PSCs de type néamine (la néamine 4'-mono C₁₈ et la néamine 5-mono C₁₈), à l'instar de la teicoplanine précédemment immobilisée sur des supports C₈ et C₁₈ (cf. **Figure 45**).

La néamine synthétisée est reprise par 2 mL d'un mélange H₂O/CH₃OH (98:2, v/v), puis elle est filtrée. Un spectre UV-visible de la solution de néamine est réalisé entre 190 et 500 nm afin de déterminer sa longueur d'onde d'absorption λ_{max} , (le spectrophotomètre utilisé est un Shimadzu[®] UV 1609). Le spectre obtenu indique une absorbance maximale à 192 nm. 200 μ L de la solution de néamine sont injectés à un débit de 3 μ L /min à température ambiante. La phase mobile utilisée est composée d'un mélange H₂O/CH₃OH (98:2, v/v). L'opération est renouvelée trois fois.

Dans un premier temps, afin de vérifier la quantité de néamine fixée dans la colonne, la phase mobile est récupérée en sortie de détecteur et le volume final après immobilisation est mesuré. Un spectre UV est réalisé et comparé au spectre de départ afin de calculer le nombre de moles de néamine fixé sur la phase stationnaire C₁₈. Cette méthode, ne donnant pas de résultats satisfaisants, a ensuite été améliorée en s'appuyant sur la propriété du cuivre à former avec la néamine un complexe néamine – Cu(II) [314]. Ainsi, une solution de sulfate de cuivre à 5 mM est injectée à un faible débit (1 μ L /min) afin de permettre la fixation du cuivre

sur les sites actifs de la néamine et ainsi, de quantifier le nombre de moles de néamine fixée à partir du plateau de saturation ($\lambda = 217$ nm pour la détection). La quantité de néamine immobilisée par cette méthode pour la colonne néamine 4'-mono C₁₈ est de 0.3 μ moles fixées pour un volume de colonne de 10 μ L.

VII-3-2-5 Conditions chromatographiques :

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- Une phase stationnaire contenant la néamine 4'-mono C₁₈ ou la néamine 5-mono C₁₈ immobilisées de la manière précédemment décrite.
- Une phase mobile composée d'eau-méthanol (98:2, v/v) additionnée de CuSO₄ à 0.5 mM.
- Un débit variant de 1 à 8 μ L/min selon la molécule à séparer.
- Chaque mélange racémique est préparé dans une solution H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) à diverses concentrations.
- Le volume injecté est de 0.1 μ L pour la PSC néamine 5-mono C₁₈ et de 0.25 μ L pour la PSC néamine 4'-mono C₁₈ (nous avons veillé à injecter pour chaque mélange racémique la même quantité de solutés pour les deux PSCs). Les injections sont répétées 3 fois.
- La température est fixée à 20°C et contrôlée par le four.
- ☉ Le facteur apparent de rétention k , l'énantiosélectivité apparente α , l'efficacité de la colonne N , la résolution R_s et le facteur d'asymétrie A_s sont déterminés en utilisant les mêmes relations citées précédemment (cf. chapitre VII-2-1-4), le t_0 est déterminé en utilisant la thiourée H₂NCSNH₂ (0.026 mM à $\lambda = 236$ nm).

VII-3-3 Résultats et discussion :

VII-3-3-1 Les propriétés énantiosélectives des deux PSCs de type néamine :

Après avoir testé une trentaine de composés différents avec les deux colonnes immobilisées, les résultats préliminaires indiquent que treize mélanges racémiques sont résolus avec la néamine 4'-mono C₁₈ et neuf avec la néamine 5-mono C₁₈ dans les mêmes conditions (cinq couples d'énantiomères séparés sont communs aux deux PSCs).

Les couples d'énantiomères séparés et leurs données chromatographiques (k , α et R_s) pour la colonne (néamine 5-mono C₁₈) et pour la colonne (néamine 4'-mono C₁₈) sont montrés respectivement dans les **Tableaux 7 et 8**.

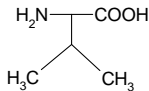
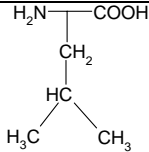
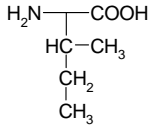
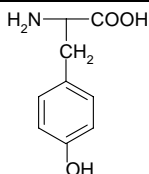
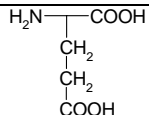
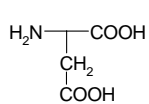
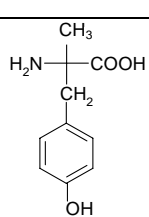
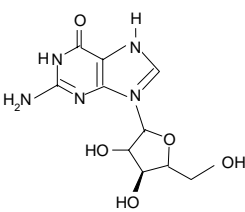
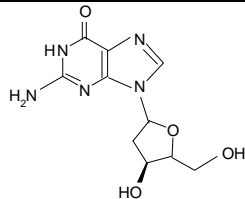
<i>Composé</i>	<i>Structure</i>	k_L	k_D	α	R_S
valine		12.45	14.01	1.13	-
leucine		54.50	58.15	1.07	-
isoleucine		34.44	39.77	1.16	0.7
tyrosine 30°C		29.68	33.37	1.12	0.93
acide glutamique		21.16	18.20	1.16	-
acide aspartique		14.63	13.03	1.12	-
α - méthyl- tyrosine		80.02	60.82	1.32	1.29
guanosine		8.33	8.98	1.08	0.87
deoxy- guanosine		9.70	10.15	1.05	-

Tableau 7 : Les composés séparés sur la colonne néamine 5-mono C₁₈ et leurs données chromatographiques. (Les données de la résolution ne sont pas déterminées pour les composés non complètement résolus).

Phase mobile: H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) + CuSO₄ 0,5 mM; température: 20°C sauf la tyrosine à 30°C; volume d'injection: 0,1 μ L; détection: 236 nm; concentration et débit pour chaque énantiomère: valine (3,75 mM, 5 μ L/min), leucine (7,5 mM, 7 μ L/min), isoleucine (10 mM, 7 μ L/min), tyrosine (0,25 mM, 7 μ L/min), acide aspartique (5 mM, 3 μ L/min), acide glutamique (10 mM, 7 μ L/min), α - méthyl-tyrosine (0,5 mM, 8 μ L/min), guanosine (0,125 mM, 4 μ L/min), deoxy-guanosine (0,125 mM, 4 μ L/min).

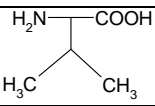
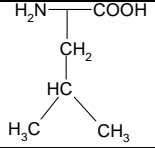
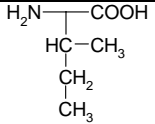
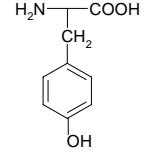
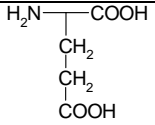
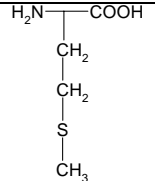
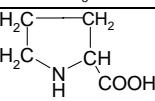
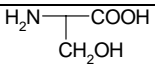
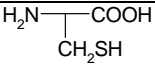
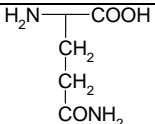
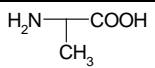
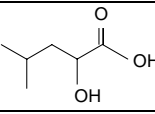
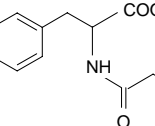
Composé	Structure	k_L	k_D	α	R_s
valine		8.35	11.84	1.42	2.44
leucine		30.02	40.07	1.33	1.70
isoleucine		25.94	37.23	1.43	2.22
tyrosine 20°C		51.42	91.41	1.78	16.95
tyrosine 30°C		34.26	66.3	1.93	11.31
acide glutamique		13.55	16.63	1.23	1.42
méthionine		14.90	19.57	1.31	1.94
proline		1.41	2.48	1.76	1.43
sérine		0.44	0.56	1.34	0.66
cystéine		9.68	17.19	1.78	3.05
glutamine		0.33	0.50	1.55	0.94
alanine		0.30	0.43	1.45	0.86
acide leucique		2.54	2.86	1.12	-
gly-tyr		2.85	3.13	1.10	0.57

Tableau 8 : Les composés séparés sur la colonne néamine 4'-mono C₁₈ et leurs données chromatographiques.

Phase mobile: H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) + CuSO₄ 0,5 mM; température: 20°C; volume d'injection: 0,25 µL; détection : 236 nm; concentration et débit pour chaque énantiomère: alanine (0,077 mM, 1 µL/min), valine (1,5 mM, 5 µL/min), leucine (3 mM, 7 µL/min), isoleucine (4 mM, 7 µL/min), méthionine (0,4 mM, 6 µL/min), proline (0,5 mM, 2 µL/min), sérine (0,15 mM, 1 µL/min), cystéine (2 mM, 4 µL/min), glutamine (0,5 mM, 1 µL/min), tyrosine (0,1 mM, 7 µL/min), acide glutamique (4 mM, 7 µL/min), acide leucique (5 mM, 1 µL/min), gly-tyr (0,468 mM, 1 µL/min).

La comparaison des résultats présentés dans les **Tableaux 7 et 8**, pour les composés séparés sur les deux colonnes (valine, leucine, isoleucine, tyrosine, acide glutamique), montre que la néamine 4'-mono C₁₈ a généralement des valeurs de k inférieures à celles de la deuxième PSC dans les mêmes conditions chromatographiques, excepté pour la tyrosine. Par contre, la colonne néamine 4'-mono C₁₈ a des valeurs supérieures de α et de R_s . Cela montre que la PSC néamine 4'-mono C₁₈ est plus stéréosélective que la PSC néamine 5-mono C₁₈ avec des temps d'analyse plus courts.

Les valeurs d'efficacité (N) de la colonne néamine 4'-mono C₁₈ varient entre ~300 et 10000 tandis que N varie entre ~150 et 5500 pour la deuxième colonne. Les valeurs de l'asymétrie A_s sont similaires pour les deux colonnes (A_s varie entre ~0.8 et 4.7).

Un exemple de séparation sur la colonne néamine 4'-mono C₁₈ est présenté pour les énantiomères de la valine (**Figure 54**).

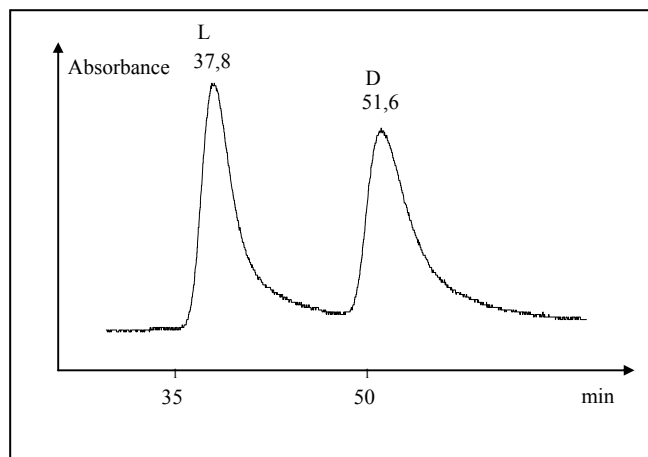


Figure 54 : Séparation de la D/L valine sur la colonne néamine 4'-mono C₁₈.

Phase mobile : H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) + CuSO₄ 0,5 mM; phase stationnaire: néamine 4'-mono C₁₈; température: 20°C; volume d'injection: 0,25 µL; concentration pour chaque énantiomère: 1,5 mM; débit: 5 µL/min; détection: 236 nm.

Les différences de valeurs pour les paramètres chromatographiques entre les deux PSCs utilisées dans cette étude, peuvent être expliquées par le fait que : **(i)** la quantité de ligands immobilisés est différente entre les deux colonnes; **(ii)** la chaîne C₁₈ introduite sur la néamine en position 4' ou 5 entraîne certaines modifications d'orientation ou de conformation de la molécule, rendant les PSCs différemment accessibles aux sites d'interaction pour les solutés testés; **(iii)** la position de la chaîne lipophile sur la néamine modifie les propriétés énantiosélectives des PSCs. Ces modifications semblent jouer également un rôle sur l'ordre d'élué. Les énantiomères en série L pour tous les solutés séparés sur la colonne néamine 4'-mono C₁₈ sont élués en premier. Ce n'est pas tout à fait le cas avec la colonne néamine 5-

mono C₁₈. L'ordre d'éluion pour trois acides aminés (acide glutamique, acide aspartique et α -méthyl-tyrosine) est inversé. Dans ce cas, l'énantiomère D est élué en premier.

Nous remarquons que les nucléosides (guanosine et deoxy-guanosine) ainsi que l'acide aspartique, séparés avec la colonne néamine 5-mono C₁₈, ne sont pas séparés par la PSC néamine 4'-mono C₁₈. Par contre, nous n'avons pas pu vérifier la séparation des acides aminés (alanine, glutamine, sérine, cystéine) sur la colonne néamine 5-mono C₁₈.

Les énantiomères de la proline sont élués les plus rapidement, avec une résolution convenable pour la PSC néamine 4'-mono C₁₈ (**Figure 55**).

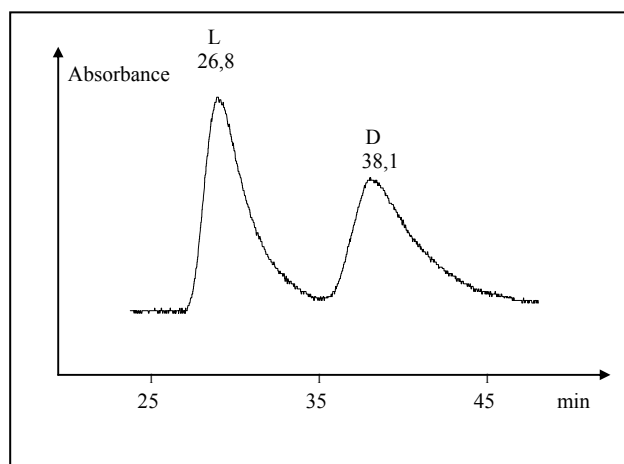


Figure 55 : Séparation de D/L proline sur la colonne néamine 4'-mono C₁₈.

Phase mobile: H₂O/CH₃OH (98:2, v/v) + CuSO₄ 0,5 mM; phase stationnaire: néamine 4'-mono C₁₈; température: 20°C; volume d'injection: 0,25 μ L; concentration pour chaque énantiomère: 0,5 mM; débit: 2 μ L/min; détection: 236 nm.

VII-3-3-2 Mécanisme de reconnaissance chirale proposé :

D'après la littérature [214, 251], la séparation des acides aminés basée sur le mécanisme d'échange de ligands dépend de la stabilité du complexe ternaire formé entre l'analyte, le sélecteur chirale et l'ion métallique. En outre, des interactions additionnelles (liaisons hydrogène, effet hydrophobe et interactions stériques) peuvent également avoir un effet crucial sur l'énantiosélectivité et l'ordre d'éluion.

Dans ce travail, le cuivre est impliqué d'une manière essentielle dans le processus de séparation des énantiomères d'acides aminés. La rétention des énantiomères de la proline sur la colonne néamine 4'-mono C₁₈ est testée avec et sans cuivre dans la phase mobile. La présence du cuivre est indispensable pour réaliser la séparation énantiomérique. Le temps de

rétenion de la proline augmente après ajout de cuivre dans la phase mobile, ce qui indique que de nouvelles interactions sont créées entre la néamine et l'acide aminé en présence du cuivre. Ce phénomène est en adéquation avec ce qui a été trouvé dans la littérature [314], montrant que le cuivre peut être complexé facilement par les aminoglycosides de type néamine (cf. **Figure 51**).

On peut supposer qu'il y a formation d'un complexe bidenté entre l'aminoglycoside immobilisé et le cuivre, mais également entre le cuivre et l'acide aminé. Ainsi, deux points d'interaction sont possibles entre l'acide aminé et le sélecteur chiral via le cuivre. Si l'on se réfère au modèle de reconnaissance chiral proposé par Dalglish [61], énonçant que trois points d'interaction sont nécessaires entre le sélecteur et le soluté à séparer, un troisième point d'interaction doit exister.

Après observation des valeurs de k dans les **Tableaux 7 et 8** des différents composés séparés sur l'ensemble des deux colonnes utilisées, on s'aperçoit que la rétention dépend, au moins en partie, du caractère hydrophobe global du substituant des acides aminés. Les composés possédant les groupements R les moins hydrophobes (alanine, valine, etc.) montrent des temps de rétention relativement faibles, tandis que les composés possédant les substituants les plus hydrophobes (leucine, α -méthyl-tyrosine, etc.) montrent un temps de rétention plus élevé. Ainsi, il pourrait exister une affinité entre la partie hydrophobe du composé injecté et la partie hydrophobe du sélecteur immobilisé (vraisemblablement la chaîne C_{18} fixée à la néamine ou les greffons C_{18} de la phase stationnaire). Cet effet pourrait correspondre au troisième point d'interaction entre le soluté et le sélecteur chiral, nécessaire à la séparation des énantiomères. Ce même type de comportement a été reporté par Ilisz et al. [248] et Schlauch et al. [214] qui supposent qu'il y a une interaction entre la partie hydrophobe des solutés injectés et la surface apolaire des phases stationnaires.

Des expériences supplémentaires ont permis de renforcer cette hypothèse. La néamine native (sans chaîne C_{18}) (cf. **Figure 50**) est ajoutée comme additif à une phase mobile contenant de l'eau et du sulfate de cuivre à 0.5 mM en utilisant une phase stationnaire de type C_{18} . La séparation d'acides aminés comme la tyrosine ou la valine a été impossible même après un changement des conditions opératoires telles que la température de la colonne, le débit ou la concentration en cuivre dans la phase mobile. Ce phénomène pourrait être dû à l'absence de la chaîne C_{18} fixée à la néamine.

Par conséquent, un mécanisme de reconnaissance chirale, basé sur les trois points d'interaction de Dalglish, pour la PSC néamine 5-mono C_{18} , par exemple, est proposé (**Figure 56**).

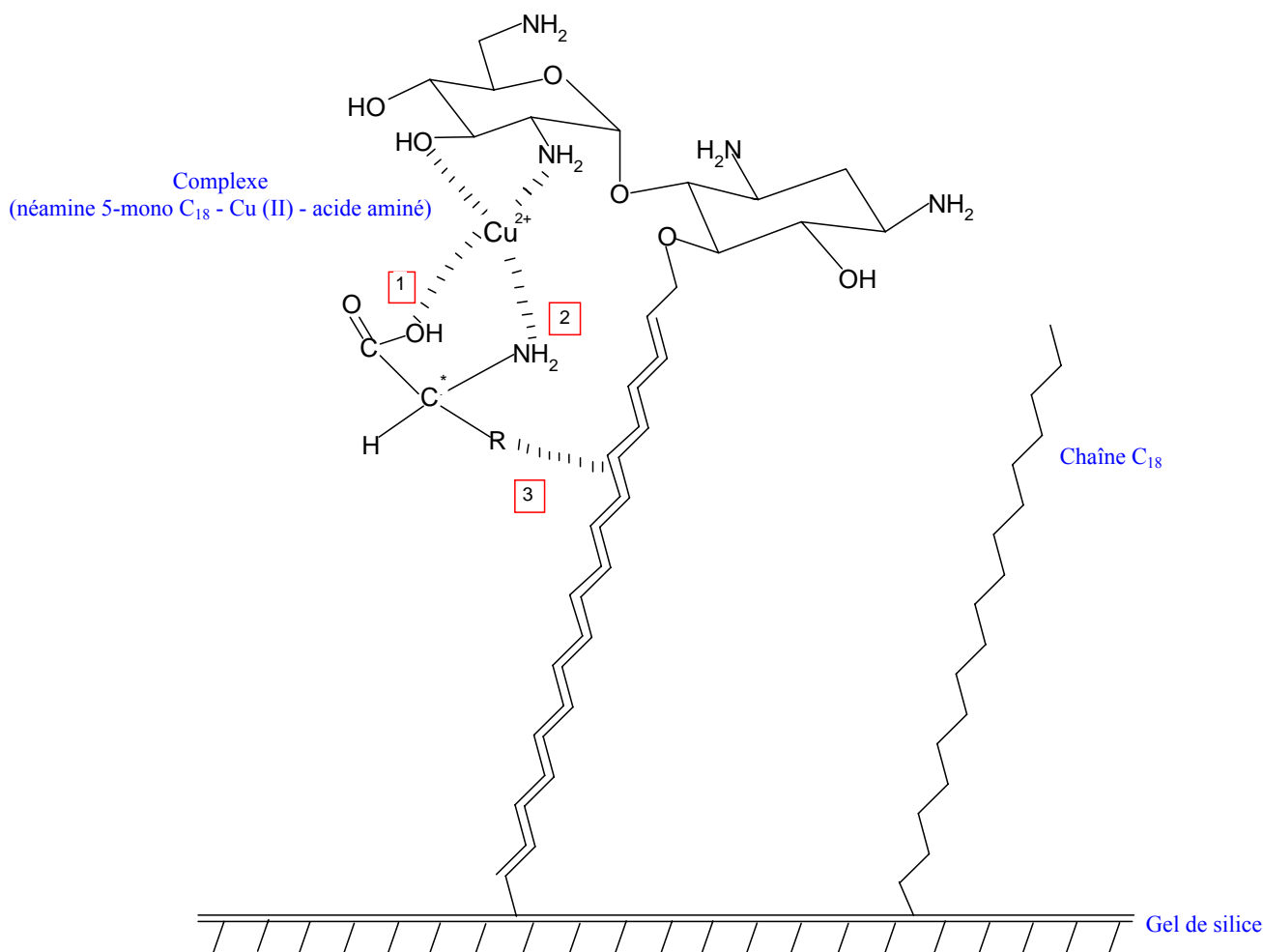


Figure 56 : Proposition d'un mécanisme de reconnaissance chirale pour la PSC néamine 5-mono C₁₈ avec les trois points d'interaction de Dalglish.

VII-3-3-3 Durée de vie et régénération des supports immobilisés avec le sélecteur chiral de type néamine :

La stabilité de la PSC néamine 5-mono C₁₈ est testée au cours du temps, en injectant la tyrosine comme molécule témoin. Cette PSC est utilisée pendant une durée de cinq mois avant qu'une certaine perte d'énantiosélectivité apparente soit observée. Ceci pourrait être due à la présence du méthanol. L'ajout de 7% de méthanol dans la phase mobile a entraîné une dégradation des propriétés énantiosélectives de cette PSC. Cependant, la colonne peut être facilement régénérée en procédant de la même manière que lors de l'étape d'immobilisation. Une telle régénération permet la restauration complète des caractéristiques originales de rétention et d'énantiosélectivité.

VII-3-4 Conclusion :

Ce travail présente pour la première fois l'utilisation des aminoglycosides en CCEL. Deux nouvelles PSCs (néamine 4'-mono C₁₈ et néamine 5-mono C₁₈) ont été utilisées avec succès pour la séparation d'un nombre total de 17 couples d'énantiomères sur les deux colonnes. La position d'attachement de la chaîne C₁₈ sur la néamine (en 4' ou en 5) influence l'énantiosélectivité et l'ordre d'éluion énantiomérique. Un mécanisme de reconnaissance chirale, basé sur les trois points d'interaction de Dalglish, est proposé.

Toutefois, ces PSCs ne sont pas exemptes d'inconvénients. Le temps d'analyse très long s'avère être l'inconvénient le plus important, celui-ci pouvant s'élever jusqu'à cinq heures (tyrosine avec la colonne néamine 4'-mono C₁₈). De plus, certaines molécules plus hydrophobes, comme le tryptophane par exemple, sont éluées trop tardivement et par conséquent, ne sont pas détectables.

VII-3-5 Perspectives :

Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'améliorer la méthodologie analytique de cette séparation chirale. Une caractérisation plus complète de ces nouvelles PSCs néamine est actuellement menée sur des colonnes chromatographiques de diamètre plus important. Les mécanismes stéréosélectifs seront étudiés en modifiant les conditions opératoires (composition de la phase mobile, température, types de cation et d'anions, etc.) et une optimisation de la résolution et du temps d'analyse sera effectuée.

De nombreux dérivés de la néamine et d'autres aminoglycosides, synthétisés par l'équipe de chimie bio-organique du DPM (**Figure 57**) seront testés, d'une part en tant que phase stationnaire chirale (en micro-CLHP) et d'autre part en tant qu'additif du tampon de migration (en électrophorèse capillaire).

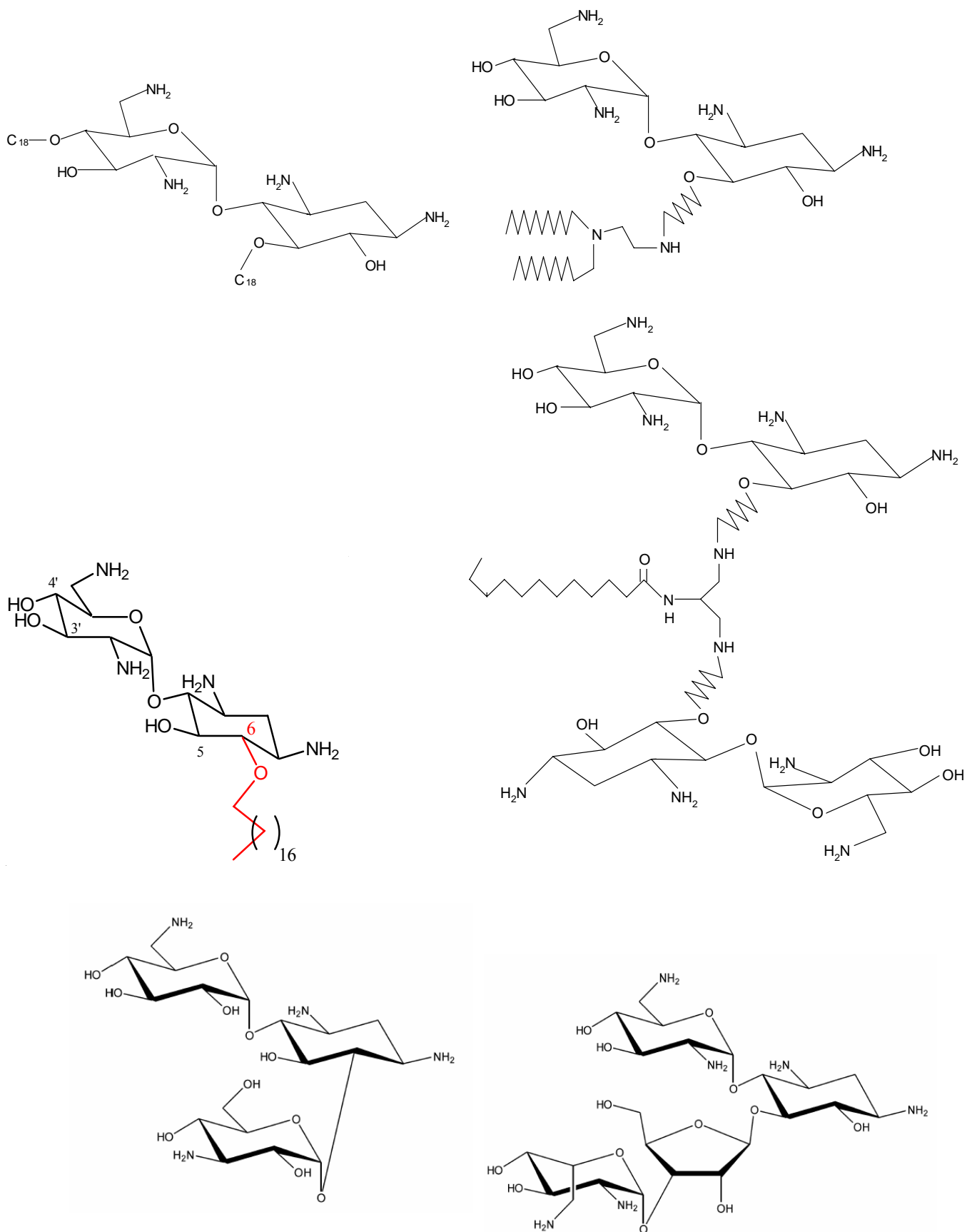


Figure 57 : Exemples de dérivés de néamine synthétisés au laboratoire de chimie bio-organique du DPM et d'aminoglycosides qui seront testés en CCEL.

VIII- Conclusion

Nous avons abordé dans la partie bibliographique, plusieurs aspects concernant la chiralité et ses incidences d'un point de vue biologique et pharmaceutique. Nous avons décrit par la suite les différentes PSCs utilisées en CLHP pour la résolution chirale. Nous nous sommes intéressé notamment à étudier l'utilisation des antibiotiques de type glycopeptide, en tant que sélecteurs chiraux, à des fins de séparation d'énantiomères d'acides aminés.

Notre travail expérimental nous a permis de mieux comprendre le processus de la reconnaissance chirale du tryptophane sur les PSCs teicoplanine ou TAG. Le modèle bi-Langmuir est très convenable pour décrire le comportement de rétention des deux énantiomères du tryptophane. Une étude thermodynamique a permis de déterminer le rôle négatif joué par les unités saccharidiques de la poche aglycone de la teicoplanine sur l'énantiosélectivité. Ces unités saccharidiques empêchent le tryptophane de se fixer aisément dans la cavité de fixation à forte affinité en modifiant à la fois l'adsorption des énantiomères et l'accessibilité au site. Les résultats de la compensation enthalpie-entropie, basés sur le modèle de Grunwald, suggèrent que la déshydratation à l'interface ligand-récepteur est un facteur important dans le processus de fixation énantiosélective. Une différence de ≈ 2 ou 3 molécules d'eau libérées, lors de la fixation stéréosélective du D/L tryptophane, est calculée entre les deux PSCs TAG et teicoplanine.

Un nouveau type de PSC teicoplanine basé sur une immobilisation non-covalente de cet antibiotique par sa queue hydrophobe sur un support chromatographique de type C_8 ou C_{18} a été développé. Ce nouveau type de PSC teicoplanine a montré son aptitude à inverser l'ordre d'éluion énantiomérique des acides aminés par rapport à celui retrouvé avec une PSC teicoplanine commerciale (teicoplanine immobilisée d'une manière covalente).

Les dérivés de la néamine, synthétisés au sein de l'équipe de chimie bio-organique du DPM, ont été utilisés pour la première fois en CCEL. Deux molécules dérivées de la néamine (néamine 4'-mono C_{18} et néamine 5-mono C_{18}) immobilisées sur un support chromatographique de type C_{18} ont permis la séparation des énantiomères de dix sept espèces. Une comparaison entre ces deux PSCs a été menée afin d'étudier l'influence de la position d'attachement de la chaîne aliphatique C_{18} sur les propriétés énantiosélectives de ces PSCs. Les expériences montrent que la PSC néamine 4'-mono C_{18} a un pouvoir résolutif plus important que la PSC néamine 5-mono C_{18} . Ces résultats encourageants présagent d'un futur prometteur pour ce type de PSC dédiée à la CCEL.

IX- Bibliographie

- [1] S. Fuchs, R. Berger, L. Klomp, T. De Koning, Mol. Genet. Metab., **85** (2005) 168.
- [2] G. Lubec, B. Lubec, Amino Acids, **4** (1993) 1.
- [3] R. Marchelli, A. Dossena, G. Palla, Trends Food Sci. Technol., **7** (1996) 113.
- [4] H.P. Husson, Ann. Pharm. Fr., **55** (1997) 14.
- [5] J.A. Le Bel, Bull. Soc. Chim. Fr., **22** (1874) 337.
- [6] J.H. Van't Hoff, Arch. Neerl. Sci. Exactes et Natur., **9** (1874) 445.
- [7] H. Kagan, *La stéréochimie organique*, PUF, Paris, (1975).
- [8] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, *Chromatographie en phase liquide et supercritique*, Masson, Paris, (1991).
- [9] J. Jacques, *La molécule et son double*, Hachette, Paris, (1992).
- [10] A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm, E. Hecker, Z. Naturforsch.B, **14** (1959) 283.
- [11] E. Alexandros, K. Demetrios, D. Chronopoulos, Tetrahedron Lett., **46** (2005) 4353.
- [12] J. C. Leffingwell, Leffingwell Reports, **3** (2003) No.1.
- [13] D.L. Lewis, A.W. Garrison, K.E. Wommack, A. Whittemore, P. Steudler, J. Melillo, Nature, **401** (1999) 898.
- [14] Jr. Holmes, B. Braun, G. Bremmer, Pharmaceut. Technol., **14** (1990) 46.
- [15] F. Shealy, C. Opliger, J. Montgomery, J. Pharma. Sci., **57** (1968) 757.
- [16] H. Ockenfels, F. Kohler, Experientia, **26** (1970) 1236.
- [17] B. Knoche, G. Blaschke, Chirality, **6** (1994) 221.
- [18] H. Kagan, L'actualité chimique, **269** (2003) 10.
- [19] S. Kirkiacharian, Techniques de l'ingénieur, **1** (2005) 3340.
- [20] W. Lindner, M. Rath, K. Stoschitzky, H. Semmelrock, Chirality, **1** (1989) 10.
- [21] R. Lalonde, D. Tenero, B. Herring, M. Bottorff, Clin. Pharma. Ther., **47** (1990) 447.
- [22] H. Kim, K. Jeong, S. Lee, S. Jung, Bull. Korean Chem. Soc., **24** (2003) 195.
- [23] T. Walle, Drug Metab. Disposit., **13** (1985) 279.
- [24] H. Zhou, B. Boden, D. Wood, A. Wood, Clin. Pharmacol., **47** (1990) 686.
- [25] R. Williams, 4th Inter. Symposium on Chiral Discrimination, Montréal, (1993) 19.
- [26] CPMP. Note for guidance : *Investigation of Chiral Active Substances*, Commission de la Communauté Européenne, Bruxelles, (1994).
- [27] FDA Policy : *Statement for Development of New Stereoisomeric Drugs*, Rockville, Maryland, (1996).
- [28] H. Shindo, J. Caldwell, Chirality, **3** (1991) 91.
- [29] I. Agranat, H. Caner, Drug. Discov. Today, **4** (1999) 313.
- [30] I. Agranat, H. Caner, J. Caldwell, Nat. Rev. Drug Discovery, **1** (2002) 753.

- [31] S. Pizzarello, J.R. Cronin, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **64** (2000) 329.
- [32] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, **906** (2001) 3.
- [33] J. Seyden-Penne, *Synthèse et catalyse asymétriques : Auxiliaires et ligands chiraux*, EDP Sciences, Paris, (1994).
- [34] N.J. Turner, *Trends Biotechnol.*, **21** (2003) 474.
- [35] T. Tonon, A. Lonvaud-Funel, *J. Appl. Microbiol.*, **89** (2000) 526.
- [36] K. Skupinska, E. McEachern, I. Baird, R. Skerlj, G. Bridger, *J. Org. Chem.*, **68** (2003) 3546.
- [37] A.E. Sigmund, R. DiCosimo, *Tetrahedron : Asymmetry*, **15** (2004) 2797.
- [38] A. Ghanem, H.Y. Aboul-Enein, *Chirality*, **17** (2005) 1.
- [39] R. Hegstrom, D.K. Kondepudi, *Sci. Am.*, **262** (1990) 108.
- [40] K. Maeda, R.A. Miller, R.H. Szumigala, A. Shafiee, S. Karady, J.D. Armstrong, *Tetrahedron Lett.*, **46** (2005) 1545.
- [41] X. Yuan, J. Li, Y. Tian, G.H. Lee, X.M. Peng, R. Zhu, X. You, *Tetrahedron : Asymmetry*, **12** (2001) 3015.
- [42] A. Ceccato, Ph. Hubert, J. Crommen, *STP Pharma Pratiques*, **9** (1999) 295.
- [43] J. Keurentjes, L. Nabuurs, E. Vegter, *J. Membr. Sci.*, **113** (1996) 351.
- [44] T. Oshima, K. Inoue, S. Furusaki, M. Goto, *J. Membr. Sci.*, **217** (2003) 87.
- [45] P.J. Pickering, J.R. Chaudhuri, *J. Membr. Sci.*, **127** (1997) 115.
- [46] N.H. Lee, C.W. Frank, *Polymer*, **43** (2002) 6255.
- [47] W.H. Pirkle, W.E. Bowen, *Tetrahedron : Asymmetry*, **5** (1994) 773.
- [48] R.I. Stefan, J.K.F. Van Staden, H.Y. Aboul-Enein, *Talanta*, **51** (2000) 969.
- [49] R.I. Stefan, J.K.F. Van Staden, H.Y. Aboul-Enein, *Talanta*, **48** (1999) 1139.
- [50] A.A. Rat'ko, R.I. Stefan, J.K.F. Van Staden, H.Y. Aboul-Enein, *Talanta*, **63** (2004) 515.
- [51] A.A. Rat'ko, R.I. Stefan, J.K.F. Van Staden, H.Y. Aboul-Enein, *Sens. Actuators B*, **99** (2004) 539.
- [52] K. Bodenhöfer, A. Hierlemann, J. Seemann, G. Gauglitz, B. Chistian, B. Koppenhoefer, W. Göpel, *Anal. Chem.*, **69** (1997) 3058.
- [53] K. Bodenhöfer, A. Hierlemann, M. Juza, V. Schurig, W. Göpel, *Anal. Chem.*, **69** (1997) 4017.
- [54] F. Lai, A. Mayer, T. Sheehan, *BioTechniques*, **11** (1991) 236.
- [55] M. Péter, Á. Gyéresi, F. Fülöp, *J. Chromatogr. A*, **910** (2001) 247.
- [56] A. Péter, E. Vékes, G. Tóth, D. Tourwé, F. Borremans, *J. Chromatogr. A*, **948** (2002) 283.

- [57] S. Freimüller, H. Altorfer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30** (2002) 209.
- [58] A. Engström, H. Wan, P.E. Andersson, B. Josefsson, *J. Chromatogr. A*, **715** (1995) 151.
- [59] T. Kubota, J. Kanega, T. Katagiri, *J. Fluorine Chem.*, **97** (1999) 213.
- [60] M. Caude, N. Bargmann-Leyder, *Techniques de l'ingénieur*, **6** (2001) 1470.
- [61] C.E. Dalgliesh, *J. Chem. Soc.*, **137** (1952) 3940.
- [62] W.H. Pirkle, T.C. Pochasky, *Chem. Rev.*, **89** (1989) 347.
- [63] I.W. Wainer, *Trends Anal. Chem.*, **6** (1987) 125.
- [64] W.H. Pirkle, M.H. Hyun, B. Bank, *J. Chromatogr. A*, **316** (1984) 585.
- [65] W. Thomann, F. Prost, A. Prochazhova, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27** (2002) 555.
- [66] Y. Wu, M. Krocka, T. Li, *J. Chromatogr. A*, **822** (1988) 11.
- [67] A.J. Bourgue, I.S. Krull, *J. Chromatogr. A*, **537** (1991) 123.
- [68] P.V. Petersen, J. Ekelund, L. Olsen, S.V. Ovesen, *J. Chromatogr. A*, **757** (1997) 65.
- [69] A.M. Dyas, M.L. Robinson, A.F. Fell, *J. Chromatogr. A*, **586** (1991) 351.
- [70] A. Dobashi, Y. Dobashi, S. Hara, *J. Liq. Chromatogr.*, **9** (1986) 243.
- [71] E.M. Martin Del Valle, *Process Biochem.*, **39** (2004) 1033.
- [72] R. Vespalac, P. Bockec, *Chem. Rev.*, **100** (2000) 3715.
- [73] X. Lu, Y. Chen, *J. Chromatogr. A*, **955** (2002) 133.
- [74] C. Baudin, C. Pean, B. Perly, P. Goselin, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **77** (2000) 233.
- [75] Y. Liu, L. Li, H.Y. Zhang, Z. Fan, X.D. Guan, *Bioorg. Chem.*, **31** (2003) 11.
- [76] S.M. Han, D.W. Armstrong, *Chiral separations by HPLC*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, (1989).
- [77] R. Herraez-Hernandez, P. Campins-Falco, *J. Chromatogr. B*, **740** (2000) 169.
- [78] L.O. Healy, J.P. Murrin, A. Tan, D. Cocker, M. McEnery, J.D. Glennon, *J. Chromatogr. A*, **924** (2001) 459.
- [79] Z. Juvancz, J. Sejtli, *Trends Anal. Chem.*, **21** (2002) 379.
- [80] M. Blanco, I. Valverde, *Trends Anal. Chem.*, **22** (2003) 428.
- [81] D. Mangelings, C. Perrin, D.L. Massart, M. Maftouh, S. Eeltink, W.T. Kok, P.J. Schoenmakers, Y. Vander Heyden, *Anal. Chim. Acta.*, **509** (2004) 11.
- [82] Z.W. Bai, X.H. Lai, L. Chen, C.B. Ching, S.C. Ng, *Tetrahedron Lett.*, **45** (2004) 7323.
- [83] A. Shitangkoon, J. Yanchinda, J. Shiowatana, *J. Chromatogr. A*, **1049** (2004) 223.
- [84] C. Perrin, H. Fabre, M. Maftouh, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, **1007** (2003) 165.
- [85] M.P. Vaccher, E. Lipka, J.P. Bonte, C. Vaccher, *Electrophoresis*, **25** (2004) 1111.
- [86] S. Duvivier, M. Turmine, P. Letellier, *Can. J. Chem.*, **76** (1998) 1210.

- [87] M. Taghvaei, G.H. Stewart, Anal. Chem., **61** (1991) 1902.
- [88] D.Y. Pharr, Z.S. Fu, T.K. Smith, W.L. Ilinze, Anal. Chem., **61** (1989) 275.
- [89] J. Szejtli, Med. Res. Rev., **14** (1994) 353.
- [90] F. Bressolle, M. Audran, T.N. Pham, J.J. Vallon, J. Chromatogr. B, **687** (1996) 303.
- [91] C. Bertucci, E. Domenici, G. Uccello-Barretta, P. Salvadori, J. Chromatogr. A, **506** (1990) 617.
- [92] C. Foulon, C. Danel, M.P. Vaccher, J.P. Bonte, C. Vaccher, J.F. Goossens, Electrophoresis, **25** (2004) 2735.
- [93] M.G. Vargas, Y. Vander Heyden, M. Maftouh, D.L. Massart, J. Chromatogr. A, **855** (1999) 681.
- [94] D.W. Armstrong, C.D. Chang, S.H. Lee, J. Chromatogr. A, **539** (1991) 83.
- [95] W.P. Yau, E. Chan, J. Pharm. Biomed. Anal., **28** (2002) 107.
- [96] A.M. Stalcup, J.R. Faulkner, Y. Tang, D.W. Armstrong, L.W. Levy, E. Regalado, Biomed. Chromatogr., **5** (1991) 3.
- [97] H. Riering, M. Sieber, J. Chromatogr. A, **728** (1996) 171.
- [98] P. Zakaria, M. Macka, P.R. Haddad, J. Chromatogr. A, **1031** (2004) 179.
- [99] C.J. Pedersen, J. Am. Chem. Soc., **89** (1967) 2495.
- [100] E. Kim, Y. Koo, D.S. Chung, J. Chromatogr. A, **1045** (2004) 119.
- [101] J. Jang, S.I. Cho, D.S. Chung, Electrophoresis, **22** (2001) 4362.
- [102] Y. Machida, H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, J. Chromatogr. A, **805** (1998) 85.
- [103] Y. Mori, K. Ueno, T. Umeda, J. Chromatogr. A, **757** (1997) 328.
- [104] G. Blaschke, J. Maibaum, J. Chromatogr. A, **366** (1986) 329.
- [105] G. Blaschke, J. Liq. Chromatogr. A, **9** (1986) 341.
- [106] Y. Okamoto, E. Yashima, Angew. Chem. Int. Ed., **37** (1998) 1020.
- [107] Y. Okamoto, Y. Kaida, J. Chromatogr. A, **666** (1994) 403.
- [108] E. Yashima, K. Maeda, Y. Okamoto, Nature, **399** (1999) 449.
- [109] Y. Okamoto, T. Nakano, S. Habaue, K. Shiohara, K. Maeda, J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem., **34** (1997) 1771.
- [110] K. Zhang, R. Krishnaswami, L. Sun, Anal. Chim. Acta, **496** (2003) 185.
- [111] T. Nakano, J. Chromatogr. A, **906** (2001) 205.
- [112] J. Irurre, J. Santamari, M.C. Gonzalez-Rego, Chirality, **7** (1995) 154.
- [113] Y. Okamoto, E. Yashima, *Macromolecular Design of polymeric materials*, Dekker, New York, (1997).

- [114] Y. Tokuma, T. Fujiwara, H. Noguchi, *J. Pharm. Sci.*, **76** (1987) 310.
- [115] C.P. Clark, B. Snider, P.B. Bowman, *J. Chromatogr. A*, **408** (1987) 275.
- [116] K. Araki, K. Inada, S. Shinikai, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **35** (1996) 72.
- [117] G. Blaschke, W. Broker, W. Frankel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **25** (1986) 830.
- [118] H. Nishi, *J. Chromatogr. A*, **792** (1997) 327.
- [119] R. Gotti, V. Cavrini, V. Andrisano, G. Macellani, *J. Chromatogr. A*, **814** (1998) 205.
- [120] E. Belloli, C. Foulon, S. Yous, M.P. Vaccher, J.P. Bonte, C. Vaccher, *J. Chromatogr. A*, **907** (2001) 1001.
- [121] B. Chankvetadze, M. Saito, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Chromatogr. A*, **773** (1997) 1331.
- [122] H. Nishi, Y. Kuwahara, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **27** (2002) 577.
- [123] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillon, *J. Chromatogr. A*, **906** (2001) 155.
- [124] Y.K. Ye, K.G. Lynam, R.W. Stringham, *J. Chromatogr. A*, **1041** (2004) 211.
- [125] Y.K. Ye, B.S. Lord, L. Yin, R.W. Stringham, *J. Chromatogr. A*, **945** (2002) 147.
- [126] A. Ceccato, B. Boulanger, P. Chiap, PH. Hubert, J. Crommen, *J. Chromatogr. A*, **819** (1998) 143.
- [127] C. Yamamoto, Y. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **77** (2004) 227.
- [128] B. Chankvetadze, L. Chankvetadze, S. Sidamonidze, E. Yashima, Y. Okamoto, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14** (1996) 1295.
- [129] A. Ahmed, D.K. Lloyd, *J. Chromatogr. A*, **766** (1997) 237.
- [130] D.K. Lloyd, A. Ahmed, F. Pastore, *Electrophoresis*, **18** (1997) 958.
- [131] X. Zhang, E.W. Davidian, T.H. Nguyen, R.W. Evans, S.J. Im, G.E. Barker, *J. Chromatogr. A*, **745** (1996) 1.
- [132] D. Eberle, R.P. Hummel, R. Kuhn, *J. Chromatogr. A*, **759** (1997) 185.
- [133] Y. Sadakane, H. Matsunaga, K. Nakagomi, Y. Hatanaka, J. Haginaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295** (2002) 587.
- [134] J. Haginaka, C. Seyama, N. Kanasugi, *Anal. Chem.*, **67** (1995) 2539.
- [135] J. Haginaka, *J. Chromatogr. A*, **906** (2001) 253.
- [136] N. Mano, Y. Oda, N. Asakawa, Y. Yoshida, T. Sato, *J. Chromatogr. A*, **623** (1992) 221.
- [137] N. Mano, Y. Oda, N. Asakawa, Y. Yoshida, T. Sato, *J. Chromatogr. A*, **603** (1992) 105.
- [138] G. Massolini, E. De Lorenzi, D. Lloyd, A. McGann, G. Caccialanza, *J. Chromatogr. A*, **712** (1998) 83.
- [139] J. Haginaka, Y. Miyano, Y. Saizen, C. Seyama, T. Murashima, *J. Chromatogr. A*, **708** (1995) 161.

- [140] J. Haginaka, T. Murashima, C. Seyama, J. Chromatogr. A, **666** (1994) 203.
- [141] R. Isaksson, C. Pettersson, G. Pettersson, S. Jönsson, J. Stalberg, J. Hermansson, I. Marle, Trends Anal. Chem., **13** (1994) 431.
- [142] M.C. Millot, J. Chromatogr. B, **797** (2003) 131.
- [143] A. Ceccato, P.H. Hubert, J. Crommen, J. Chromatogr. A, **760** (1997) 193.
- [144] J. Hermansson, I. Hermansson, J. Chromatogr. A, **666** (1994) 181.
- [145] H. Henriksson, J. Stahlberg, R. Isaksson, G. Pettersson, FEBS Lett., **390** (1996) 339.
- [146] H. Henriksson, L.G. Munoz, R. Isaksson, C. Pettersson, G. Pettersson, J. Chromatogr. A, **898** (2000) 63.
- [147] H. Henriksson, S. Jönsson, R. Isaksson, G. Pettersson, Chirality, **7** (1995) 415.
- [148] E. Domenici, C. Brett, P. Salvadori, G. Félix, I. Cahagne, S. Motellier, I.W. Wainer, Chromatographia, **29** (1990) 170.
- [149] D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, J.R. Chen, Chirality, **6** (1994) 496.
- [150] D.W. Armstrong, Y.B. Tang, S.S. Chen, Y.W. Zhou, C. Babwil, J.R. Chen, Anal. Chem., **66** (1994) 1473.
- [151] T.J. Ward, A.B. Farris, J. Chromatogr. A, **906** (2001) 73.
- [152] R. Bhushan, V. Parashad, J. Chromatogr. A, **736** (1996) 235.
- [153] F. Hui, K.H. Ekborg-Ott, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **906** (2001) 91.
- [154] A.S. Carter-finich, N.W. Smith, J. Chromatogr. A, **848** (1999) 375.
- [155] D.W. Armstrong, U.B. Nair, Electrophoresis, **18** (1997) 2331.
- [156] T.J. Ward, T.M. Oswald, J. Chromatogr. A, **792** (1997) 309.
- [157] M.P. Gasper, A. Berthod, U.B. Nair, D.W. Armstrong, Anal. Chem., **68** (1996) 2501.
- [158] T.J. Ward, C. Dann III, A. Blaylock, J. Chromatogr. A, **715** (1995) 337.
- [159] K.H. Ekborg-Ott, Y. Liu, D.W. Armstrong, Chirality, **10** (1998) 434.
- [160] T.J. Ward, K.D. Ward, *The impact of Stereochemistry on drug Developpment and Use*, John Wiley & Sons, New York, (1997).
- [161] D.W. Armstrong, K.I. Rundlett, J. Liq. Chromatogr., **18** (1995) 3659.
- [162] D.W. Armstrong, M.P. Gasper, K.L. Rundlett, J. Chromatogr. A, **689** (1995) 285.
- [163] K. Mosbach, Trends Biochem. Sci., **19** (1994) 9.
- [164] G. Wulff, Angew. Chem. Int. Ed., **34** (1995) 1812.
- [165] K.J. Shea, Trends Poly. Sci., **2** (1994) 166.
- [166] Y. Lu, C. Li, H. Zhang, X. Liu, Anal. Chim. Acta, **489** (2003) 33.
- [167] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, J. Chromatogr. A, **817** (1998) 5.
- [168] Y. Lu, C. Li, X. Liu, W. Huang, J. Chromatogr. A, **950** (2002) 89.

- [169] P. Owens, L. Karlsson, E. Lutz, L. Andersson, *Trends Anal. Chem.*, **18** (1999) 146.
- [170] C.C. Hwang, W.C. Lee, *J. Chromatogr. B*, **76** (2001) 45.
- [171] O. Ramström, R.J. Ansell, *Chirality*, **10** (1998) 195.
- [172] R. Suedee, C. Songkram, A. Petmoreekul, S. Sangkunakup, S. Sanakasa, N. Kongyarit, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19** (1999) 519.
- [173] W.A. König, I. Benecke, *J. Chromatogr. A*, **209** (1981) 91.
- [174] B. Sellergren, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 1578.
- [175] A.G. Mayes, K. Mosbach, *Trends Anal. Chem.*, **16** (1997) 321.
- [176] L.I. Andersson, *Anal. Chem.*, **68** (1996) 111.
- [177] C. Baggiani, F. Trotta, G. Giraudi, G. Moraglio, A. Vanni, *J. Chromatogr. A*, **786** (1997) 23.
- [178] M. Walshe, E. Garcia, J. Howarth, M.R. Smyth, M.T. Kelly, *Anal. Commun.*, **34** (1997) 119.
- [179] L.I. Andersson, K. Mosbach, *J. Chromatogr. A*, **516** (1990) 313.
- [180] O. Ramström, I.A. Nicholls, K. Mosbach, *Tetrahedron : Assymetry*, **5** (1994) 649.
- [181] L. Fischer, R. Müller, B. Ekberg, K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **113** (1991) 9358.
- [182] M. Kempe, K. Mosbach, *J. Mol. Recognit.*, **6** (1993) 25.
- [183] M. Siemann, L.I. Andersson, K. Mosbach, *J. Antibiot.*, **50** (1997) 89.
- [184] R. Nezlin, *The Immunoglobulins*, Academic Press, San Diego, (1998).
- [185] O. Hofstetter, H. Lindstrom, H. Hofstetter, *J. Chromatogr. A*, **1049** (2004) 85.
- [186] O. Hofstetter, H. Lindstrom, H. Hofstetter, *Anal. Chem.*, **74** (2002) 2119.
- [187] O. Hofstetter, H. Hofstetter, M. Wilchek, V. Schurig, B.S. Green, *Int. J. Bio-Chromatogr.*, **5** (2000) 165.
- [188] C.J. Van Oss, *Immunochemistry*, Marcel Dekker, New York, (1994).
- [189] T.K. Nevanen, L. Söderholm, K. Kukkonen, T. Suortti, T. Teerinen, M. Linder, H. Söderlund, T.T. Teeri, *J. Chromatogr. A*, **925** (2001) 89.
- [190] S.D. Jayasena, *Clin. Chem.*, **45** (1999) 1628.
- [191] F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, *J. Chromatogr. A*, **906** (2001) 35.
- [192] W.H. Pirkle, D.W. House, J.M. Finn, *J. Chromatogr. A*, **192** (1980) 143.
- [193] E. Brahmachary, F.H. Ling, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Comb. Chem.*, **5** (2003) 441.
- [194] K. Lewandowski, P. Murer, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *J. Comb. Chem.*, **1** (1999) 105.
- [195] P. Murer, K. Lewandowski, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Anal. Chem.*, **71** (1999) 1278.
- [196] C. Welch, G. Bhat, M.N. Protopova, *Enantiomer*, **3** (1998) 463.
- [197] C. Welch, G. Bhat, M.N. Protopova, *J. Comb. Chem.*, **1** (1999) 364.

- [198] M. Chiari, V. Desperati, E. Manera, R. Longhi, Anal. Chem., **70** (1998) 4967.
- [199] M.D. Weingarten, K. Sekanina, W.C. Still, J. Am. Chem. Soc., **120** (1998) 9112.
- [200] C. Tuerk, L. Gold, Science, **249** (1990) 505.
- [201] J. Ciesiolka, L. Gold, Science, **2** (1996) 785.
- [202] E. Vianini, M. Palumbo, B. Gatto, Bioorg. Med. Chem., **9** (2001) 2543.
- [203] X. Ye, A.D. Gorin, D.A. Ellington, D.J. Patel, Nat. Struct. Mol. Biol., **3** (1996) 1026.
- [204] A.D. Ellington, J.W. Szostak, Nature, **346** (1990) 818.
- [205] M.C. Golden, B.D. Collins, M.C. Willis, T.H. Koch, J. Biotechnol., **81** (2000) 167.
- [206] D. Kigan, Y. Futamura, K. Sakamoto, S. Yokoyama, Nucl. Acids. Res., **26** (1998) 1755.
- [207] M.N. Stojanovic, P. De Prada, D.W. Landry, J. Am. Chem. Soc., **123** (2001) 4928.
- [208] M. Famulok, J. Am. Chem. Soc., **116** (1994) 1698.
- [209] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, J. Am. Chem. Soc., **125** (2003) 8672.
- [210] M. Michaud, E. Jourdan, C. Ravelet, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, Anal. Chem., **76** (2004) 1015.
- [211] A. Brumbt, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, Anal. Chem., **77** (2005) 1993.
- [212] C. Ravelet, R. Boulkedid, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, J. Fize, E. Peyrin, J. Chromatogr. A, **1076** (2005) 62.
- [213] J. Ruta, C. Ravelet, C. Grosset, J. Fize, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, Anal. Chem., **78** (2006) 3032.
- [214] M. Schlauch, O. Kos, A. Frahm, J. Pharm. Biomed. Anal., **27** (2002) 409.
- [215] M. Ramansky, B. Limson, J. Hawkins, Antibiot. annu., **57** (1956) 706.
- [216] S. Wren, J. Chromatogr. A, **603** (1992) 234.
- [217] M. Gasper, A. Berthod, U. Nair, D.W. Armstrong, Anal. Chem., **68** (1996) 2501.
- [218] A. Berthod, Y. Liu, C. Bagwill, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **731** (1996) 123.
- [219] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, Chromatographia, **52** (2000) 679.
- [220] A. Cavazzini, G. Nadalini, F. Dondi, F. Gasparrini, A. Ciogli, C. Villani, J. Chromatogr. A, **1031** (2004) 143.
- [221] I. D'Acquarica, F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, A. Carroti, S. Cellamare, S. Muck, J. Chromatogr. A, **857** (1999) 145.
- [222] E. Peyrin, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, C. Ravelet, E. Nicolle, J. Alary, Chromatographia, **53** (2001) 645.

- [223] B. Loukili, C. Dufresne, E. Jourdan, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, J. Chromatogr. A, **986** (2003) 45.
- [224] J. Ruta, C. Grosset, C. Ravelet, J. Fize, A. Villet, A. Ravel, E. Peyrin, J. Chromatogr. B, **845** (2007) 186.
- [225] J. Lokajová, E. Tesařová, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **1088** (2005) 57.
- [226] A. Berthod, X. Chen, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Aquarica, C. Villani, A. Carotti, Anal. Chem., **72** (2000) 1767.
- [227] A. Berthod, T.L. Xiao, Y. Liu, W.S. Jenks, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **955** (2002) 53.
- [228] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, J. Sep. Sci., **25** (2002) 851.
- [229] Y. Liu, A. Berthod, C.R. Mitchell, T.L. Xiao, B. Zhang, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **978** (2002) 185.
- [230] I. D'Aquarica, F. Gasparrini, D. Misiti, G. Zappia, C. Cimarelli, G. Palmieri, A. Carotti, S. Cellamare, C. Villani, Tetrahedron : Asymmetry, **11** (2000) 2375.
- [231] T.L. Xiao, E. Tesařová, J.L. Anderson, M. Egger, D.W. Armstrong, J. Sep. Sci., **29** (2006) 429.
- [232] D.W. Armstrong, Y. Liu, K.H. Ekborg-Ott, Chirality, **7** (1995) 474.
- [233] P. Jandera, M. Skavrada, K. Klemmova, V. Backovska, G. Guichon, J. Chromatogr. A, **917** (2001) 123.
- [234] A. Péter, G. Török, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **793** (1998) 283.
- [235] M. Hafnawy, H.Y. Aboul-Enein, Talanta, **61** (2003) 667.
- [236] B. Visegrády, T. Konecsni, N. Grobuschek, M. Schmid, F. Kilár, H.Y. Aboul-Enein, G. Gübits, J. Biochem. Biophys. Methods, **53** (2002) 15.
- [237] C. Desiderio, S. Fanali, J. Chromatogr. A, **807** (1998) 37.
- [238] S. Fanali, P. Catarcini, C. Presutti, J. Chromatogr. A, **994** (2003) 227.
- [239] M. Schmid, N. Grobuschek, V. Passenhofer, A. Klostius, G. Gübits, J. Chromatogr. A, **990** (2003) 83.
- [240] A. Péter, R. Török, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **1057** (2004) 229.
- [241] A. Péter, A. Árki, D. Tourwé, E. Forró, F. Fülöp, D.W. Armstrong, J. Chromatogr. A, **1031** (2004) 159.
- [242] M. Schmid, M. Hölbling, N. Schnedlitz, G. Gübits, J. Biochem. Biophys. Methods, **61** (2004) 1.
- [243] V.A. Davankov, S.V. Rogozhin, J. Chromatogr. A, **60** (1971) 280.
- [244] V.A. Davankov, J. Chromatogr. A, **1000** (2003) 891.

- [245] V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, **965** (2002) 315.
- [246] K. Günther, *J. Chromatogr. A*, **448** (1988) 11.
- [247] V. Schurig, M. Fluck, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **43** (2000) 223.
- [248] I. Ilisz, D. Tourwé, D.W. Armstrong, A. Péter, *Chirality*, **18** (2006) 539.
- [249] E. Gassman, J.E. Kuo, R.N. Zare, *Science*, **230** (1985) 813.
- [250] M.G. Schmid, N. Grobuschek, C. Tuscher, G. Gübitz, A. Végváry, E. Machtejevas, A. Maruska, S. Hjertén, *Electrophoresis* **21** (2000) 3143.
- [251] G. Gübitz, *J. Liq. Chromatogr.*, **9** (1986) 519.
- [252] G. Gubitz, S. Mihellyes, G. Kobinger, A. Wutte, *J. Chromatogr. A*, **666** (1994) 91.
- [253] M. Hyun, S. Han, C. Lee, Y. Lee, *J. Chromatogr. A*, **950** (2002) 55.
- [254] B. Natalini, R. Sardelia, A. Macchiarulo, R. Pellicciari, *Chirality*, **18** (2006) 509.
- [255] M. Remelli, P. Fornasari, F. Pulidori, *J. Chromatogr. A*, **761** (1997) 79.
- [256] M. Śliwka, M. Ślebioda, A. Kolodziejczyk, *J. Chromatogr. A*, **824** (1998) 7.
- [257] A. Kurganov', *J. Chromatogr. A*, **906** (2001) 51.
- [258] Z. Chen, K. Uchiyama, T. Hobo, *Anal. Chim. Acta*, **523** (2004) 1.
- [259] X. Lu, Y. Chen, L. Guo, Y. Yang, *J. Chromatogr. A*, **945** (2002) 249.
- [260] M.H. Hyum, S.C. Han, C.W. Lee, Y.K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **950** (2002) 55.
- [261] Z.X. Zheng, J.M. Lin, F. Qu, *J. Chromatogr. A*, **1007** (2003) 189.
- [262] M.G. Schmid, O. Lecnik, U. Sitte, G. Gübitz, *J. Chromatogr. A*, **875** (2000) 307.
- [263] G. Bazylak, *J. Chromatogr. A*, **65** (1994) 75.
- [264] M.G. Schmid, R. Rinaldi, D. Dreveny, G. Gübitz, *J. Chromatogr. A*, **846** (1999) 157.
- [265] S. Kodama, A. Yamamoto, A. Matsunaga, T. Soga, K. Hayakawa, *Electrophoresis*, **22** (2001) 3286.
- [266] A. Berthod, T. Yu, J.P. Kullman, D.W. Armstrong, F. Gasparrini, I. D'Acquarica, D. Misiti, A. Carotti, *J. Chromatogr. A*, **897** (2000) 113.
- [267] K. Mihlbachler, K. Kaczmariski, A. Seidel-Morgenstern, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **955** (2002) 35.
- [268] K. Kaczmariski, A. Cavazzini, P. Szabelski, D. Zhou, X. Liu, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **962** (2002) 57.
- [269] A. Cavazzini, A. Felinger, K. Kaczmariski, P. Szabelski, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **953** (2002) 55.
- [270] T. Fornstedt, P. Sanjoz, G. Guiochon, *Chirality*, **10** (1998) 375.
- [271] G. Gotmar, L. Asnin, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1059** (2004) 43.

- [272] M. Skavrada, P. Jandera, D.E. Cherrak, A. Aced, G. Guiochon, J. Chromatogr. A, **1016** (2003) 143.
- [273] P. Jandera, V. Backovska, A. Felinger, J. Chromatogr. A, **919** (2001) 67.
- [274] G. Gotmar, T. Fornstedt, G. Guiochon, Anal. Chem., **72** (2000) 3908.
- [275] E. Grunwald, C. Steel, J. Am. Chem. Soc., **117** (1995) 5687.
- [276] L. Liu, C. Yang, Q.X. Guo, Biophys. Chem., **84** (2000) 239.
- [277] R. Lumry, S. Rajender, Biopolymers, **9** (1970) 1125.
- [278] P. Gilli, V. Feretti, G. Gilli, P.A. Borea, J. Phys. Chem., **98** (1994) 1515.
- [279] M. Westwell, M. Searle, J. Klein, D. Williams, J. Phys. Chem., **100** (1996) 16000.
- [280] T. Mizutani, K. Wada, S. Kitagawa, J. Org. Chem., **65** (2000) 6097.
- [281] L. Jen-Jacobson, L.E. Engler, L.A. Jacobson, Structure, **8** (2000) 1015.
- [282] M.V. Rekharsky, Y. Inoue, Chem. Rev., **98** (1998) 1875.
- [283] J.P. Foley, J.G. Dorsey, Anal. Chem., **55** (1983) 730.
- [284] F. Gritti, W. Piatkowski, G. Guiochon, J. Chromatogr. A, **978** (2002) 81.
- [285] I. Slama, C. Ravelet, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, J. Chromatogr. Sci., **40** (2002) 83.
- [286] D. Williams, M. Searl, J. Mackay, U. Gerthard, R. Maplastone, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **90** (1993) 1172.
- [287] D.H. Williams, J.P.L. Cox, A.J. Doig, M. Gardner, U. Gerhard, P.T. Kaye, A.R. Lal, I.A. Nicholls, C.J. Salter, R.C. Mitchell, J. Am. Chem. Soc., **113** (1991) 7020.
- [288] A.L. Myers, J.M. Prausnitz, AIChE J., **11** (1965) 121.
- [289] P. Arriaga, J. Laynez, M. Menendez, J. Canada, F. Garcia-Blanco, Biochem. J., **265** (1990) 69.
- [290] K. Sharp, Protein Sci., **10** (2001) 661.
- [291] A.C. Bowden, J. Biosci., **27** (2002) 121.
- [292] L. Liu, Q.X. Guo, Chem. Rev., **101** (2001) 673.
- [293] R.R. Krug, W.G. Hunter, R.A. Grieger, J. Phys. Chem., **80** (1976) 2335.
- [294] A. Dorn, S.R. Vippagunta, H. Matile, C. Jaquet, J.L. Vennerstrom, R.G. Ridley, Biochem. Pharmacol., **55** (1998) 727.
- [295] Y. Inoue, Y. Liu, L.H. Tong, B.J. Shen, D.S. Jin, J. Am. Chem. Soc., **115** (1993) 10644.
- [296] R. Zidovetzki, Y. Blatt, G. Schepers, I. Pecht, Mol. Immunol., **25** (1988) 379.
- [297] F. Schwarz, D. Tello, F. Goldbaum, R. Mariuzza, R. Poljak, Eur. J. Biochem., **228** (1995) 388.
- [298] B.W. Sigurskjold, D.R. Bundle, J. Biol. Chem., **267** (1992) 8371.

- [299] P.A. Borea, A. Dalpiaz, K. Varani, P. Gilli, G. Gilli, Biochem. Pharmacol., **60** (2000) 1549.
- [300] M.C. Chervenak, E.J. Toone, J. Am. Chem. Soc., **116** (1994) 10533.
- [301] A.A. Rashin, M.A. Bukatin, Biophys. Chem., **51** (1994) 239.
- [302] P.L. Privalov, G.I. Makhatadze, J. Mol. Biol., **232** (1993) 660.
- [303] R. Bingham, J. Findlay, S. Hsieh, A. Kalverda, A. Kjellberg, C. Perazzolo, S. Phillips, K. Seshadri, C. Trinh, W. Turnbull, G. Bodenhausen, S. Homans, J. Am. Chem. Soc., **126** (2004) 1675.
- [304] I. Jelesarov, H.R. Bosshard, J. Mol. Recognit., **12** (1999) 3.
- [305] P.D. Ross, S. Subramanian, Biochemistry, **20** (1981) 3096.
- [306] J.S. Fritz, P. R. Haddad, J. Chromatogr. A, **997** (2003) 21.
- [307] M. Hanna, V. De Biasi, B. Bond, P. Camilleri, A. Hutt, Chromatographia, **52** (2000) 710.
- [308] Q. Wan, P. Shaw, M. Davies, D. Barrett, J. Chromatogr. A, **765** (1997) 187.
- [309] Q. Wan, P. Shaw, M. Davies, D. Barrett, J. Chromatogr. A, **786** (1997) 249.
- [310] J. Oxelbark, S. Claeson, Tetrahedron : Asymmetry, **13** (2002) 2235.
- [311] H. Kamimori, M. Konishi, J. Chromatogr. A, **929** (2001) 1.
- [312] A. Sandberg, K.E. Markides, E. Heldin, J. Chromatogr. A, **828** (1998) 149.
- [313] M. Doležalová, M. Tkaczyková, Chirality, **11** (1999) 394.
- [314] A. Sreedhara, J. Freed, J. Cowan, J. Am. Chem. Soc., **122** (2000) 8814.
- [315] M. Kaul, D. Pilch, Biochemistry, **41** (2002) 7695.
- [316] C. Liang, A. Romero, D. Rubuka, P. Sgarbi, K. Marby, J. Duffield, S. Yao, M. Cheng, Y. Ichikawa, P. Sears, C. Hu, S. Hwang, Y. Shue, S. Sucheck, Bioorg. Med. Chem. Lett., **15** (2005) 2123.
- [317] J. Woodcock, D. Moazed, M. Cannon, J. Davies, H. Noller, EMBO J., **10** (1991) 3099.
- [318] D. Ryu, C. Tan, R. Rando, Bioorg. Med. Chem. Lett., **13** (2003) 901.
- [319] S. Hirukawa, K. Olson, T. Tsuji, G. Hu, Clin. Canc. Res., **11** (2005) 8745.
- [320] H. Mei, M. Cui, A. Heldsinger, S. Lemrow, J. Loo, K. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, A. Czarnik, Biochemistry, **37** (1998) 14204.
- [321] M. Zapp, S. Stern, M. Green, Cell, **74** (1993) 969.
- [322] E. Riguet, J. Désiré, C. Bailly, J.L. Décout, Tetrahedron, **60** (2004) 8053.
- [323] E. Riguet, S. Tripathie, B. Chaubey, J. Désiré, V. Pandey, J.L. Décout, J. Med. Chem., **47** (2004) 4806.
- [324] H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, Chromatographia, **43** (1996) 426.

- [325] K. Petrusevska, M.A. Kuznestov, K. Gedicke, V. Meshko, S.M. Staroverov, A. Seidel-Morgenstern, J. Sep. Sci., **29** (2006) 1447.

X- Annexe

Mohamed Haroun
Corinne Ravelet
Anne Ravel
Catherine Grosset
Annick Villet
Eric Peyrin

Département de Pharmacochimie
Moléculaire, UMR 5063 CNRS,
ICMG FR 2607, UFR de
Pharmacie, Université Joseph
Fourier, Grenoble, France

Thermodynamic origin of the chiral recognition of tryptophan on teicoplanin and teicoplanin aglycone stationary phases

The D-, L-tryptophan binding and the chiral recognition properties of the teicoplanin and teicoplanin aglycone (TAG) chiral stationary phase (CSPs) were compared at various column temperatures. The solute adsorption isotherms (bi-Langmuir model) were determined for both the two CSPs using the perturbation method. It was demonstrated that the sugar units were involved in the reduction of the apparent enantioselectivity through two phenomena: (i) the inhibition of some enantioselective contacts with low-affinity binding regions of the aglycone and (ii) a decrease in the stereoselective properties of the aglycone high-affinity binding pocket. The phenomenon (ii) was governed by both a decrease in the ratio of the enantiomer adsorption constant and a strong reduction of the site accessibility for D- and L-tryptophan. In addition, a temperature effect study was performed to investigate the chiral recognition mechanism at the aglycone high-affinity pocket. An enthalpy-entropy compensation analysis derived from the Grunwald model as well as the comparison with the literature data demonstrated that the enantioselective binding mode was dependent on an interface dehydration process. The change in the enantioselective process observed between the TAG and teicoplanin CSP was characterized by a difference of ca. 2–3 ordered water molecules released from the species interface.

Key Words: Chiral recognition; Adsorption isotherm; Teicoplanin; Teicoplanin aglycone

Received: November 16, 2004; revised: December 10, 2004; accepted: December 13, 2004

DOI 10.1002/jssc.200400043

1 Introduction

Immobilized teicoplanin is one of the most useful chiral stationary phases (CSPs) for the resolution of racemic compounds with a carboxylic group such as amino acids and dipeptides. This chiral selector (more than 20 stereogenic centers) is characterized by a complex structure consisting of an aglycone portion of four fused macrocyclic rings that form a characteristic "basket" shape and three carbohydrate moieties (two D-glucosamines and one D-mannose) attached to the aglycone basket (**Figure 1**). The aglycone basket contains an amine and a carboxylic group. A hydrophobic C₁₁ acyl side chain is attached to a D-glucosamine group. Such complexity of the selector structure is responsible for binding processes involving a great number of potential interacting groups [1]. For the amino acid enantiomer binding, it has been previously shown that a bi-Langmuir model describes adequately the solute distribution isotherm [2, 3]. It involves one high-affinity/enantioselective site and some other low-affinity regions. It is generally accepted that the high-enantio-

selectivity site for amino acids and dipeptides is localized inside the aglycone pocket formed by the macrocyclic rings [1, 4]. Based on the binding model of peptide cell analogs (terminated by a D-alanine-D-alanine residue) proposed by Williams and co-workers, the interactions of amino acids and dipeptides are expected to take place near the amine functional group [5, 6]. Both polar (carbonyl and NH) and apolar (benzene rings) groups of the cavity are involved in the intermolecular contacts with these specific ligands [5, 6]. The role of the groups localized near or around this pocket, such as the sugar groups, is less clearly defined. By comparing the chromatographic data on teicoplanin aglycone (TAG) or A-40,926 CSPs and those on teicoplanin CSP, Armstrong and co-workers have shown that the carbohydrate units reduce the apparent stereoselective properties of teicoplanin for the amino acids [7–9]. However, from a mechanistic point of view, little is known about their exact influence on the chiral recognition mechanism. Various hypotheses have been formulated: (i) the sugar units interact with the enantiomers and offer additional sites [7] which would overwhelm, at least in part, the enantioselective properties of the aglycone high-affinity site; (ii) the presence of sugar units at the teicoplanin surface hinders enantioselective interactions. This hindrance mechanism can be caused by several phenomena involving, for example, steric effects [7],

Correspondence: Eric Peyrin, Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR 5063 CNRS, ICMG FR 2607, UFR de Pharmacie, Université Joseph Fourier, 38041 Grenoble, France. Phone: +33 (0)4 76 04 10 33. Fax: +33 (0)4 76 04 10 07. E-mail: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr.



Reversal of the enantiomeric elution order of some aromatic amino acids using reversed-phase chromatographic supports coated with the teicoplanin chiral selector

Mohamed Haroun, Corinne Ravelet, Catherine Grosset, Anne Ravel, Annick Villet, Eric Peyrin*

Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble FR 2607, Université Joseph Fourier, UFR de Pharmacie de Grenoble, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France

Received 8 March 2005; received in revised form 25 May 2005; accepted 13 July 2005
Available online 10 August 2005

Abstract

In this paper, two chiral stationary phases were prepared by coating the surface of both C8 and C18 high-performance liquid chromatography (HPLC) supports with the teicoplanin chiral selector. The hydrophobic C11 acyl side chain, attached to the D-glucosamine group of teicoplanin, served as anchor moiety for the immobilization of the chiral selector on the apolar support material. The retention and enantioselectivity of these coated stationary phases were studied using some aromatic amino acids as probe solutes and an aqueous solution as mobile phase. It was found that the enantiomer elution order on the modified C8 and C18 stationary phases was reversed ($L > D$) relatively to that classically observed with a teicoplanin covalently immobilized on a silica support ($D > L$). Such a dynamic coating on the reversed-phase supports was found to be of interest since the apparent enantioselectivity was not significantly changed by the use during an extended period of time or following a long-term storage of the columns.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chiral separation; Teicoplanin; Coating; Aromatic amino acids

1. Introduction

Coating methodology of apolar chromatographic surfaces with appropriate ligands has been widely exploited in HPLC notably for the separation of ionic species by ion chromatography [1] or the study of the interactions between bioactive compounds and “membrane-like” systems [2]. Such an approach has been also reported for HPLC chiral separation. Previous papers have shown that reversed-phase chromatographic supports such as C18 or porous graphitic carbon stationary phases, coated with chiral selectors covalently bonded to a suitable non-polar anchor molecule, can be used successfully as chiral stationary phases (CSPs). Various chiral selectors such as amino acids derivatives, tartaramide, lasalocid or acylcarnitine have been immobilized via such

a methodology and successfully used for the resolution of various racemates [3–7].

During the past decade, the macrocyclic antibiotics have been widely used as chiral selectors in both capillary electrophoresis (CE) and high-performance liquid chromatography (HPLC), especially for the resolution of native amino acid racemates. Although these glycopeptides have been used in some cases as chiral mobile phase additives (CMPA) [8–11], the design of chiral stationary phases is the most popular methodology reported for the HPLC applications. To date, the commercially available glycopeptidic CSPs are silica based, with the chiral selector covalently bound [12,13]. The cyclic antibiotics have been attached to silica gel via carboxylic acid or epoxy-terminated organosilanes [12]. Teicoplanin is unique among the glycopeptides in that it has a C11 hydrophobic acyl side chain attached to the glucopyranosyl group. This characteristic is notably responsible for the formation of micelles and specific pharmacological

* Corresponding author. Tel.: +33 4 76 04 10 33; fax: +33 4 76 04 10 07.
E-mail address: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr (E. Peyrin).

Phases stationnaires chirales à base de teicoplanine et d'aminoglycosides pour la séparation d'énantiomères d'acides aminés

Résumé : Les acides aminés sont des éléments chiraux essentiels de la vie, ils ont des effets biologiques et pharmacologiques très importants. La séparation chirale des énantiomères des acides aminés est indispensable dans de nombreux domaines tels que l'industrie pharmaceutique, l'agroalimentaire, l'archéologie et la médecine légale. La chromatographie liquide haute performance (CLHP) avec l'utilisation d'une phase stationnaire chirale constitue à l'heure actuelle la méthode de choix pour séparer des énantiomères. Ce travail a permis d'étudier les mécanismes d'interactions mis en jeu dans la fixation et la séparation des énantiomères du tryptophane sur des phases stationnaires chirales (PSCs) de type teicoplanine et teicoplanine aglycone (TAG). Une étude thermodynamique comparative entre ces deux PSCs a permis de déterminer le rôle négatif joué par les trois unités saccharidiques de la teicoplanine dans le processus de discrimination chirale du tryptophane. Ainsi, nous avons montré que cet acide aminé interagit considérablement avec la poche aglycone de la teicoplanine. L'utilisation d'une nouvelle PSC de type teicoplanine, immobilisée de manière non-covalente sur des supports chromatographiques de type C₈ et C₁₈, a permis de séparer quelques acides aminés aromatiques et d'inverser leur ordre d'éluion énantiomérique (L>D) par rapport à celui classiquement obtenu avec une immobilisation covalente sur gel de silice (D>L). Par ailleurs, nous avons développé une nouvelle classe de sélecteurs chiraux à base d'aminoglycosides en chromatographie chirale d'échange de ligands. Plusieurs énantiomères d'acides aminés et de nucléosides ont été séparés avec succès sur ce nouveau type de PSCs.

Mots clés : Séparation chirale - Enantiosélectivité - Chromatographie liquide haute performance - Acides aminés - Teicoplanine - Teicoplanine aglycone - Néamine - Isotherme d'adsorption - Immobilisation non covalente - Aminoglycoside - Chromatographie chirale d'échange de ligands.

Chiral stationary phases of teicoplanin-based and of aminoglycosides-based for the separation of amino acids enantiomers

Abstract : Amino acids are essential chiral elements of life, they have very important biological and pharmacological effects. The separation of amino acids enantiomers is of a crucial importance in various fields such as pharmaceutical industry, agroalimentary, archaeology and forensic sciences. The high performance liquid chromatography (HPLC) using a chiral stationary phase represents at present time the method of choice to separate enantiomers. This work has analyzed the interaction mechanisms involved in the fixation and in the enantioselective separation of tryptophan enantiomers on teicoplanin and teicoplanin aglycone (TAG) chiral stationary phases (CSPs). A comparative thermodynamic study between these two CSPs was performed to investigate the negative role played by the three saccharidic units of the teicoplanin in the chiral discrimination process. Thus, we showed that tryptophan interacts considerably with the aglycone pocket of the teicoplanin. A simple coating method of reversed-phase supports to prepare a new teicoplanin CSP has allowed to separate some aromatic amino acids and to reverse their enantiomeric elution order (L>D) compared to that classically obtained with a teicoplanin covalently immobilized on silica support (D>L). In addition, we have developed a new class of chiral selectors based on aminoglycosides for chiral ligand-exchange chromatography. Several enantiomers of amino acids and nucleosides were separate successfully on this new kind of CSPs.

Key words : Chiral separation - Enantioselectivity - High performance liquid Chromatography - Amino acids - Teicoplanin - Teicoplanin aglycone - Neamine - Adsorption isotherm - Coating - Aminoglycoside - Chiral ligand-exchange chromatography.