

DEA de Chimie Organique
Université Paris-Sud
Orsay

Laboratoire de Chimie Structurale Organique
Batiment 410, Centre Scientifique
Orsay

**Synthèse et étude de mésophases lyotropes
du poly-(β -phénéthyl-L-aspartate)
comme milieu RMN pour la
discrimination énantiomérique.**

Présenté par : Jérôme KIEFFER

Directeur du laboratoire : Professeur Jacques COURTIEU.
Responsable de stage : Docteur Abdelkrim MEDDOUR.

Rapport du Stage de DEA.
Année 2000-2001

Remerciements

Je remercie vivement M. le Professeur Jacques COURTIEU, directeur de l'Institut de Chimie Moléculaire d'Orsay, pour l'honneur qu'il m'a fait en m'accueillant au sein de son laboratoire et pour m'avoir donné la possibilité d'y effectuer mon stage.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude, tout particulièrement envers Abdelkrim MEDDOUR, maître de conférences pour m'avoir encadré tout au long de mon stage. Je tiens donc à le remercier pour ses précieux conseils, la patience dont il a fait preuve envers mes nombreuses questions et donc pour tout le temps qu'il m'a consacré, tant en synthèse organique, qu'en RMN ou pour la correction de ce rapport. C'est en grande partie grâce à lui que ce stage a été si passionnant et si instructif.

J'exprime enfin toute ma gratitude à M. Marc LE BRET, Directeur de recherche au Laboratoire de Biotechnologies et de Pharmacogénétique Appliquée (CNRS UMR 8532) à l'ENS de Cachan qui m'a donné les méthodes et les moyens pour modéliser les différentes hélices du PPLA. Sa grande connaissance des macromolécules biologiques et de leurs modélisations m'a apporté une nouvelle vision de la modélisation moléculaire des polymères.

Ma reconnaissance s'adresse également à toute l'équipe du laboratoire de Chimie Structurale Organique pour leur aide ponctuelle, pour leur bonne humeur et pour leur accueil chaleureux.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	3
Introduction	4
1 La RMN en milieu anisotrope	5
1.1 Les phases cristal liquide	5
1.2 Les phases cristal liquide du PBLG et du PPLA	5
1.3 Les bases théoriques de la RMN en milieu anisotrope.	6
1.4 La visualisation énantiomérique par RMN du deutérium en solvant cristal liquide chiral	7
2 Résultats expérimentaux	9
2.1 Synthèse des polymères	9
2.1.1 Estérification.	9
2.1.2 Formation du N-Carboxy Anhydride	10
2.1.3 Polycondensation	10
2.2 Analyse RMN	11
2.2.1 Diagramme de phase du PPLA	11
2.2.2 Le PPLA pour la discrimination énantiomérique	12
2.2.3 Comportement en température : inversion de l'hélice	12
2.2.4 Effet de l'inversion sur la discrimination énantiomérique	13
2.3 Modélisation moléculaire.	14
2.3.1 Choix du Système :	14
2.3.2 Création de la géométrie initiale.	15
2.3.3 Champ de Force utilisé :	15
2.3.4 Adaptation de AMBER94 au poly-(β -phénéthyl-L-aspartate)	16
2.3.5 Résultats des minimisations	16
2.3.6 Analyse des résultats	17
Conclusion	20
ANNEXE : Partie expérimentale.	21
Appareillage.	21
Préparation des échantillons cristaux liquides.	21
Synthèse.	21
β -Phénéthyl-L-Aspartate.	21
β -Phénéthyl-L-Aspartate N-Carboxy Anhydride.	21
Poly-(β -Phénéthyl-L-Aspartate).	22
Références	23

Introduction

L'essor de la synthèse énantiosélective, au cours des dernières décennies, a créé un besoin grandissant de méthodes fiables pour mesurer la pureté énantiomérique d'un produit. De nombreuses techniques analytiques permettent de mesurer la pureté énantiomérique d'un mélange, telles que les méthodes chiroptiques (polarimétrie, dispersion rotatoire optique) et les techniques chromatographiques.¹

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est également un outil performant dans ce domaine d'analyse.² En RMN en milieu isotrope, la visualisation des énantiomères n'est pas directe car ces derniers possèdent des propriétés magnétiques identiques. En créant des interactions diastéréomériques par l'intermédiaire de substrats chiraux énantiopurs (agents de dérivation ou de solvation chiraux) ou de réactifs chiraux de déplacement chimique, il est possible de distinguer les énantiomères. Cependant, le champ d'application de ces techniques n'est pas général. Il a donc été nécessaire de développer d'autres méthodes de visualisation.

En 1963, Saupe découvrit³ qu'une molécule dissoute dans un cristal liquide pouvait présenter un spectre RMN "haute résolution". Ce dernier est dominé par les interactions anisotropes, telles que l'anisotropie de déplacement chimique, les interactions dipolaires et quadripolaires (pour les noyaux de spin $I \geq 1$). Au début des années 90, l'utilisation d'un solvant cristal liquide chiral a permis au laboratoire de Chimie Structurale Organique de l'université Paris-Sud de développer une nouvelle méthode de visualisation des énantiomères par RMN.⁴ Cette technique a été généralisée par l'utilisation de cristaux liquides chiraux lyotropes obtenus avec des solutions concentrées de poly-(γ -benzyl-L-glutamate) - ou PBLG- dans des solvants organiques hélicogènes. En effet, puisque deux énantiomères dissous dans un tel milieu s'orientent différemment, la RMN, très sensible aux orientations moléculaires, permet leur discrimination. Les isomères optiques de composés possédant une large gamme de fonctions organiques ont ainsi pu être discriminés.^{5, 6}

Une des thématiques du laboratoire est aujourd'hui la reconnaissance des configurations absolues par la compréhension des interactions entre ces solvants chiraux et les deux énantiomères. Ainsi peut-on se demander si la discrimination chirale provient des centres asymétriques de chaque résidu de la chaîne polypeptidique, ou au contraire si elle est induite par la chiralité macromoléculaire au niveau de l'hélice. Dès 1962, Bradbury⁷ a mis en évidence un comportement étrange de divers poly(β -alkyl-L-aspartates) qui semblent changer de sens d'hélice avec la température. Ces changements de conformation ont été largement étudiés par l'équipe japonaise de Abe à partir de 1991⁸ dans différentes phases, en particulier dans les mésophases lyotropes. Notre but est de voir si l'utilisation de ces polymères en RMN peut nous apporter une réponse, au moins partielle.

Mon travail cette année a consisté en la synthèse de divers poly(β -ester-L-aspartates) susceptibles de présenter une inversion du sens de l'hélicité afin d'observer en RMN le comportement de solutés chiraux dans un cristal liquide de ce type lors du changement de phase. Après une brève description de la phase cristal liquide utilisée, nous rappellerons quelles sont les observables de la RMN dans un tel milieu avec notamment l'interaction quadripolaire.

Les résultats obtenus sur la discrimination énantiomérique dans les phases cristal liquide du PPLA, ainsi que la modélisation des conformations de ce polypeptide seront présentés et discutés.

1 La RMN en milieu anisotrope

1.1 Les phases cristal liquide

L'état cristal liquide,⁹ découvert en 1888 par Reinitzer, est un état de la matière dans lequel l'organisation moléculaire est intermédiaire entre les états solide et liquide (aujourd'hui le terme mésophase est plus approprié pour désigner cet état). Il existe deux classes de cristaux liquides : les thermotropes et les lyotropes.

- Les thermotropes sont des composés qui possèdent une phase cristal liquide intrinsèque, stable dans un intervalle de température donné.
- Les phases lyotropes sont obtenues par mélange de plusieurs composés. Elles sont stables dans des domaines de concentration précis et dépendent de la température.

On distingue plusieurs types de phases thermotropes parmi lesquels les nématiques, les cholestériques et les smectiques. Ces phases qui diffèrent selon leur arrangement moléculaire sont présentées sur la figure 1 ci-dessous :

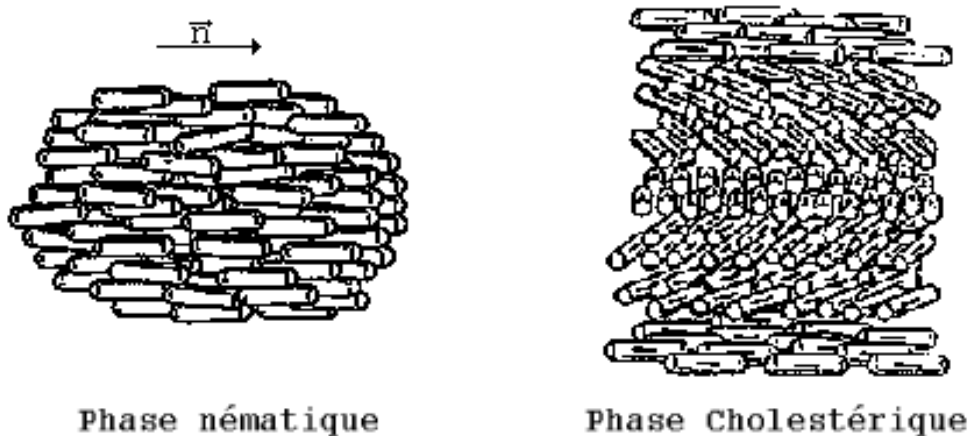


FIG. 1 – Schéma de l'organisation moléculaire de quelques types de cristaux liquides.

Dans les phases cristal liquide nématiques, les molécules sont alignées parallèlement les unes par rapport aux autres suivant une direction appelée directeur (axe moléculaire le plus long), et notée \vec{n} . Une phase cholestérique est composée d'une succession de couches moléculaires nématiques dont le directeur \vec{n} est dévié d'un angle α d'une couche à l'autre. Dans les phases smectiques, les molécules sont parallèles entre elles et forment des couches équidistantes. Les phases cristal liquide se caractérisent donc par l'existence d'un ordre orientationnel.

1.2 Les phases cristal liquide du PBLG et du PPLA

Le PBLG et le PPLA sont des polypeptides de synthèse. En solution dans des solvants organiques hélicogènes, ils adoptent une structure en hélice comme décrit dans la figure 2 ci-dessous :

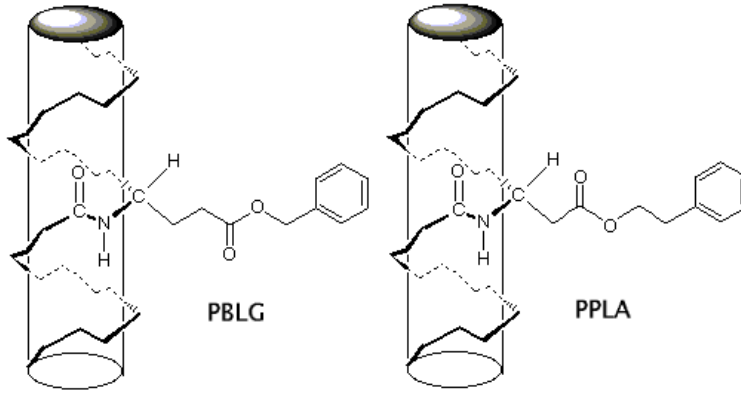


FIG. 2 – Structure en hélice du PBLG et du PLLA

Les solutions concentrées de ces polymères dans un solvant organique hélicogène forment une phase cristal liquide cholestérique. Dans un champ magnétique intense \vec{B}_0 , l'arrangement hélicoïdal du cholestérique est détruit pour conduire à une phase nématique dont le directeur s'oriente parallèlement à \vec{B}_0 . Il s'agit là d'une phase nématique chirale.¹⁰ L'utilisation d'un tel milieu comme solvant pour la RMN conduit à des spectres "haute résolution".

1.3 Les bases théoriques de la RMN en milieu anisotrope.

L'hamiltonien de spin en solvant cristal liquide s'exprime ainsi :

$$\hat{H}_0 = \hat{H}_\delta + \hat{H}_J + \hat{H}_D + \hat{H}_Q$$

avec

- \hat{H}_δ l'hamiltonien de déplacement chimique.
- \hat{H}_J l'hamiltonien de couplage scalaire.
- \hat{H}_D l'hamiltonien de couplage dipolaire.
- \hat{H}_Q l'hamiltonien associé à l'interaction quadripolaire.

Toutes ces interactions RMN sont non nulles en milieu anisotrope et ont une partie anisotrope mesurable. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'interaction quadripolaire.¹¹

Celle-ci représente l'interaction entre le moment quadripolaire Q du noyau ($I \geq 1$) et le gradient de champ électrique q au niveau de ce noyau. Cette interaction, purement anisotrope, joue un rôle fondamental dans la relaxation des noyaux de spin $I > 1/2$. L'hamiltonien de cette interaction est donnée par la relation :

$$\hat{H}_Q = \frac{e^2}{4h} \sum_i \frac{Q_i q_{izz}}{I_i(2I_i - 1)} [3I_{zi}^2 - I_i(I_i - 1)]$$

Dans le cas du deutérium ($I=1$) porté par un carbone, on obtient deux transitions ν_1 et ν_2 à un quantum formant un doublet centrées sur ν_D , fréquence de résonance du deutérium considéré :

$$\nu_1 = \nu_D - \frac{3e^2 q Q}{4h} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle$$

$$\nu_2 = \nu_D + \frac{3e^2 q Q}{4h} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle$$

l'éclatement quadripolaire est alors la différence entre ces deux transitions et vaut :

$$\Delta\nu_Q = \frac{3e^2 Qq}{2h} \left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle$$

Elle est directement reliée au paramètre d'ordre de la direction C-D, $\left\langle \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{2} \right\rangle$ où θ est l'angle entre la liaison et le champ \vec{B}_0 ; les brackets représentant la moyenne sur l'ensemble des orientations moléculaires. On constate qu'au terme constant $K_Q = \frac{3e^2 Qq}{2h}$ près, la mesure de l'éclatement quadripolaire nous permet de déterminer le paramètre d'ordre S de la liaison C-D.

1.4 La visualisation énantiomérique par RMN du deutérium en solvant cristal liquide chiral

Le laboratoire de Chimie Structurale Organique d'Orsay a mis au point une méthode de visualisation d'énantiomères par RMN en solvant cristal liquide chiral.¹² La discrimination provient du fait que deux énantiomères adoptent des orientations moléculaires différentes dans une mésophase chirale. Ils ont, par conséquent, des paramètres d'ordre différents ce qui permet de les discriminer par RMN.

Les spectres de RMN du proton en milieu orienté sont souvent très complexes du fait des nombreux couplages dipolaires qui les caractérisent. A l'inverse, les spectres de RMN du deutérium découplé du proton, RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$, sont dominés par l'interaction quadripolaire, et sont donc très simples à analyser.

Considérons le cas d'un mélange racémique d'une molécule monodeutérée. Dans un milieu cristal liquide non chiral, le spectre de RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ est constitué d'un doublet d'éclatement quadripolaire $\Delta\nu_Q$ centré sur le déplacement chimique ν_D . Le spectre de ce mélange racémique dissous dans un solvant cristal liquide chiral (polymère/cosolvant) se compose de deux doublets d'éclatements quadripolaires $\Delta\nu_Q^2$ et $\Delta\nu_Q^2$ d'égale intensité centrés sur le même déplacement chimique. Chaque doublet correspond à un énantiomère (figure 3) :

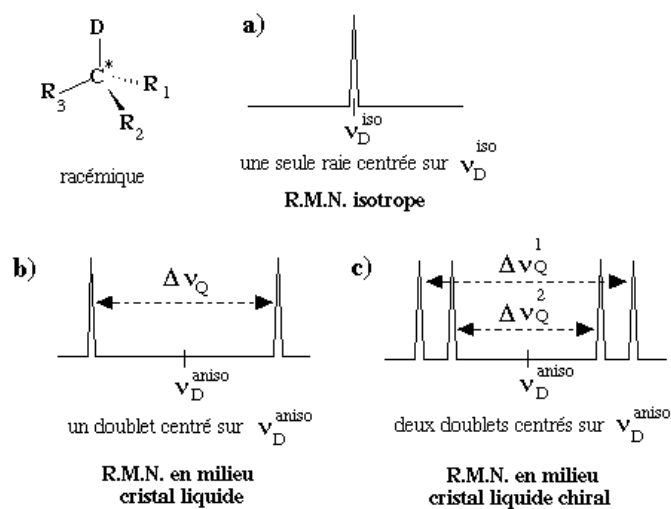


FIG. 3 – Représentation schématique des spectres de RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ d'un mélange racémique d'une molécule monodeutérée, obtenus dans différents types de solvants : a) solvant isotrope, b) solvant cristal liquide non chiral, c) solvant cristal liquide chiral.

On définit le terme F_D ou facteur de dédoublement comme étant le rapport des éclatements quadripolaires des deux énantiomères, il reflète le rapport des paramètres d'ordre de la direction C-D dans les deux énantiomères.

$$F_D = \frac{\Delta\nu_Q^1}{\Delta\nu_Q^2} \approx \frac{S_{CD}^1}{S_{CD}^2}$$

2 Résultats expérimentaux

Le but de ce stage était de voir quelles informations supplémentaires pourrait nous apporter un changement de l'hélicité du polymère sur la compréhension des interactions soluté-solvant dans la discrimination énantiomérique en milieu RMN. Les propriétés du PPLA en phase cristal liquide sont connues depuis 1993 et les travaux de l'équipe japonaise de Watanabe et Abe.⁸ Comme le PPLA est un isomère de position du PBLG nous pouvions avoir de bons espoirs quant à ses propriétés de discrimination énantiomérique. Le problème majeur était sans doute que malgré les dix années d'expérience dans la synthèse du PBLG, jamais personne n'avait réussi à synthétiser un polymère utilisable pour la discrimination énantiomérique au LCSO.

Le PPLA présentant une température de transition hélice droite→hélice gauche en phase cristal liquide de 90°C, ce qui est un peu chaud pour la plupart des composés chiraux qui risquent de se racémiser, nous avons essayé de synthétiser d'autres composés de la même famille : le poly-(β-benzyl-L-aspartate) qui ne présente pas de transition mais peut aisément être transformé en poly-(β-propyl-L-aspartate) par transestérification. Ce dernier présente une température de transition bien plus basse (vers 30°C).¹³

Il faut également noter que la température de transition du PPLA varie en fonction de la phase : elle est plus basse dans les solutions (60-80°C) et plus haute dans les solides (120-140°C). Dans la phase cristal liquide elle prend place vers 80-100°C en fonction du degré de polymérisation. De plus il y a coexistence des deux hélices sur une plage de température relativement étendue : c'est un changement de phase du second ordre c'est à dire qu'il peut y avoir coexistence des deux phases sur une plage de température restreinte.

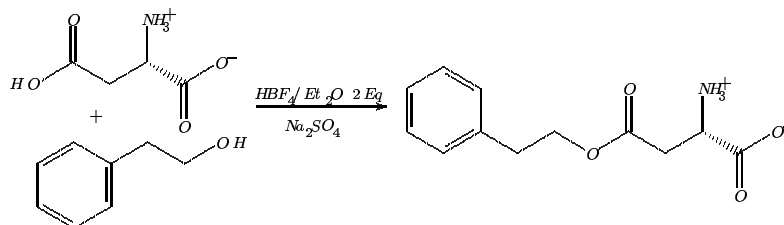
Voici donc l'ensemble des résultats que j'ai obtenu sur le sujet et l'exposé des difficultés rencontrées pendant les trois phases de mon stage : la synthèse, la RMN et la modélisation.

2.1 Synthèse des polymères

La synthèse est semblable à celle proposée par Blout et Karlson en 1956¹⁴ pour le PBLG : polycondensation de β-phényl-éthyl-N-carboxy-L-aspartate anhydride. La synthèse se fait donc en trois étapes : d'une part l'estérification de l'acide aminé, suivi de la formation du N-carboxy anhydride par réaction avec un précurseur du phosgène et finalement la polycondensation.

2.1.1 Estérification.

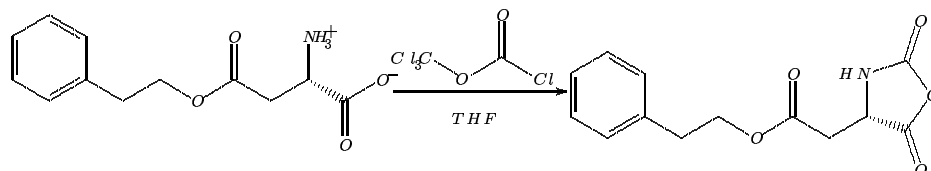
L'estérification est réalisée d'après le protocole de Rainer¹⁵ pour la synthèse d'esters ω-aspartiques et glutamiques, catalysé par l'éthérate de l'acide tétrafluoroborique :



Les rendements sont conformes à ce qui est décrit dans la publication (51%), nous avons obtenu 50% tant pour l'ester benzylique que pour l'ester phénylique.

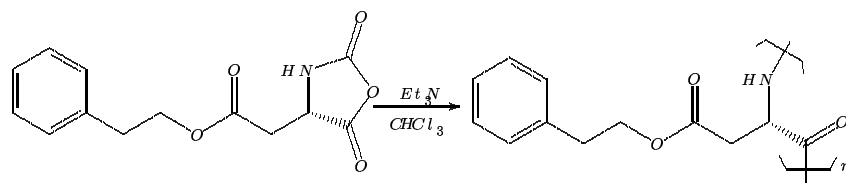
2.1.2 Formation du N-Carboxy Anhydride

Historiquement on formait le NCA des acides aminés par réaction avec le phosgène (gaz très toxique). Aujourd'hui on préfère utiliser le chloroformiate de trichlorométhyle (diphosgène, liquide)¹⁶ ou le carbonate de bis(trichlorométhyl) (triphosgène, solide),¹⁷ qui se décomposent en phosgène sous l'action de la chaleur et d'un catalyseur comme le charbon actif. Le phosgène ainsi libéré réagit *in-situ*



Toutes les réactions de formation de NCA ont été faites avec le diphosgène¹⁶ : la réaction est rapide (30 minutes) et limite les risques liés au phosgène. Le rendement de la réaction après une recristallisation est excellent (84%) mais l'étape suivante nécessitant un NCA exempt de phosgène, il faut entre deux et quatre recristallisations à deux solvants, ce qui fait tomber le rendement global à 64%.

2.1.3 Polycondensation



Le dioxane est utilisé pour synthétiser le PBLG,¹⁴ par contre la polymérisation s'arrête rapidement pour le PPLA par précipitation des fibres. Comme il n'a pas été possible d'obtenir de mésophase lyotrope avec ce polymère, nous supposons que son degré de polymérisation n'est pas très grand. Avec le chloroforme on est limité par la solubilité du NCA, ce qui tend à augmenter le volume de solvant nécessaire et le temps de réaction : la solubilité du NCA du β -benzyl-L-aspartate est plus faible encore que celle de NCA du β -phénéthyl-L-aspartate.

Une base couramment employée pour initier ces réactions est la triéthylamine qui donne des degrés de polymérisation assez importants. Contrairement à ce qui est décrit¹⁴ pour la synthèse du PBLG, il semblerait que le degré de polymérisation du PPLA dépende de la quantité d'initiateur. Tous les réactifs et solvants doivent être d'une grande pureté, en particulier le chloroforme qui, une fois débarrassé de son amylène, est mis à reflux sur chlorure de calcium puis distillé juste avant usage.

Après quelques jours le milieu réactionnel devient visqueux, preuve de la présence de polymère ; pour récupérer ce dernier, il faut le précipiter du solvant héliogène dans un non-solvant. A cause de la non miscibilité de l'eau et du chloroforme, le solvant est évaporé dans un premier temps, puis le polymère redissout dans un minimum de dioxane chaud avant d'être précipité dans un grand volume d'eau. L'eau est le seul non-solvant qui donne de bons résultats : si on précipite le polymère dans le méthanol, il n'est pas possible d'obtenir une mésophase lyotrope qui soit utilisable comme milieu pour la discrimination énantiomérique en RMN : on observe en effet un élargissement des raies très important sur les spectres RMN.

Cette procédure a été employée pour synthétiser du poly-(γ -benzyl-L-glutamate), du poly-(β -benzyl-L-aspartate) et du poly-(β -phénéthyl-L-aspartate) qui ont servi à préparer des tubes RMN. Seul le PBLA n'a pas donné de phase cristal liquide utilisable, sans doute à cause du degré

de polymérisation qui était trop faible, donc la transestérification qui devait mener au poly-(β -propyl-L-aspartate) n'a pas été essayée. Plusieurs échantillons de PPLA ont été préparés avec des fractions d'initiateur A/I=250, 500, 1000 et 2000. Seuls les deux polymères avec A/I=500 et A/I=1000 ont été étudiés en RMN. Habituellement, on caractérise ces polymères par viscosimétrie en solution dans un acide dénaturant comme l'acide dichloroacétique ou trifluoroacétique ; mais sans viscosimètre adapté, cette étude n'a pas pu être faite. La seule caractérisation que nous avons sur ces polymères est l'analyse RMN qui, comme nous allons le voir, est très riche en informations.

2.2 Analyse RMN

Parmi les polymères qui ont été synthétisés cette année, trois ont un degré de polymérisation tel qu'ils forment une mésophase lyotrope. Encore faut-il savoir sur quelle plage de températures et de concentrations ils sont utilisables.

2.2.1 Diagramme de phase du PPLA

Pour tracer ce diagramme on a préparé les échantillons de PPLA dans le 1,1,2,2-tétrachloro-éthane (TCE, contenant un peu de 1,1,2,2-tétrachloro-1,2-didéutéroéthane). Si l'échantillon est trouble, c'est qu'il y a un gel (phase liquide dispersée dans une phase solide). Si le spectre RMN présente un doublet, c'est que la phase est purement anisotrope, si elle présente un singulet, c'est que le système est isotrope (figure 3). Voici les résultats qui ont été obtenus pour un polymère avec A/I=1000 (figure 4) :

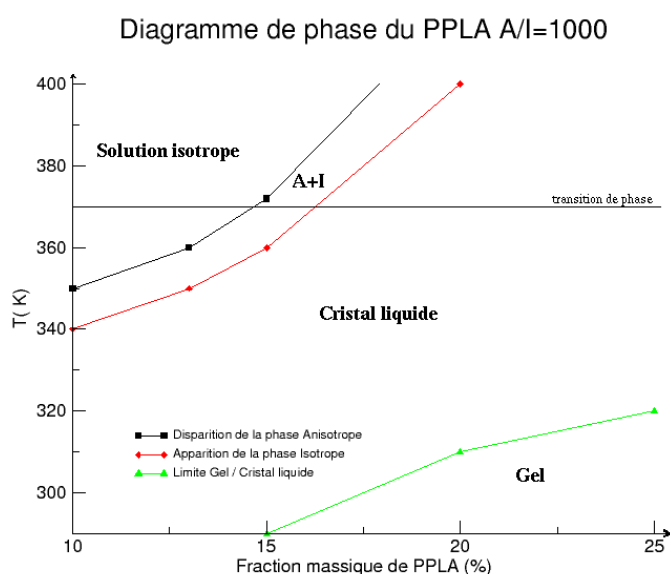


FIG. 4 – Diagramme de phase PPLA (A/I=1000)/TCE.

On constate donc que si l'on veut atteindre la transition (360-375 K), il faut travailler à plus de 20% en fraction massique. De plus à cette concentration on limite le problème dû à la présence d'un gel : en fait, il est intéressant de travailler avec des solutions les plus diluées possible pour des questions pratiques de préparation des échantillons : l'homogénéisation est d'autant plus facile si c'est plus fluide.

2.2.2 Le PPLA pour la discrimination énantiomérique

Nous avons avant tout vérifié que la mésophase préparée était capable de faire une discrimination énantiomérique (figure 5) :

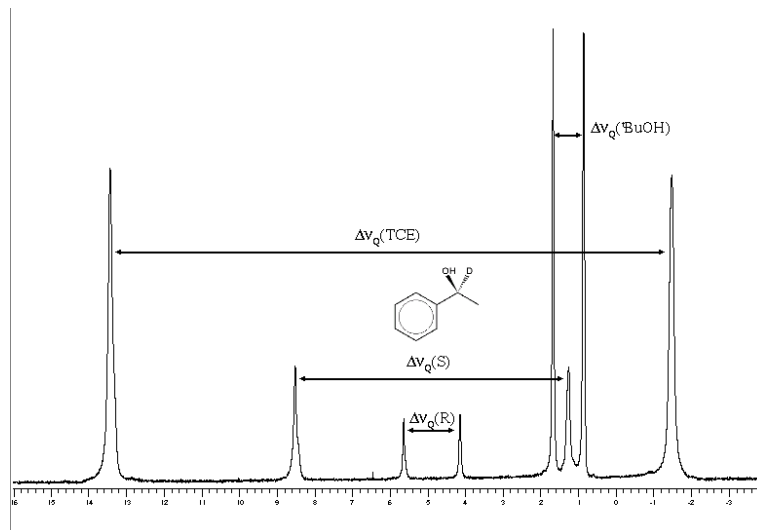


FIG. 5 – Spectre RMN $^2\text{H}\{-^1\text{H}\}$ du 1-deutéro-1-phényléthan-1-ol dans un cristal liquide PPLA (A/I=1000)/TCE à 19.56%. Le 1,1-(trideutérométhyl)éthanol sert de référence à 1.26 ppm.

On obtient bien des raies suffisamment fines pour que la discrimination énantiomérique soit possible : le PPLA peut donc servir à la discrimination énantiomérique tout comme le PBLG ou le poly-(ϵ -carbobenzoxy-L-lysine)⁶(PCBLL). Nous allons maintenant voir quel est le comportement du système aux températures proches de l'inversion de l'hélicité.

2.2.3 Comportement en température : inversion de l'hélice

Dans un premier temps, nous allons examiner les paramètres d'ordre de deux composés achiraux : le solvant perdeutééré (TCE- d_2) et un tertio-butanol hexadeutééré (le 1,1-di-(perdeutérométhyl)-éthanol) comme sonde en solution dans le TCE protonné. Le couplage dipolaire des protons du solvant, l'éclatement quadrupolaire des deutériums du solvant et du tertio-butanol ont été observés au cours de la montée en température.

Dans ce graphique (figure 6) ont été reportés les éclatements quadrupolaires des deutériums de la sonde en fonction de la température. Les barres verticales représentent le double de la valeur des largeurs de raie.

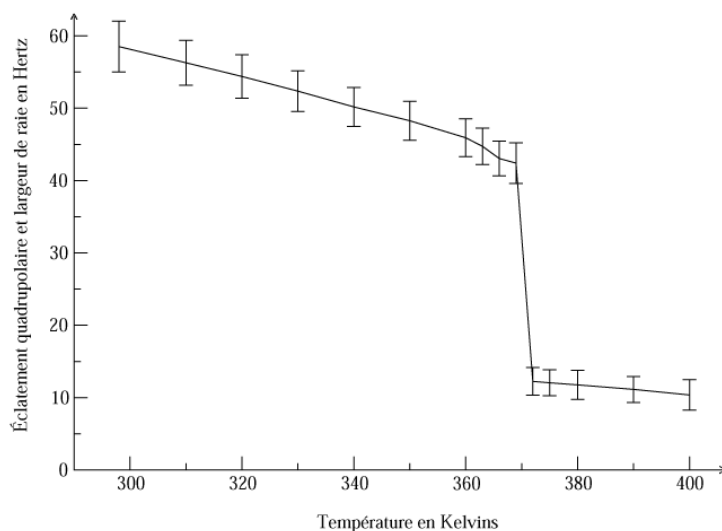


FIG. 6 – 152 mg de PPLA A/I=1000, 12.6 mg t BuOH- d_6 , 87.2 mg TCE- d_2 , 509 mg de TCE.

Il y a bien une variation très rapide de l'éclatement quadrupolaire vers 370 K, ce qui confirme l'existence d'une transition de phase à cette température. De part et d'autre de la transition, on constate que l'éclatement quadrupolaire, et donc l'ordre dans la mésophase, diminue régulièrement avec la température, ce qui traduit une diminution du facteur d'ordre pouvant s'expliquer par l'agitation thermique. La chute des valeurs des éclatements quadrupolaires au cours de la transition s'explique par une diminution du facteur d'ordre S_{CD} . Ceci peut être dû à une diminution de l'ordre moléculaire.

2.2.4 Effet de l'inversion sur la discrimination énantiomérique

Si nous faisons le même type d'étude que précédemment sur un composé chiral énantiomériquement enrichi, nous observons un croisement des deux courbes (figure 7) :

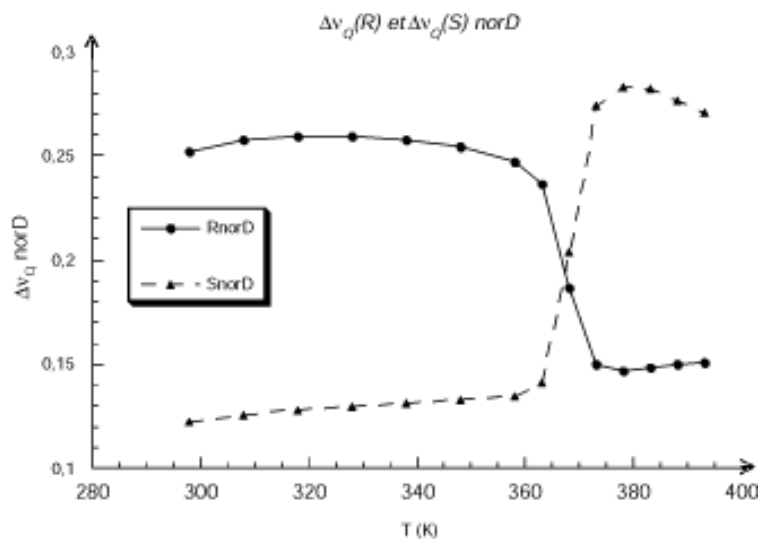


FIG. 7 – 162.3 mg PPLA A/I=500, 20.3 mg 2-deutéro-heptan-2-ol.11.9 mg TCE- d_2 , 438.9 mg TCE.

Nous avons tracé les éclatements quadrupolaires normés, c'est à dire divisés par ceux du solvant afin de tenir compte de l'agitation thermique. On constate que la transition de phase induit une inversion des éclatements quadrupolaires des deux énantiomères, ce qui, mis en parallèle avec les travaux des autres équipes^{8,13,18,19} qui affirment que cette transition se fait de l'hélice droite vers une hélice gauche, implique donc qu'une grande partie de la discrimination énantiomérique soit due à la chiralité d'hélice, et non à la chiralité au niveau de chaque carbone.

Mais pour mieux comprendre ces interactions au sein de l'hélice mais aussi celles entre les hélices et les interactions soluté-hélice, il est intéressant de se servir de la modélisation moléculaire dans le but de visualiser les hélices et pour nous aider à comprendre ce qui s'est passé au cours de la transition.

2.3 Modélisation moléculaire.

Si nous voulons calculer *a priori* les facteurs d'ordre des molécules en solution dans la méso-phase chirale ou comprendre l'inversion de l'hélice, il faut que l'on commence par modéliser les différentes hélices. Mais ceci nécessite de prendre en compte un millier d'atomes, ce qui présente quelques difficultés et nous oblige à utiliser un champ de force simplifié.

2.3.1 Choix du Système :

Le PPLA a une formule brute $(C_{12}H_{13}NO_3)_n$, ce qui représente 29 atomes par résidu. Si nous voulons étudier une fibre qui a un diamètre bien inférieur à sa longueur, il nous faut l'équivalent d'une dizaine de tours d'hélice, soit 36 résidus pour une hélice α ou 43 dans le cas d'une hélice π . J'ai choisi de prendre 40 résidus β -phényl-L-aspartate avec en début de chaîne un acétate et en fin de chaîne la méthylamine pour limiter les effets de bord. Ceci représente 1172 atomes qu'il va falloir disposer dans l'espace avant de pouvoir réaliser le moindre calcul dessus.

2.3.2 Création de la géométrie initiale.

Mes premières tentatives ont été réalisées avec HYPERCHEM5²⁰ (disponible au laboratoire). Son modeleur 3D permet la génération de polypeptides en contraignant les angles ϕ , ψ et ω , mais il n'est pas possible de définir des acides aminés autres que les 21 présents dans la nature. Cela m'a néanmoins permis de générer tous les types d'hélices qu'avait prévu Ramachandran²¹ par le calcul (figure 8) :

Type d'hélice	Angle dièdre (°)			Résidus par tour	Translation par résidu (Å)
	ϕ	ψ	ω		
α -droite	-57	-47	180	3.6	1.5
α -gauche	57	47	180	3.6	1.5
π -droite	-57	-70	180	4.4	1.15
π -gauche	57	70	180	4.4	1.15

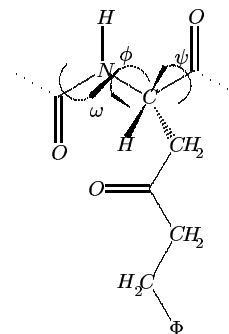


FIG. 8 – Paramètres des hélices α et π

La meilleur façon de différencier les hélices est sans doute la suivante : pour une hélice α , il y a une liaison hydrogène entre le CO^i et le NH^{i+4} . Pour l'hélice π , c'est entre CO^i et le NH^{i+5} : l'hélice est donc plus large et moins longue.

Pour décrire ces hélices, j'ai codé le programme "constructor.py" (en python²²), qui réalise une transformation hélicoïdale des atomes à partir des coordonnées d'un résidu, du nombre de résidus par tour, de la translation par résidu, de l'axe de l'hélice, d'un point de l'hélice et du sens de l'hélicité. Ce programme génère directement la structure d'une molécule avec les terminaisons ; le format de ce fichier est XFA compréhensible par le programme MORCAD²³ qui va minimiser la structure.

2.3.3 Champ de Force utilisé :

Le champ de force MM2, le plus utilisé en chimie, n'est pas adapté aux grosses molécules comme le PLLA car il ne tient pas compte des liaisons hydrogène et il est trop raffiné, ce qui ralentit grandement les calculs. Les biologistes ont développé un champ de force simplifié adapté aux protéines et aux acides nucléiques : AMBER94,²⁴ où l'énergie est calculée de la manière suivante :

$$\begin{aligned}
 E_{\text{total}} = & \sum_{\text{bonds}} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
 & + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] + \sum_{\text{H-bonds}} \left[\frac{C_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{R_{ij}^{10}} \right]
 \end{aligned}$$

On constate que les termes électrostatiques sont gérés par une loi coulombienne et qu'il y a un terme spécifique pour les liaisons hydrogène. Les interactions électrostatiques sont donc particulièrement bien prises en compte dans ce champ de force ; de plus AMBER ne surévalue pas la stabilisation apportée par le π - *stacking* des systèmes aromatiques comme c'est le cas pour

MM2 ; c'est donc un excellent champ de force pour les molécules pour lesquelles il a été développé : les macromolécules biologiques en milieu aqueux. Notre plus gros problème est que le β -phénéthyl-L-aspartate n'est pas connu par AMBER : en particulier il manque la densité électronique des atomes ainsi que les paramètres du champ de force concernant la liaison ester (qui n'existe pas dans les protéines, ni dans les acides nucléiques).

2.3.4 Adaptation de AMBER94 au poly-(β -phénéthyl-L-aspartate)

Tous les paramètres qui sont dans AMBER ont été calculés par la mécanique quantique : une méthode Hartree-Fock avec un jeu d'orbitales 6-31* c'est à dire que l'on tient compte des orbitales s pour l'hydrogène et des orbitales s , p et d pour tous les autres atomes. J'ai effectué ces calculs avec GAUSSIAN98 sur un résidu de β -phénéthyl-L-aspartate avec un acétate et une méthylamine de part et d'autre. A l'issue de ce calcul, les charges partielles ont été redistribuées pour tenir compte des symétries et pour rendre chaque résidu neutre. Finalement les constantes de force pour l'ester ont été prises comme les différentielles secondes de l'énergie calculée par GAUSSIAN98 par rapport aux coordonnées de la vibration considérée.

Habituellement les biologistes utilisent AMBER94 dans l'eau c'est à dire que le terme coulombien est divisé par ϵ_r ; celui-ci variant avec la distance avec une forme sigmoïdale (figure 9) :

$$\epsilon_r = \epsilon_{r\infty} - (\epsilon_{r\infty} - 1) \times \left(1 + \frac{r}{d_{sol}} + \left(\frac{r}{d_{sol}}\right)^2\right) \times e^{-\frac{r}{d_{sol}}}$$

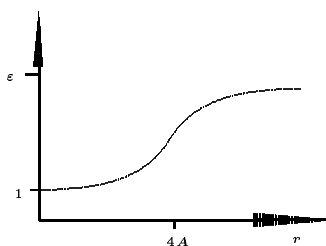


FIG. 9 – Variation de ϵ_r avec la distance

La permittivité relative du solvant a été prise à 4.9 et le diamètre des molécules de solvant a été fixé à 4Å afin d'obtenir des conditions les plus proches possible du chloroforme.

Les interactions 1-4 sont représentées dans AMBER94 par trois termes : les déformations des angles dièdres, les interactions électrostatiques et les interactions de van der Waals. Afin de ne pas surévaluer la contribution de ces systèmes à l'énergie totale, on divise les deux derniers termes par 2. Maintenant que le champ de force est entièrement défini, il ne reste plus qu'à minimiser les différentes structures par des méthodes classiques. Ici nous avons utilisé une méthode type Newton-Raphson qui, au lieu de calculer la dérivée seconde, l'approxime en considérant les variations de la dérivée première ce qui permet d'accélérer les calculs.

Les calculs de mécanique quantique ont été fait en 8 heures sur 32 processeurs du SGI O2000 du pôle parallélisme Ile de France Sud.

2.3.5 Résultats des minimisations

La minimisation s'est faite par MORCAD²³ à partir des conformations issues du programme "constructor". Ces calculs ont été effectués en 3 heures chacun sur une station SGI O2 au LBPA.

Type d'hélice	α -droite		α -gauche		π -gauche	
	théo.	mod.	théo.	mod.	théo.	mod.
Angle ϕ ($^\circ$)	-57	-59.3	57	49.1	57	52.9
Angle ψ ($^\circ$)	-47	-44.8	47	51.1	70	74.4
Angle ω ($^\circ$)	180	175.9	-180	171.4	180	178.0
Translation par résidu (\AA)	1.5	1.485	1.5	1.486	1.15	1.134
Translation par tour (\AA)	5.4	5.297	5.4	5.126	5.06	5.090
Résidus par tour	3.6	3.566	3.6	3.450	4.4	4.488
Rayon interne(\AA)	1.58		1.56		2.18	
Rayon externe (\AA)	7.64		6.99		8.43	
Angle phényl-axe ($^\circ$)	34.7 \pm 1		30.7 \pm 4		32.1 \pm 16	
Énergie Totale (kcal/mol)	-1989.64		-1968.03		-1936.84	
Énergie de liaison	13.93		17.10		13.30	
Énergie de torsion	33.70		65.54		70.49	
Énergie angles dièdre	181.26		221.19		271.33	
Énergie Coulomb.	-2950.05		-2898.08		-2927.18	
Énergie van der Waals	-677.87		-672.76		-669.96	
Énergie Coulomb. 1-4	1059.65		974.89		1003.91	
Énergie VdW 1-4	349.74		324.08		301.25	
Cycles de minimisation	4980		6000		6729	
Gradient (kcal/mol/ \AA)	0.0019		0.0022		0.0023	

2.3.6 Analyse des résultats

La première constatation est que l'hélice droite - thermodynamiquement la plus stable - est bien celle qui a l'énergie la plus faible, mais force est de constater que l'écart relatif entre elles est très faible ce qui justifie la coexistence des différentes formes d'hélices à des températures modérées.

Le reste de l'analyse a été faite par le programme "angle.py" (également écrit en python²²) qui calcule les paramètres importants des hélices à partir des fichiers HYPERCHEM ou MORCAD et d'un peu de géométrie euclidienne :

- L'angle dièdres de ABCD est donné par $\varphi = \pm \arccos(\overrightarrow{BA} \bullet \overrightarrow{CD})$
- L'axe de l'hélice est approximé par la moyenne de trois méthodes, en particulier par le minimum de la translation par résidu.
- Le centre de l'hélice est donné par le théorème de l'angle au centre.

À partir de ce moment là, on en déduit la translation par résidu, la translation par tour et le nombre de résidus par tour, les valeurs retenus sont, bien-sûr, moyennées sur l'hélice (moins les 5 premiers et derniers résidus pour limiter les effets de bord). Le résultat principal est que les hélices n'ont pas changé de conformation au cours de la minimisation donc que les trois formes étudiées sont bien des minima locaux. Par contre on peut noter que la déformation de la liaison amide (angle ω) est assez importante : presque 10° dans le cas de l'hélice α -gauche.

Une autre information intéressante : l'écart-type de l'angle entre l'axe de l'hélice et le phényl en bout de chaîne qui traduit l'orientation de la chaîne latérale. Bien sûr on peut retrouver tous ces paramètres visuellement sur la représentation des molécules (figure 10).

Maintenant que nous avons ces conformations, le travail de modélisation peut s'orienter suivant deux axes :

- Vers un calcul des paramètres d'ordre pour différentes petites molécules. Ce calcul s'ap-

- parente beaucoup au “docking” que les biologistes ont l’habitude de faire pour décrire les interactions anticorps-antigènes, ce qui nous permettrait une fois de plus de travailler avec leurs outils. Le “docking” est une méthode d’ajustement de deux surfaces en faisant la transformée de Fourier de ces deux surfaces et en cherchant les bandes communes. La transformée inverse de ces deux bandes donne la surface de contact. Une autre méthode consiste à faire une recherche de configuration par l’algorithme de Monté-Carlo & Métropolis.
- Soit vers une modélisation de l’inversion de l’hélice. Ce travail a déjà été entrepris par l’équipe de Abe en 1995¹⁹ mais leur hypothèse de travail était que la transition se faisait entre une hélice α -droite et une hélice α -gauche, ce qui n’est pas compatible avec ce qu’ils ont publié en 1996 ni avec les résultats que nous avons obtenus par la RMN

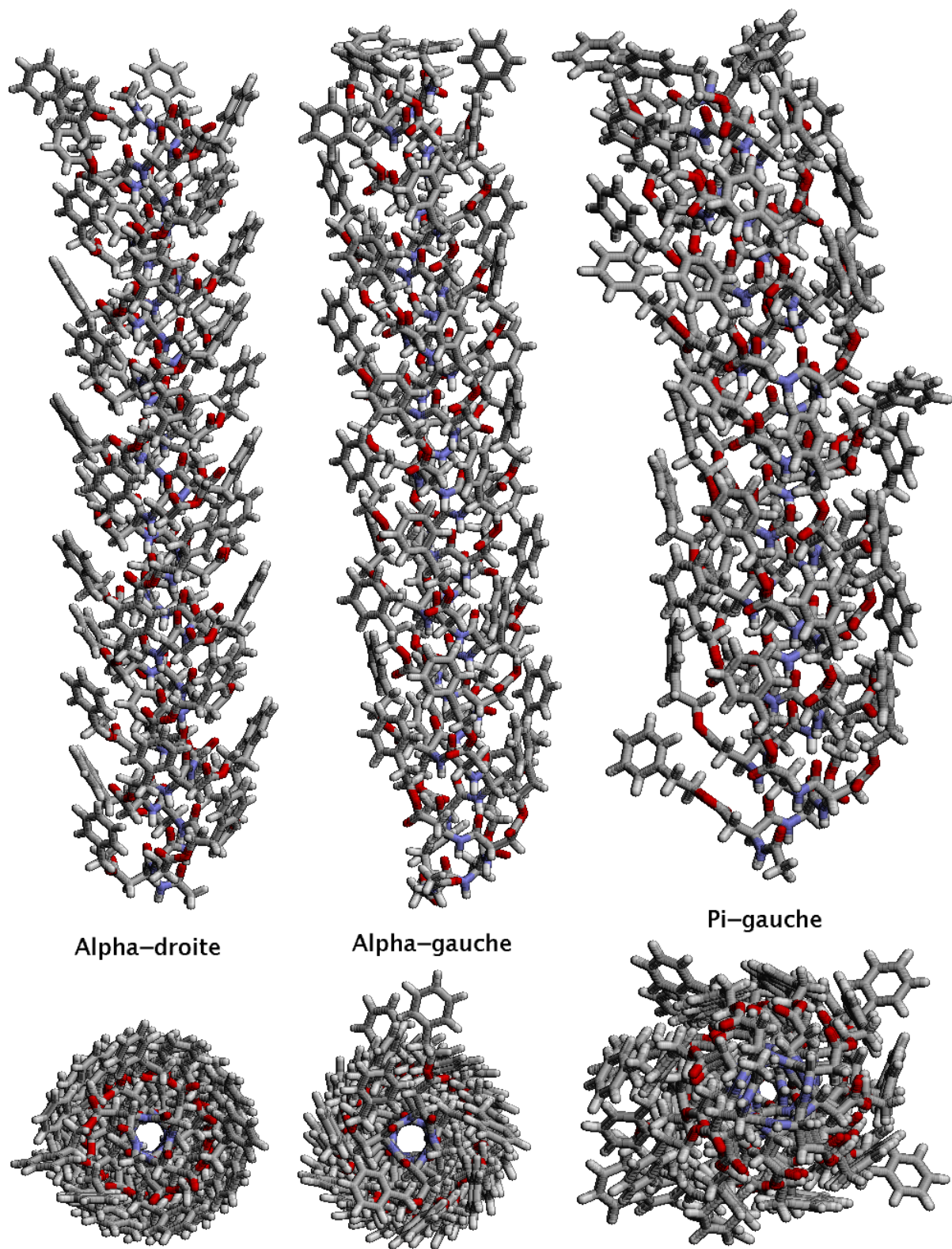


FIG. 10 – Représentation des différentes hélices après minimisation

Conclusion.

Les études menées cette année ont montré qu'il était possible de synthétiser un polymère utilisable pour la discrimination énantiomérique en milieu cristal liquide chiral ; ce poly-(β -phénéthyl-L-aspartate) présente bien une transition de phase vers 90°C en phase cristal liquide.

En RMN dans cette mésophase chirale, deux énantiomères voient leurs éclatements quadripolaires inversés. Comme il n'y a pas de modification des carbones assymétriques au niveau de la chaîne polypeptidique, on peut en déduire que la discrimination énantiomérique est en grande partie induite par la chiralité de l'hélice.

Les calculs de modélisation moléculaire ne nous ont pas permis de déterminer exactement quelle était la forme de l'hélice présente à haute température, néanmoins on peut être tenté de faire le rapprochement entre la chute du paramètre d'ordre au cours de la transition et le fait que l'hélice π -gauche ait un rapport longueur sur diamètre bien plus faible que celui de l'hélice α -droite.

Malgré cette avancée, le problème de la recherche des configurations absolues n'est pas encore résolu, loin de là, et il reste encore beaucoup de travail à faire, en particulier :

- La conformation de l'hélice du poly-(β -phénéthyl-L-aspartate) n'est pas bien connue en phase cristal liquide à haute température : il se pourrait en particulier qu'il y ait deux transitions de phase successives, la première menant d'une hélice α -droite à une hélice α -gauche, puis quelques degrés plus hauts vers une hélice π -gauche. Ceci n'est pas invraisemblable puisque un phénomène de ce genre se produit pour le poly-(β -phénéthyl-L-aspartate) en phase solide. Mais contrairement à ce qui se passe en phase solide, la transition est réversible en mésophase lyotrope.
- La compréhension du mécanisme du changement de phase : même si une théorie sur l'inversion de l'hélice α est proposée par rupture de trois liaisons hydrogène successives avec propagation de la zone d'inversion. Il serait sans doute intéressant d'essayer de modéliser cette transition par des calculs de dynamique moléculaire.
- La comparaison avec d'autres polymères qui sont déjà employés comme le PBLG ou le PCBL. Une approche multilatérale serait sans doute très enrichissante pour mieux comprendre les interactions soluté chiral - hélice.
- Le calcul *a priori* des facteurs d'ordre des solutés, soit par une méthode classique de Monté-Carlo & Métropolis comme on le fait en couramment en chimie, soit par un "docking" comme le font les biologistes sur les protéines.
- La transtéréification du PPLA qui devrait mener à d'autres poly(β -alkyl-L-aspartates) qui présentent des transitions à des températures plus basses, nous permettant ainsi de travailler avec plus de composés chiraux, ces derniers étant souvent sensibles à la température.

ANNEXE : Partie expérimentale.

Appareillage.

Les spectres de RMN ^1H ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker AC200 (200 MHz), AC250 (250 MHz), AM250 (250 MHz) et DRX400 (400 MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane utilisé comme référence interne. Les lettres s, d, t, m et e correspondent à la structure fine du spectre et signifient respectivement singulet, doublet, triplet, multiplet et élargi. L'intégration relative des protons pour chaque signal est également indiquée.

Les spectres de RMN ^2H ont été enregistrés sur des spectromètres Bruker AM250 (38,39 MHz) et DRX400 (61,42 MHz) en utilisant une sonde BBI avec découplage large bande du proton. La température est maintenue constante à $\pm 0,5$ K avec un contrôleur de température BVT-3000. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm, et le solvant est utilisé comme référence interne.

Préparation des échantillons cristaux liquides.

Les solutions de substrats chiraux dans le cristal liquide PPLA /cosolvant organique ont été préparées directement dans des tubes de RMN ($\varnothing=5$ mm) : environ 150 mg de PPLA sont pesés dans le tube. On ajoute environ 20 mg de substrat à analyser, puis on complète avec du 1,1,2,2-tétrachloroéthane pour obtenir une solution à la fraction massique voulue. Après dissolution du polymère et du soluté, le tube est homogénéisé par de brèves centrifugations dans un sens puis dans l'autre.

Synthèse.

β -Phénéthyl-L-Aspartate :

Dans un ballon de 500 mL muni d'un réfrigérant et surmonté d'une garde à chlorure de calcium, 13.58 g (0.1 mol) d'acide aspartique et 14.20 g (0.1mol) de sulfate de sodium anhydre sont mis en suspension dans 166 mL (2.7 mol) de 2-phényléthanol. 30 mL (0.44 mol) d'une solution d'acide tétrafluoroborique à 54% dans l'ether sont ajoutés *lentement*. Le milieu réactionnel est porté à 60°C pendant 8 heures. Après refroidissement du milieu réactionnel, 300 mL de THF sont ajoutés avant filtration sur célite. Le filtrat est neutralisé par 34 mL (0.24 mol) de triéthylamine entraînant la précipitation de l'ester. Les solvants sont éliminés à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu est agité avec 600 mL d'acétate d'éthyle. Le solide obtenu est récupéré par filtration puis recristallisé dans 500 mL d'eau. On obtient 11.99 g de β -phénéthyl-L-aspartate, soit un rendement de 50%.

Analyse CCM : (Méthanol-Chloroforme-Eau : 50,50,15), RF=0.50

RMN ^1H (250 MHz, DCl à 0.5 M dans D_2O) δ (ppm) :

7.05-7.30	m	5H	C_6H_5-	2.85	t	2H	J=5.3Hz	$\phi - \text{CH}_2$
4.15-4.35	m	3H	$\text{O} - \text{CH}_2 + \text{HC}_\alpha$	2.75	t	1H	J=6.4Hz	$\text{CH}_2 - \text{C}_\alpha$

β -Phénéthyl-L-Aspartate N-Carboxy Anhydride :

Dans un ballon de 500 mL muni d'un réfrigérant et surmonté d'une garde à chlorure de calcium, 28.25 g (119 mmol) de β -phénéthyl-L-aspartate sont mis en suspension avec 0.5 g

de charbon actif dans 150 mL de THF anhydre sous agitation magnétique, 11mL (89 mmol) de chloroformiate de trichlorométhyle sont ajoutés goutte à goutte à la seringue. Le mélange réactionnel est porté à 55°C pendant 30 minutes puis filtré sur célite à température ambiante. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif et le résidu est recristallisé dans un mélange acétate d'éthyle / heptane. On obtient 20.06 g de β -phénéthyl-L-aspartate N-carboxy anhydride, soit un rendement de 64%.

RMN ^1H (250MHz : CDCl_3), $\delta(\text{ppm})$:

7.17-7.35	m	5H		C_6H_5-
6.3	s	1H		NH
4.51	dd	1H	3.1 Hz et 8.9 Hz	$\text{HC}\alpha$
4.41	t	2H	6.7 Hz	$\text{O}-\text{CH}_2-$
3.02	t	2H	6.6 Hz	$\phi-\text{CH}_2-$
2.93	m	2H		$\text{OC}-\text{CH}_2-\text{C}\alpha$

Poly-(β -Phénéthyl-L-Aspartate) :

Dans un erlenmeyer de 250mL muni d'une agitation magnétique et sous atmosphère d'argon 2 g (7.6 mmol) de β -phénéthyl-L-aspartate-N-carboxy anhydride sont dissous dans 100 mL de chloroforme fraîchement distillé. 1 mL d'une solution de triéthylamine à 7.6 mmol/L dans le chloroforme (soit 7.6 μmol) est ajouté à l'aide d'une seringue. Le milieu réactionnel est agité pendant 7 jours puis le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu est redissous dans 140 mL de dioxane chaud puis versé dans 800 mL d'eau. Le polymère précipité est récupéré par filtration puis rincé 4 fois avec de l'eau. Après séchage à 60°C sous pression réduite (1 mmHg), on obtient 1.63 g de poly-(β -phénéthyl-L-aspartate) soit un rendement de 98%.

Références

- [1] E.L. ELIEL, S.H. WILEN, and L.N. MANDER. *Stereochemistry of organic compounds*. John Wiley and Sons, 1994.
- [2] R. ROTHCHILD. *Enantiomer*, 5 :457–471, 2000.
- [3] A. SAUPE and G. ENGLERT. *Phys. Rev. Letters*, 11 :462, 1963.
- [4] E. LAFONTAINE, J.P. BAYLE, and J. COURTIEU. *J. Am. Chem. Soc.*, 111 :8294, 1989.
- [5] I. CANET and J. COURTIEU. *J. Am. Chem. Soc.*, 117 :6520–6526, 1995.
- [6] M. SARFATI, C. AROULANDA, J. COURTIEU, and Ph. LESOT. *Tetrahedron : Assymetry*, 12 :737–744, 2001.
- [7] E. M. BRADBURY and L. BROWN. *J. Mol. Biol.*, 5 :230, 1962.
- [8] J. WATANABE, S. OKAMOTO, and A. ABE. *Liquid Crystals*, 15(2) :259–263, 1993.
- [9] R.Y. DONG. *Nuclear Magnetic Resonance of Liquid Crystals*. Springer Verlag, 1980.
- [10] S. SOBAJIMA. *J. Phys. Soc. Japan*, 23 :1070, 1967.
- [11] C.P. SLICHTER. *Principles of Manetic Resonance*. Springer Verlag, 1980.
- [12] E. LAFONTAINE and C.L. MAYNE J.M. PÉCHINÉ. *Liq. cryst.*, 7 :293, 1990.
- [13] J. WATANABE, S. OKAMOTO, and A. ABE. *Macromolecules*, 29 :7084–7088, 1996.
- [14] E. R. BLOUT and R. H. KARLSON. *J. Am. Chem. Soc.*, 78 :941–946, 1956.
- [15] R. ALBERT, J. DANKLMAIER, H. HÖNIG, and H. KANDOLF. *Synthesis*, pages 635–637, 1987.
- [16] R. KATAKAI and Y. IIZUKA. *J. Org. Chem*, 50 :715–716, 1985.
- [17] W. H. DALY and D. POCHE. *Tetrahedron Letters*, 29(46) :5859–5862, 1988.
- [18] S. LEÓN, C. ALEMÁN, and S. MUÑOZ-GERRA. *Macromolecules*, 30 :6662–6667, 1997.
- [19] S. OKAMOTO, H. FURUYA, and A. ABE. *Polymer Journal*, 27(7) :746–756, 1995.
- [20] HYPERCHEM. <http://www.hyper.com>.
- [21] G. N. RAMACHANDRAN and V. SASSIEKHARAN. *Adv. Protein Chem.*, 28 :283–437, 1968.
- [22] M. LUTZ and al. Python : langage de programmation semi-scriptique orienté objet. <http://www.python.org>.
- [23] M. LE BRET, J. GABARRO-ARPA, J.C. GILBERT, and C. LEMARÉCHAL. *J. Chim. Phys.*, 88 :2489–2496, 1991.
- [24] W. D. CORNELL and P. A. KOLLMAN. *J. Am. Chem. Soc.*, 117 :5179–5197, 1995.