



HAL
open science

Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire

Sébastien Fiorucci

► **To cite this version:**

Sébastien Fiorucci. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Chimie. Université de Nice Sophia-Antipolis (UNS), 2006. Français. NNT : . tel-02545765

HAL Id: tel-02545765

<https://hal.univ-cotedazur.fr/tel-02545765>

Submitted on 17 Apr 2020

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

Présentée à l'Université Nice-Sophia Antipolis
En vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS
Spécialité Chimie

Par

SEBASTIEN FIORUCCI

**Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes :
Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire.**

Soutenue publiquement le 6 Octobre 2006 à 14h30

JURY

Rapporteurs :

M. Manuel Ruiz-López Directeur de Recherche CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy I

M. David Perahia Directeur de Recherche CNRS, Université d'Orsay, Paris XI

Examineurs :

M. Gilles Iacazio Maître de conférences, Université Paul Cézanne, Aix-Marseille III

M. Patrick Trouillas Maître de conférences, Université de Limoges

Directeurs de thèse :

M. Daniel Cabrol-Bass Professeur, Université Nice-Sophia Antipolis

M. Serge Antonczak Maître de conférences, Université Nice-Sophia Antipolis

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Mr. le Professeur Daniel Cabrol-Bass, ainsi que mon co-directeur de thèse, le Dr. Serge Antonczak pour m'avoir accueilli dans leur équipe et pour m'avoir fait confiance depuis mon arrivée au laboratoire. Je tiens également à associer à ces remerciements le Dr. Jérôme Golebiowski. Je les remercie tous les trois pour leur sympathie, leur sincérité, et surtout pour leur soutien. La passion communicative qui les anime dans leur travail ont fait de ces années une expérience très enrichissante.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à Messieurs Manuel Ruiz-López et David Perahia, Directeurs de Recherche CNRS, pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie également les Dr. Gilles Iacazio et Patrick Trouillas pour avoir examiné et jugé ce rapport.

Je tiens à remercier le centre informatique national de l'enseignement supérieur (CINES) pour nous avoir alloué les heures de calculs nécessaires à mes travaux, ainsi que le Centre de modélisation et d'imagerie moléculaire (CMIM) pour avoir mis à la disposition de l'équipe les stations de travail utiles à la visualisation et l'analyse des simulations.

Merci également aux personnes du laboratoire LCMBA que j'ai eu l'occasion de côtoyer ces dernières années. Je tiens plus particulièrement à saluer les doctorants du laboratoire pour l'ambiance exceptionnelle qui y régnait et surtout en dehors.

Ces remerciements ne seraient pas complets si n'apparaissait pas Stéphane, Sylvain, Jean-Jacques et Cécilia, Xavier, Laurent, Loïc, Fabrice, Fanny, Juan et Thomas qui sont tous passés ou sont toujours au sein du laboratoire. Je n'oublie pas les biologistes (les AT se reconnaîtront) pour les discussions que nous avons pu avoir et mes meilleurs amis Alexandre, Aurélien, Edouard, Julien, Florian et Nicolas.

Ma famille a suivi avec attention mon parcours au fur et à mesure de ma scolarité. J'espère qu'ils seront fiers de moi.

Table des Matières

Avant Propos.....	9
-------------------	---

Chapitre 1 : Introduction.....	12
--------------------------------	----

I. Introduction – les flavonoïdes, une famille de polyphénols.....	14
I.1. DECOUVERTE DES VITAMINES P PAR ALBERT SZENT-GYÖRGYI	14
I.2. BIOSYNTHESE ET STRUCTURE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES	15
I.3. BIODISPONIBILITE DES FLAVONOÏDES.....	17
II. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes	19
II.1. STRESS OXYDANT.....	19
II.2. LES ESPECES REACTIVES DE L' OXYGENE.....	20
II.3. IMPLICATIONS BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES	21
II.3.1. Capture directe de radicaux libres	21
II.3.2. Peroxydation lipidique.....	22
II.3.3. Interaction avec les cations métalliques	23
II.3.4. Prooxydation	24
II.3.5. Inhibition de diverses enzymes	25
III. Différentes approches physico-chimiques pour étudier les propriétés des flavonoïdes	27
IV. La quercétine – une molécule modèle.....	28
V. Références	30

Chapitre 2 : Etude théorique des formes activées de la quercétine.....	37
--	----

I. Etat des connaissances	39
I.1. PROPRIETES STRUCTURALES ET ENERGETIQUES	39
I.2. PROPRIETES ELECTRONIQUES	42
II. Méthodologie	44
II.1. FORMES ETUDIEES	45
II.2. INFLUENCE DU CUIVRE.....	47
II.3. AUTRES ESPECES ETUDIEES ET CYCLES THERMODYNAMIQUES.....	48
II.4. METHODES DE CALCULS EMPLOYEES	49
III. Analyse des formes activées.....	51
III.1. QUERCETINE (Q) ET QUERCETINE RADICALAIRE (QR)	51
III.2. FORMES DEPROTONEES (D)	51
III.3. FORMES DOUBLEMENT DEPROTONEES (DD).....	52
III.4. FORMES SEMIQUINONES (SQ).....	54
III.5. FORMES SEMIQUINONES DEPROTONEES (SQD).....	55
III.6. FORMES QUINONES (OQ).....	57
IV. Influence d'un métal de transition.....	58
IV.1. DONNEES STRUCTURALES	59
IV.2. DONNEES ELECTRONIQUES	59
IV.3. DONNEES ENERGETIQUES	60
V. Implications dans les mécanismes biologiques	61
V.1. ENTHALPIE DE FORMATION DES AUTRES ESPECES ETUDIEES	61
V.2. CYCLES THERMODYNAMIQUES	62
V.2.1. Formation de l'espèce semiquinone SQ5.....	62
V.2.2. Formation de l'espèce semiquinone déprotonée SQD2.....	63
V.2.3. Influence du cuivre sur la formation la forme déprotonée D5.....	64
VI. Conclusion.....	65
VII. Références.....	67
VIII. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 2	71

Chapitre 3 : La quercétine comme substrat de la Quercétinase.....78

I. Etude mécanistique de la réaction d'oxygénolyse	84
I.1. METHODOLOGIE.....	85
I.1.1. Etude de la coupure homolytique de la liaison O-O.....	85
I.1.2. Choix de la méthode et de la base.....	85
I.2. CYCLOADDITION 1,2 vs 1,3.....	86
I.2.1. Différentes étapes du mécanisme.....	86
I.2.2. Etape 1 : addition de O ₂ sur C2.....	87
I.2.3. Suite de la réaction : Cas de la cycloaddition 1,3 (intermédiaire endoperoxo).....	89
I.2.4. Suite de la réaction : Cas de la cycloaddition 1,2 (intermédiaire dioxétane).....	91
I.2.5. Conclusion partielle sur le mécanisme :	92
I.3. DIFFERENCES ENTRE LE MODELE ET LA QUERCETINE	93
I.3.1. Différences d'un point de vue énergétique.....	93
I.3.2. Différences structurales et électroniques.....	95
I.3.3. Oxygénolyse d'autres flavonoïdes.....	96
I.4. ROLE DU CUIVRE	98
I.4.1. Influence sur les barrières d'énergies.....	99
I.4.2. Influence sur la compétition cycloaddition 1,2 vs 1,3.....	99
I.4.3. Influence sur les paramètres électroniques.....	99
II. Etude structurale de l'enzyme.....	100
II.1. METHODOLOGIE	100
II.1.1. Enzyme native et Système E/S.....	100
II.1.2. Mise au point des paramètres van der Waals du Cuivre(I) et (II).....	101
II.1.3. Mise au point des paramètres de la quercétine	101
II.1.4. Dynamiques moléculaires.....	103
II.1.5. Energie de complexation	105
II.1.6. Calculs quantiques.....	105
II.2. ANALYSE STRUCTURALE.....	106
II.2.1. Rôle du linker.....	107
II.2.2. Interactions Enzyme/substrat.....	110
II.3. CONCLUSION SUR L'ACTIVATION ET LA RECONNAISSANCE DU SUBSTRAT PAR L'ENZYME	115
III. Etude du canal à Dioxygène	116
III.1. DEFINITION DU CANAL.....	117
III.2. ETUDE ENERGETIQUE.....	119
III.2.1. Méthodologie.....	119
III.2.2. Résultats	121
IV. Conclusion.....	123
V. Références	126
VI. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 3.....	131

Chapitre 4 : La quercétine comme inhibiteur de la Lipoxigénase-3.....135

I. Etude mécanistique de la dégradation de la quercétine.....	141
I.1. METHODOLOGIE.....	141
I.1.1. Différentes formes activées envisagées.....	141
I.1.2. Différents chemins réactionnels étudiés.....	143
I.1.3. Choix de la méthode et de la base d'orbitale atomique	144
I.2. ETUDE DU MECANISME REACTIONNEL LORS DE L'ACTIVATION EN O ⁷	145
I.2.1. Etape 1 : Addition de O ₂ en C2.....	145
I.2.2. Etape 2 : Formation de l'intermédiaire endoperoxo	146
I.2.3. Etape 3 : Ouverture du cycle et formation des produits	147
I.3. ETUDE DU MECANISME REACTIONNEL LORS DE L'ACTIVATION EN O ⁴	148
I.3.1. Etape 1 : Addition de O ₂ en C3.....	148
I.3.2. Etape 2 : Formation de l'intermédiaire dioxétane.....	149
I.3.3. Etape 3 : Ouverture du cycle et formation des produits	150
I.4. RAPPEL DU MECANISME LORS DE L'ACTIVATION EN O ³	150

I.5. COMPARAISON DES DIFFERENTS CHEMINS	151
II. Etude du site Actif de l'enzyme	153
II.1. METHODOLOGIE	153
II.2. PRINCIPAUX RESULTATS	155
III. Etude structurale de l'enzyme	158
III.1. METHODOLOGIE	158
III.1.1. Système E/S	159
III.1.2. Paramètres du résidu C-terminal, de la quercétine et de l'ion fer	159
III.1.3. Dynamiques moléculaires	163
III.1.4. Energie de complexation	164
III.2. ETUDE STRUCTURALE	164
III.2.1. Particularités de l'activation en O3	166
III.2.2. Particularités de l'activation en O7	168
III.2.3. Particularités de l'activation en O4'	170
III.2.4. Energie de complexation	173
III.2.5. Comparaison des interactions enzyme/substrat	174
IV. Conclusion / proposition de mécanisme	174
V. Références	176
VI. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 4	180

Chapitre 5 : Conclusion Générale.....186

Annexe : Les méthodes de chimie théorique.....191

I. Méthodes de chimie quantique.....	193
I.1. APPROXIMATIONS FONDAMENTALES	193
I.1.1. L'approximation Born-Oppenheimer.....	194
I.1.2. L'approximation d'Orbitales Moléculaires	194
I.2. METHODE HARTREE-FOCK	195
I.2.1. Equation de Hartree-Fock	196
I.2.2. L'approximation CLOA	196
I.2.3. La procédure SCF.....	197
I.3. METHODES BASEES SUR LA THEORIE DE LA FONCTIONNELLE DE LA DENSITE (DFT)	198
I.4. ENERGIE DE CORRELATION.....	199
I.5. CHOIX DE LA BASE D'ORBITALES ATOMIQUES	200
I.6. CORRECTIONS THERMODYNAMIQUES	200
II. Exploration de la surface de potentiel, application à la réactivité chimique.....	201
II.1.1. Recherche d'état stationnaire.....	203
II.1.2. Recherche d'état de transition.....	203
III. La mécanique moléculaire.....	204
III.1. LA DYNAMIQUE MOLECULAIRE.....	205
III.2. METHODE LOCALLY ENHANCED SAMPLING (LES)	207
III.3. ESTIMATION DE L'ENERGIE LIBRE.....	207
III.3.1. Umbrella Sampling et Potentiel de force moyenne	207
III.3.2. Méthodes GB/SA et PB/SA	208
IV. Références	209

Avant-propos

-

Objectifs

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle. La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques, toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles, et s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments.

Les flavonoïdes sont des composés naturels qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'être humain. En plus de leur rôle dans la pigmentation des végétaux, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêt, telles que des actions anti-radicalaires et antioxydantes. En effet, par complexation avec des enzymes spécifiques, les flavonoïdes sont capables, par exemple, de métaboliser le dioxygène et l'oxyde nitrique ou de stopper l'action de radicaux tels que l'anion superoxyde. En revanche, sous certaines conditions, ils peuvent présenter une activité prooxydante responsable de la peroxydation lipidique et de l'altération de l'ADN et de certaines protéines.

Leur grande variété de structures (plus de 8000 composés identifiés) et d'activités biologiques (antioxydante, prooxydante et inhibitrice) font des flavonoïdes un objet d'étude particulièrement complexe. Afin d'établir et de rationaliser les relations entre un grand nombre de composés et une activité ou une propriété, les méthodes QSAR/QSPR sont des méthodes de choix. Une revue récente¹ a montré que les multiples modes d'actions des flavonoïdes et l'emploi de nombreuses méthodes de détection, d'identification et de mesure de ces processus offre une explication à l'obtention de résultats souvent divergents. Le nombre important de publications concernant ces substances atteste de l'origine très hétérogène des données utilisées pour établir les descripteurs QSAR/QSPR : une recherche sur le Chemical Abstract donne plus de 52000 références avec le seul mot clé *flavonoid*, dont plus de 50% d'entre elles publiées ces dix dernières années.

L'étude des caractéristiques de substances naturelles est l'un des axes de recherche prioritaire de notre laboratoire. Plusieurs équipes travaillent actuellement sur cette thématique et, au sein de l'équipe « Chimiométrie et Modélisation » dans laquelle j'ai pu effectuer ma thèse, nous utilisons les outils de la chimiométrie et de la modélisation moléculaire pour étudier au niveau atomique et électronique les propriétés des molécules.

Afin de rationaliser au mieux les propriétés des flavonoïdes et de déterminer les processus réactionnels impliquant ces composés, nous nous sommes alors naturellement tournés vers les approches de chimie quantique. En regard du nombre de publications énoncé ci-dessus, très peu d'études théoriques sur cette famille de substances naturelles ont été réalisées à ce jour. L'intérêt

majeur de ces méthodes est de permettre la caractérisation des grandeurs électroniques, structurales et énergétiques d'un système moléculaire mais également de permettre l'élucidation d'un mécanisme réactionnel, *via* la caractérisation d'intermédiaires réactionnels et d'états de transition. La puissance de calcul actuelle des ordinateurs, mise en place pour le calcul scientifique intensif, est telle que des systèmes de plus en plus complexes sont à la portée des chimistes théoriciens. Malgré tout, les processus biologiques des flavonoïdes impliquent très souvent des systèmes moléculaires complexes tels qu'une enzyme ou un fragment d'ADN, et le temps de calcul sur un tel système est souvent une limitation à l'utilisation de ces méthodes. Les méthodes de mécanique moléculaire et de dynamique moléculaire permettent de prendre en compte un nombre très important d'atomes et/ou de molécules. Ceci est particulièrement intéressant pour l'étude dynamique de systèmes complexes. Il est alors possible de simuler le comportement d'une protéine en phase aqueuse, d'analyser l'évolution des conformations du complexe enzyme/substrat au cours du temps, et de caractériser les interactions hydrophiles et hydrophobes entre le ligand et le récepteur.

Les méthodes de chimie quantique se basent généralement sur l'étude de « modèles » afin de se focaliser sur une caractéristique précise d'un système plus complexe. Dans le cas de l'étude des flavonoïdes, le composé le plus représentatif est la quercétine puisqu'il intervient dans la majorité des processus biologiques associés à ce type de substances. Elle paraît donc être un bon représentant pour l'étude des flavonoïdes.

L'objectif du présent travail est, dans un premier temps, de mieux comprendre les propriétés électroniques, énergétiques et structurales de la quercétine. Dans cette première partie nous nous focaliserons sur les différentes formes activées de la quercétine et sur l'influence de la complexation avec un métal de transition dans l'optique de caractériser les motifs structuraux qui jouent un rôle important pour expliquer réactivité de cette molécule.

Dans un deuxième temps, nous étudierons le processus de dégradation de la quercétine au sein de l'enzyme Quercétine 2,3-Dioxygénase. Nous détaillerons le mécanisme réactionnel de l'oxygénolyse de la quercétine et montrerons le rôle de l'enzyme sur la reconnaissance et l'activation des flavonoïdes dans ce processus de dégradation.

Enfin, dans une troisième partie, nous nous sommes attachés à décrire le mécanisme, un peu particulier, d'inhibition de l'enzyme Lipoxygénase-3 par la quercétine. En effet, la quercétine n'est pas l'inhibiteur de la LOX-3 mais une réaction de dioxygénation de la flavonoïde forme le produit responsable de l'inhibition de l'enzyme. Afin de proposer un mécanisme de dégradation potentiel, nous avons étudié plusieurs mécanismes réactionnels sur la base de résultats expérimentaux, et avons étudié l'interaction de différentes formes activées de la quercétine avec l'enzyme.

[1] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, 13(10), 572-584.

Chapitre 1

Introduction

-

Les Flavonoïdes

I. Introduction – les flavonoïdes, une famille de polyphénols.....	14
I.1. DECOUVERTE DES VITAMINES P PAR ALBERT SZENT-GYÖRGYI	14
I.2. BIOSYNTHESE ET STRUCTURE CHIMIQUE DES FLAVONOÏDES	15
I.3. BIODISPONIBILITE DES FLAVONOÏDES.....	17
II. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes	19
II.1. STRESS OXYDANT.....	19
II.2. LES ESPECES REACTIVES DE L’OXYGENE.....	20
II.3. IMPLICATIONS BIOLOGIQUES DES FLAVONOÏDES	21
II.3.1. Capture directe de radicaux libres	21
II.3.2. Peroxydation lipidique.....	22
II.3.3. Interaction avec les cations métalliques	23
II.3.4. Prooxydation	24
II.3.5. Inhibition de diverses enzymes	25
III. Différentes approches physico-chimiques pour étudier les propriétés des flavonoïdes	27
IV. La quercétine – une molécule modèle.....	28
V. Références	30

I. Introduction – les flavonoïdes, une famille de polyphénols

I.1. Découverte des Vitamines P par Albert Szent-Györgyi

C'est au début du XX^{ème} siècle que les chimistes et les biochimistes se sont initialement attachés à étudier la composition de l'alimentation humaine et animale. Ils ont pour la première fois identifié une classe de composés qui seront appelés, un peu plus tard, vitamines. Leur découverte est due au biochimiste Casimir Funk qui, en 1910, le premier isola la vitamine B₁. Le terme vitamine provient de la contraction du mot *vita*, signifiant vie en latin, et du mot amine, terme associé à cette époque aux composés issus de la chimie de l'ammoniaque. Le mot vitamine sera par la suite associé aux substances nutritives indispensables dont l'organisme ne peut faire la synthèse.

En 1937, Albert Szent-Györgyi reçoit le prix Nobel de physiologie et de médecine pour ses découvertes dans le domaine des processus de combustions biologiques, notamment concernant la vitamine C et la catalyse de l'acide fumarique¹. C'est en s'intéressant au transfert d'énergie dans les plantes (métabolisme des carbohydrates) et aux processus d'oxydation qu'il découvre une nouvelle classe de composés, les vitamines P².

Il travaille sur l'oxydation de la vitamine C et s'intéresse au rôle de l'enzyme peroxidase. Il démontre qu'une classe de composés polyphénoliques hydrosolubles (flavone, flavonol, et flavanone) provenant essentiellement des pigments des plantes, intervient dans l'oxydation de l'acide ascorbique. La peroxidase transforme ces phénols en quinone, lesquels oxydent ensuite la vitamine C. Il détecte une grande concentration de ces composés dans le paprika et s'attache à expliquer leurs propriétés biologiques, notamment pour mieux comprendre leur rôle (en synergie avec la vitamine C) dans la guérison du scorbut. Il en conclut que ces polyphénols agissent sur la protection des vaisseaux sanguins, en faisant varier leur perméabilité et leur résistance. Il montre que certains membres de la famille des flavonoïdes possèdent des propriétés similaires aux vitamines, et les nomment alors vitamines P. A l'heure actuelle, cette notation a été abandonnée puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines.

Dans les années trente, les flavonoïdes sont connus essentiellement pour la protection des parois cellulaires et des vaisseaux sanguins, ainsi que pour leur rôle dans la pigmentation des végétaux. Et ce n'est que 60 ans plus tard, avec l'intensification de la recherche sur les radicaux libres, que les scientifiques se sont de nouveaux intéressés aux flavonoïdes. La grande diversité de leurs structures en fait l'une des familles de substances naturelles les plus étendues et confère aux flavonoïdes un large spectre d'activité biologique.

I.2. Biosynthèse et structure chimique des Flavonoïdes

L'objectif n'est pas de faire ici une étude complète mais de mieux saisir les relations structurales entre les différents flavonoïdes et de montrer la grande variété de structures de cette famille.

Les composés polyphénoliques des végétaux constituent un groupe d'une très grande diversité dont les flavonoïdes font partie³⁻⁵. A l'origine, les flavonoïdes proviennent de la désamination d'un acide aminé essentiel, la phénylalanine. La réaction de désamination est catalysée par la phényl ammonia lyase (PAL) et conduit à la formation de cinnamate. Ce dernier est ensuite transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'enzyme cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et la CoA-ligase (4CL). Cette synthèse précède la biosynthèse de tous les flavonoïdes mais également celle d'autres composés de la voie des phénylpropanoïdes, composés très importants pour la vie d'un végétal. Le coumaroyl-CoA est ensuite transformé en chalcone en faisant intervenir le malonyl-CoA, et la chalcone synthase. Le motif chalcone est ainsi le point de départ de la synthèse des différents groupes des flavonoïdes. La figure 1 résume les différentes étapes de la biosynthèse des flavonoïdes.

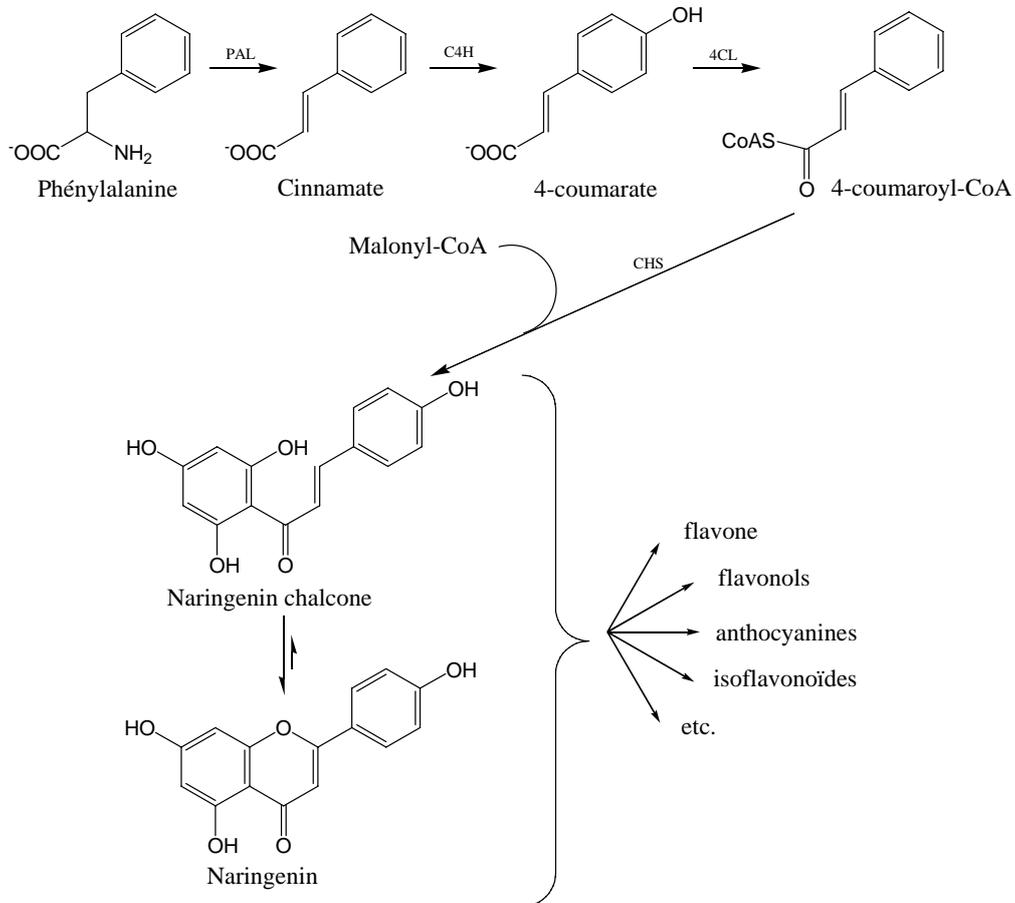


Figure 1 : Etapes communes de la biosynthèse de toutes les flavonoïdes.

Leur structure chimique commune est le motif flavone dérivant lui-même du motif flavane constitué de deux noyaux aromatiques A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C⁶⁻⁸. La figure 2 présente la nomenclature des flavonoïdes ainsi que la numérotation utilisée.

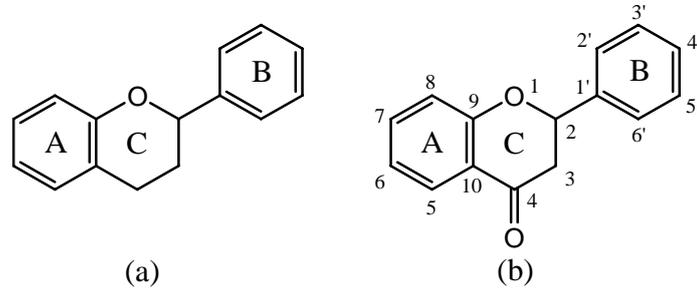


Figure 2 : motif flavane (a) et flavone (b) et numérotation systématique.

Les flavonoïdes sont classés selon plusieurs critères : présence ou non d'une double liaison en position 2, et présence ou non d'un groupement hydroxyle en position 3. Des groupements hydroxyles (mais également méthoxyles) peuvent le plus souvent se situer en position 2', 3', 4' et 5' ainsi qu'en position 5 et 7. Les isoflavones proviennent d'une transposition du noyau aromatique (du carbone C2 vers le carbone C3) ; les flavones et flavonols d'une oxydation (formation de la double liaison sur le cycle C) respectivement des flavanones et des dihydroflavonols.

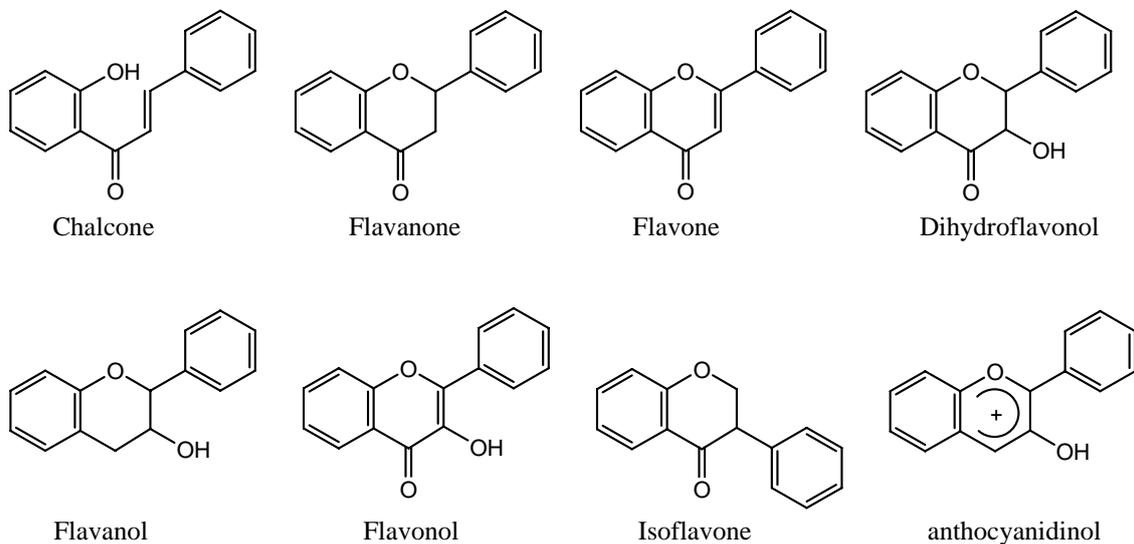


Figure 3 : Structure des différents sous-groupes de flavonoïdes.

Il est important de noter que les flavonoïdes se rencontrent également sous formes glycosylées (O- et C-hétérosides), au contraire des formes aglycones qui ne sont pas substituées par un ose. Il s'agit généralement des motifs flavone, flavanol, dihydroflavonol et flavanone qui sont substitués par un sucre en position 3 mais également en position 5 et 7. Le cas des flavanols est singulier puisqu'en plus des formes glycosylées, il est possible de les rencontrer substituées par l'acide gallique, mais

également sous formes polymériques. La configuration des carbones asymétriques augmente encore la complexité de structure des flavonoïdes. Par exemple la catéchine possède une configuration 2R,3S. On rajoute le préfixe « *épi* » ou « *ent* » respectivement dans le cas où la configuration est 2R,3R ou 2S,3R.

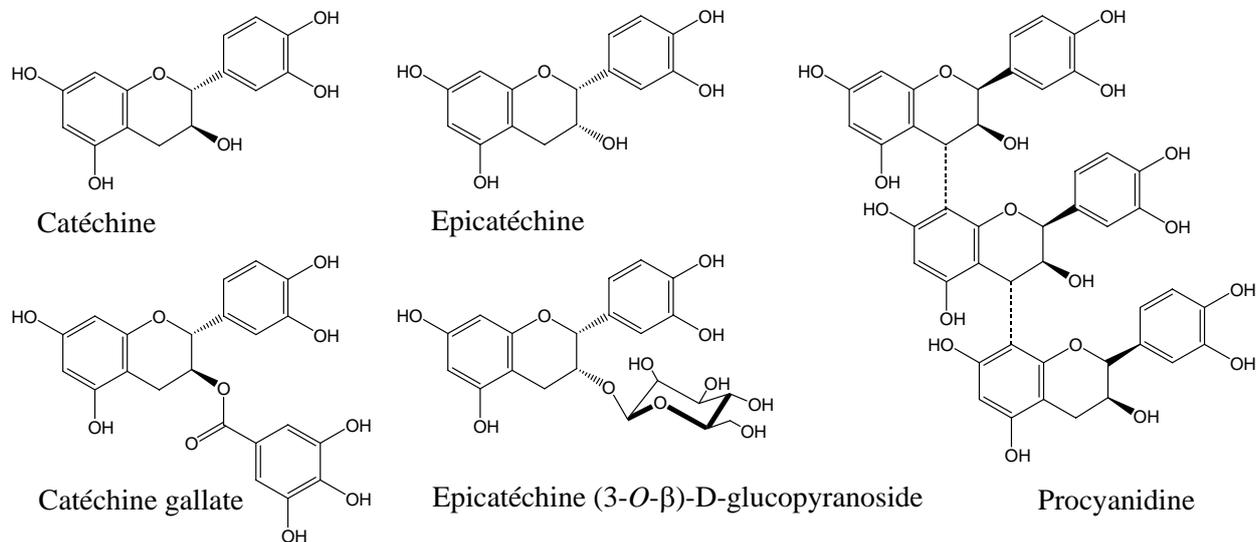


Figure 4 : exemple de la complexité de structures des flavanols. Cas de la catéchine.

Cette grande diversité de structures fait des flavonoïdes l'une des familles de substances naturelles connues les plus étendues. En effet, les techniques d'analyse récentes ont permis d'identifier plus de 8000 flavonoïdes⁸⁻¹¹. L'intérêt grandissant pour les substances naturelles bioactives a contribué à l'intensification des recherches concernant les flavonoïdes et nul doute que de nouveaux composés de cette famille seront identifiés.

I.3. Biodisponibilité des flavonoïdes

L'organisme humain ne synthétise pas de flavonoïdes mais, de manière générale, elles sont largement rencontrées dans le règne végétal. Nous retrouvons les flavonoïdes dans notre alimentation quotidienne^{6, 8, 12, 13}. Les fruits (orange, raisin, etc.), les légumes (oignon, laitue, etc.), mais également les graines (fève, cacao) ou encore les racines des plantes sont, pour l'homme, des sources importantes de flavonoïdes. Les feuilles de thé sont également connues pour être riches en flavonoïdes.

La quercétine est l'un des composés les plus représentatifs de cette famille en cela qu'elle est l'une des plus répandues dans les fruits et les légumes et qu'elle présente une activité plus ou moins importante dans la majeure partie des processus biologiques impliquant ces composés¹⁴. Ainsi, plutôt

que de présenter une liste exhaustive de la disponibilité de plusieurs flavonoïdes, nous avons choisi de présenter dans le Tableau 1 uniquement la concentration en quercétine dans divers fruits et légumes et dans diverses boissons. Plusieurs valeurs pour un même aliment/boisson signifient que plusieurs études ont été effectuées. On constate une grande variabilité au niveau de la concentration en quercétine pour certains aliments. Plusieurs facteurs peuvent influencer sur les résultats. Des études récentes¹³ ont montré que des facteurs extrinsèques tels que des facteurs géographiques, climatiques, mais également les ressources dont les plantes disposent, du degré de maturation de la plante, de la partie du fruit étudié, ou encore la préparation des aliments sont susceptibles de modifier les concentrations analysées.

Tableau 1 : Concentration en quercétine dans divers fruits et légumes ainsi que dans diverses boissons selon la référence¹³.

	concentration en quercétine *
Canneberge	149
Myrtille	10,5-16
Pomme	2-7 ; 2 ; 10-26
Brocoli	3 ; 3,7 ; 1,8 ; 0,6
Ciboulette	10,4 ; 30
Fève	2 ; 134
Laitue	0,2-3 ; 32 ; 1-9 ; 47
Oignon blanc	28-49 ; 18-63 ; 41 ; 54 ; 35
Jus d'orange	0,34-0,57
Thé vert	1,4-2,3 ; 0,11
Vin rouge	0,4-1,6 ; 0-0,2

* les valeurs données sont en mg/100g pour les fruits et les légumes et en mg/100ml pour les boissons.

La consommation journalière en flavonoïdes n'a jamais été étudiée de manière systématique au vu du très grand nombre de composés et de matrices naturelles à prendre en considération. Ces études seraient néanmoins particulièrement utiles pour connaître la quantité de flavonoïdes présente dans notre alimentation. Les seules estimations précises sur la consommation en flavonoïdes concernent essentiellement les flavonols et les flavones^{15, 16}, groupes caractérisés par l'insaturation de la liaison 2,3 et de la fonction carbonyle en position 4. Ainsi la consommation journalière en flavonols et flavones est de l'ordre de quelques dizaines à une centaine de mg. Mais il ne faut pas oublier que ces chiffres sont certainement en dessous de la réalité puisque ces études se focalisent sur un nombre restreint de composés, et ne prennent pas en compte, par exemple, la dépolymérisation des flavonoïdes par le milieu acide de l'estomac.

« French paradox » et régime méditerranéen

La recherche sur les flavonoïdes a reçu un écho particulier au sein de la communauté scientifique lors de la « découverte » du paradoxe français¹⁷⁻¹⁹. En effet, des études épidémiologiques ont montré qu'une population ayant une alimentation riche en acide gras polyinsaturés présentait un taux de mortalité accru dû aux maladies cardiovasculaires. Bien que la population française présente un taux de cholestérol sanguin équivalent à ceux d'autres pays industrialisés, les victimes d'infarctus sont bien moins nombreuses que celles de ces mêmes pays. Les populations méditerranéennes, bien que présentant une alimentation riche en graisse, étaient moins sujettes à ces maladies. L'explication pourrait provenir en partie de la consommation quotidienne de flavonoïdes présents dans le vin rouge et dans l'huile d'olive. Ces études¹⁷⁻¹⁹ suggèrent un rôle protecteur des flavonoïdes contre les maladies coronariennes, en empêchant le dépôt de graisses sur les parois des artères. Ces travaux ont été initiés dans les années 1990 et dès lors les chercheurs ont tenté de mieux comprendre les mécanismes d'action des flavonoïdes.

II. Propriétés antioxydantes des flavonoïdes

II.1. Stress Oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre en faveur des espèces prooxydantes par rapport au système de défense de l'organisme (antioxydants) contre ces substances. Ce déséquilibre a pour conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour les cellules²⁰.

La source principale des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO ou ROS en anglais pour *Reactive Oxygen Species*) dans les cellules des mammifères est d'origine enzymatique. La NADPH oxydase, les peroxyosomes, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont parmi les sources endogènes d'ERO les plus importantes. Les mitochondries, éléments essentiels au fonctionnement cellulaire puisqu'elles métabolisent le dioxygène, produisent également en permanence des ERO. Ces ERO sont particulièrement réactives et sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir avec toute une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN, ...). Au niveau moléculaire, les ERO peuvent aussi agir comme messagers secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies. Les ERO sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé ainsi que le tabagisme. Toutes ces situations provoquent une surproduction d'ERO dans notre organisme.

Pour se protéger contre les effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de contrôler et parfois réguler la production des ERO. Dans ces systèmes de défense, on inclut des composés antioxydants (glutathion, vitamines A, C et E, etc.), des oligo-éléments (cuivre, zinc, sélénium, etc.) ainsi que des protéines (superoxyde dismutase, catalase, glutathion transférase, etc.) qui régulent la concentration de ERO. En tant qu'antioxydants exogènes, les flavonoïdes peuvent également entrer dans le système de défense contre le stress oxydant en intervenant à différents niveaux.

II.2. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non-radicalaires très réactifs. Certaines espèces réactives de l'azote (ERA ou RNS en anglais pour Reactive Nitrogen Species) sont parfois mentionnées comme appartenant à cette classification puisqu'elles possèdent un atome d'oxygène et qu'elles se comportent de manière similaire (espèces généralement radicalaires, pouvoir oxydant important, générées et régulées par l'organisme) aux ERO vis-à-vis du stress oxydant. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont regroupées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Espèces réactives de l'oxygène

ROS	Formule chimique
Oxygène moléculaire	$^3\text{O}_2$
Dioxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion superoxyde	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	OH^{\cdot}
Radical hydroperoxyde	HOO^{\cdot}
Radical peroxyde	ROO^{\cdot}
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO^{\cdot}
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^{\cdot}
Peroxinitrite	ONOO^{\cdot}
Hypochlorite	ClO^{\cdot}

II.3. Implications biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant^{6, 7, 21-23} : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ERO. Sous certaines conditions, les flavonoïdes sont cependant susceptibles de se comporter comme agent prooxydant²⁴⁻²⁹ et engendrer une altération des protéines, de l'ADN ou encore des lipides membranaires et des glucides.

II.3.1. Capture directe de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. C'est pourquoi les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont souvent associées à leur potentiel antiradicalaire.

De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des flavonoïdes est essentiellement liée à leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxide, hydroxyle, peroxy, et alkoxy³⁰⁻³⁷. La plupart de ces résultats proviennent d'études expérimentales de radiolyses pulsées, initialement développées par l'équipe de Bors *et al.*^{30,38}, permettant de générer spécifiquement les formes réactives des flavonoïdes capables de capturer ces radicaux. Cette approche est combinée avec diverses techniques d'analyse physico-chimique (essentiellement la spectroscopie d'absorption UV/vis) afin de déterminer les constantes de vitesse associées à ces processus de capture des composés radicalaires^{31, 32, 37, 39-42}.

La méthode spectrophotométrique de prédiction du pouvoir antioxydant vis-à-vis des ERO, mise au point au début des années 1990 par Miller *et al.*⁴³⁻⁴⁷, reste d'actualité. Il s'agit de mesurer le pouvoir antioxydant d'un composé vis-à-vis du 2,2'-azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS⁺), et de le comparer à un antioxydant de référence, le Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthylchroman-2-carboxylic acid), analogue de la vitamine E mais soluble dans l'eau. Cela a permis de comparer une série de flavonoïdes et de prédire certaines des activités antioxydantes de celles-ci. Cette méthode a donné le nom à un indice de pouvoir antioxydant, le TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity). Il s'agit de la concentration exprimée en millimole d'une solution de Trolox ayant la même activité antioxydante qu'une solution millimolaire de la substance testée. En conséquence, Plus la valeur du TEAC est élevée plus le composé possède une activité antioxydante importante. A titre d'exemple, la quercétine est l'une des flavonoïdes possédant un TEAC le plus élevé avec 4,7.

D'autres méthodes basées sur le même principe existent. On pourrait, entre autres, citer la méthode DPPH⁴⁸. Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle) est un radical libre stable possédant une

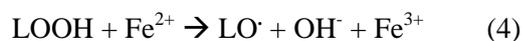
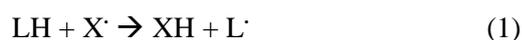
couleur rouge-violet en solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant.

II.3.2. Peroxydation lipidique

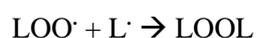
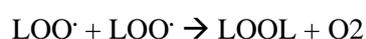
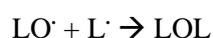
Les lipides sont les constituants essentiels des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Leur peroxydation est un processus qui intervient dans certaines pathologies impliquant le stress oxydant²⁰. La peroxydation lipidique est un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables notamment de la diminution de la fluidité membranaire.

L'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) est en partie la cause des lésions dues à l'accumulation de dépôts lipidiques (essentiellement cholestérol) dans les vaisseaux sanguins. Le mécanisme d'oxydation des LDL reste encore l'objet de débats et de nombreux laboratoires travaillent actuellement à une meilleure compréhension de cette étape importante dans l'artériosclérose. Depuis les résultats obtenus par Rankin et *al.* en 1988^{49,50} démontrant le rôle inhibiteur des flavonoïdes sur l'oxydation *in vitro* des lipoprotéines de faible densité (LDL), cette famille de substances naturelles a fait l'objet de très nombreuses publications sur le sujet.

Il est admis que les acides gras polyinsaturés sont oxydés en présence de radicaux libre et d'un cation métallique (Fe^{2+} ou Cu^+)⁵¹. Dans les équations ci-dessous, LH équivaut à un acide gras polyinsaturé, X \cdot à un radical libre, L \cdot au radical alkyl dérivant de l'abstraction de H \cdot par le radical libre X \cdot , LOO \cdot au radical peroxyde, LOOH à l'hydroperoxyde, et LO \cdot au radical alkoxyde.



L'équation (1) correspond à la phase d'initiation de la peroxydation lipidique ; les équations (2), (3) à la phase de propagation du radical. Un ion Fer(II) réagit généralement avec l'hydroperoxyde produit lors de l'étape (3) pour former un radical alkoxyde et d'un ion hydroxyle (4). Simultanément, les réactions de terminaison font intervenir diverses espèces :



Les flavonoïdes peuvent intervenir à différents niveaux de ce processus de peroxydation⁵²⁻⁵⁴. Ils sont capables de capturer directement les composés radicalaires, et ainsi d'interrompre la propagation de la réaction en chaîne radicalaire. Les flavonoïdes, présents à la surface des membranes, sont capables de régénérer la vitamine E, l'un des antioxydants essentiels dans la protection des membranes cellulaires. Relativement peu d'études ont porté sur cette implication biologique des flavonoïdes⁵⁵⁻⁵⁷. Comme nous allons le voir par la suite, les flavonoïdes sont également capables d'inhiber les enzymes responsables de la production des ERO, ici la lipoxygénase et la cyclooxygénase et donc d'empêcher la production de l'hydroperoxyde LOOH⁵⁸⁻⁶³. Enfin, étant de bons chélatants, elles sont capables de coordonner le fer libre et donc d'empêcher la réaction (4)⁶⁴⁻⁷⁰.

II.3.3. Interaction avec les cations métalliques

Les ions métalliques présents dans notre organisme, comme le fer ou le cuivre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèce moins réactive H₂O₂ via la réaction de Fenton^{20,51} :



Les flavonoïdes sont connus pour leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production d'ERO⁶⁴⁻⁷⁰. La capacité des flavonoïdes à interagir avec les cations métalliques peut être mise en évidence par les modifications spectrales provoquées par la complexation. Les effets bathochromes au maximum d'absorption sont caractéristiques de la chélation du métal avec le composé. Plus le complexe est stable, plus le décalage vers les grandes longueurs d'ondes sera important. Les études d'électrochimie sont ici utiles pour obtenir les potentiels d'oxydation des différents couples mis en jeu (flavonoïde/métal)⁶⁸. Il est alors possible de classer les flavonoïdes selon leur capacité à chélater un cation, et par voie de conséquence selon leur activité antioxydante. Il s'avère que l'un des éléments essentiels d'un flavonoïde concernant sa capacité à complexer un métal est la présence ou non d'un motif catéchol⁶⁹.

Des études récentes^{69, 71-73} laissent supposer que les flavonoïdes, en subissant une réaction d'oxydoréduction en présence de métal, possèdent une activité antioxydante accrue. La forme radicalaire ainsi obtenue, une semiquinone, serait plus active que la forme initiale. Une autre réaction peut entrer en jeu, il s'agit de la réaction de disproportionation. Deux formes semiquinones réagissent ensemble pour former deux espèces neutres : une forme oxydée (la forme quinone) et une autre forme (généralement la forme initiale). Mais les études sont peu nombreuses et les conclusions parfois en contradiction avec celles sur l'activité prooxydante des flavonoïdes. En effet, cette activité négative est

décrite comme étant dépendante de plusieurs conditions comme la présence de métal de transition dans le milieu réactionnel^{26, 74}.

II.3.4. Prooxydation

Un nombre croissant de publications traitent de l'effet prooxydant des flavonoïdes. Certains auteurs attribuent ces effets à la capacité d'autoxydation des flavonoïdes, engendrant les formes semiquinones et quinones ainsi que la production de ERO^{24, 25, 27, 74-77}. La présence d'une double liaison en position 2,3 et de la fonction carbonyle en position 4 permet une isomérisation de la forme quinone en quinones méthides connues pour être des formes responsables d'altérations sur les acides nucléiques et aminés. Les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore clairement définis, mais récemment plusieurs modes d'action ont été proposés (cf figure 5).

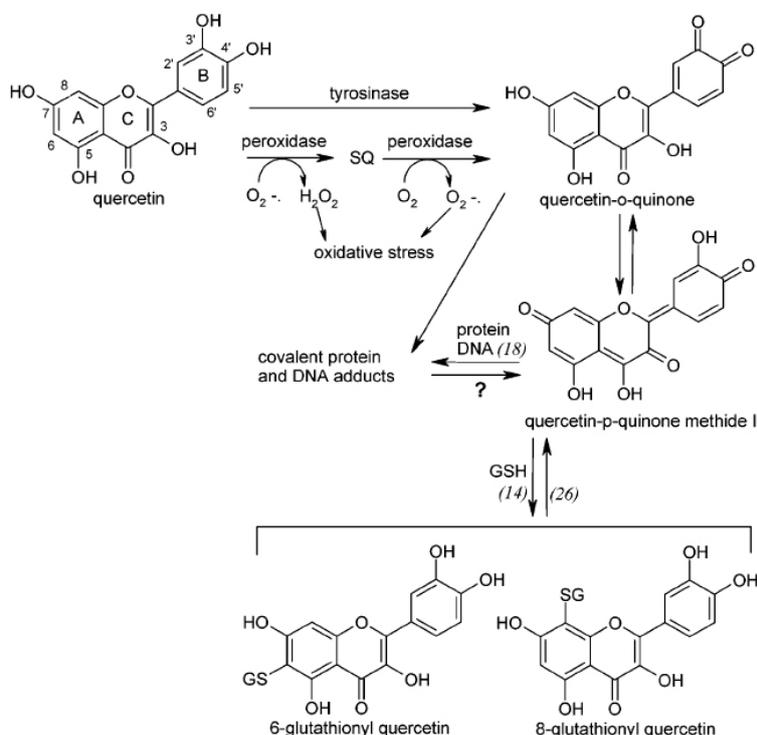


Figure 5 : relations proposées par Hester van der Woude et al. entre les formes actives de la quercétine et leur activité prooxydante²⁷.

L'équipe du Pr. Rietjens étudie la formation d'adduits par création de liaisons covalentes entre des formes quinones, ou de leurs isomères, avec le glutathion (GSH)^{27, 76, 78}. Ces études ont pour but de comprendre la formation d'adduits entre un flavonoïde et une protéine, et plus précisément avec les groupements thiols. Les mesures par spectroscopie UV/vis permettent de connaître l'évolution au

cours du temps de la formation des adduits. D'un point de vue moléculaire, ces résultats sont aujourd'hui quasiment les seuls indices de l'action prooxydante des flavonoïdes.

D'autres études ont permis de comprendre le rôle prooxydant des flavonoïdes sur l'ADN. La formation d'adduits est l'un des modes d'action, mais en présence de métaux de transition Yamashita N. *et al.*²⁶ suggèrent un autre mécanisme. La formation des espèces quinone et semiquinone implique des co-réactifs. Les ERO jouent alors le rôle d'oxydant et l'espèce H_2O_2 est formée, laquelle se complexe avec le cuivre(II), donnant le complexe $Cu(I)OOH$ qui sera responsable de l'altération des bases nucléiques. Encore une fois les résultats sont très récents et les mécanismes mal identifiés.

II.3.5. Inhibition de diverses enzymes

Les flavonoïdes sont responsables de l'inhibition de très nombreuses enzymes. Deux revues très complètes rendent compte de l'incroyable potentialité des flavonoïdes^{79, 80}. Les enzymes directement impliquées dans le stress oxydant et pouvant être inhibées par les flavonoïdes sont la glutathione S-tranf rerase, les lipoxygénases, les cyclooxygénases, la xanthine oxydase, et les nitrique oxyde synthases (NOS). Certains flavonoïdes inhibent les kinases. C'est le cas par exemple de la quercétine et la myr citrine qui inhibent la phosphoinositide 3-kinase, protéine intervenant dans la signalisation cellulaire. Les modes d'inhibition peuvent être différents selon le flavono ide et l'enzyme étudiés.

II.3.5.a. Xanthine oxydase

Depuis que Mc Cord et Fridovich⁸¹ ont démontré la participation de la xanthine oxydase dans la production de radicaux libres, cette enzyme a été largement étudiée. Elle catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique. Cette réaction s'accompagne de la génération des ERO $O_2^{\cdot-}$ et H_2O_2 à partir du dioxygène (cf. figure 6).

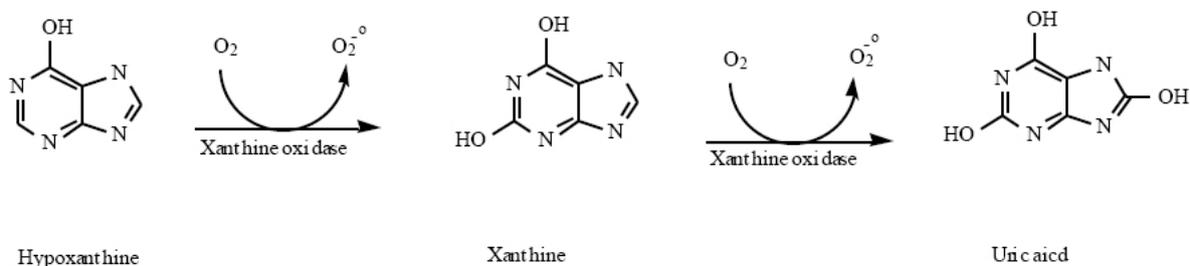


Figure 6 : processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase²¹.

A l'aide de méthodes de chimie quantique, il a été montré une similarité au niveau structural et électronique du cycle purine de la xanthine et du cycle A des flavonoïdes⁸².

D'autres facteurs entrent en jeu comme l'absence de substitution en position 6 ou la présence de fonction hydroxyle en position 7, 3 et/ou 5²¹. Cela fait des flavonoïdes possédant ces différents critères des inhibiteurs potentiels. Différents modes d'inhibition ont été rencontrés : compétitif, non-compétitif ou mixte^{21, 83}. Dans le dernier cas, le flavonoïde est capable de se lier aussi bien à l'enzyme native qu'au complexe enzyme/substrat.

II.3.5.b. NO synthases

Les nitrique oxyde synthases constituent un groupe d'enzymes responsables de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) à partir de l'atome d'azote terminal d'une L-arginine en présence de O₂ et de différents cofacteurs comme la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et la flavine adénine dinucléotide (FAD)⁵¹. Un atome de fer (au sein d'un hème) est responsable de la réaction d'oxydo-réduction nécessaire à la formation de monoxyde d'azote.

De nombreuses publications traitent de ce sujet et font références aux flavonoïdes comme inhibiteurs potentiels de la NOS⁸⁴⁻⁸⁷, mais aucun indice au niveau moléculaire n'a pu être apporté pour éclaircir le mécanisme d'inhibition.

II.3.5.c. Lipoxygénases

Les lipoxygénases constituent une classe d'enzymes à fer non-hème responsables de l'oxydation des acides gras polyinsaturés^{20, 51}. L'hydroperoxyde ainsi produit entre dans divers processus cellulaires selon l'acide gras initial et la lipoxygénase considérés. Par exemple, les leucotriènes, molécules impliquées dans les processus de réponses inflammatoires, sont formées à partir du linoléate au sein de la 5-lipoxygénase.

Bien que le cycle catalytique des lipoxygénases ait été très étudié et le mécanisme d'oxydation des acides gras soit relativement bien connu, leur inhibition par les flavonoïdes a fait l'objet d'études récentes^{58-63, 88}. La molécule la plus étudiée reste la quercétine et un mécanisme particulier considéré comme étant responsable de l'inhibition de la 3-lipoxygénase⁶². En effet, la quercétine semble être dégradée au sein de l'enzyme, et le produit de dégradation (l'acide protocatéchuique) serait responsable de l'inhibition de l'enzyme.

III. Différentes approches physico-chimiques pour étudier les propriétés des flavonoïdes

Le champ d'investigation est vaste lorsque l'on cherche à connaître les propriétés d'une substance naturelle. Dans le cas des flavonoïdes, les méthodes employées sont nombreuses et nous allons nous focaliser sur certaines d'entre elles. Les paramètres physico-chimiques les plus importants pour connaître les propriétés antioxydantes d'un flavonoïde sont les potentiels rédox, les valeurs de pK, et les paramètres cinétiques de capture de radicaux libres.

La radiolyse pulsée permet de contrôler les radicaux initialement formés et les coefficients de vitesse de capture de ERO par les flavonoïdes peuvent être déterminés par des méthodes de spectrophotométrie UV-vis, de chimiluminescence, ou de spectrofluorimétrie^{31,32,37,39-42}. La technique de détection la plus utilisée est la spectroscopie UV-vis pour une gamme de longueurs d'ondes allant de 210 à 600 nm. Deux bandes d'absorption sont caractéristiques des flavonoïdes. La première se situe dans la région de 210-290 nm et la deuxième à 320-380 nm (pouvant aller jusqu'à 490-540 nm dans le cas des anthocyanines).

D'autres méthodes couramment employées dans la chimie radicalaire sont disponibles comme la spectroscopie ESR ou EPR^{24,36,41,89}. Cette dernière est l'une des méthodes de choix lorsque l'on cherche à avoir des informations structurales, en particulier lorsque les flavonoïdes sont en présence de métaux de transition⁶⁵.

Les structures RX sont traditionnellement employées pour obtenir les structures cristallisées des protéines et/ou des complexes enzymes/substrats^{62,90}. Elles sont également employées pour connaître les caractéristiques de chélation des flavonoïdes vis-à-vis d'un métal de transition⁹¹. On obtient notamment des informations sur le mode de complexation, par exemple le ratio flavonoïde : métal (généralement 1:1 ou 2:1) dans le cristal.

En tant que composés possédant de nombreux groupements-OH, les constantes de dissociation de chaque fonction hydroxyle ne sont pas facilement accessibles^{92,93}. Les propriétés acido-basiques des flavonoïdes ne peuvent pas être déterminées par titrations spectrophotométriques car ces méthodes ne donnent qu'une valeur de pK macroscopique. Seules les études RMN sont capables de donner accès aux constantes de dissociation individuelles des groupements hydroxyles⁹⁴.

Les potentiels rédox des flavonoïdes sont obtenus par les méthodes électrochimiques comme la voltampérométrie cyclique^{92,95}. Là encore, la détermination n'est pas aisée puisque les réactions aux électrodes génèrent des radicaux phénoxyles qui sont susceptibles de se polymériser et de se fixer sur l'électrode.

Toutes ces méthodes fournissent d'excellents renseignements sur le comportement des flavonoïdes et de précieux descripteurs moléculaires pour les approches basées sur les relations structures/propriétés et structures/activités (QSPR et QSAR)⁹⁶⁻⁹⁹. Pour un problème précis, il semble

possible d'établir des correspondances entre une structure particulière et une activité même si la diversité de structures des flavonoïdes et l'hétérogénéité des résultats rend le problème complexe¹⁰⁰. Par exemple la présence du motif catechol et de l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4 semblent être les facteurs déterminants de l'activité antioxydante.

Les méthodes de chimie quantique donnent accès à des informations au niveau moléculaire : comme la densité électronique ou de spin dans le cas des formes radicalaires¹⁰¹⁻¹⁰⁵, les énergies des niveaux HOMO et LUMO utiles dans les études de réactivité^{97,103,106,107}, l'énergie de la barrière de rotation le long de l'axe C2-C1'^{103,108}, les énergies de dissociation de liaison O-H (appelée BDE pour *Bond Dissociation Energy*)¹⁰⁹, etc. La détermination des chemins réactionnels, à l'aide de ces méthodes, permet de mieux comprendre le rôle d'un composé dans des processus biologiques encore mal identifiés¹¹⁰. Dans le cas présent, les modes d'action des flavonoïdes dans les processus enzymatiques ne sont pas clairement déterminés. L'emploi de ces méthodes, ainsi que celui de la dynamique moléculaire, permet de mieux comprendre la réactivité de ces systèmes et les interactions entre les différents protagonistes.

IV. La quercétine – une molécule modèle

La quercétine est l'une des molécules les plus représentatives de la famille des flavonoïdes. Elle intervient dans la quasi-totalité des mécanismes cités précédemment et se trouve être l'objet de la plupart des études. Elle dérive du motif flavonol, par substitution de groupements hydroxyles en position 3, 5, 7, 3' et 4'. Cette structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'un flavonoïde : le cycle catéchol et l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4. De plus elle possède les trois sites de complexation communément admis pour les flavonoïdes (cf. Figure 7). Pour toutes ces raisons, la quercétine est la molécule modèle par excellence pour aborder l'étude des flavonoïdes à l'aide des méthodes de chimie théorique.

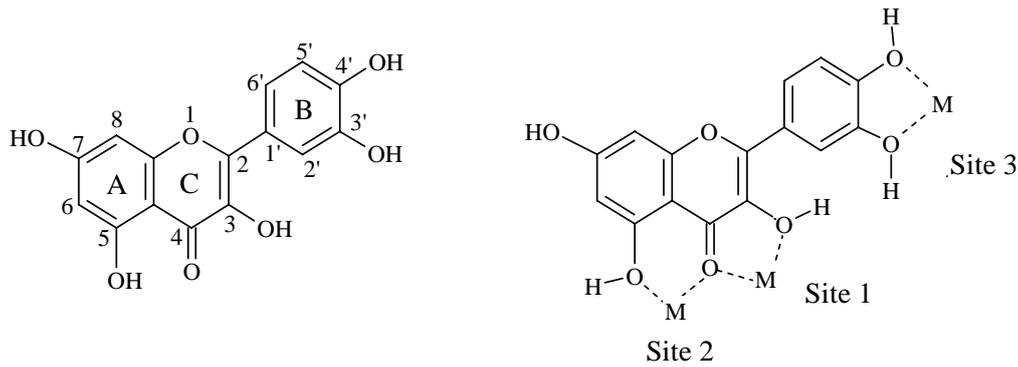


Figure 7 : structure de la quercétine, numérotation des positions et des cycles, et sites potentiels de chélation.

Par la suite nous allons décrire différentes caractéristiques de la quercétine. Dans un premier temps, à l'aide des méthodes de chimie quantique, nous nous sommes attachés à mieux comprendre la réactivité d'un tel système en étudiant ses différentes formes activées (quinone, semiquinone, déprotonée, ...) et leur interaction avec un métal de transition.

Ensuite nous avons considéré la quercétine comme substrat de la Quercétine 2,3-Dioxygénase. Oxydoréductase de la famille des cupines, cette enzyme est responsable de la dégradation des flavonoïdes^{90, 111, 112}. Son substrat de référence est la quercétine. Pour élucider le mécanisme réactionnel d'oxydation au sein de l'enzyme et caractériser les états de transition et les intermédiaires réactionnels, nous avons utilisé des méthodes de chimie quantique tout en prenant en compte les résultats expérimentaux déjà obtenus. L'étude des interactions enzyme/substrat a pu être effectuée grâce aux méthodes de dynamique moléculaire.

Enfin nous avons considéré la quercétine comme inhibiteur de la 3-lipoxygénase⁶², une enzyme à fer non-hème. Il ne s'agit pas d'une inhibition compétitive dans le sens où elle ne remplace pas le substrat empêchant ainsi la réaction de se produire. C'est le produit de dégradation par la lipoxygénase qui est lui-même l'inhibiteur. Nous avons utilisé la même double approche quantique et classique pour ce système que pour celui de la quercétinase : une étude du mécanisme à l'aide des méthodes de chimie quantique et l'étude des interactions enzyme/substrat à l'aide des méthodes de dynamiques moléculaire.

V. Références

- [1] Szent-Györgyi, A., Oxidation, Energy Transfer, and Vitamins. In *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1922-1941*, Elsevier Publishing Company: Amsterdam, 1965.
- [2] Rusznyak, I.; Szent-Györgyi, A. Vitamin P: flavanols as vitamins. *Nature*. **1936**, 1936(138), 27.
- [3] Hahlbrock, K., Flavonoid. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise: Secondary Plant Products Vol 7*, E.E. Academic Press: New York, 1981.
- [4] Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, 126(2), 485-493.
- [5] Winkel-Shirley, B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2002**, 5(3), 218-223.
- [6] Peterson, J.; Dwyer, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.* **1998**, 18(12), 1995-2018.
- [7] Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* **1999**, 65(4), 337-353.
- [8] Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 79(5), 727-747.
- [9] Markham, K.R. *Techniques of flavonoid identification*. New York : Academic Press: London, 1982.
- [10] Harborne, J.B.; Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **2000**, 55(6), 481-504.
- [11] Markham, K.R.; Bloor, S.J., Analysis and identification of Flavonoids in Practice. In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York, 1998; pp 1-34.
- [12] Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, 130(8S Suppl), 2073S-2085S.
- [13] Aherne, S.A.; O'Brien, N.M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. **2002**, 18(1), 75-81.
- [14] Formica, J.V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, 33(12), 1061-1080.
- [15] Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer*. **1993**, 20, 21-29.
- [16] Hertog, M.G.L.; Kromhout, D.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.B.; Fidanza, F.; Giampaoli, S.; Jansen, A.; Menotti, A.; Nedeljkovic, S.; Pekkarinen, M.; Simic, B.S.; Toshima, H.; Feskens, J.M.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. Flavonoids intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Int. Med.* **1995**, 155, 381-386.
- [17] Criqui, M.H.; Ringel, B.L. Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet*. **1994**, 344, 1719-1723.

- [18] Richard, J.L. Coronary risk factors. the French paradox. *Arch. Maladies Coeur Vaisseaux*. **1987**, 80, 17-21.
- [19] Renaud, S.; de Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. **1992**, 339(8808), 1523-1526.
- [20] Delattre, J.; Beaudeau, J.-L.; Bonnefort-Rousselot, D. *Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologiques et pathologiques*. Tec & Doc Lavoisier: Londres - Paris - New York, 2005.
- [21] Cotelle, N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr. Top. Med. Chem.* **2001**, 1(6), 569-590.
- [22] Nijveldt, R.J.; Van Nood, E.; Van Hoorn, D.E.C.; Boelens, P.G.; Van Norren, K.; Van Leeuwen, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 74(4), 418-425.
- [23] Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63(7), 1035-1042.
- [24] Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickancaite, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26(1-2), 107-116.
- [25] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide-Glutathione Adducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 378(2), 224-233.
- [26] Yamashita, N.; Tanemura, H.; Kawanishi, S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutat. Res.* **1999**, 425(1), 107-115.
- [27] van der Woude, H.; Alink, G.M.; Van Rossum, B.E.J.; Walle, K.; Van Steeg, H.; Walle, T.; Rietjens, I.M.C.M. Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18(12), 1907-1916.
- [28] Oikawa, S.; Hirose, I.; Hirakawa, K.; Kawanishi, S. Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. *Carcinogenesis*. **2001**, 22(8), 1239-1245.
- [29] Galati, G.; Moridani, M.Y.; Chan, T.S.; O'Brien, P.J. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 30(4), 370-382.
- [30] Erben-Russ, M.; Bors, W.; Saran, M. Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol.* **1987**, 52, 393-412.
- [31] Bors, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol.* **1994**, 234, 420-429.
- [32] Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **1990**, 186, 343-355.
- [33] Rajendran, M.; Manisankar, P.; Gandhidasan, R.; Murugesan, R. Free Radicals Scavenging Efficiency of a Few Naturally Occurring Flavonoids: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52(24), 7389-7394.
- [34] Nagai, S.; Ohara, K.; Mukai, K. Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution. *J. Phys. Chem. B.* **2005**, 109(9), 4234-4240.

- [35] Krishnamachari, V.; Levine, L.H.; Pare, P.W. Flavonoid Oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(15), 4357-4363.
- [36] McPhail, D.B.; Hartley, R.C.; Gardner, P.T.; Duthie, G.G. Kinetic and Stoichiometric Assessment of the Antioxidant Activity of Flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51(6), 1684-1690.
- [37] Jovanovic, S.V.; Steenken, S.; Tasic, M.; Marjanovic, B.; Simic, M.G. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4846-4851.
- [38] Saran, M.; Vetter, G.; Erben-Russ, M.; Winter, R.; Kruse, A.; Michel, C.; Bors, W. Pulse radiolysis equipment: a setup for simultaneous multiwavelength kinetic spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **1987**, 58, 363-368.
- [39] Chen, Y.T.; Zheng, R.L.; Jia, Z.J.; Ju, Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1990**, 9(1), 19-21.
- [40] Robak, J.; Gryglewski, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37(5), 837-841.
- [41] Sichel, G.; Corsaro, C.; Scalia, M.; Di Bilio, A.J.; Bonomo, R.P. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂⁻(·). *Free Radical Biol. Med.* **1991**, 11(1), 1-8.
- [42] Bors, W.; Saran, M. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Res. Commun.* **1987**, 2(4-6), 289-294.
- [43] Miller, N.J.; Rice-Evans, C. Factor influencing the antioxidant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, 26, 195-199.
- [44] Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A. Spectrophotometric determinations of antioxidant activity. *Redox Rep.* **1996**, 2, 161-171.
- [45] Miller, N.J.; Sampson, J.; Candeias, L.P.; Bramley, P.M.; Rice-Evans, C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.* **1996**, 384(3), 240-242.
- [46] Miller, N.J.; Castelluccio, C.; Tijburg, L.; Rice-Evans, C. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters--radical scavengers or metal chelators? *FEBS Lett.* **1996**, 392(1), 40-44.
- [47] Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* **1993**, 84(4), 407-412.
- [48] Atsumi, T.; Iwakura, I.; Kashiwagi, Y.; Fujisawa, S.; Ueha, T. Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. *Antioxid. Redox Signal.* **1999**, 1(4), 537-546.
- [49] Rankin, S.M.; Hoult, J.R.S.; Leake, D.S. Effects of flavonoids on the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **1988**, 95, 727P.
- [50] de Whalley, C.V.; Rankin, S.M.; Hoult, J.R.; Jessup, W.; Leake, D.S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 39(11), 1743-1750.
- [51] Stryer, L. *Biochemistry*. Flammarion: Paris, 1992.

- [52] Leake, D.S., Isoflavonoids as inhibitors of lipid peroxidation and quenchers of singlet oxygen. In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York, 1998; pp 295-302.
- [53] Terao, J.; Piskula, M.K., Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York, 1998; pp 277-294.
- [54] Leake, D.S., Effects of flavonoids on the oxidation of low-density lipoproteins. In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York, 1998; pp 253-276.
- [55] Jessup, W.; Rankin, S.M.; De Whalley, C.V.; Hoult, J.R.; Scott, J.; Leake, D.S. Alpha-tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem. J.* **1990**, 265(2), 399-405.
- [56] Wickramasinghe, S.N.; Hasan, R.; Khalpey, Z. Differences in the serum levels of acetaldehyde and cytotoxic acetaldehyde-albumin complexes after the consumption of red and white wine: in vitro effects of flavonoids, vitamin E, and other dietary antioxidants on cytotoxic complexes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1996**, 20(5), 799-803.
- [57] Negre-Salvayre, A.; Mabile, L.; Delchambre, J.; Salvayre, R. alpha-Tocopherol, ascorbic acid, and rutin inhibit synergistically the copper-promoted LDL oxidation and the cytotoxicity of oxidized LDL to cultured endothelial cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **1995**, 47(1-3), 81-91.
- [58] Chi, Y.S.; Jong, H.G.; Son, K.H.; Chang, H.W.; Kang, S.S.; Kim, H.P. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 62(9), 1185-1191.
- [59] Pinto, M.d.C.; Macias, P. Oxidation of dietary polyphenolics by hydroperoxidase activity of lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53(23), 9225-9230.
- [60] Da Silva, E.L.; Tsushida, T.; Terao, J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 349(2), 313-320.
- [61] Perusse, P.; Leech, D. A voltammetric assay of antioxidants and inhibitors of soybean lipoxygenase. *Electroanalysis.* **2003**, 15(5-6), 573-578.
- [62] Borbulevych, O.Y.; Jankun, J.; Selman, S.H.; Skrzypczak-Jankun, E. Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 Å resolution. *Proteins.* **2004**, 54(1), 13-19.
- [63] Skrzypczak-Jankun, E.; Zhou, K.; Jankun, J. Inhibition of lipoxygenase by (-)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1 Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead. *Int. J. Mol. Med.* **2003**, 12, 415-422.
- [64] Ferrali, M.; Signorini, C.; Caciotti, B.; Sugherini, L.; Ciccoli, L.; Giachetti, D. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* **1997**, 416(2), 123-129.
- [65] Bravo, A.; Anaconda, J.R. Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties. *Transition Met. Chem.* **2001**, 26(1-2), 20-23.
- [66] Zhou, J.; Wang, L.; Wang, J.; Tang, N. Antioxidative and antitumour activities of solid quercetin metal(II) complexes. *Transition Met. Chem.* **2001**, 26(1-2), 57-63.

- [67] Zhou, J.; Wang, L.-F.; Wang, J.-Y.; Tang, N. Synthesis, characterization, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2001**, 83(1), 41-48.
- [68] Van Acker, S.A.B.E.; Van Balen, G.P.; Van Den Berg, D.-J.; Bast, A.; Van Der Vijgh, W.J.F. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56(8), 935-943.
- [69] Moridani, M.Y.; Pourahmad, J.; Bui, H.; Siraki, A.; O'Brien, P.J. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biol. Med.* **2003**, 34(2), 243-253.
- [70] Engelmann, M.D.; Hutcheson, R.; Cheng, I.F. Stability of Ferric Complexes with 3-Hydroxyflavone (Flavonol), 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3',4'-Dihydroxyflavone. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53(8), 2953-2960.
- [71] de Souza, R.F.; De Giovani, W.F. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.* **2004**, 9(2), 97-104.
- [72] Afanas'eva, I.B.; Ostrakhovitch, E.A.; Mikhal'chik, E.V.; Ibragimova, G.A.; Korkina, L.G. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 61(6), 677-684.
- [73] Bodini, M.E.; Copia, G.; Tapia, R.; Leighton, F.; Herrera, L. Iron complexes of quercetin in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide anion radical. *Polyhedron.* **1999**, 18(17), 2233-2239.
- [74] Galati, G.; Chan, T.; Wu, B.; O'Brien, P.J. Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12(6), 521-525.
- [75] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. Structure-Activity Study on the Quinone/Quinone Methide Chemistry of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, 14(4), 398-408.
- [76] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; Van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with Flavonoid Quinone/Quinone Methides Is pH-Dependent. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15(3), 343-351.
- [77] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; van der Woude, H.; van Zanden, J.; van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett.* **2002**, 520(1-3), 30-34.
- [78] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; Van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. Quenching of Quercetin Quinone/Quinone Methides by Different Thiolate Scavengers: Stability and Reversibility of Conjugate Formation. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, 16(7), 822-831.
- [79] Havsteen, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2002**, 96(2-3), 67-202.
- [80] Middleton, E., Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **2000**, 52(4), 673-751.
- [81] McCord, J.M.; Fridovich, I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **1968**, 243(21), 5753-5760.

- [82] da Silva, S.L.; da Silva, A.; Honorio, K.M.; Marangoni, S.; Toyama, M.H.; da Silva, A.B.F. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *J. Mol. Structure (Theochem)*. **2004**, 684(1-3), 1-7.
- [83] Lin, C.-M.; Chen, C.-S.; Chen, C.-T.; Liang, Y.-C.; Lin, J.-K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 294(1), 167-172.
- [84] Harris, S.R.; Thorgeirsson, U.P. Flavone acetic acid stimulates nitric oxide and peroxynitrite production in subcutaneous mouse tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 235(3), 509-514.
- [85] Chiesi, M.; Schwaller, R. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, 49(4), 495-501.
- [86] Man-Ying Chan, M.; Mattiacci, J.A.; Hwang, H.S.; Shah, A.; Fong, D. Synergy between ethanol and the grape polyphenols quercetin and resveratrol in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, 60(10), 1539-1548.
- [87] Chen, Y.-C.; Shen, S.-C.; Lee, W.-R.; Hou, W.-C.; Yang, L.-L.; Lee, T.J.F. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.* **2001**, 82(4), 537-548.
- [88] Sadik, C.D.; Sies, H.; Schewe, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65(5), 773-781.
- [89] Miura, T.; Muraoka, S.; Fujimoto, Y. Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide pro-oxidative and anti-oxidative actions of quercetin. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, 41(6), 759-765.
- [90] Fusetti, F.; Schroter, K.H.; Steiner, R.A.; van Noort, P.I.; Pijning, T.; Rozeboom, H.J.; Kalk, K.H.; Egmond, M.R.; Dijkstra, B.W. Crystal structure of the copper-containing quercetin 2,3-dioxygenase from *Aspergillus japonicus*. *Structure*. **2002**, 10(2), 259-268.
- [91] El Amrani, F.B.; Perello, L.; Real, J.A.; Gonzalez-Alvarez, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Garcia-Granda, S.; Montejo-Bernardo, J. Oxidative DNA cleavage induced by an iron(III) flavonoid complex: Synthesis, crystal structure and characterization of chlorobis(flavonolato)(methanol) iron(III) complex. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 1208-1218.
- [92] Jovanovic, S.V.; Steeken, S.; Simic, M.G.; Hara, Y., Antioxydant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radical. In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C. A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York, 1998; pp 137-162.
- [93] Jovanovic, S.V.; Steeken, S.; Hara, Y.; Simic, M.G. Reduction potentials of flavonoid phenoxyl radicals. Which ring is responsible for antioxydant activity? *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*. **1996**, 2497.
- [94] Agrawal, P.K.; Schneider, H.J. Deprotonation induced ¹³C NMR shifts in phenols and flavonoids. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 177-180.
- [95] Brett, A.M.O.; Ghica, M.-e. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis*. **2003**, 15(22), 1745-1750.
- [96] Mukherjee, S.; Mukherjee, A.; Saha, A. QSAR modeling on binding affinity of diverse estrogenic flavonoids: electronic, topological and spatial functions in quantitative approximation. *J. Mol. Structure (Theochem)*. **2005**, 715(1-3), 85-90.

- [97] Alves, C.N.; Pinheiro, J.C.; Camargo, A.J.; de Souza, A.J.; Carvalho, R.B.; da Silva, A.B.F. A quantum chemical and statistical study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *J. Mol. Structure (Theochem)*. **1999**, 491, 123-131.
- [98] Alves, C.N.; Pinheiro, J.C.; Camargo, A.J.; Ferreira, M.M.C.; Romero, R.A.F.; da Silva, A.B.F. A multiple linear regression and partial least squares study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *J. Mol. Structure (Theochem)*. **2001**, 541, 81-88.
- [99] Weber, K.C.; Honorio, K.M.; da Silva, S.L.; Mercadante, R.; da Silva, A.B.F. Selection of quantum chemical descriptors by chemometric methods in the study of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Int. J. Quantum Chem.* **2005**, 103(5), 731-737.
- [100] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, 13(10), 572-584.
- [101] van Acker, S.A.B.E.; de Groot, M.J.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M.N.J.L.; Donne-Op den Kelder, G.; van der Vijgh, W.J.F.; Bast, A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9(8), 1305-1312.
- [102] O'Malley, P.J. Electronic structure studies of quinones and semiquinones: accurate calculation of spin densities and electron paramagnetic resonance parameters. *Antioxid. Redox Signal.* **2001**, 3(5), 825-838.
- [103] Trouillas, P.; Fagnere, C.; Lazzaroni, R.; Calliste, C.; Marfak, A.; Duroux, J.-L. A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical-scavenging activity. *Food Chem.* **2004**, 88(4), 571-582.
- [104] Erkoc, S.; Erkoc, F.; Keskin, N. Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *J. Mol. Structure (Theochem)*. **2003**, 631, 141-146.
- [105] Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, 111(2-6), 210-216.
- [106] Meyer, M. Ab initio study of flavonoids. *Int. J. Quantum Chem.* **2000**, 76(6), 724-732.
- [107] Vasilescu, D.; Girma, R. Quantum molecular modeling of quercetin-simulation of the interaction with the free radical t-BuOO. *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, 90(2), 888-902.
- [108] Lau, K.S.; Mantas, A.; Chass, G.A.; Ferretti, F.H.; Estrada, M.; Zamarbide, G.; Csizmadia, I.G. Ab initio and DFT conformational analysis of selected flavones: 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) and 7,8-dihydroxyflavone. *Can. J. Chem.* **2002**, 80(7), 845-855.
- [109] Zhang, H.-Y.; Sun, Y.-M.; Wang, X.-L. Substituent effects on O-H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: a DFT study and its implications in the rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure - activity relationships for flavonoid antioxidants. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9(2), 502-508.
- [110] Fiorucci, S.; Golebiowski, J.; Cabrol-Bass, D.; Antonczak, S. Oxygenolysis of flavonoid compounds: DFT description of the mechanism for quercetin. *ChemPhysChem.* **2004**, 5(11), 1726-1733.
- [111] Steiner, R.A.; Kalk, K.H.; Dijkstra, B.W. Anaerobic enzyme-substrate structures provide insight into the reaction mechanism of the copper-dependent quercetin 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(26), 16625-16630.
- [112] Oka, T.; Simpson, F.J.; Krishnamurthy, H.G. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. Studies on specificity, inhibition, and possible mechanism of quercetinase. *Can. J. Microbiol.* **1972**, 18, 493-508.

Chapitre 2

Etude théorique des formes
activées de la quercétine

I. Etat des connaissances	39
I.1. PROPRIETES STRUCTURALES ET ENERGETIQUES	39
I.2. PROPRIETES ELECTRONIQUES	42
II. Méthodologie	44
II.1. FORMES ETUDIEES	45
II.2. INFLUENCE DU CUIVRE.....	47
II.3. AUTRES ESPECES ETUDIEES ET CYCLES THERMODYNAMIQUES.....	48
II.4. METHODES DE CALCULS EMPLOYEES	49
III. Analyse des formes activées.....	51
III.1. QUERCETINE (Q) ET QUERCETINE RADICALAIRE (QR)	51
III.2. FORMES DEPROTONEES (D)	51
III.3. FORMES DOUBLEMENT DEPROTONEES (DD).....	52
III.4. FORMES SEMIQUINONES (SQ).....	54
III.5. FORMES SEMIQUINONES DEPROTONEES (SQD).....	55
III.6. FORMES QUINONES (OQ).....	57
IV. Influence d'un métal de transition.....	58
IV.1. DONNEES STRUCTURALES	59
IV.2. DONNEES ELECTRONIQUES	59
IV.3. DONNEES ENERGETIQUES	60
V. Implications dans les mécanismes biologiques	61
V.1. ENTHALPIE DE FORMATION DES AUTRES ESPECES ETUDIEES	61
V.2. CYCLES THERMODYNAMIQUES	62
V.2.1. Formation de l'espèce semiquinone SQ5.....	62
V.2.2. Formation de l'espèce semiquinone déprotonée SQD2.....	63
V.2.3. Influence du cuivre sur la formation la forme déprotonée D5.....	64
VI. Conclusion.....	65
VII. Références.....	67
VIII. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 2	71
VIII.1. TABLEAUX DES ENTHALPIES LIBRES DE FORMATIONS DES ESPECES TRAITEES DANS CE CHAPITRE.....	71
VIII.2. TABLEAU DES DISTANCES INTERATOMIQUES DES FORMES ACTIVEES NON COMPLEXEES.....	72
VIII.3. TABLEAU DES CHARGES ATOMIQUES DES FORMES ACTIVEES NON COMPLEXEES.....	73
VIII.4. TABLEAU DES DENSITES DE SPIN ATOMIQUE DES FORMES ACTIVEES NON COMPLEXEES	74
VIII.5. TABLEAU DES DISTANCES INTERATOMIQUES DES FORMES ACTIVEES COMPLEXEES	75
VIII.6. TABLEAU DES CHARGES ATOMIQUES DES FORMES ACTIVEES COMPLEXEES	76
VIII.7. TABLEAU DES DENSITES DE SPIN ATOMIQUE DES FORMES ACTIVEES COMPLEXEES	77

Les flavonoïdes présentent plusieurs fonctions hydroxyles susceptibles de réagir lors de processus chimiques et biochimiques avec des espèces oxydantes, radicalaires et acido-basiques. Au cours de ces transformations, de nouvelles structures dérivant du flavonoïde sont créées et peuvent avoir un rôle d'intermédiaire réactionnel ou de produit final. La quercétine comporte cinq fonctions hydroxyles susceptibles d'être déshydrogénées (abstraction de H[•]), déprotonées, ou oxydées au cours des mécanismes biologiques. Le nombre relativement important de ces fonctions oxygénées est à l'origine d'un grand nombre de formes activées différentes telles que des espèces semiquinones, quinones, etc. Aucune étude théorique ne s'est attachée à décrire systématiquement les propriétés électroniques, structurales et énergétiques des différentes formes activées de la quercétine. Seules les propriétés des formes semiquinones ont été décrites à l'aide de méthodes de chimie quantique. Nous présenterons nos résultats décrivant les propriétés physico-chimiques de la quercétine et de ses formes activées après un préambule résumant ceux extraits de la littérature.

La description des méthodes de chimie quantique a été incluse en annexe. La structure de la quercétine et la numérotation systématique sont rappelées dans la figure 1.

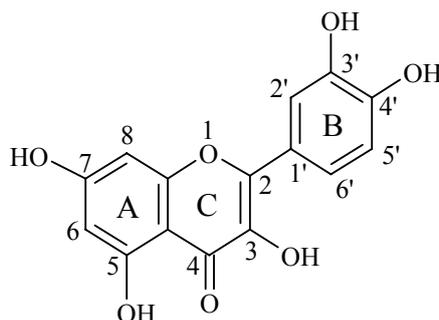


Figure 1 : structure de la quercétine

I. Etat des connaissances

I.1. Propriétés structurales et énergétiques

Diverses études *ab initio* et DFT ont montré que ces méthodes reproduisent avec une grande précision les longueurs de liaison de la quercétine obtenues par spectroscopie RX¹ (cf. Tableau 1). L'existence d'une double liaison entre les atomes de carbone 2 et 3 permet une conjugaison entre d'un côté les cycles A et C et de l'autre le cycle B. Le nuage électronique est délocalisé sur l'ensemble de la quercétine attestant de sa structure plane comme le montrent les études théoriques de Van Acker *et al.*²

et Leopoldini *et al.*³, effectuées respectivement au niveau de calcul UHF/STO-3G//UHF/6-31G* et B3LYP/6-31++G**.

Tableau 1 : Distances interatomiques (en Å) des structures optimisées au niveau de calcul B3LYP/6-31+G* et AM1 et de la structure cristallisée de la quercétine

	B3LYP	AM1	RX
O1C2	1,38	1,39	1,37
O1C9	1,36	1,38	1,37
O3C3	1,36	1,38	1,36
O4C4	1,27	1,25	1,24
O5C5	1,35	1,36	1,35
O7C7	1,37	1,37	1,36
O3'C3'	1,38	1,38	1,37
O4'C4'	1,36	1,37	1,37
C2C3	1,37	1,36	1,36
C3C4	1,45	1,47	1,43
C4C10	1,43	1,45	1,45
C10C5	1,42	1,42	1,42
C5C6	1,39	1,40	1,37
C6C7	1,40	1,40	1,40
C7C8	1,40	1,40	1,39
C8C9	1,39	1,30	1,38
C9C10	1,41	1,41	1,39
C2C1'	1,46	1,46	1,47
C1'C2'	1,41	1,40	1,40
C2'C3'	1,39	1,40	1,38
C3'C4'	1,40	1,41	1,39
C4'C5'	1,39	1,40	1,38
C5'C6'	1,39	1,39	1,38
C6'C1'	1,41	1,40	1,40

La prédiction de la planéité de la molécule est dépendante de la méthode employée. En effet, des calculs semi-empiriques AM1 et PM3^{4, 5} sur la quercétine conduisent à une structure présentant un angle de torsion autour de la liaison C2-C1' d'environ 27°. Nous avons calculé l'énergie de la molécule en fonction de la rotation du groupement catechol par différentes méthodes de calculs (Figure 2). Nos résultats prédisent l'existence de quatre minima lorsque les effets de corrélation électronique ne sont pas pris en compte. Cet écart à la planéité s'estompe lorsqu'on utilise des méthodes de calcul de niveau plus élevé, et n'aura qu'un impact mineur sur l'énergie du système moléculaire puisque la surface de potentiel est très plane aux alentours de 0° et 180°.

L'énergie de la barrière de rotation est relativement faible <6 kcal.mol⁻¹, quelle que soit la méthode utilisée, et les énergies des différents conformères sont très proches. Leopoldini *et al.*³ ont également étudié l'influence du solvant sur la rotation du groupement catechol par l'utilisation d'un continuum diélectrique (modèle PCM⁶ pour Polarizable Continuum Model). L'énergie de la barrière

passé de 5,59 kcal.mol⁻¹ pour le système en phase gazeuse à 2,41 kcal.mol⁻¹ en phase aqueuse. Les faibles énergies mises en jeu montrent qu'à température ambiante, la quercétine peut adopter différentes conformations. Ces résultats mettent en avant que les méthodes semi-empiriques devront être employées avec précaution.

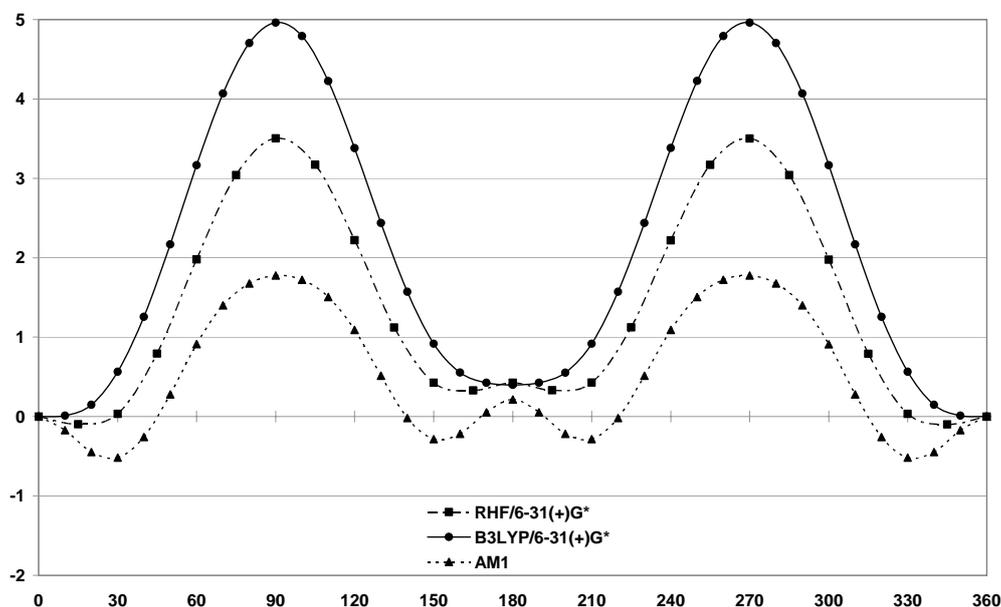
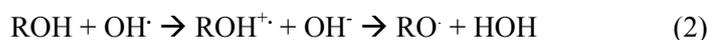


Figure 2 : Barrière énergétique (en kcal.mol⁻¹) de rotation le long de la liaison C₂-C₁' en phase gaz et pour différentes méthodes de calcul.

La rotation des différents groupements hydroxyles, étudiée par Vasilescu *et al.*⁵, n'a qu'une faible influence sur les paramètres structuraux et sur les charges atomiques nettes. Par contre, la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires, entre les groupements hydroxyles portés par C3 et C5 et le groupement carbonyle porté par C4 ainsi qu'entre les groupements hydroxyles portés par C3' et C4', influenceront fortement les valeurs d'enthalpie de dissociation des liaisons O-H (BDE pour *Bond Dissociation Enthalpy*) ou le potentiel d'ionisation (IP pour *Ionisation Potential*).

Connaître les énergies associées à ces deux processus élémentaires (BDE et IP) est essentiel pour estimer le potentiel antioxydant d'un système polyphénolique. En effet, ces composés (ROH) sont capables de stopper l'action des radicaux libres (OH· par exemple) par transfert d'hydrogène impliquant une coupure homolytique de la liaison O-H (1) ou par transfert électronique suivi d'une abstraction de proton (2) selon le schéma suivant :



La réaction est gouvernée par l'enthalpie de dissociation de la liaison OH dans le cas (1) et par le potentiel d'ionisation dans le cas (2). Le radical formé doit être relativement stable pour éviter qu'il ne réagisse avec d'autres substances et ne devienne ainsi prooxydant. Le phénol, qui présente une activité antioxydante et antiradicalaire, est souvent considéré comme un composé de référence. Toute substance aromatique présentant des groupements hydroxyles et dont la BDE ou l'IP est inférieure au phénol peut être considérée comme un antioxydant potentiel vis-à-vis de substances radicalaires comme les ERO⁷⁻¹³.

La structure phénolique a été très étudiée, aussi bien d'un point de vue théorique qu'expérimental^{7,9,10,12-19}. Ces études ont montré que l'effet de polarisation induit par le solvant, la substitution du noyau aromatique par des groupements électrodonneurs et électroattracteurs, ou encore la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires sont des facteurs influençant les valeurs de BDE et d'IP.

En utilisant la méthode DFT hybride B3LYP avec la base 6-31G(d,p), H.Y. Zhang *et al.*⁹ ont montré que la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire diminuait considérablement les valeurs de BDE et d'IP. Par rapport au système de référence, le catechol présente des énergies globalement inférieures d'environ 10 kcal.mol⁻¹ (BDE_{catechol} : 72,8 kcal.mol⁻¹ et IP_{catechol} : 175,5 kcal.mol⁻¹; BDE_{phenol} : 82,8 kcal.mol⁻¹ et IP_{phenol} : 184,9 kcal.mol⁻¹). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Wright *et al.*⁷ même s'ils sont dépendant de la méthode et de la base d'orbitales moléculaires employées.

Au-delà de ces grandeurs obtenues classiquement par les méthodes de chimie théorique, il peut s'avérer nécessaire de rechercher une description plus précise du système pour expliquer les différentes activités biologiques de la quercétine. En effet, ses propriétés de chélation, d'inhibition ou encore de prooxydation ne peuvent être décrites simplement par ces seuls descripteurs structuraux et énergétiques.

I.2. Propriétés électroniques

Les orbitales frontières HOMO et LUMO sont très souvent utilisées comme des indices pouvant expliquer la réactivité d'une molécule, ici la quercétine^{5, 8, 20-22}. Comme le montre la Figure 3, l'orbitale HOMO de la quercétine dans son état fondamental est essentiellement localisée sur la double liaison C2-C3, les liaisons carbone-carbone du cycle B ainsi que sur les atomes d'oxygène des fonctions 3, 3', 4'-hydroxyles. La forme de cette orbitale frontière nous renseigne sur les sites réactifs

de la quercétine et conforte les résultats expérimentaux²²⁻²⁴ qui mettent en avant l'importance de ces motifs structuraux dans son activité antioxydante.

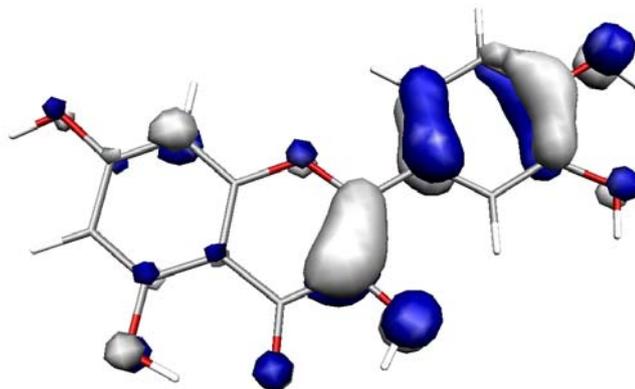


Figure 3 : Orbitale HOMO de la quercétine au niveau B3LYP/6-31(+)*

Parmi les formes radicalaires, seules les espèces semiquinones dérivant de la quercétine initiale par coupure homolytique d'une liaison O-H ont fait l'objet d'études théoriques^{3-5,8,24-26}. Les différentes études se limitent à la description de la densité de spin, à la variation de charges atomiques entraînant une modification du moment dipolaire de la molécule, ainsi qu'à la description de l'orbitale possédant l'électron célibataire (SOMO).

Van Acker *et al.*²⁴ ont étudié les formes radicalaires de différents flavonoïdes, dont la quercétine, au niveau de calcul UHF/STO-3G//UHF/6-31G*, et ont montré que la densité de spin était essentiellement localisée sur l'atome d'oxygène auquel on a retiré l'hydrogène H' (84% de la densité de spin totale sur l'atome O4'). Cela est pour le moins surprenant puisque la structure délocalisée de la quercétine était jusqu'alors tenue pour responsable de la stabilisation du radical. Ils précisent néanmoins que la présence de la double liaison en C2-C3 permet une délocalisation « plus importante » que dans le cas de la taxifoline (structure similaire à la quercétine mais sans l'insaturation en position 2,3) pour laquelle la densité de spin se concentre essentiellement sur le cycle B (Cf. Figure 4).

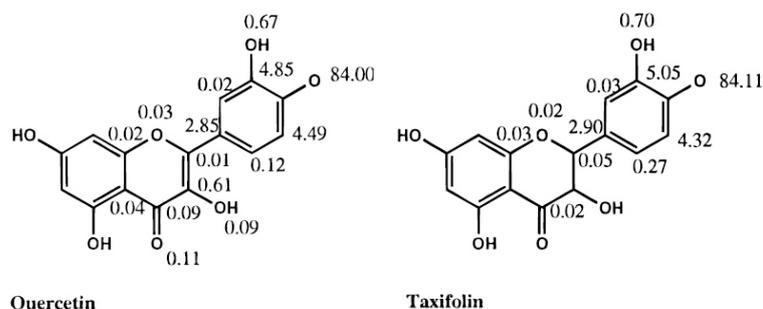


Figure 4 : Distribution de spin (en %) pour les radicaux quercétine et taxifoline selon van Acker *et al.*²⁴

Russo *et al.*⁴ ont également étudié les cinq formes semiquinone de la quercétine à l'aide des méthodes semi-empirique AM1 et PM3. D'après leurs résultats, trois familles peuvent être classées suivant un simple critère énergétique. Les deux formes les plus stables proviennent de l'abstraction de H[•] sur la fonction 3-OH et 4'-OH et sont très proches d'un point de vue énergétique ($\Delta E \approx 0,22$ kcal.mol⁻¹). Les auteurs relient ces résultats à ceux de Jovanovic *et al.*²⁷ précisant qu'il existe deux valeurs de pKa pour la quercétine. D'un point de vue électronique, ils obtiennent une répartition de la densité de spin différente en comparaison avec les travaux de van Acker *et al.* La densité de spin est mieux répartie sur la molécule mais reste localisée sur les atomes proches de la fonction hydroxyle impliquée dans le processus radicalaire. Ils proposent comme explication le fait que les méthodes Hartree-Fock surestiment la densité de spin sur les hétéroatomes en citant comme références les travaux d'Adamo *et al.*²⁸.

Récemment, Trouillas *et al.*²⁶ ont étudié aux niveaux de calcul B3P86/6-311+G(d,p) et B3LYP/6-311+G(d,p) différentes propriétés de la quercétine et de la taxifoline : la BDE et la densité de spin des cinq formes radicalaires. A ce niveau de calcul, le classement par ordre croissant des BDE de la quercétine donne la séquence suivante : 4'-OH < 3'-OH < 3-OH < 7-OH < 5-OH. Les énergies associées sont comprises entre +74,6 et +88,6 kcal.mol⁻¹. Les auteurs ont confirmé l'importance de la double liaison dans la délocalisation de l'électron célibataire en étudiant les densités de spin des différentes formes semiquinone de la quercétine et de la taxifoline et ont notamment conclu sur la spécificité du site 3-OH. Lors de l'abstraction de H[•] sur la fonction 3-OH, la densité de spin se répartit aussi bien sur l'atome oxygène O3 que sur l'atome de carbone C2, pouvant expliquer ainsi la réactivité de la quercétine sur ce site particulier. Leurs résultats ont également montré que l'équilibre céto-énolique de la fonction 3-OH était peu envisageable en phase aqueuse ($\Delta E \approx 20$ kcal.mol⁻¹ en faveur de la forme énol). Ils suggèrent toutefois que dans un environnement enzymatique cet équilibre ne devrait pas être négligé.

II. Méthodologie

Dans la littérature scientifique, de nombreux mécanismes réactionnels sont discutés sur la base de travaux expérimentaux et permettent de mieux cerner quelles sont les différentes formes activées de la quercétine impliquées dans les activités biologiques de ce flavonoïde^{5,23,29-43}. Nous avons effectué une étude des propriétés de ces formes activées incluant l'influence d'un cation métallique tel que l'ion cuivre(II). Le rôle de divers co-réactifs couramment rencontrés dans ces processus biologiques a également été pris en compte, à travers l'utilisation de fonctions chimiques modèles, pour définir la

réactivité de ces différentes formes. A terme, ces résultats permettront de confirmer les mécanismes proposés et servir de base de réflexion pour l'élaboration de nouveaux chemins réactionnels.

II.1. Formes étudiées

La Figure 5 présente les différentes formes activées qui ont été étudiées ici ainsi que les processus élémentaires conduisant à leur formation. La forme « native » de la quercétine (Q) ainsi que la forme radicalaire (Qr) provenant de la quercétine par perte d'un électron (IP) ont également été étudiées.

Les formes semiquinones (SQ) et quinones (OQ) provenant respectivement de l'abstraction d'un ou de deux H[•] se rencontrent dans les processus de capture des ERO mais également dans les processus prooxydants^{23,29-31,44-49}. La quercétine, par exemple, réduit le radical peroxy impliqué dans la peroxidation lipidique et, à travers cette réaction, produit une forme semiquinone. Celle-ci, par réaction de disproportionation, génère une espèce quinone. Ces formes sont également impliquées dans les processus d'oxydation de l'ADN et dans la formation d'adduits avec les acides aminés. L'oxydation du groupement catechol via un cycle rédox impliquant Cu²⁺, O₂ et NADH génère un complexe Cu(I)OOH responsable de certaines altérations des bases de l'ADN.

Les formes déprotonées (D) et doublement déprotonées (DD), provenant de l'abstraction de protons par une espèce chargée négativement comme OH⁻ ou par la chaîne latérale d'un acide aminé, peuvent également être considérées comme des intermédiaires dans l'ensemble de ces processus. Les formes semiquinones déprotonées (SQD) sont également des intermédiaires qui ont déjà été évoquées dans différents travaux, notamment ceux de Metodiewa *et al.*²⁹

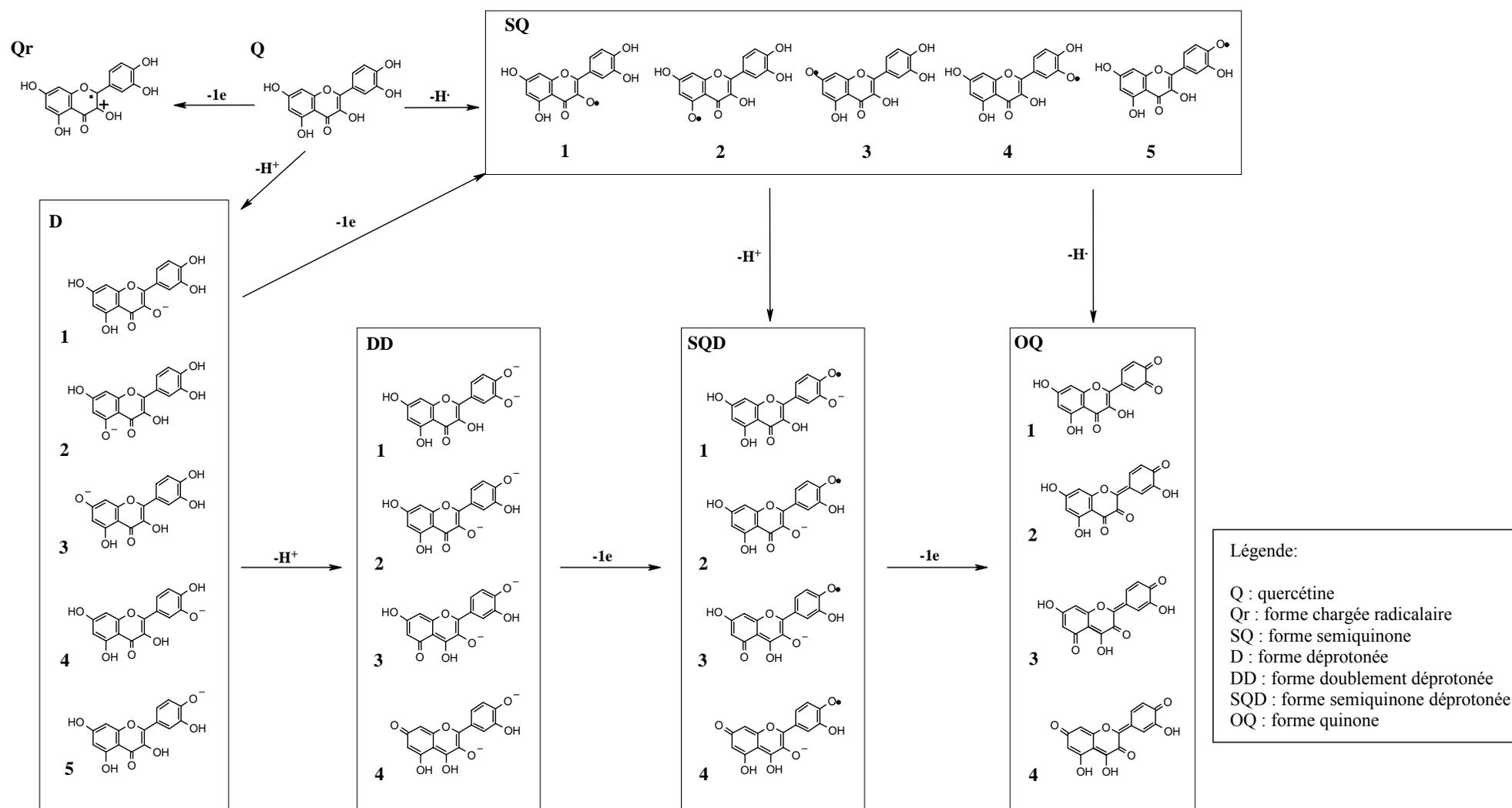


Figure 5 : Formes activées de la quercétine.

II.2. Influence du cuivre

Le fer, le zinc et le cuivre sont les métaux de transition les plus couramment rencontrés dans les processus biologiques. Les activités antioxydantes et prooxydantes de la quercétine font le plus souvent intervenir un co-facteur métallique de type cuivre. Nous avons donc examiné l'influence du cation métallique Cu(II) sur les propriétés physicochimiques et sur la réactivité des différentes formes activées de la quercétine.

Nous avons regroupé ces nouvelles espèces en fonction du site de complexation : les sites 3-hydroxychromone (1), 5-hydroxychromone (2) ou le motif catechol (3). La Figure 6 présente les neuf complexes considérés. Chaque système dérive d'une forme activée non-complexée que nous avons également étudiée, excepté $[DD_3Cu]^{2+}$ qui provient de la double déprotonation des fonctions hydroxyles du cycle B, et $[OQ_2Cu]^{2+}$ qui provient de la forme quinone OQ_3 dans laquelle le proton sur l'atome d'oxygène O_4 a été transféré sur O_3 .

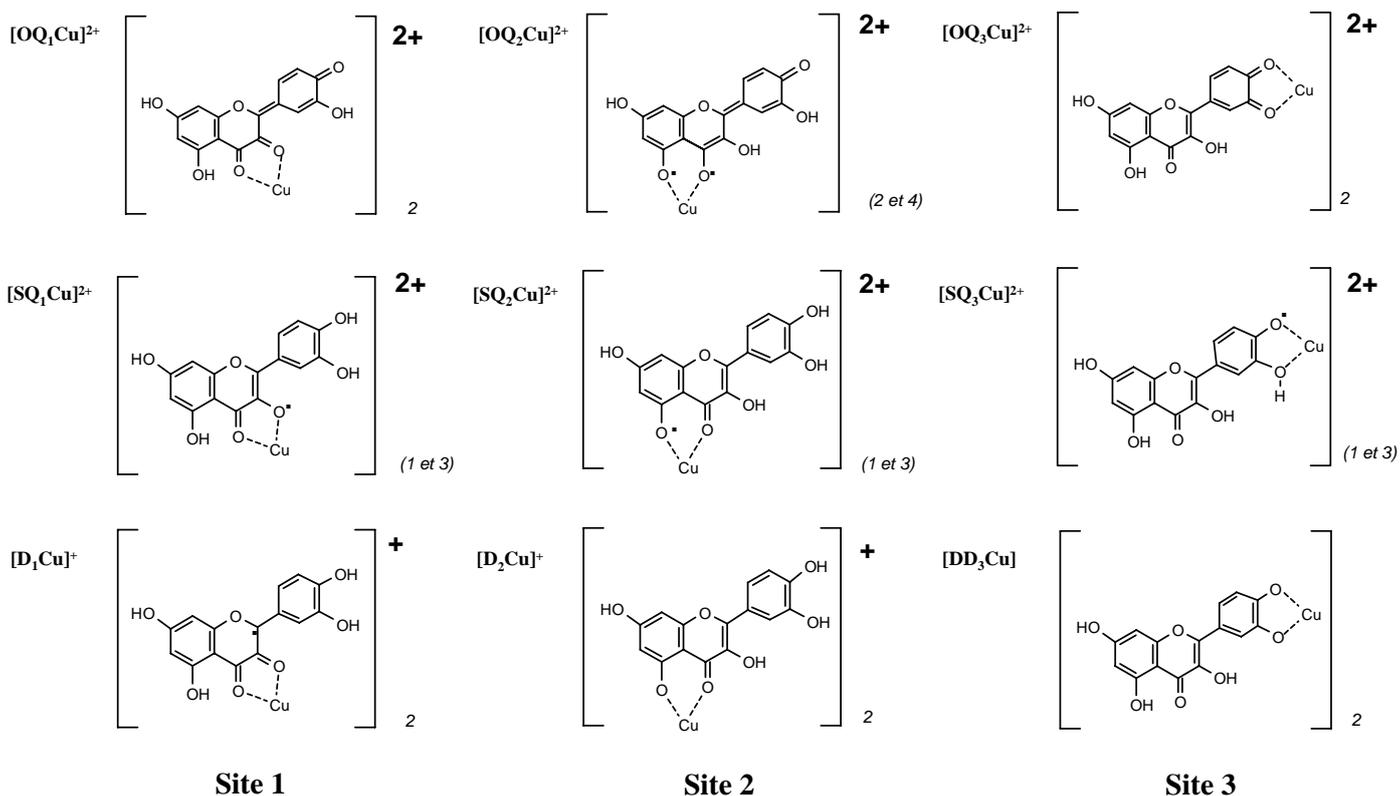


Figure 6 : Formes activées de la quercétine coordonnées au cation métallique Cu^{2+} .

Le chiffre en italique correspond à la multiplicité de spin du système.

II.3. Autres espèces étudiées et cycles thermodynamiques

La variation d'enthalpie libre associée à un processus est un indice pour déterminer quel est le chemin le plus favorable pour obtenir telle ou telle forme activée. Il est alors nécessaire de tenir compte des espèces couramment rencontrées dans les processus oxydatifs impliquant les flavonoïdes. Nous les avons choisies en fonction des trois processus élémentaires suivant : transferts d'électron, de proton et d'hydrogène. Le Tableau 2 regroupe les espèces considérées.

Tableau 2 : Espèces co-réactives pouvant intervenir dans la formation des formes activées de la quercétine.

+ e ⁻	+ H ⁺	+ H [·]
H ⁺ → H [·]	OH ⁻ → H ₂ O	OH [·] → H ₂ O
OH [·] → OH ⁻	O ₂ ^{·-} → HOO [·]	HOO [·] → H ₂ O ₂
O ₂ → O ₂ ^{·-}	HOO ⁻ → H ₂ O ₂	HCOO [·] → HCOOH
HOO [·] → HOO ⁻	HCOO ⁻ → HCOOH	O ₂ → HOO [·]
HCOO [·] → HCOO ⁻		O ₂ ^{·-} → HOO [·]
Cu ²⁺ → Cu ⁺		

Le phénol est le composé de référence lorsque l'on cherche à comparer les valeurs d'IP et de BDE d'un système polyphénolique. C'est pourquoi la forme radicalaire (noté Pher) et semiquinone (noté Phesq) du phénol (noté Phe) seront également étudiées.

Ces co-réactifs seront exploités pour établir les cycles thermodynamiques présentés dans les Figures 7 et 8. Concernant la Figure 7, l'indice x sera remplacé, dans la discussion, par le numéro de la forme activée considérée, tel que présenté dans la Figure 5. A⁻ et AH, A[·] et AH et enfin Ox et Red correspondront aux co-réactifs étudiés respectivement lors d'un transfert de proton, d'hydrogène et d'électron comme indiqué dans le Tableau 2. La Figure 8 ne présente que les deux chemins de complexation envisageables pour une espèce déprotonée (cycle c) : complexation puis déprotonation ou le processus inverse.

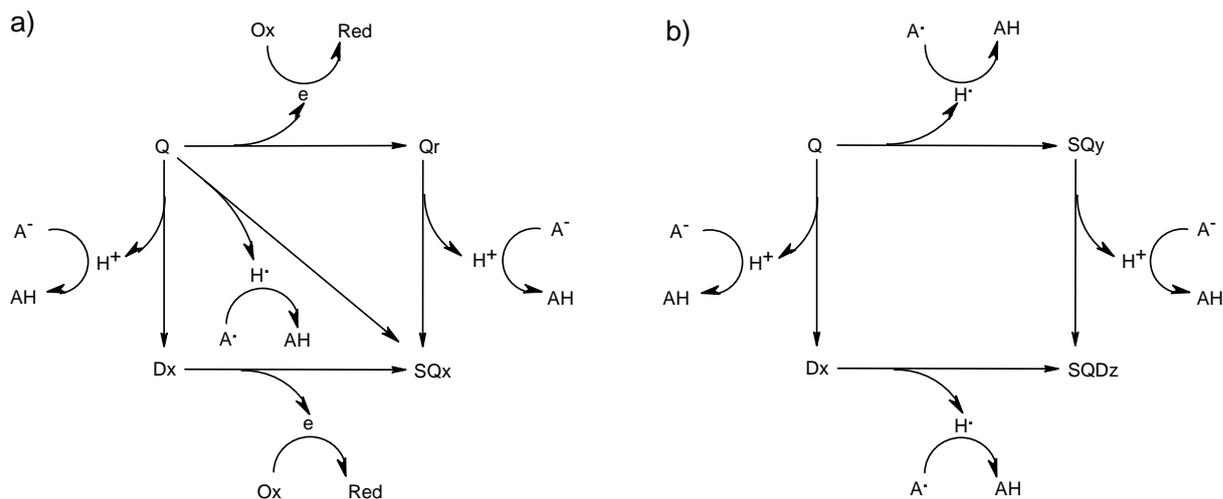


Figure 7 : Cycles thermodynamiques impliquant les formes activées de la quercétine.

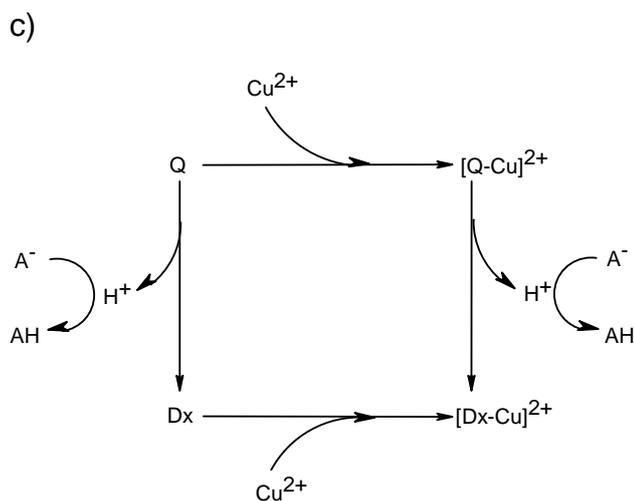


Figure 8 : Cycle thermodynamique impliquant les formes activées de la quercétine et l'ion Cu^{2+} .

II.4. Méthodes de calculs employées

Dans le cadre d'une vision générale impliquant la description d'une structure statique mais aussi l'élaboration d'un mécanisme réactionnel, il nous a semblé important de choisir une méthode alliant une reproduction précise des grandeurs structurales expérimentales de la quercétine et une description correcte de la réactivité des ERO. Une pré-étude a permis d'établir que la méthode B3LYP^{50,51} associée à une base d'orbitales atomiques de type double dzeta remplissait ces conditions. Cette méthode introduit les effets de la corrélation électronique pour un moindre coût en temps de calculs.

La base d'orbitales atomiques retenue est 6-31G*⁵² à laquelle nous avons ajouté des fonctions diffuses sur les atomes d'oxygène. Les fonctions diffuses(+)⁵³ et de polarisation(*)⁵⁴ sont très utilisées dans le cas de systèmes ioniques ou radicalaires puisqu'elles donnent plus de souplesse et de directionnalité aux orbitales moléculaires. Nous verrons également dans le chapitre suivant que l'emploi de cette méthode et de cette base est la meilleure approche possible pour étudier une réaction faisant intervenir une coupure de liaison oxygène-oxygène. L'ajout de fonctions diffuses sur les atomes d'hydrogène et de carbone ne donnait pas des résultats significativement meilleurs mais entraînait une augmentation drastique des temps de calculs (facteur 4-5).

La base ECP LanL2DZ⁵⁵⁻⁵⁷, développée à Los Alamos, a été choisie pour décrire le rôle du cuivre(II). Le pseudopotentiel utilisé pour représenter les électrons de cœur permet de prendre en compte une partie des effets non-relativistes (dans le cas des métaux de transition ne possédant pas d'électron *d* dans les couches internes comme le cuivre) et relativistes (pour les métaux de transition possédant des électrons *d* dans les couches internes) au sein du métal. En résumé, nous avons utilisé la méthode B3LYP et une base mixte alliant la description 6-31G* pour les atomes C et H, 6-31+G* pour les atomes O, et LanL2DZ pour l'atome Cu. Cette base sera notée 6-31(+)*G*.

Chaque système moléculaire a fait l'objet d'une optimisation de géométrie à l'aide du programme Gaussian98⁵⁸. Afin de vérifier que les systèmes moléculaires étudiés correspondaient bien à des minima de la surface d'énergie potentielle, nous avons effectué des calculs de fréquences au même niveau de calculs que les optimisations de géométrie. Ces calculs nous ont également permis d'accéder aux corrections thermodynamiques nécessaires pour exprimer les différences d'enthalpie libre associées pour l'obtention des cycles thermodynamiques à 298K et 1 atm. Au cours de ce chapitre, les énergies associées aux autres processus réactionnels seront exprimées en variation d'enthalpie libre. Pour conserver une cohérence dans la présentation des résultats, les valeurs de BDE et d'IP seront également exprimées en variation d'enthalpie libre, bien que dans la définition exacte elles soient calculées en variation d'enthalpie. Les valeurs peuvent être recalculées à l'aide des enthalpies libres absolues (exprimées en u.a.) figurant dans les tableaux venant en complément de ce chapitre. Les charges atomiques ont été calculées à l'aide de la procédure NPA implémentée dans le module NBO^{59,60} de Gaussian98. Pour les composés radicalaires, l'analyse de spin a été effectuée à l'aide de la densité de spin atomique de Mulliken. La valeur du spin total $\langle S^2 \rangle$ a été vérifiée pour chaque structure et aucune contamination de spin n'a été reportée.

III. Analyse des formes activées

Par la suite nous ne discuterons que de l'évolution des différents paramètres électroniques, structuraux, et énergétiques. L'ensemble de ces résultats est présenté dans les tableaux donnés en complément de ce chapitre.

III.1. Quercétine (Q) et quercétine radicalaire (Qr)

Les longueurs de liaison de la structure optimisée de la quercétine ne diffèrent au maximum que de 0,02 Å par rapport à celles relevées dans la quercétine cristallisée. L'ionisation de la quercétine n'a que peu d'influence sur l'évolution des longueurs de liaison. En effet, les différences entre les distances des espèces Q et Qr sont inférieures en valeurs absolues à 0,04 Å. On peut toutefois noter que l'ensemble des distances C-O sont légèrement plus courtes pour la forme Qr. L'angle dièdre O1C2C1'C2' de l'espèce Q, aussi bien que celle de l'espèce Qr, est de 180° confortant le caractère aromatique de l'ensemble des deux structures.

Le calcul des sommes des charges nettes des atomes appartenant aux cycles AC d'un côté et B de l'autre et un bon indice de la délocalisation électronique entre ces deux motifs structuraux conjugués. Un éventuel transfert électronique pourra nous donner des indications quant à l'évolution de réactivité du substrat sous l'influence de telle ou telle réaction. Dans le cas de la quercétine aucun transfert électronique n'est relevé. En effet, la somme des charges sur le cycle B est de 0,06e alors que sur les cycles A et C est de -0,06e. Pour la forme radicalaire, la charge positive se répartit autant sur le cycle B (0,49e) que sur les cycles AC (0,51e).

L'enthalpie libre de la réaction $Q \rightarrow Qr + e$ correspond au potentiel d'ionisation (IP) de la quercétine. Cette valeur, +163,1 kcal.mol⁻¹ est légèrement inférieure à celle du phénol, +186,4 kcal.mol⁻¹ pour la réaction $Phe \rightarrow Pher + e$. Ce résultat met en avant que la stabilisation du radical est plus importante pour une structure du type flavonoïde que pour un phénol.

III.2. Formes déprotonées (D)

La déprotonation n'affecte pas particulièrement les paramètres structuraux de la quercétine. Seules les longueurs de liaisons C-O et des C-C vicinales des fonctions impliquées dans l'abstraction du proton varient de façon significative. Cette tendance est similaire pour l'ensemble des cinq formes déprotonées : $\Delta_{C-O} \approx -0,1$ Å et $\Delta_{C-C} \approx 0,05$ Å. Les formes déprotonées restent planes, l'angle de torsion le long de la liaison C2C1' est de 181° pour D1, D2 et D3 et de 180° pour D4 et D5.

Les enthalpies libres des réactions $Q \rightarrow D_x + H^+$ correspondent à l'affinité protonique (PA ou Proton Affinity en anglais)¹ des différentes fonctions hydroxyles de la quercétine et sont rassemblées dans le Tableau 3. Les valeurs plus élevées obtenues pour D1 et D2 sont la conséquence de la perte d'une liaison hydrogène intramoléculaire. Dans le cas de D5, cette perte est compensée par la rotation du groupement hydroxyle 3'-OH recréant ainsi l'interaction entre les fonctions 3'-OH et 4'-OH.

Tableau 3 : Enthalpie libre de formation des espèces déprotonées.

	ΔG_{298K} (kcal.mol ⁻¹)
D1	+331,6
D2	+337,6
D3	+322,9
D4	+327,0
D5	+318,2

L'aspect électronique est plus intéressant. L'excès de charge négative dû à l'abstraction du proton ne reste pas localisé sur l'atome d'oxygène ($-0,07e < \Delta q_o < +0,01e$) impliqué dans cette abstraction mais se répartit sur l'ensemble de la structure. Deux tendances ressortent de l'analyse de la répartition de cette charge négative (cf. Tableau 4). Lorsque la déprotonation a lieu sur les atomes O3, O5 et O7, la charge se répartit quasiment exclusivement sur les cycles A et C, alors que lorsqu'il s'agit des atomes O3' et O4', la charge excédentaire se délocalise sur les trois cycles.

Tableau 4 : Répartition de la charge sur les cycles A, C et B.

	D1	D2	D3	D4	D5
Σq_{AC}	-0,86	-0,94	-0,96	-0,26	-0,36
Σq_B	-0,14	-0,06	-0,04	-0,74	-0,64

III.3. Formes doublement déprotonées (DD)

Deux formes doublement déprotonées (DD1 et DD2) provenant de l'abstraction d'un proton supplémentaire à partir de la structure déprotonée la plus stable (D5), ainsi que deux conformères (DD3 et DD4) ont été considérés. De ces formes découlent les formes semiquinones déprotonées et quinones qui sont considérées comme des intermédiaires stables lors des réactions biochimiques citées dans le Chapitre 1.

¹ Plus exactement, l'affinité protonique correspond à la valeur négative de l'enthalpie libre associée à la réaction $D_x + H^+ \rightarrow Q$.

D'un point de vue structural, et en prenant la forme D5 comme référence, la seconde déprotonation engendre, pour DD1, DD2 et DD3, une diminution d'environ 0,1 Å de la longueur de la liaison C-O impliquée dans ce processus. Concernant DD3, l'existence d'une fonction carbonyle en C5 occasionne une diminution de la longueur de liaison C5O5 d'environ 0,05 Å et une augmentation de celle de la liaison C4O4 de 0,05 Å dûe à l'ajout d'un atome d'hydrogène sur l'atome O4. Il en est de même pour DD4 avec la fonction carbonyle en position 7 et hydroxyle en position 4. L'ensemble des structures DD sont planes.

Au schéma de réaction $D5 \rightarrow DDx + H^+$ est associé la deuxième affinité protonique de la quercétine. Les valeurs d'enthalpie libre associées à ce processus sont résumées dans le Tableau 5. Puisqu'une forme chargée négativement est moins susceptible de céder un proton qu'une espèce neutre, ces valeurs sont supérieures à celle de la première déprotonation. L'existence de deux liaisons hydrogènes intramoléculaires pour les espèces DD1, DD2 et DD3 et de 3 pour l'espèce DD4 explique en partie la stabilité de l'espèce DD4 en comparaison des autres formes DD.

Tableau 5 : Enthalpie libre de formation des formes DD à partir de la forme D5.

	ΔG_{298K} (kcal.mol ⁻¹)
DD1	+421,7
DD2	+403,3
DD3	+400,9
DD4	+392,1

L'analyse électronique de ces structures est un indice supplémentaire permettant d'expliquer la valeur de l'enthalpie de déprotonation significativement supérieure de l'espèce DD1. Une deuxième déprotonation sur le motif catechol présentant déjà un excès de charge négative est énergétiquement défavorable et n'est pas compensée par la délocalisation électronique vers les cycles A et C (cf. Tableau 6). En prenant la structure D5 comme référence, on note que la charge sur l'atome O₄' augmente de 0,05e pour la forme DD1 contrairement aux autres formes. Cette disparité entre DD1 et les autres formes se remarque également sur les atomes C₃ et C₄'.

Tableau 6 : Répartition de la charge sur les cycles A, C et B.

	DD1	DD2	DD3	DD4
Σq_{AC}	-0,78	-1,11	-1,16	-1,19
Σq_B	-1,22	-0,89	-0,84	-0,81

III.4. Formes semiquinones (SQ)

Les formes semiquinones peuvent être générées directement à partir de la quercétine par coupure homolytique d'une liaison O-H suivant le schéma de réaction : $Q \rightarrow SQ + H\cdot$, correspondant aux différentes valeurs de BDE de la quercétine présentées dans le Tableau 7. En accord avec les données expérimentales qui suggèrent que le cycle B est très réactif en présence d'espèces radicalaires, nos résultats montrent que l'abstraction d'un atome d'hydrogène est plus aisée pour les fonctions 4'-OH et 3'-OH du motif catechol que pour les autres fonctions.

Tableau 7 : Valeurs de BDE permettant d'obtenir les formes semiquinones.

	ΔG_{298K} (kcal.mol ⁻¹)
SQ1	+68,8
SQ2	+83,0
SQ3	+74,5
SQ4	+64,3
SQ5	+62,1

Les formes semiquinones peuvent également être obtenues à partir d'une forme déprotonée par perte d'un électron, selon le schéma suivant : $D \rightarrow SQ + e^-$, dont l'énergie associée correspond aux potentiels d'ionisation des formes déprotonées. Le tableau 8 rassemble les valeurs d'IP pour les cinq formes SQ provenant des formes D (D1 \rightarrow SQ1, D2 \rightarrow SQ2, etc.). Ces valeurs sont significativement inférieures à celle du potentiel d'ionisation de la quercétine (+163,1 kcal.mol⁻¹). L'oxydation de la forme D1 en SQ1 est énergétiquement la plus favorable. La voie d'accès à ces formes semiquinones dépendra de la présence ou non d'espèces chargées négativement capables d'activer la quercétine par transfert de proton.

Tableau 8 : Valeurs d'IP des formes D amenant à la formation des formes SQ.

	ΔG_{298K} (kcal.mol ⁻¹)
SQ1	+57,8
SQ2	+66,0
SQ3	+72,2
SQ4	+57,9
SQ5	+64,5

A partir de la forme neutre de la quercétine (Q), la perte d'un proton ou d'un hydrogène produit sensiblement les mêmes modifications structurales. En effet, les longueurs des liaisons C-O et C-C vicinales impliquées dans le processus réactionnel varient respectivement de -0,1 Å et 0,06 Å, et toutes les structures conservent leur caractère plan.

L'analyse électronique apporte d'avantage de renseignements sur la réactivité des formes SQ. Le Tableau 9 présente les densités de spin atomique significatives. Pour l'ensemble des cinq formes SQ, l'électron célibataire est localisé à plus de 93% sur une petite partie de la structure (moins de cinq atomes). Cette densité de spin se concentre essentiellement sur des atomes voisins de l'atome d'oxygène impliqué dans le processus d'abstraction d'hydrogène. Cette tendance est particulièrement marquée dans le cas des formes SQ2, SQ3 et SQ4. Ces analyses, en légère contradiction avec les résultats obtenus par van Acker *et al.*², sont en accord avec l'explication apportée par Adamo *et al.*²⁸ qui explique que le calcul de la densité de spin est méthode dépendant. En revanche, ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Russo *et al.*⁴ et plus récemment Trouillas *et al.*²⁶

Tableau 9 : Densité de spin atomique de Mulliken des formes SQ.

En gras sont indiqués les atomes sur lesquels la densité de spin est essentiellement répartie.

	SQ1	SQ2	SQ3	SQ4	SQ5
C2	0,37	0,03	0,06	0,01	-0,12
C3	0,01	0,05	0,04	0,00	0,17
C6	0,01	0,36	0,18	0,00	-0,01
C8	0,04	0,45	0,41	0,00	-0,01
C10	-0,01	0,17	0,28	0,00	0,00
C1'	-0,08	-0,01	-0,01	-0,06	0,29
C2'	0,09	0,01	0,02	0,19	-0,14
C3'	-0,05	-0,01	-0,01	0,00	0,25
C4'	0,13	0,02	0,03	0,28	0,01
C5'	-0,06	0,00	-0,01	-0,14	0,15
C6'	0,13	0,01	0,03	0,32	-0,07
O3	0,31	0,02	0,02	0,00	0,04
O5	0,01	0,33	-0,02	0,00	0,00
O7	0,00	-0,01	0,39	0,00	0,00
O3'	0,00	0,00	0,00	0,35	0,07
O4'	0,03	0,00	0,01	0,08	0,29

Lors de la formation de SQ1 et SQ5, la densité de spin atomique se délocalise entre les cycles A, C et B. L'abstraction de H' depuis le site 3-OH est un cas particulier puisque le passage de la forme Q à SQ1 active la position en C2. Ce point sera important lors de la discussion abordée dans le chapitre 3 traitant de la dégradation de la quercétine par le dioxygène au sein de l'enzyme Quercétine 2,3-Dioxygénase.

III.5. Formes semiquinones déprotonées (SQD)

Les formes semiquinones déprotonées peuvent être générées selon trois processus différents : déprotonation d'une forme SQ, abstraction d'un H' à partir d'une forme D, ou oxydation par perte d'un électron à partir d'une forme DD. Pour les deux premiers processus, nous avons choisi comme structure de référence les

structures D5 et SQ5 qui sont les espèces les plus stables de leur catégorie. Pour le dernier processus, chaque forme DD correspond à une forme SQD (DD1 \rightarrow SQD1, DD2 \rightarrow SQD2, etc.). Les énergies associées à ces différents processus sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Enthalpie libre (ΔG_{298K}) de formation des espèces SQD à partir de différentes formes activées.

	SQ5 \rightarrow SQD + H⁺	D5 \rightarrow SQD + H⁺	DD \rightarrow SQD + e
SQD1	+321,9	+65,8	+35,2
SQD2	+313,9	+57,8	+24,9
SQD3	+317,0	+60,9	+19,3
SQD4	+316,4	+60,3	+11,1

La déprotonation d'une forme semiquinone demande autant d'énergie que la déprotonation de la quercétine. Il en est de même si l'on compare la dissociation homolytique d'une liaison OH à partir d'une forme D ou de la quercétine (Q). En revanche, l'oxydation d'une forme DD demande beaucoup moins d'énergie que l'oxydation de la quercétine (Q \rightarrow Qr) ou d'une forme D (D \rightarrow SQ). Cela est cohérent avec le fait qu'une espèce doublement chargée négativement cède plus facilement un électron qu'une espèce simplement chargée ou une espèce neutre. D'un point de vue structural, les formes SQD sont très proches des formes DD. Cela montre que la perte d'un électron n'affecte que faiblement la structure des formes DD.

La différence d'enthalpie libre des formes SQD montre que les espèces SQD2, SQD3 et SQD4 sont les formes les plus stables de cette catégorie. L'espèce SQD1 est plus haute en énergie que les trois autres d'environ 8 kcal.mol⁻¹. Dans ce cas, la stabilité relative ne dépend pas du nombre de liaisons hydrogène intramoléculaires, puisque la forme la plus stable (SQD2) possède autant de liaisons H que SQD1 et SQD3 et une de moins que l'espèce SQD4.

L'analyse électronique des radicaux SQD est un bon indice de la réactivité de ces structures. Concernant les formes SQD2, SQD3, et SQD4, l'électron célibataire est en partie localisé sur les atomes O3 et O4' et sur leurs carbones vicinaux mais également mieux réparti sur l'ensemble de la structure que dans le cas des formes semiquinones ; au contraire de la forme SQD1 où la densité de spin est essentiellement localisée sur les atomes O3' et O4' et C2' (Cf. Tableau 11).

Tableau 11 : Densité de spin atomique de Mulliken des espèces SQD

	SQD1	SQD2	SQD3	SQD4
C3	0,03	0,08	0,08	0,15
C4	0,04	0,06	0,09	-0,02
C8	0,00	-0,01	0,02	0,09
C10	-0,01	-0,03	-0,02	0,09
C1'	0,01	0,12	0,13	0,15
C2'	0,27	-0,07	-0,07	-0,08
C3'	0,02	0,09	0,09	0,10
C4'	0,03	0,06	0,05	0,05
C5'	0,03	0,06	0,06	0,07
C6'	0,05	0,04	0,02	0,01
O3	0,01	0,24	0,25	0,18
O4	0,03	0,08	0,04	0,00
O5	0,00	0,01	0,04	0,00
O7	0,00	0,00	0,01	0,10
O3'	0,31	0,02	0,02	0,02
O4'	0,13	0,17	0,16	0,17

Lorsque l'on analyse la répartition de la charge sur les cycles A,C et B (Tableau 12), on s'aperçoit qu'elle est bien répartie sur l'ensemble de la structure, confirmant le transfert électronique entre les noyaux aromatiques. La forme la plus stable (SQD2) présente la meilleure délocalisation, alors que la forme la moins stable conserve une grande partie de la charge négative sur le cycle B.

Tableau 12 : Répartition de l'excès de charge sur les cycles AC et B pour les formes SQD.

	SQD1	SQD2	SQD3	SQD4
Σq_{AC}	-0,30	-0,58	-0,61	-0,64
Σq_B	-0,70	-0,42	-0,39	-0,36

III.6. Formes quinones (OQ)

Les formes quinones sont souvent considérées comme des intermédiaires stables produits au cours de la transformation ou de la métabolisation des flavonoïdes. Dans l'étude présente, elles sont considérées comme le produit final d'une suite de processus de déprotonation et d'oxydation. Les deux chemins les plus probables qui amènent à la production de formes quinones sont l'oxydation d'une forme semiquinone déprotonée (SQD \rightarrow OQ + e) et la perte d'un hydrogène à partir d'une forme semiquinone (SQ \rightarrow OQ + H⁺). Nous allons prendre comme référence les espèces les plus stables des formes semiquinones (SQ5) et semiquinones déprotonées (SQD2). Ce qui nous permettra d'accéder aux enthalpies libre de formations des espèces quinones.

Le Tableau 13 rassemble les énergies associées à ces deux processus et la différence d'enthalpie libre (noté ΔG_{ref} dans le Tableau 13) en prenant comme référence la forme la plus stable des formes OQ. On peut noter que les processus d'oxydation ou de perte d'un hydrogène sont relativement proches d'un point de vue énergétique. Ceci est important lorsque l'on sait que les formes quinones sont notamment impliquées dans les mécanismes de prooxydation. En effet, la réduction de ces espèces très réactives engendreraient alors aussi bien des formes semiquinones que semiquinones déprotonées. L'environnement de la quercétine jouera alors un rôle primordial dans l'espèce produite lors de cette réaction.

Tableau 13 : Enthalpie libre ($\Delta G_{298\text{K}}$) de formation des espèces OQ à partir de différentes formes activées et stabilité relative par rapport à la forme la plus stable des OQ.

	$\text{SQ5} \rightarrow \text{OQ} + \text{H}^{\cdot}$	$\text{SQD2} \rightarrow \text{OQ} + \text{e}$	ΔG_{ref}
OQ1	+63,6	+70,3	+2,3
OQ2	+61,3	+68,0	0
OQ3	+68,1	+74,9	+6,8
OQ4	+73,0	+79,7	+11,7

On peut classer les formes OQ selon deux catégories : celles dont l'aromaticité du cycle A est conservée et les autres. On retrouve alors OQ1 et OQ2 dans la première catégorie, et OQ3 et OQ4 dans la seconde. Cette modification est sans doute à l'origine de la différence de stabilité des formes quinones. L'analyse structurale confirme le caractère simple, double, et aromatique des liaisons tel que présentées dans la Figure 5. L'angle de torsion $\text{O}_1\text{C}_2\text{C}_1'\text{C}_2'$ reste de 180° pour les quatre structures.

IV. Influence d'un métal de transition

La structure de la quercétine donne la possibilité à un cation métallique de se complexer sur trois sites : la fonction 3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone, et le motif catechol, respectivement notés site 1, 2 et 3 dans la Figure 6. Pour la suite de la discussion, nous avons choisi l'ion Cu^{2+} puisque dans la majorité des processus proposés dans la littérature scientifique, les formes quinones, semiquinones et déprotonées sont liés au cation cuivre(II). De plus, le cuivre joue un rôle central dans la métabolisation de la quercétine au sein de la quercétinase (cf. Chapitre 3).

IV.1. Données structurales

La complexation modifie peu la structure de la quercétine et de ses formes activées. Si nous comparons les formes complexées à leurs équivalents non-complexés, la variation des longueurs de liaison n'est que d'environ $\pm 0,1$ Å. Les distances cuivre-oxygène sont comprises entre 1,95 et 2,17 Å lorsque l'atome d'oxygène ne porte pas d'atome d'hydrogène, et atteint 2,38 Å lorsqu'il s'agit d'une fonction O-H comme dans le complexe SQ3Cu.

IV.2. Données électroniques

L'analyse électronique des systèmes avec cuivre est nettement plus intéressante. La charge atomique sur le cuivre est comprise entre 0,91 et 0,98e, excepté lorsque le cuivre est complexé à une quercétine doublement déprotonée (DD3Cu) où $q_{\text{Cu}} = 0,86e$. Cela suggère que la quercétine est oxydée par le cuivre quelle que soit la forme considérée. Le transfert électronique est légèrement plus important sur les sites 1 et 3 que sur le site 2. On note une légère diminution de la charge des atomes d'oxygène engagés dans la complexation. Ce transfert d'électron est légèrement plus important dans le cas des formes déprotonées ($\approx 1,2e$) que dans celui des formes semiquinones ($\approx 1,1e$). La même tendance est observée entre les formes semiquinones et les formes quinones.

Une valeur constante proche de zéro pour la densité de spin atomique du cuivre confirme le transfert électronique depuis la quercétine vers le centre métallique sur l'ensemble des neuf formes complexées. La densité de spin sur les autres atomes est très variable en fonction du site de complexation, mais une tendance générale ressort. La Figure 9 présente les sites où la densité de spin est non négligeable. La densité de spin est mieux répartie sur l'ensemble des atomes des formes complexées que non-complexées, bien que l'électron célibataire se répartisse en grande partie sur l'atome de carbone C_8 (20-50% de la densité de spin). Cette tendance est inversée pour les formes D1Cu et DD3Cu où seuls le cycle B et le motif C2C3O3 sont majoritairement concernés par cette délocalisation. Dans le cas des formes semiquinones complexées la position 6 présente également une densité de spin non-négligeable. C'est également le cas lorsque le cuivre est lié à la quercétine sur le site 2.

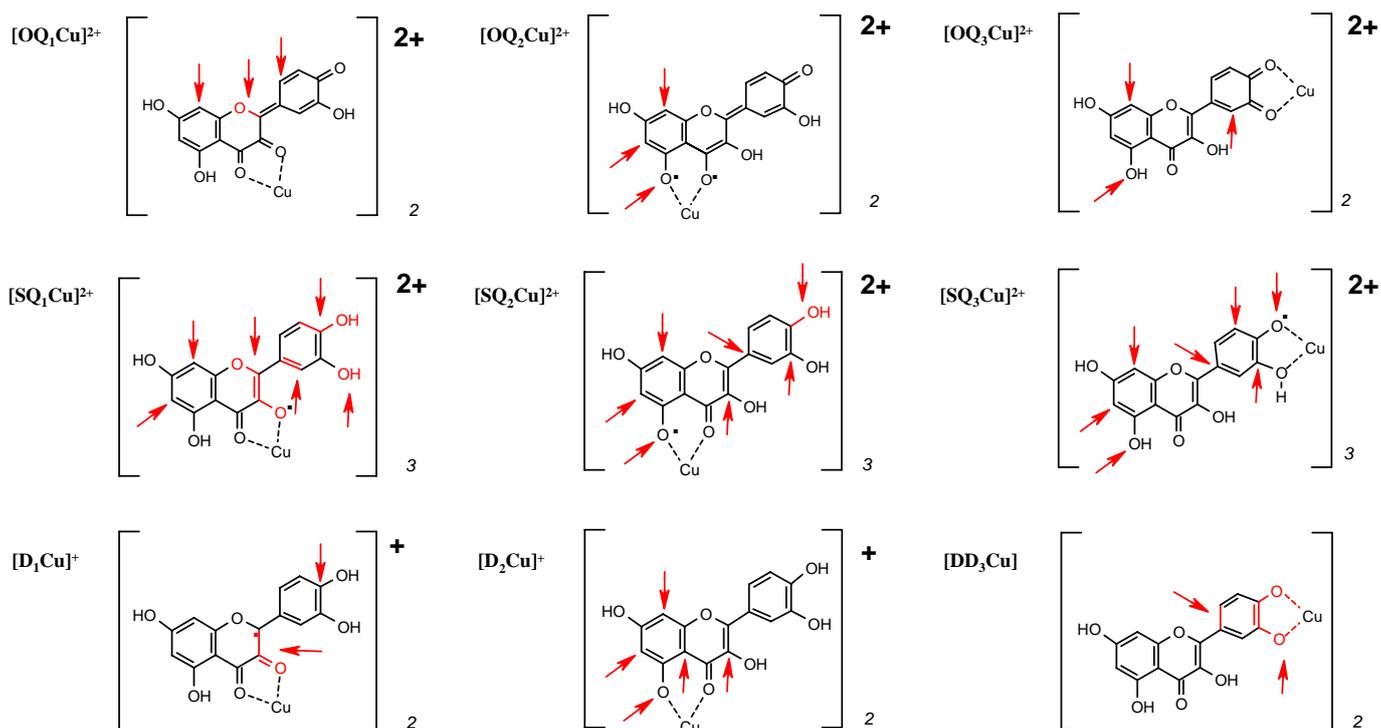


Figure 9: Positions activées lors de la complexation avec le cuivre. Les flèches rouges pointent sur les atomes présentant une densité de spin importante. Pour ne pas trop alourdir la figure, les atomes voisins présentant une densité de spin importante sont directement colorés en rouge

IV.3. Données énergétiques

Le processus de complexation des formes activées avec l'ion cuivre(II) est énergétiquement favorable dans chaque cas, comme l'indiquent les énergies présentées dans le Tableau 15. Pour aider à la compréhension, les formes à l'origine de la complexation sont rappelées. Les structures non complexées à l'origine des espèces OQ_2Cu et DD_3Cu ont également été optimisées. Cela nous a permis d'obtenir les enthalpies libres de complexation pour ces deux formes.

Dans le cas des formes semiquinones, les sites 1 et 2 présentent une meilleure complexation d'un point de vue énergétique que le site 3, alors que dans le cas des formes quinones, les sites peuvent être classés selon l'ordre suivant : $2 > 3 > 1$.

Tableau 15 : Enthalpie libre de complexation des formes activées avec l'ion Cu^{2+}

Espèces complexée	Formes activée originale	$\Delta G_{298\text{K}}$ de complexation
OQ1Cu	OQ2	-302,7
OQ2Cu	OQ3 *	-336,1
OQ3Cu	OQ1	-308,2
SQ1Cu _{ml}	SQ1	-322,8
SQ1Cu _{m3}	SQ1	-312,5
SQ2Cu _{ml}	SQ2	-323,3
SQ2Cu _{m3}	SQ2	-328,8
SQ3Cu _{ml}	SQ5	-302,7
SQ3Cu _{m3}	SQ5	-301,5
D1Cu	D1	-500,2
D2Cu	D2	-499,8
DD3Cu	**	-676,7

* l'espèce OQ2Cu provient de la forme OQ3 où l'hydrogène en position 4 a migré en position 3 pour libérer le site de complexation n°2.

** l'espèce DD3Cu provient de la double déprotonation du cycle B de la quercétine.

V. Implications dans les mécanismes biologiques

V.1. Enthalpie de formation des autres espèces étudiées

L'étude des formes activées de la quercétine nous a permis de préciser les spécificités électroniques, structurales, et énergétiques de chaque système moléculaire. Pour rationaliser la réactivité de ces espèces dans un milieu biologique, il est nécessaire d'étudier les composés susceptibles de réagir avec la quercétine, et notamment les ERO. Nous avons donc choisi les espèces couramment rencontrées lorsqu'un processus oxydatif se produit *in vivo*. L'acide formique HCOOH nous servira de modèle pour représenter la chaîne latérale d'un acide aminé possédant une fonction acide carboxylique. Le Tableau 16 présente les enthalpies de réaction associées aux trois processus rencontrés pour la formation des espèces activées de la quercétine. Dans le cas des co-réactifs, il s'agit de la réduction par gain d'un électron, de l'ajout d'un proton et enfin de l'ajout d'un hydrogène. Nous serons ainsi en mesure de compléter les cycles thermodynamiques proposés dans le paragraphe II.3 par ces valeurs d'énergie.

Tableau 16 : Valeurs des enthalpies de réaction des espèces co-réactives.

	Réactions	ΔG_{298K} (kcal.mol ⁻¹)
+ e	$H^+ \rightarrow H$	-320,6
	$OH \cdot \rightarrow OH^-$	-39,2
	$O_2 \rightarrow O_2^-$	-14,2
	$HOO \cdot \rightarrow HOO^-$	-23,1
	$HCOO \cdot \rightarrow HCOO^-$	-77,5
	$Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$	-479,2
+ H ⁺	$OH^- \rightarrow H_2O$	-385,6
	$O_2^- \rightarrow HOO \cdot$	-346,3
	$HOO^- \rightarrow H_2O_2$	-368,7
	$HCOO^- \rightarrow HCOOH$	-338,1
+ H [·]	$OH \cdot \rightarrow H_2O$	-104,2
	$HOO \cdot \rightarrow H_2O_2$	-71,2
	$HCOO \cdot \rightarrow HCOOH$	-94,9
	$O_2 \rightarrow HOO \cdot$	-39,9
	$O_2^- \rightarrow HOO^-$	-48,8

V.2. Cycles thermodynamiques

V.2.1. Formation de l'espèce semiquinone SQ5

En suivant le cycle thermodynamique a) de la Figure 7, la formation d'une espèce semiquinone peut s'effectuer selon trois chemins réactionnels :



La forme déprotonée (D5) et semiquinone (SQ5) ont été choisies puisqu'elles sont les espèces les plus stables de leur catégorie. Dans le schéma (1), nous pouvons envisager, lors de la première étape, que le transfert électronique sert à réduire l'espèce OH[·]. Lors de la deuxième étape, OH[·] ainsi produit peut capter le proton cédé par la forme Qr. Dans le schéma (2), nous pouvons imaginer le cas inverse où OH[·] capte d'abord un proton de la

quercétine, et OH^\cdot réduit ensuite la forme déprotonée. Dans le schéma (3), on utilisera l'espèce OH^\cdot qui captera directement l'hydrogène de la quercétine.

Dans les trois cas, l'enthalpie libre de la réaction $\text{Q} \rightarrow \text{SQ5}$ est identique et vaut $-42,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. En revanche chaque étape est différente. Dans le cas (1), les enthalpies libres de réaction sont successivement de $+124,0$ et $-166,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$, alors qu'elles sont de $-67,3$ et $+25,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ dans le cas (2).

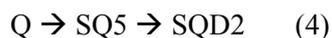
Dans tous les cas la réaction est thermodynamiquement favorisée. En revanche, elle est moins favorable pour le cas (1) où la première étape nécessite $+124,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Il apparaît alors que la réaction de coupure homolytique de la liaison O-H (cas 3) est l'évènement le plus thermodynamiquement favorisée parmi ces trois cas. Connaître les valeurs associées à ce processus (BDE) est donc un indice très important pour estimer le pouvoir antioxydant des espèces polyphénoliques comme les flavonoïdes.

Suivant les mêmes schémas (1), (2) et (3), nous pouvons envisager l'intervention d'autres espèces co-réactives. Par exemple, le transfert électronique servirait à réduire O_2 en $\text{O}_2^\cdot-$, et le proton à produire HCOOH à partir de HCOO^\cdot , et HOO^\cdot à capter directement H^\cdot pour produire H_2O_2 . Les enthalpies libres de réaction des cas (1) et (2) restent identiques et sont de $+30,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. En revanche, dans le cas (3) elle est désormais de $-9,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Dans le cas (1), les énergies de réaction successives sont de $+149,0$ et $-118,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, alors que dans le cas (2), elles sont de $-19,8$ et $+50,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Les conclusions générales sur la faisabilité de tel ou tel processus restent inchangées (favorable au cas (3)) mais, il apparaît clairement que plus l'espèce co-réactive est oxydante, comme un cation métallique par exemple, plus la réaction est thermodynamiquement favorisée.

V.2.2. Formation de l'espèce semiquinone déprotonée SQD2

En suivant le cycle thermodynamique b) de la Figure 7, la formation d'une espèce semiquinone déprotonée peut s'effectuer selon deux chemins réactionnels :



Dans un premier temps imaginons que les co-réactifs mis en jeu soient HOO^\cdot et OH^\cdot respectivement pour capter H^\cdot et H^+ . L'enthalpie libre de réaction $\text{Q} \rightarrow \text{SQD2}$ a la même valeur quel que soit le chemin choisi et s'élève à $-80,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Dans le cas (4) l'enthalpie libre des étapes successives est respectivement de $-9,1$ et $-71,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$, alors que dans le cas (5) elles sont de $-67,4$ et $-13,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Quel que soit le chemin suivi, la

réaction est énergétiquement favorisée ; mais si nous estimons que la première étape (l'étape d'activation de la quercétine) est la plus importante, alors le cas (5) est le plus probable sur la base de ces résultats thermodynamiques.

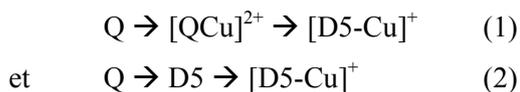
Considérons les co-réactifs HOO^\cdot et OH^\cdot . L'enthalpie libre de réaction $\text{Q} \rightarrow \text{SQD2}$ est maintenant de $-96,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$, pouvant se décomposer pour le cas (4) en $-42,0$ et $-54,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$, et pour le cas (5) en $-50,5$ et $-46,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Il apparaît alors que les deux chemins ont quasiment autant de chance de se produire d'un point de vue énergétique.

Ces résultats peuvent servir de base de comparaison avec ceux obtenus par Metodiewa *et al.*²⁹ pour la formation de la forme semiquinone déprotonée SQD1 (également appelé dans ses travaux o-semiquinone ou Q^\cdot) au sein de la lactoperoxidase. Toujours dans cet article, les auteurs proposent un autre chemin menant à la formation de l'espèce semiquinone déprotonée : la quercétine est oxydée via un cycle rédox faisant intervenir O_2^\cdot et générant *in fine* H_2O_2 . La deuxième espèce mise en jeu ne peut être que HOO^\cdot qui est générée via la déprotonation de la quercétine par O_2^\cdot . HOO^\cdot sert alors à capturer H. L'enthalpie libre de la réaction $\text{Q} \rightarrow \text{SQD2}$ est de $-41,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, et se décompose pour le cas (4) en $-9,1$ et $-32,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, et pour le cas (5) en $-28,1$ et $-13,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Les valeurs d'enthalpie libre de chaque étape montrent que la formation de l'intermédiaire déprotonée D5 est thermodynamiquement favorisée.

Nous pourrions ainsi imaginer de nombreux autres cycles thermodynamiques, mais au vu du nombre des espèces pouvant réagir avec la quercétine, il serait inutile de tous les énumérer. Il faut se servir de ces cycles comme d'une information supplémentaire sur la réactivité des formes activées de la quercétine, et pas comme d'une preuve absolue sur la faisabilité de tel ou tel réaction. En effet, dans un milieu biologique, de nombreux autres facteurs entrent en compétition et influencent la production des formes activées de la quercétine mais également les barrières de transition. C'est pourquoi, une approche purement quantique n'est possible que si nous connaissons l'ensemble des entités (ERO, protéine, métal de transition, co-facteur, solvant, etc.) qui interviennent lors d'une réaction biochimique. Il suffit de garder à l'idée que le fait d'envisager ces cycles thermodynamiques va nous permettre de mieux comprendre l'activation de la quercétine et les chemins réactionnels menant à la formation de ses formes activées.

V.2.3. Influence du cuivre sur la formation la forme déprotonée D5

La complexation du cuivre sur la quercétine modifie considérablement les énergies de formation des espèces activées de la quercétine. Prenons comme exemple la formation du complexe $[\text{D5-Cu}]^+$ provenant de la forme déprotonée D5 selon les deux chemins réactionnels présentés dans la figure 8 :



L'abstraction du proton peut s'effectuer par $HCOO^-$ pour produire $HCOOH$. L'enthalpie libre de la réaction est de $-495,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$, se décomposant en $-305,1$ et $-190,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour le cas (1) et en $-19,8$ et $-476,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour le cas (2). D'un point de vue énergétique, l'étape de déprotonation est nettement facilitée, d'environ $171 \text{ kcal.mol}^{-1}$, lorsque la quercétine est complexée. Il est logique qu'une espèce chargée positivement cède plus facilement un proton qu'une espèce neutre.

Contrairement à la plupart des mécanismes proposées dans la littérature, ces résultats montrent que la chélation d'un métal de transition avec un flavonoïde survient généralement avant la déprotonation où l'abstraction de H.

Le même résultat a été obtenu pour l'oxygénolyse de la quercétine au sein de l'enzyme Quercétine 2,3-Dioxygénase (Cf. Chapitre 3). La quercétine se lie au centre métallique Cu^{2+} via le site 1 de complexation. La déprotonation est également favorisée lorsque le complexe enzyme-substrat est formé. La déprotonation ne demande alors que $+147,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$, en comparaison de la quercétine non complexée qui demande $+318,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Il ressort clairement de ces résultats, qu'un cation métallique joue le rôle d'activateur dans la production d'espèces activées des flavonoïdes qui présenteront une réactivité accrue vis-à-vis des espèces oxydantes ou radicalaires.

VI. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons étudié la quercétine ainsi que ses formes activées en utilisant les méthodes quantiques basées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité. Cela nous a permis d'obtenir de nouvelles informations sur les propriétés structurales, électroniques et énergétiques de ces systèmes. L'examen de l'évolution de ces différents paramètres a permis de mieux cerner la réactivité de chaque forme activée.

Le résultat essentiel est que la quercétine présente plusieurs sites réactifs bien différenciés et indépendants les uns des autres. En effet, la structure plane de la quercétine laisse supposer une délocalisation sur l'ensemble de la structure, mais pour certaines formes activées la délocalisation est limitée. En effet, si on prend l'exemple des formes semiquinones, la densité de spin ne se répartit que sur quelques atomes. Cela rend ces formes activées très réactives et nous permet de repérer les positions qui seront préférentiellement attaquées par une espèce radicalaire.

Sans l'étude des espèces co-réactives, nous n'aurions pas pu mettre au point les cycles thermodynamiques. Cela s'est avéré très utile pour envisager les différents chemins réactionnels amenant à la production des formes activées. Les renseignements que nous pouvons tirer de cette étude sont de nature thermodynamique. La faisabilité de tel ou tel mécanisme peut être discutée sur la base des enthalpies libres de formation. Mais dans un milieu biologique, de nombreux autres facteurs entrent en jeu (solvant, protéine, ERO, etc.) lors d'une réaction chimique, et il deviendra alors nécessaire de caractériser les différents états de transition afin d'obtenir les énergies d'activation de chaque étape d'un mécanisme réactionnel et ainsi avoir des informations d'un point de vue cinétique. Il faut alors garder à l'idée que ces cycles thermodynamiques sont un indice supplémentaire pour mieux comprendre la réactivité des formes activées de la quercétine.

Enfin, l'influence de la complexation avec le cation cuivre(II) sur les différents paramètres des formes activées a également été étudiée. Cela a permis de montrer qu'un centre métallique jouait le rôle d'activateur de la quercétine est permettait de diminuer l'énergie nécessaire pour obtenir les formes activées.

VII. Références

- [1] Jin, G.Z.; Yamagata, Y.; Tomita, K.-I. Structure of quercetin dihydrate. *Acta Cryst. C*. **1990**, 46, 310.
- [2] van Acker, S.A.B.E.; de Groot, M.J.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M.N.J.L.; Donne-Op den Kelder, G.; van der Vijgh, W.J.F.; Bast, A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9(8), 1305-1312.
- [3] Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. Density functional computations of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, 111(2-6), 210-216.
- [4] Russo, N.; Toscano, M.; Uccella, N. Semiempirical Molecular Modeling into Quercetin Reactive Site: Structural, Conformational, and Electronic Features. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48(8), 3232-3237.
- [5] Vasilescu, D.; Girma, R. Quantum molecular modeling of quercetin-simulation of the interaction with the free radical t-BuOO. *Int. J. Quantum Chem.* **2002**, 90(2), 888-902.
- [6] Barone, V.; Cossi, M.; Tomasi, J. Geometry Optimization of Molecular Structures in Solution by the Polarizable Continuum Model. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 404-417.
- [7] Wright, J.S.; Johnson, E.R.; DiLabio, G.A. Predicting the Activity of Phenolic Antioxidants: Theoretical Method, Analysis of Substituent Effects, and Application to Major Families of Antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(6), 1173-1183.
- [8] Trouillas, P.; Fagnere, C.; Lazzaroni, R.; Calliste, C.; Marfak, A.; Duroux, J.-L. A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical-scavenging activity. *Food Chem.* **2004**, 88(4), 571-582.
- [9] Zhang, H.-Y.; Sun, Y.-M.; Wang, X.-L. Substituent effects on O-H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: a DFT study and its implications in the rational design of phenolic antioxidants and elucidation of structure - activity relationships for flavonoid antioxidants. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9(2), 502-508.
- [10] Brinck, T.; Haerberlein, M.; Jonsson, M. A Computational Analysis of Substituent Effects on the O-H Bond Dissociation Energy in Phenols: Polar Versus Radical Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119(18), 4239-4244.
- [11] Mandado, M.; Grana, A.M.; Mosquera, R.A. AIM charge density study of simple natural phenolic antioxidants. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, 400(1-3), 169-174.
- [12] Guerra, M.; Amorati, R.; Pedulli, G.F. Water Effect on the O-H Dissociation Enthalpy of Para-Substituted Phenols: a DFT Study. *J. Org. Chem.* **2004**, 69(16), 5460-5467.
- [13] Bakalbassis, E.G.; Lithoxidou, A.T.; Vafiadis, A.P. Theoretical Calculation of Accurate Absolute and Relative Gas- and Liquid-Phase O-H Bond Dissociation Enthalpies of 2-Mono- and 2,6-Disubstituted Phenols, Using DFT/B3LYP. *J. Phys. Chem. A.* **2003**, 107(41), 8594-8606.
- [14] Ross, L.; Barclay, C.; Vinqvist, M.R., Phenols as antioxidant. In *The Chemistry of Phenols*, Rappoport, Z., Ed. John Wiley & Sons: Jerusalem, 2003; pp 840-908.
- [15] Vedernikova, I.; Proynov, E.; Salahub, D.; Haemers, A. Local atomic and orbital reactivity indices from density functional calculations for hydrogen-bonded 1,2-dihydroxybenzene. *Int. J. Quantum Chem.* **2000**, 77(1), 161-173.

- [16] Bouchoux, G.; Defaye, D.; McMahon, T.; Likholyot, A.; Mo, O.; Yanez, M. Structural and energetic aspects of the protonation of phenol, catechol, resorcinol, and hydroquinone. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8(13), 2900-2909.
- [17] Bartmess, J.E.; Scott, J.A.; McIver, R.T. Scale of Acidities in the Gas Phase from Methanol to Phenol. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6046-6056.
- [18] Wayner, D.D.M.; Luszyk, E.; Page, D.; Ingold, K.U.; Mulder, P.; Laarhoven, L.J.J.; Aldrich, H.S. Effects of Solvation on the Enthalpies of Reaction of tert-Butoxyl Radicals with Phenol and on the Calculated O-H Bond Strength in Phenol. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117(34), 8737-8744.
- [19] Mestres, J.; Duran, M.; Bertran, J.; Csizmadia, I.G. The effect of substituents on the deprotonation energy of selected primary, secondary and tertiary alcohols. *J. Mol. Structure (Theochem)*. **1995**, 358, 229-249.
- [20] Cornard, J.P.; Merlin, J.C.; Boudet, A.C.; Vrielynck, L. Structural study of quercetin by vibrational and electronic spectroscopies combined with semiempirical calculations. *Biospectr.* **1997**, 3(3), 183-193.
- [21] Lien, E.J.; Ren, S.; Bui, H.H.; Wang, R. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26(3-4), 285-94.
- [22] Ghiotto, R.C.T.; Lavarda, F.C.; Ferreira, F.J.B. Antioxidant activity of flavonols. *Int. J. Quantum Chem.* **2004**, 97(5), 949-952.
- [23] Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.* **1997**, 22(5), 749-760.
- [24] van Acker, S.A.B.E.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M.N.J.L.; Griffioen, D.H.; van Bennekom, W.P.; van der Vijgh, W.J.F.; Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* **1996**, 20(3), 331-342.
- [25] Erkoç, S.; Erkoç, F.; Keskin, N. Theoretical investigation of quercetin and its radical isomers. *J. Mol. Structure (Theochem)*. **2003**, 631, 141-146.
- [26] Trouillas, P.; Marsal, P.; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J.-L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chem.* **2006**, 97, 679-688.
- [27] Jovanovic, S.V.; Steeken, S.; Hara, Y.; Simic, M.G. Reduction potentials of flavonoid phenoxyl radicals. Which ring is responsible for antioxidant activity? *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.* **1996**, 2497.
- [28] Adamo, C.; Subra, R.; Di Matteo, A.; Barone, V. Structure and magnetic properties of benzyl, anilino, and phenoxyl radicals by density functional computations. *J. Chem. Phys.* **1998**, 109, 10244-10254.
- [29] Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickançaitė, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26(1-2), 107-116.
- [30] Yamashita, N.; Tanemura, H.; Kawanishi, S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutat. Res.* **1999**, 425(1), 107-115.
- [31] Gliszczynska-Swiglo, A.; van der Woude, H.; de Haan, L.; Tyrakowska, B.; Aarts, J.M.M.J.G.; Rietjens, I.M.C.M. The role of quinone reductase (NQO1) and quinone chemistry in quercetin cytotoxicity. *Toxicol. in Vitro.* **2003**, 17(4), 423-431.
- [32] Lebeau, J.; Furman, C.; Bernier, J.-L.; Duriez, P.; Teissier, E.; Cotelle, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, 29(9), 900-912.

- [33] Moridani, M.Y.; Pourahmad, J.; Bui, H.; Siraki, A.; O'Brien, P.J. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biol. Med.* **2003**, 34(2), 243-253.
- [34] Makris, D.P.; Rossiter, J.T. Hydroxyl Free Radical-Mediated Oxidated Degradation of Quercetin and Morin: A preliminary Investigation. *J. Food Comp. Anal.* **2002**, 15, 103-113.
- [35] Steiner, R.A.; Kalk, K.H.; Dijkstra, B.W. Anaerobic enzyme-substrate structures provide insight into the reaction mechanism of the copper-dependent quercetin 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(26), 16625-16630.
- [36] Balogh-Hergovich, E.; Kaizer, J.; Speier, G. Kinetics and mechanism of the Cu(I) and Cu(II) flavonolate-catalyzed oxygenation of flavonol. Functional quercetin 2,3-dioxygenase models. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2000**, 159(2), 215-224.
- [37] Balogh-Hergovich, E.; Kaizer, J.; Pap, J.; Speier, G.; Huttner, G.; Zsolnai, L. Copper-mediated oxygenolysis of flavonols via endoperoxide and dioxetan intermediates; synthesis and oxygenation of [CuII(phen)2(fla)]ClO₄ and [CuII(L)(fla)₂] [flaH = flavonol; L = 1,10-phenanthroline (phen), 2,2'-bipyridine (bpy), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TMEDA)] complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, (9), 2287-2295.
- [38] Barhacs, L.; Kaizer, J.; Speier, G. Kinetics and mechanism of the stoichiometric oxygenation of the ionic zinc(II) flavonolate complex [Zn(fla)(idpa)]ClO₄ (fla=flavonolate; idpa=3,3'-iminobis(N,N-dimethylpropylamine)). *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2001**, 172(1-2), 117-125.
- [39] Krishnamachari, V.; Levine, L.H.; Pare, P.W. Flavonoid Oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(15), 4357-4363.
- [40] Alluis, B.; Dangles, O. Quercetin (=2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one) glycosides and sulfates: chemical synthesis, complexation, and antioxidant properties. *Helv. Chim. Acta.* **2001**, 84(5), 1133-1156.
- [41] Steiner, R.A.; Meyer-Klaucke, W.; Dijkstra, B.W. Functional Analysis of the Copper-Dependent Quercetin 2,3-Dioxygenase. 2. X-ray Absorption Studies of Native Enzyme and Anaerobic Complexes with the Substrates Quercetin and Myricetin. *Biochemistry.* **2002**, 41(25), 7963-7968.
- [42] Boersma, M.G.; Vervoort, J.; Szymusiak, H.; Lemanska, K.; Tyrakowska, B.; Cenas, N.; Segura-Aguilar, J.; Rietjens, I.M. Regioselectivity and reversibility of the glutathione conjugation of quercetin quinone methide. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13(3), 185-191.
- [43] Hirakawa, K.; Oikawa, S.; Hiraku, Y.; Hirosawa, I.; Kawanishi, S. Catechol and Hydroquinone Have Different Redox Properties Responsible for Their Differential DNA-damaging Ability. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15(1), 76-82.
- [44] Galati, G.; Chan, T.; Wu, B.; O'Brien, P.J. Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12(6), 521-525.
- [45] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. Structure-Activity Study on the Quinone/Quinone Methide Chemistry of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, 14(4), 398-408.
- [46] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; Van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with Flavonoid Quinone/Quinone Methides Is pH-Dependent. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15(3), 343-351.
- [47] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide-Glutathione Adducts. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 378(2), 224-233.

- [48] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; van der Woude, H.; van Zanden, J.; van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett.* **2002**, 520(1-3), 30-34.
- [49] van der Woude, H.; Alink, G.M.; Van Rossum, B.E.J.; Walle, K.; Van Steeg, H.; Walle, T.; Rietjens, I.M.C.M. Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, 18(12), 1907-1916.
- [50] Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5642.
- [51] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B: Condens. Matter.* **1988**, 37, 785-789.
- [52] Hehre, W.J.; Ditchfield, R.; Pople, J.A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1972**, 56, 2257-2261.
- [53] Chandrasekhar, J.; Andrade, J.G.; Schleyer, P.v.R. Efficient and Accurate Calculation of Anion Proton Affinities. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 5609-5612.
- [54] Hariharan, P.C.; Pople, J.A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chem. Acc.* **1973**, 28, 213-222.
- [55] Hay, P.J.; Wadt, W.R. *Ab initio* effective core potential for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 299-310.
- [56] Hay, P.J.; Wadt, W.R. *Ab initio* effective core potential for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 270-283.
- [57] Hay, P.J.; Wadt, W.R. *Ab initio* effective core potential for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 284-298.
- [58] *Gaussian98*, Revision A7; M. J. Frisch, G.W.T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc. Pittsburg PA, 1998.
- [59] Reed, A.E.; Weinstock, R.B.; Franck, W. Natural population analysis. *J. Chem. Phys.* **1985**, 83, 735-746.
- [60] Reed, A.E.; Franck, W. Natural localized molecular orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, 83, 1736-1740.

VIII. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 2

VIII.1. Tableaux des enthalpies libres de formations des espèces traitées dans ce chapitre.

Espèces non complexés	G (en u.a.)	Espèces complexées	G (en u.a.)	Autres Espèces	G (en u.a.)
Q	-1104,011024	SQ1CU $m1$	-1298,986152	OH ⁻	-75,803323
Qr	-1103,751036	SQ1CU $m3$	-1298,969752	OH \cdot	-75,740889
D1	-1103,482585	OQ1CU	-1298,356226	H ₂ O	-76,41781
D2	-1103,472986	D1CU	-1299,361113	O ₂	-150,341719
D3	-1103,496416	SQ2CU $m1$	-1298,964349	O ₂ \cdot^-	-150,364299
D4	-1103,489837	SQ2CU $m3$	-1298,973107	HOO \cdot	-150,916192
D5	-1103,503867	OQ2CU	-1298,352048	HOO \cdot^-	-150,952985
DD1	-1102,831913	D2CU	-1299,350885	H ₂ O ₂	-151,540616
DD2	-1102,861139	SQ3CU $m1$	-1298,964854	HCOO \cdot^-	-189,216703
DD3	-1102,865006	SQ3CU $m3$	-1298,962979	HCOO \cdot	-189,093196
DD4	-1102,879094	OQ3CU	-1298,361254	HCOOH	-189,755429
SQ1	-1103,390423	DD3CU	-1298,991630	Cu ²⁺	-195,081365
SQ2	-1103,367845	D3CU	-1299,343992	Cu ⁺	-195,845057
SQ3	-1103,381296	QCu	-1299,578704	H \cdot	-0,510927
SQ4	-1103,397623			Phe	-307,389743
SQ5	-1103,401072			Pher	-307,092654
SQD1	-1102,888079			Phe \cdot^-	-306,833920
SQD2	-1102,900855			Phesq	-306,766788
SQD3	-1102,895836				
SQD4	-1102,896854				
OQ1	-1102,788792				
OQ2	-1102,792421				
OQ3	-1102,781573				
OQ4	-1102,773792				

VIII.2. Tableau des distances interatomiques des formes activées non complexées

	Q	Qr	D1	D2	D3	D4	D5	DD1	DD2	DD3	DD4	SQD1	SQD2	SQD3	SQD4	SQ1	SQ2	SQ3	SQ4	SQ5	OQ1	OQ2	OQ3	OQ4
O1C2	1,38	1,36	1,40	1,38	1,38	1,39	1,39	1,42	1,40	1,38	1,39	1,39	1,39	1,38	1,38	1,36	1,37	1,37	1,38	1,38	1,38	1,37	1,37	1,37
O1C9	1,36	1,37	1,34	1,38	1,39	1,35	1,36	1,35	1,34	1,35	1,37	1,36	1,35	1,36	1,37	1,37	1,36	1,37	1,36	1,36	1,36	1,37	1,36	1,37
O3C3	1,36	1,33	1,27	1,36	1,37	1,37	1,37	1,38	1,28	1,28	1,32	1,37	1,26	1,26	1,28	1,25	1,35	1,36	1,36	1,35	1,35	1,22	1,23	1,24
O4C4	1,27	1,26	1,26	1,26	1,29	1,28	1,29	1,32	1,29	1,34	1,36	1,28	1,26	1,32	1,35	1,24	1,24	1,27	1,26	1,26	1,26	1,24	1,31	1,35
O5C5	1,35	1,33	1,35	1,25	1,37	1,35	1,35	1,36	1,35	1,30	1,39	1,35	1,35	1,29	1,37	1,34	1,25	1,35	1,35	1,35	1,34	1,34	1,27	1,36
O7C7	1,37	1,35	1,38	1,39	1,26	1,38	1,38	1,40	1,40	1,40	1,27	1,38	1,38	1,38	1,25	1,36	1,37	1,26	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36	1,24
O3'C3'	1,38	1,36	1,40	1,39	1,39	1,29	1,37	1,28	1,39	1,39	1,38	1,26	1,36	1,36	1,36	1,38	1,38	1,38	1,26	1,34	1,22	1,34	1,34	1,34
O4'C4'	1,36	1,33	1,38	1,38	1,38	1,35	1,28	1,26	1,30	1,30	1,29	1,25	1,27	1,27	1,27	1,36	1,36	1,36	1,33	1,26	1,22	1,24	1,24	1,24
C2C3	1,37	1,40	1,42	1,36	1,36	1,39	1,40	1,42	1,44	1,44	1,41	1,39	1,45	1,45	1,43	1,45	1,37	1,38	1,37	1,38	1,37	1,48	1,48	1,46
C3C4	1,45	1,47	1,50	1,49	1,46	1,43	1,42	1,39	1,47	1,45	1,43	1,42	1,50	1,47	1,45	1,51	1,47	1,45	1,45	1,46	1,46	1,53	1,50	1,47
C4C10	1,43	1,42	1,45	1,43	1,40	1,44	1,45	1,45	1,45	1,42	1,39	1,44	1,45	1,40	1,38	1,44	1,45	1,44	1,43	1,43	1,43	1,44	1,38	1,37
C10C5	1,42	1,43	1,43	1,48	1,44	1,42	1,42	1,41	1,43	1,46	1,43	1,42	1,43	1,46	1,45	1,43	1,48	1,44	1,42	1,43	1,43	1,43	1,48	1,47
C5C6	1,39	1,39	1,39	1,45	1,37	1,39	1,39	1,40	1,39	1,42	1,37	1,39	1,39	1,42	1,36	1,39	1,46	1,37	1,39	1,39	1,39	1,39	1,42	1,36
C6C7	1,40	1,40	1,41	1,38	1,46	1,40	1,40	1,40	1,41	1,40	1,46	1,40	1,40	1,39	1,46	1,40	1,38	1,45	1,40	1,40	1,40	1,40	1,38	1,46
C7C8	1,40	1,42	1,39	1,41	1,45	1,39	1,39	1,39	1,38	1,39	1,44	1,39	1,39	1,41	1,45	1,40	1,41	1,46	1,40	1,40	1,40	1,40	1,43	1,47
C8C9	1,39	1,38	1,40	1,38	1,37	1,40	1,40	1,40	1,41	1,40	1,38	1,40	1,40	1,39	1,37	1,39	1,41	1,38	1,39	1,39	1,39	1,40	1,37	1,35
C9C10	1,41	1,41	1,41	1,42	1,43	1,40	1,40	1,40	1,41	1,41	1,43	1,40	1,41	1,41	1,44	1,41	1,40	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,43	1,45
C2C1'	1,46	1,44	1,45	1,47	1,47	1,45	1,43	1,41	1,45	1,45	1,44	1,44	1,42	1,42	1,42	1,44	1,46	1,46	1,47	1,45	1,46	1,39	1,39	1,39
C1'C2'	1,41	1,42	1,42	1,41	1,41	1,42	1,44	1,43	1,43	1,43	1,43	1,40	1,43	1,43	1,43	1,42	1,41	1,42	1,39	1,41	1,37	1,44	1,44	1,44
C2'C3'	1,39	1,38	1,39	1,39	1,39	1,41	1,37	1,41	1,38	1,38	1,37	1,44	1,37	1,37	1,37	1,38	1,38	1,38	1,44	1,38	1,47	1,36	1,36	1,36
C3'C4'	1,40	1,43	1,40	1,40	1,40	1,45	1,45	1,52	1,44	1,44	1,44	1,52	1,46	1,46	1,46	1,41	1,41	1,41	1,46	1,47	1,56	1,48	1,48	1,48
C4'C5'	1,39	1,41	1,39	1,39	1,39	1,39	1,43	1,46	1,42	1,42	1,42	1,46	1,44	1,44	1,44	1,40	1,39	1,40	1,39	1,44	1,47	1,46	1,46	1,46
C5'C6'	1,39	1,38	1,39	1,39	1,39	1,39	1,38	1,36	1,39	1,39	1,39	1,36	1,37	1,37	1,37	1,39	1,39	1,39	1,39	1,37	1,35	1,35	1,35	1,35
C6'C1'	1,41	1,43	1,42	1,41	1,41	1,42	1,43	1,45	1,42	1,42	1,42	1,45	1,44	1,44	1,44	1,42	1,41	1,41	1,44	1,44	1,48	1,46	1,46	1,46

VIII.3. Tableau des charges atomiques des formes activées non complexées

	Q	Qr	D1	D2	D3	D4	D5	DD1	DD2	DD3	DD4	SQD1	SQD2	SQD3	SQD4	SQ1	SQ2	SQ3	SQ4	SQ5	OQ1	OQ2	OQ3	OQ4
O1	-0,486	-0,473	-0,498	-0,516	-0,512	-0,488	-0,496	-0,516	-0,494	-0,490	-0,499	-0,494	-0,501	-0,494	-0,499	-0,489	-0,480	-0,481	-0,490	-0,490	-0,490	-0,503	-0,497	-0,498
O3	-0,735	-0,655	-0,748	-0,764	-0,758	-0,728	-0,742	-0,745	-0,773	-0,781	-0,837	-0,731	-0,627	-0,632	-0,713	-0,546	-0,722	-0,721	-0,716	-0,705	-0,704	-0,507	-0,518	-0,599
O4	-0,701	-0,650	-0,675	-0,670	-0,769	-0,748	-0,766	-0,844	-0,737	-0,722	-0,787	-0,752	-0,657	-0,678	-0,749	-0,604	-0,614	-0,692	-0,689	-0,687	-0,681	-0,589	-0,643	-0,720
O5	-0,712	-0,663	-0,747	-0,700	-0,751	-0,736	-0,741	-0,777	-0,777	-0,804	-0,763	-0,737	-0,736	-0,743	-0,733	-0,705	-0,500	-0,711	-0,709	-0,707	-0,705	-0,698	-0,669	-0,704
O7	-0,704	-0,669	-0,731	-0,742	-0,728	-0,722	-0,725	-0,747	-0,750	-0,754	-0,781	-0,722	-0,724	-0,724	-0,671	-0,701	-0,708	-0,510	-0,702	-0,700	-0,698	-0,695	-0,693	-0,568
O3'	-0,750	-0,716	-0,772	-0,765	-0,763	-0,822	-0,759	-0,803	-0,787	-0,783	-0,782	-0,608	-0,737	-0,734	-0,733	-0,747	-0,748	-0,746	-0,574	-0,681	-0,489	-0,688	-0,687	-0,686
O4'	-0,711	-0,636	-0,746	-0,736	-0,733	-0,752	-0,754	-0,706	-0,847	-0,832	-0,824	-0,623	-0,702	-0,693	-0,685	-0,699	-0,709	-0,702	-0,673	-0,585	-0,491	-0,580	-0,581	-0,576
C2	0,338	0,357	0,195	0,271	0,290	0,366	0,351	0,292	0,257	0,299	0,318	0,342	0,272	0,297	0,304	0,356	0,321	0,358	0,321	0,310	0,304	0,292	0,297	0,305
C3	0,211	0,335	0,298	0,227	0,224	0,191	0,180	0,192	0,276	0,279	0,226	0,195	0,311	0,317	0,295	0,331	0,243	0,233	0,232	0,254	0,255	0,427	0,430	0,410
C4	0,447	0,438	0,458	0,446	0,404	0,414	0,395	0,310	0,399	0,362	0,343	0,404	0,454	0,425	0,349	0,471	0,446	0,423	0,452	0,446	0,452	0,466	0,424	0,331
C5	0,414	0,448	0,408	0,464	0,366	0,401	0,397	0,367	0,394	0,422	0,343	0,400	0,411	0,449	0,355	0,428	0,449	0,370	0,417	0,418	0,419	0,436	0,483	0,361
C6	-0,378	-0,364	-0,409	-0,439	-0,378	-0,392	-0,393	-0,410	-0,423	-0,448	-0,379	-0,391	-0,402	-0,428	-0,356	-0,379	-0,297	-0,314	-0,377	-0,377	-0,375	-0,384	-0,411	-0,329
C7	0,377	0,411	0,346	0,345	0,444	0,354	0,350	0,319	0,315	0,324	0,424	0,354	0,356	0,365	0,450	0,382	0,317	0,404	0,381	0,384	0,386	0,393	0,396	0,468
C8	-0,356	-0,303	-0,374	-0,421	-0,399	-0,361	-0,363	-0,381	-0,378	-0,410	-0,413	-0,362	-0,366	-0,388	-0,367	-0,344	-0,229	-0,235	-0,356	-0,354	-0,355	-0,346	-0,336	-0,300
C9	0,393	0,373	0,397	0,372	0,358	0,396	0,392	0,396	0,381	0,374	0,373	0,393	0,396	0,391	0,364	0,382	0,361	0,334	0,393	0,395	0,394	0,390	0,380	0,345
C10	-0,267	-0,259	-0,286	-0,290	-0,277	-0,259	-0,254	-0,236	-0,272	-0,269	-0,269	-0,257	-0,287	-0,280	-0,228	-0,291	-0,225	-0,180	-0,268	-0,268	-0,267	-0,299	-0,260	-0,168
C1'	-0,124	-0,084	-0,093	-0,091	-0,096	-0,156	-0,178	-0,153	-0,161	-0,167	-0,167	-0,169	-0,113	-0,117	-0,109	-0,131	-0,123	-0,128	-0,123	-0,057	-0,075	-0,062	-0,065	-0,060
C2'	-0,266	-0,261	-0,291	-0,281	-0,281	-0,308	-0,275	-0,400	-0,278	-0,272	-0,276	-0,253	-0,280	-0,277	-0,281	-0,253	-0,266	-0,261	-0,219	-0,285	-0,248	-0,286	-0,286	-0,290
C3'	0,262	0,295	0,248	0,252	0,253	0,319	0,253	0,330	0,237	0,236	0,240	0,346	0,278	0,278	0,281	0,261	0,264	0,264	0,351	0,342	0,448	0,315	0,316	0,319
C4'	0,311	0,400	0,257	0,274	0,278	0,305	0,374	0,415	0,324	0,334	0,338	0,414	0,374	0,380	0,381	0,332	0,313	0,325	0,365	0,381	0,460	0,449	0,447	0,447
C5'	-0,270	-0,258	-0,282	-0,276	-0,274	-0,313	-0,325	-0,334	-0,339	-0,337	-0,336	-0,318	-0,303	-0,302	-0,296	-0,274	-0,269	-0,268	-0,308	-0,256	-0,277	-0,270	-0,269	-0,265
C6'	-0,206	-0,158	-0,241	-0,224	-0,220	-0,246	-0,207	-0,220	-0,241	-0,230	-0,226	-0,206	-0,209	-0,203	-0,204	-0,189	-0,208	-0,196	-0,143	-0,212	-0,177	-0,174	-0,176	-0,177
H3	0,534	0,554		0,527	0,530	0,522	0,523	0,514				0,524					0,536	0,538	0,536	0,537	0,538			
H4										0,526	0,535			0,535	0,542								0,543	0,547
H5	0,538	0,544	0,532		0,527	0,537	0,537	0,536	0,528		0,520	0,537	0,534		0,524	0,537		0,535	0,538	0,538	0,538	0,537		0,528
H6	0,250	0,273	0,229	0,217	0,238	0,236	0,234	0,215	0,213	0,207	0,226	0,236	0,234	0,229	0,248	0,253	0,251	0,268	0,252	0,253	0,255	0,255	0,253	0,270
H7	0,508	0,525	0,494	0,497		0,498	0,497	0,486	0,486	0,486		0,498	0,499	0,498		0,509	0,511		0,509	0,510	0,510	0,511	0,513	
H8	0,267	0,283	0,249	0,24	0,238	0,260	0,257	0,244	0,241	0,237	0,232	0,259	0,255	0,253	0,249	0,268	0,268	0,264	0,267	0,269	0,269	0,270	0,270	0,268
H2'	0,264	0,275	0,283	0,263	0,261	0,253	0,260	0,236	0,275	0,277	0,268	0,257	0,282	0,283	0,278	0,279	0,265	0,266	0,280	0,280	0,280	0,291	0,291	0,287
H3'	0,519	0,537	0,514	0,513	0,513		0,516		0,510	0,510	0,512		0,516	0,517	0,518	0,523	0,520	0,521		0,528		0,526	0,526	0,527
H4'	0,522	0,542	0,511	0,513	0,514	0,523										0,525	0,523	0,525	0,531					
H5'	0,256	0,283	0,233	0,241	0,244	0,225	0,226	0,202	0,203	0,207	0,211	0,228	0,231	0,234	0,237	0,259	0,256	0,260	0,260	0,256	0,259	0,260	0,260	0,262
H6'	0,256	0,274	0,241	0,256	0,260	0,230	0,234	0,218	0,218	0,223	0,230	0,236	0,240	0,243	0,248	0,257	0,253	0,259	0,259	0,260	0,263	0,262	0,262	0,265

VIII.4. Tableau des densités de spin atomique des formes activées non complexées

	Qr	SQD1	SQD2	SQD3	SQD4	SQ1	SQ2	SQ3	SQ4	SQ5
O1	0,02	0,01	-0,01	-0,02	-0,01	0,04	0,03	0,02	0,00	0,00
C2	0,00	0,02	0,03	-0,01	-0,04	0,37	0,03	0,06	0,01	-0,12
C3	0,30	0,03	0,08	0,08	0,15	0,01	0,05	0,04	0,00	0,17
C4	-0,03	0,04	0,06	0,09	-0,02	0,01	-0,03	-0,05	0,00	0,00
C5	0,04	0,01	0,03	0,03	-0,02	0,02	-0,10	-0,11	0,00	0,01
C6	-0,01	0,00	-0,02	-0,01	0,04	0,01	0,36	0,18	0,00	-0,01
C7	0,02	0,01	0,03	0,03	-0,01	0,01	-0,16	-0,10	0,00	0,01
C8	0,10	0,00	-0,01	0,02	0,09	0,04	0,45	0,41	0,00	-0,01
C9	-0,04	0,00	0,03	0,03	-0,04	-0,01	-0,12	-0,15	0,00	0,01
C10	0,03	-0,01	-0,03	-0,02	0,09	-0,01	0,17	0,28	0,00	0,00
C1'	0,11	0,01	0,12	0,13	0,15	-0,08	-0,01	-0,01	-0,06	0,29
C2'	-0,03	0,27	-0,07	-0,07	-0,08	0,09	0,01	0,02	0,19	-0,14
C3'	0,04	0,02	0,09	0,09	0,10	-0,05	-0,01	-0,01	0,00	0,25
C4'	0,16	0,03	0,06	0,05	0,05	0,13	0,02	0,03	0,28	0,01
C5'	-0,02	0,03	0,06	0,06	0,07	-0,06	0,00	-0,01	-0,14	0,15
C6'	0,07	0,05	0,04	0,02	0,01	0,13	0,01	0,03	0,32	-0,07
O3	0,11	0,01	0,24	0,25	0,18	0,31	0,02	0,02	0,00	0,04
O4	0,02	0,03	0,08	0,04	0,00	0,04	-0,01	0,01	0,00	0,04
O5	0,03	0,00	0,01	0,04	0,00	0,01	0,33	-0,02	0,00	0,00
O7	0,02	0,00	0,00	0,01	0,10	0,00	-0,01	0,39	0,00	0,00
O3'	0,02	0,31	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,35	0,07
O4'	0,08	0,13	0,17	0,16	0,17	0,03	0,00	0,01	0,08	0,29

VIII.5. Tableau des distances interatomiques des formes activées complexées

	OQ1Cu	OQ2Cu _{m2} *	OQ3Cu	SQ1Cu _{m1} *	SQ1Cu _{m3} *	SQ2Cu _{m1} *	SQ2Cu _{m3} *	SQ3Cu _{m1} *	SQ3Cu _{m3} *	D1Cu	D2Cu	DD3Cu
CuO3	2,10			2,17	2,07					2,03		
CuO4	2,09	2,04		2,03	2,09	2,03	2,03			2,04	1,98	
CuO5		2,00				1,98	1,93				1,95	
CuO3'			2,11					2,38	2,38			2,00
CuO4'			2,10					1,97	1,95			2,02
O1C2	1,35	1,37	1,37	1,34	1,36	1,35	1,37	1,36	1,37	1,36	1,35	1,38
O1C8	1,36	1,35	1,35	1,38	1,35	1,37	1,35	1,38	1,35	1,37	1,36	1,36
O3C3	1,25	1,32	1,32	1,24	1,27	1,30	1,33	1,30	1,33	1,28	1,34	1,36
O4C4	1,26	1,26	1,24	1,27	1,27	1,27	1,27	1,25	1,25	1,28	1,28	1,26
O5C5	1,32	1,26	1,31	1,32	1,32	1,26	1,27	1,32	1,31	1,34	1,28	1,35
O7C7	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	1,34	1,33	1,33	1,35	1,35	1,36
O3'C3'	1,30	1,30	1,24	1,35	1,33	1,35	1,34	1,36	1,36	1,37	1,37	1,29
O4'C4'	1,22	1,22	1,23	1,31	1,31	1,31	1,31	1,25	1,27	1,34	1,34	1,28
C2C3	1,45	1,39	1,39	1,48	1,43	1,42	1,39	1,42	1,39	1,43	1,40	1,37
C3C4	1,51	1,48	1,48	1,51	1,50	1,47	1,47	1,48	1,47	1,49	1,46	1,45
C4C10	1,41	1,43	1,43	1,40	1,42	1,42	1,43	1,41	1,43	1,41	1,43	1,43
C10C5	1,45	1,48	1,45	1,45	1,44	1,50	1,47	1,45	1,44	1,44	1,48	1,42
C5C6	1,40	1,44	1,41	1,39	1,41	1,43	1,44	1,39	1,42	1,39	1,43	1,39
C6C7	1,39	1,40	1,39	1,40	1,40	1,38	1,40	1,40	1,39	1,40	1,38	1,40
C7C8	1,43	1,41	1,44	1,43	1,42	1,44	1,41	1,43	1,43	1,41	1,42	1,40
C8C9	1,39	1,41	1,40	1,37	1,40	1,38	1,41	1,37	1,41	1,38	1,38	1,39
C9C10	1,41	1,41	1,39	1,42	1,41	1,41	1,41	1,42	1,39	1,42	1,42	1,41
C2C1'	1,43	1,45	1,46	1,41	1,45	1,43	1,45	1,42	1,45	1,43	1,44	1,46
C1'C2'	1,41	1,40	1,38	1,44	1,41	1,43	1,41	1,44	1,42	1,42	1,42	1,39
C2'C3'	1,39	1,39	1,45	1,37	1,39	1,37	1,39	1,36	1,38	1,38	1,38	1,42
C3'C4'	1,52	1,52	1,55	1,44	1,45	1,44	1,45	1,48	1,46	1,42	1,42	1,49
C4'C5'	1,47	1,47	1,45	1,42	1,41	1,42	1,42	1,45	1,44	1,40	1,40	1,43
C5'C6'	1,35	1,35	1,35	1,37	1,37	1,37	1,37	1,36	1,37	1,38	1,38	1,37
C6'C1'	1,48	1,48	1,48	1,45	1,45	1,44	1,45	1,45	1,44	1,43	1,42	1,44

* : les caractères m1 et m3 en italiques correspondent aux multiplicités de spin des systèmes étudiés.

VIII.6. Tableau des charges atomiques des formes activées complexées

	OQ1Cu	OQ2Cu _{m2}	OQ3Cu	SQ1Cu _{m1}	SQ1Cu _{m3}	SQ2Cu _{m1}	SQ2Cu _{m3}	SQ3Cu _{m1}	SQ3Cu _{m3}	D1Cu	D2Cu	DD3Cu
Cu	0,9470	0,9790	0,9520	0,941	0,9330	0,9790	0,9700	0,9540	0,9490	0,9090	0,9330	0,855
O1	-0,427	-0,452	-0,441	-0,455	-0,423	-0,451	-0,451	-0,471	-0,431	-0,472	-0,461	-0,489
O3	-0,651	-0,637	-0,636	-0,617	-0,704	-0,616	-0,661	-0,611	-0,660	-0,734	-0,677	-0,714
O4	-0,732	-0,741	-0,605	-0,757	-0,733	-0,772	-0,746	-0,630	-0,613	-0,781	-0,809	-0,695
O5	-0,606	-0,648	-0,584	-0,628	-0,608	-0,673	-0,650	-0,626	-0,584	-0,674	-0,742	-0,711
O7	-0,635	-0,651	-0,640	-0,632	-0,646	-0,651	-0,655	-0,634	-0,646	-0,671	-0,679	-0,703
O3'	-0,568	-0,567	-0,590	-0,699	-0,652	-0,691	-0,667	-0,742	-0,740	-0,727	-0,727	-0,754
O4'	-0,430	-0,419	-0,582	-0,584	-0,583	-0,587	-0,579	-0,666	-0,671	-0,654	-0,659	-0,748
C2	0,327	0,289	0,322	0,384	0,339	0,361	0,323	0,321	0,331	0,370	0,374	0,324
C3	0,418	0,362	0,349	0,460	0,336	0,414	0,317	0,444	0,311	0,323	0,299	0,233
C4	0,453	0,460	0,449	0,427	0,463	0,407	0,460	0,418	0,455	0,445	0,422	0,447
C5	0,489	0,480	0,500	0,477	0,486	0,503	0,472	0,471	0,502	0,439	0,473	0,415
C6	-0,324	-0,231	-0,319	-0,359	-0,301	-0,330	-0,223	-0,362	-0,300	-0,368	-0,353	-0,378
C7	0,417	0,366	0,397	0,444	0,395	0,386	0,361	0,439	0,380	0,414	0,376	0,379
C8	-0,190	-0,192	-0,139	-0,254	-0,185	-0,167	-0,200	-0,254	-0,125	-0,320	-0,250	-0,356
C9	0,377	0,413	0,375	0,360	0,392	0,341	0,415	0,357	0,389	0,385	0,364	0,394
C10	-0,266	-0,244	-0,242	-0,245	-0,276	-0,185	-0,253	-0,219	-0,256	-0,265	-0,232	-0,267
C1'	0,003	0,045	-0,043	-0,083	-0,044	-0,069	-0,027	-0,007	-0,033	-0,112	-0,120	-0,101
C2'	-0,261	-0,295	-0,238	-0,247	-0,267	-0,262	-0,278	-0,278	-0,277	-0,252	-0,255	-0,263
C3'	0,457	0,472	0,476	0,302	0,372	0,316	0,356	0,327	0,341	0,280	0,280	0,352
C4'	0,461	0,466	0,493	0,472	0,426	0,457	0,441	0,481	0,417	0,384	0,375	0,379
C5'	-0,213	-0,205	-0,265	-0,253	-0,251	-0,247	-0,245	-0,226	-0,216	-0,264	-0,261	-0,295
C6'	-0,191	-0,194	-0,137	-0,120	-0,143	-0,136	-0,145	-0,164	-0,194	-0,163	-0,172	-0,186
H3		0,563	0,565			0,569	0,560	0,571	0,561		0,550	0,534
H5	0,554		0,559	0,550	0,555			0,553	0,561	0,542		0,538
H6	0,298	0,289	0,299	0,293	0,294	0,290	0,286	0,291	0,297	0,271	0,269	0,251
H7	0,545	0,541	0,545	0,543	0,543	0,542	0,540	0,542	0,545	0,523	0,523	0,508
H8	0,301	0,299	0,298	0,299	0,297	0,300	0,296	0,296	0,297	0,283	0,283	0,267
H2'	0,304	0,305	0,301	0,284	0,294	0,281	0,288	0,282	0,283	0,277	0,270	0,276
H3'	0,560	0,560		0,550	0,555	0,551	0,555	0,558	0,556	0,530	0,530	
H4'				0,560	0,556	0,559	0,558			0,538	0,536	
H5'	0,300	0,301	0,298	0,302	0,301	0,301	0,301	0,297	0,291	0,277	0,276	0,252
H6'	0,284	0,286	0,282	0,284	0,281	0,281	0,282	0,289	0,277	0,268	0,265	0,255

VIII.7. Tableau des densités de spin atomique des formes activées complexées

	OQ1Cu	SQ1Cu _{m3}	D1Cu	OQ2Cu _{m2}	SQ2Cu _{m3}	D2Cu	SQ3Cu _{m3}	OQ3Cu	DD3Cu
O1	0,12	0,11	0,01	0,06	0,05	0,04	0,09	0,09	0,00
C2	0,18	0,15	0,11	0,02	-0,07	0,00	-0,06	0,08	-0,06
C3	-0,01	0,10	0,17	0,00	0,21	0,22	0,23	0,07	0,07
C4	-0,02	0,00	0,01	-0,02	-0,03	-0,06	-0,02	-0,03	0,00
C5	0,06	0,07	0,04	-0,03	-0,03	0,01	0,09	0,09	0,00
C6	0,08	0,13	-0,02	0,39	0,41	0,11	0,14	0,09	0,00
C7	-0,06	-0,07	0,03	-0,15	-0,14	-0,07	-0,09	-0,07	0,01
C8	0,35	0,38	0,06	0,40	0,39	0,29	0,52	0,50	0,00
C9	-0,08	-0,04	-0,02	-0,02	-0,01	-0,10	-0,05	-0,09	0,00
C10	0,03	0,00	0,00	0,07	0,07	0,12	0,05	0,08	0,00
C1'	-0,05	0,16	0,03	0,00	0,23	0,05	0,31	-0,07	0,12
C2'	0,11	-0,04	0,02	0,01	-0,11	-0,01	-0,13	0,10	0,01
C3'	0,10	0,20	0,00	0,02	0,17	0,01	0,25	-0,01	0,16
C4'	-0,01	0,23	0,14	0,00	0,22	0,08	0,05	0,00	0,15
C5'	-0,03	-0,06	-0,03	0,00	-0,02	-0,01	0,14	-0,03	-0,01
C6'	0,02	0,13	0,09	0,00	0,08	0,04	-0,08	0,03	0,11
O3	0,07	0,22	0,23	0,00	0,07	0,08	0,08	0,05	0,02
O4	-0,02	0,02	0,03	-0,01	0,02	-0,01	0,03	-0,03	0,02
O5	0,07	0,09	0,02	0,27	0,28	0,17	0,13	0,12	0,00
O7	0,01	0,01	0,01	-0,02	-0,01	0,00	0,01	0,02	0,00
O3'	0,08	0,10	0,01	0,01	0,08	0,01	0,05	0,05	0,21
O4'	0,04	0,14	0,06	0,01	0,14	0,04	0,26	-0,02	0,19
Cu	0,00	0,01	0,01	0,03	0,03	0,02	0,02	0,00	0,01

Chapitre 3

*La quercétine comme substrat
de la Quercétinase*

I. Etude mécanistique de la réaction d'oxygénolyse	84
I.1. METHODOLOGIE.....	85
I.1.1. Etude de la coupure homolytique de la liaison O-O.....	85
I.1.2. Choix de la méthode et de la base.....	85
I.2. CYCLOADDITION 1,2 VS 1,3.....	86
I.2.1. Différentes étapes du mécanisme.....	86
I.2.2. Etape 1 : addition de O ₂ sur C2.....	87
I.2.3. Suite de la réaction : Cas de la cycloaddition 1,3 (intermédiaire endoperoxo).....	89
I.2.4. Suite de la réaction : Cas de la cycloaddition 1,2 (intermédiaire dioxétane).....	91
I.2.5. Conclusion partielle sur le mécanisme :	92
I.3. DIFFERENCES ENTRE LE MODELE ET LA QUERCETINE	93
I.3.1. Différences d'un point de vue énergétique.....	93
I.3.2. Différences structurales et électroniques.....	95
I.3.3. Oxygénolyse d'autres flavonoïdes.....	96
I.4. ROLE DU CUIVRE	98
I.4.1. Influence sur les barrières d'énergies.....	98
I.4.2. Influence sur la compétition cycloaddition 1,2 vs 1,3.....	99
I.4.3. Influence sur les paramètres électroniques.....	99
II. Etude structurale de l'enzyme.....	100
II.1. METHODOLOGIE	100
II.1.1. Enzyme native et Système E/S.....	100
II.1.2. Mise au point des paramètres van der Waals du Cuivre(I) et (II).....	101
II.1.3. Mise au point des paramètres de la quercétine	101
II.1.4. Dynamiques moléculaires.....	103
II.1.5. Energie de complexation	105
II.1.6. Calculs quantiques.....	105
II.2. ANALYSE STRUCTURALE.....	106
II.2.1. Rôle du linker.....	107
II.2.2. Interactions Enzyme/substrat.....	110
II.3. CONCLUSION SUR L'ACTIVATION ET LA RECONNAISSANCE DU SUBSTRAT PAR L'ENZYME	115
III. Etude du canal à Dioxygène	116
III.1. DEFINITION DU CANAL.....	117
III.2. ETUDE ENERGETIQUE.....	119
III.2.1. Méthodologie.....	119
III.2.2. Résultats	121
IV. Conclusion.....	123
V. Références	126
VI. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 3.....	131

VI.1. STRUCTURES DES INTERMEDIAIRES REACTIONNELS ET DES ETATS DE TRANSITION DE LA REACTION D'OXYGENOLYSE DE LA QUERCETINE (A GAUCHE LE MODELE ET A DROITE LA QUERCETINE COMPLETE)	131
VI.2. CHARGES NPA DES ATOMES DU COMPOSE MODELE AU COURS DE LA REACTION	134

L'enzyme Quercétine 2,3-Dioxygénase (ou quercétinase, notée 2,3-QD) catalyse la dégradation d'une certaine catégorie de flavonoïdes. Cette enzyme est produite au sein de micro-organismes fongiques tels qu'*Aspergillus Japonicus* ou *Aspergillus Flavus*. Les premiers travaux de Krishnamurty *et al.*¹ et d'Oka *et al.*² menés au début des années 1970 ont permis de mieux comprendre le rôle de l'enzyme sur cette famille de substances naturelles. La dégradation des flavonoïdes au sein de la 2,3-QD s'effectue par addition des deux atomes du dioxygène sur le flavonoïde, suivie du clivage du cycle central et de libération de monoxyde de carbone (Cf. Figure 1).

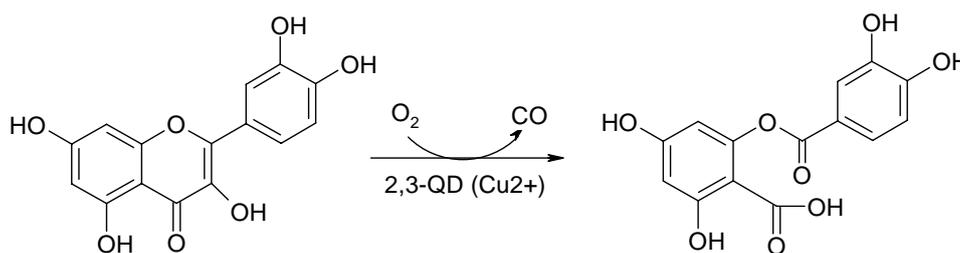


Figure 1 : Oxygénolyse de la quercétine au sein de la Quercétinase.

Les oxygénases sont des enzymes catalysant l'incorporation d'un ou de deux atomes de dioxygène sur des substrats organiques. Le dioxygène dans son état fondamental triplet ne peut réagir directement sur un substrat dans son état singulet puisque cela violerait la conservation du moment angulaire total. La présence d'un co-facteur métallique au sein du site actif de l'enzyme permet, via une réaction d'oxydo-réduction impliquant le substrat, d'activer ce dernier et de permettre la réaction avec O_2 . Dans le cas des dioxygénase, il s'agit généralement d'un atome de fer. La quercétinase appartient à la famille des cupines³ et est la seule dioxygénase non-hème connue possédant un ion cuivre(II) au centre de son site actif.

Récemment, l'équipe de G. Speier a mis au point différents mimes de site actif à base de cuivre et de cobalt et a étudié la cinétique de la réaction de dégradation de la quercétine⁴⁻¹³. D'un point de vue mécanistique, il a montré que le cuivre était très probablement coordonné sur le site 3-hydroxychromone et que l'addition du dioxygène sur le flavonoïde amenait à la formation, soit d'un intermédiaire cyclique à cinq atomes de type endoperoxo, soit d'un intermédiaire cyclique à quatre atomes de type dioxétane (cf. Figure 2).

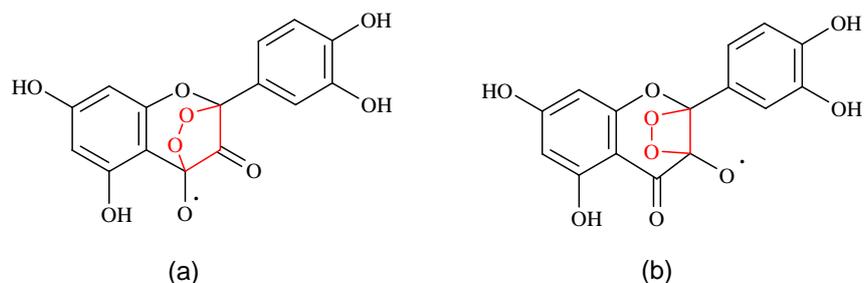


Figure 2 : Intermédiaires réactionnels de type endoperoxo (a) et dioxetane (b)

La structure cristallisée de l'enzyme est connue depuis 2002 avec les travaux de diffraction des RX de Fusetti *et al.*¹⁴ La 2,3-QD possède une structure dimérique présentant, pour chaque monomère, deux domaines similaires contenant une cavité hydrophobe. Les deux domaines sont connectés par une chaîne labile d'acides aminés appelée « linker ». Le domaine N-terminal contient le site catalytique contrairement au domaine C-terminal qui ne possède pas de cofacteur métallique. Dans la structure native, l'ion cuivre(II) est coordonné aux chaînes latérales de trois histidines et à une molécule d'eau labile. La chaîne latérale d'un glutamate, proche du site actif, peut également se coordonner au cuivre. D'après Fusetti *et al.*¹⁴ le rôle du glutamate est essentiellement de déprotoner la fonction 3-OH de la quercétine, facilitant ainsi la formation du complexe enzyme/substrat. D'après leurs travaux, un transfert d'électron est possible entre le substrat déprotoné et le centre métallique, permettant ainsi d'activer la quercétine en vue de l'addition du dioxygène. En revanche, ils n'excluent pas une addition préalable du dioxygène sur le cuivre permettant alors d'activer le dioxygène, suivie de l'addition de cette même molécule sur le substrat.

Une étude DFT du mécanisme d'oxydation de la quercétine a été menée par P.E.M. Siegbahn¹⁵. Le système étudié comprend le substrat, le dioxygène, le centre métallique ainsi que des composés modèles permettant de représenter les chaînes latérales des acides aminés de la première sphère de coordination du cuivre (imidazole pour les histidines, et acide formique pour le glutamate). Les intermédiaires et états de transition ont été optimisés au niveau de calcul B3LYP/lacvp suivi d'un calcul au niveau B3LYP/lacv3p* pour obtenir les énergies de réaction. Le rôle du cuivre est au centre de cette étude. Dans le mécanisme proposé, le cuivre active non pas le substrat mais le dioxygène. L'addition sur la quercétine passe par un intermédiaire où le dioxygène est ponté entre le cuivre et la quercétine (cf Figure 3). La suite du mécanisme est relativement similaire à celui proposé par l'équipe ayant travaillé sur la cristallisation de l'enzyme même s'ils n'envisagent pas d'intermédiaire dioxétane comme le fait l'équipe de G. Speier.

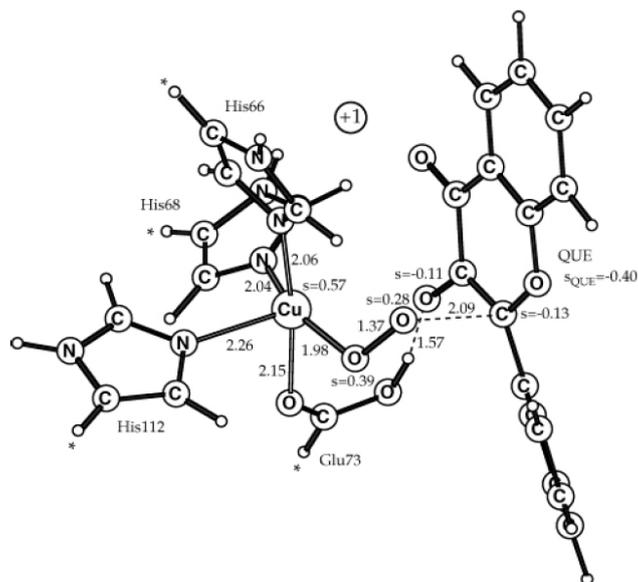


Figure 3 : Structure optimisée de l'état de transition lors de la formation de la première liaison C-O entre le dioxygène et la quercétine selon P.E.M. Siegbahn¹⁵.

Le mécanisme enzymatique de l'oxygénolyse de la quercétine comporte encore des zones d'ombres (activation du substrat ou du dioxygène, passage par un intermédiaire dioxétane ou endoperoxo, etc.) que nous allons essayer de lever. Dans un premier temps nous allons nous focaliser sur l'étude mécanistique de la dégradation de la quercétine à l'aide des méthodes de chimie quantique. L'étude structurale de l'enzyme, à l'aide des méthodes de dynamique moléculaire permettra de rationaliser le rôle de l'enzyme dans le mécanisme. Dans un troisième temps, nous allons détailler la caractérisation d'un canal au sein de l'enzyme et qui pourrait être dédié à la diffusion du dioxygène au sein de l'enzyme.

I. Etude mécanistique de la réaction d'oxygénolyse

Afin d'apporter des éléments de réponses aux questions restées en suspens (i.e. formation d'un intermédiaire réactionnel de type endoperoxo ou dioxétane, rôle du cuivre dans l'activation, etc.), nous avons caractérisé différents mécanismes réactionnels permettant d'expliquer la dégradation de la quercétine. Pour cela nous avons effectué cette étude par étape, en nous focalisant sur chacune de ces questions. Ainsi, dans un premier temps, nous avons étudié les deux chemins réactionnels (passage par l'intermédiaire endoperoxo ou dioxétane) de dégradation de la quercétine. Puis nous avons étudié l'influence du transfert d'électron depuis la quercétine vers le site actif de l'enzyme, sur le mécanisme d'oxydation.

Nous avons choisi de débiter cette étude, qui a été amorcée lors de mon stage de DEA, par l'utilisation d'un modèle de la quercétine. Le modèle retenu est présenté en Figure 4. Une double justification prévaut à ce choix. Premièrement, l'étude des formes activées de la quercétine (Chapitre 2) nous a montré que l'activation sur l'oxygène O3 n'entraînait que des modifications électroniques et structurales mineures sur le cycle catéchol (B) ou sur les fonctions 5-OH et 7-OH. L'étude du mécanisme réactionnel sur le composé modèle nous permettra d'étendre les conclusions à l'ensemble des flavonoïdes présentant un motif 3-hydroxychromone. Deuxièmement, la recherche et la caractérisation des différentes formes stationnaires (intermédiaires réactionnels et états de transition) étant relativement lourdes en temps de calcul, nous avons décidé de restreindre la taille du système considéré afin d'avoir la possibilité d'étudier relativement rapidement les divers mécanismes potentiels. Plusieurs modèles ont été testés et différentes propriétés électroniques, énergétiques et structurales (distribution de charge, énergie de complexation, affinité protonique, affinité électronique, etc.) ont été comparées avec celles de la quercétine. Le modèle présenté dans la Figure 4 a été retenu, il présente le même site 3-hydroxychromone que la quercétine. Par la suite nous avons étudié le même mécanisme sur la quercétine complète et sur d'autres flavonoïdes présentant le motif 3-hydroxychromone et nous avons obtenu des résultats similaires. Nous allons donc commencer par présenter l'étude du mécanisme de dégradation sur le modèle de quercétine.

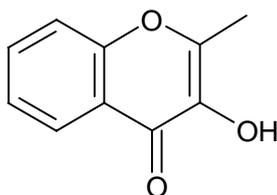


Figure 4 : composé modèle retenu pour cette étude.

I.1. Méthodologie

I.1.1. Etude de la coupure homolytique de la liaison O-O

L'étude par des méthodes de chimie quantique du comportement et des caractéristiques de la molécule de dioxygène est délicate, et une description insuffisamment précise de la rupture de la liaison oxygène-oxygène peut être à l'origine d'erreurs dans le calcul des grandeurs de réactions. Nous avons donc testé différentes méthodes DFT et bases d'orbitales atomiques afin de reproduire au mieux l'enthalpie de la réaction de dissociation du dioxygène $\frac{1}{2} \text{O}_{2(\text{g})} \rightarrow \text{O}_{(\text{g})}$ dont la valeur expérimentale est $59,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

La différence entre la valeur théorique et expérimentale, reportée dans le Tableau 1, montre que les méthodes DFT hybrides reproduisent mieux la dissociation du dioxygène que les méthodes DFT pures. De plus l'ajout d'une orbitale diffuse diminue sensiblement cet écart. Notre choix s'est donc porté sur la méthode B3LYP^{16, 17} et une base 6-31+G*¹⁸⁻²⁰ pour décrire les atomes d'oxygène.

Tableau 1 : Ecart à la valeur expérimentale ($\Delta H_{\text{théorique}} - \Delta H_{\text{expérimental}}$ en kcal.mol^{-1}) dans le cas de la dissociation du dioxygène.

	BP86	BPW91	BLYP	B3PW91	B3LYP
6-31G*	12,0	9,9	9,4	2,4	2,1
6-31+G*	9,7	7,7	6,7	0,8	0.1
6-311G*	10,2	8,2	7,5	1,1	0,7
6-311+G*	9,0	7,0	6,0	0,2	-0,4

I.1.2. Choix de la méthode et de la base

La méthode employée dans cette étude sera la méthode B3LYP puisqu'elle reproduit correctement la valeur de l'enthalpie de dissociation du dioxygène ainsi que les paramètres structuraux de la quercétine. La base d'orbitale atomique choisie allie une description 6-31+G* pour les atomes d'oxygène, la base 6-31G* pour les atomes d'hydrogène et les atomes de carbone. L'ajout de fonctions diffuses sur les atomes d'hydrogène et de carbone n'a pas apporté de résultats significativement meilleurs mais entraîne une augmentation drastique des temps de calculs (facteur 4-5). Elle sera notée par la suite 6-31(+)G*. Pour le cuivre, on utilisera la base ECP Lan12DZ²¹⁻²³.

Les intermédiaires réactionnels ont fait l'objet d'une optimisation de géométrie suivant l'algorithme de Berny implémenté dans le programme Gaussian98²⁴. Afin de vérifier que les systèmes moléculaires étudiés correspondaient bien à des minima de la surface d'énergie potentielle, nous avons effectué des calculs de fréquences au même niveau de calcul que les optimisations de géométrie. Ils nous ont également permis d'accéder aux corrections thermodynamiques nécessaires pour calculer les variations d'enthalpie libre à 298K et 1 atm. La recherche d'états de transition a été effectuée selon la procédure classique implémentée dans Gaussian98. Chaque état de transition a également fait l'objet d'un calcul de fréquences pour vérifier s'il possédait bien une et une seule fréquence imaginaire (dont le mode normal de vibration était caractéristique des modifications structurales de l'étape considérée), montrant ainsi qu'il correspondait bien à un maximum d'énergie sur la surface de potentiel. Les grandeurs énergétiques de la réaction seront présentées en variation d'enthalpie libre. Les charges atomiques ont été calculées à l'aide de la procédure NPA implémenté dans le module NBO^{25, 26} de Gaussian98.

I.2. Cycloaddition 1,2 vs 1,3

I.2.1. Différentes étapes du mécanisme

D'après Steiner *et al.*^{14,27-30}, l'activation du substrat au sein de l'enzyme s'effectue selon deux processus. La chelation au cuivre facilite la réaction acido-basique entre le Glu73 et la fonction hydroxyle 3-OH de la quercétine entraînant la déprotonation de ce groupement. S'ensuit une réaction d'oxydoréduction entre le cuivre et le substrat menant à un cuivre +I et à une forme semiquinone de la quercétine. Les résultats obtenus dans le Chapitre 2 concernant les formes activées vont dans le même sens. Dans le but de nous focaliser sur le mécanisme et afin de simplifier le problème, nous considérons que ces deux étapes ont déjà eu lieu. Notre système d'étude se compose donc d'une quercétine déjà déprotonée et oxydée. Le métal est donc absent de notre système, mais l'on considère qu'il a joué son rôle d'oxydant en captant un électron à la quercétine. De plus, nous considérons une molécule de dioxygène déjà en interaction avec le substrat. La Figure 5 expose les différentes étapes du mécanisme réactionnel. Dans le cas d'un dioxygène en interaction avec la quercétine, notre système ne sera pas chargé et possèdera une multiplicité de spin de 2. Nous avons envisagé deux chemins réactionnel, avec d'un côté le passage par l'intermédiaire endoperoxo (I2) et de l'autre par l'intermédiaire dioxétane (I2'). Dans la suite de l'étude, les atomes du dioxygène seront notés Oa et Ob. Dans un souci de clarté, le modèle sera nommé quercétine, et les structures des intermédiaires réactionnels et des états de transition sont présentés en complément de ce chapitre.

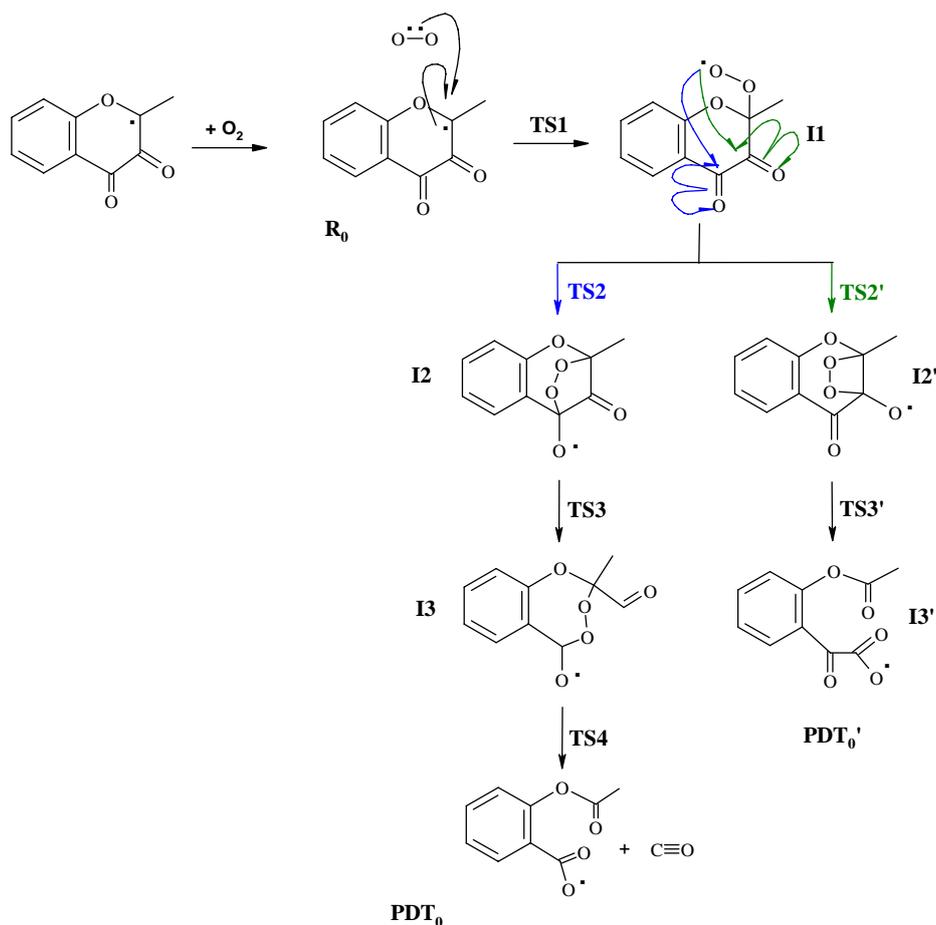


Figure 5 : Différentes étapes du mécanisme d'oxygénolyse

I.2.2. Etape 1 : addition de O_2 sur C2

La première étape consiste en la création de la liaison C2Oa : la contribution majeure au mode normal associé à la fréquence imaginaire de l'état de transition ($TS1$) correspond à la diminution de cette distance (cf. Tableau 2). Toutefois, on constate également une augmentation des longueurs de liaison autour du carbone 2, (les distances C2C3 et C2O1 évoluent vers des valeurs se rapprochant de celles des liaisons simples), et une diminution de l'angle dièdre θ_{C2} (le carbone 2 devient tétraédrique). On peut également noter un renforcement des liaisons carbonyles C4O8 et C3O7, et un affaiblissement de la liaison OaOb.

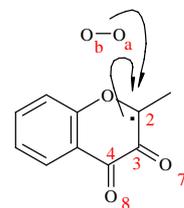
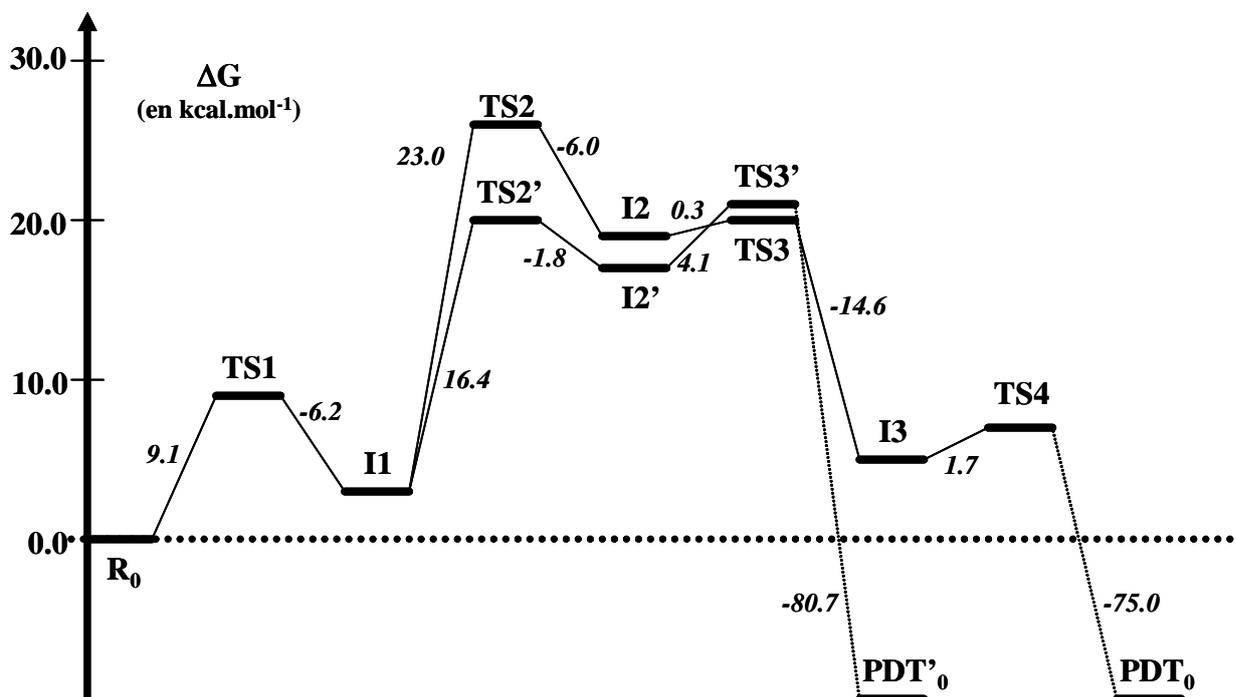


Tableau 2 : Evolution des paramètres structuraux les plus pertinents (en Å et en degrés) au cours de l'étape d'initiation.

	RI_0	TSI	II
C2Oa	3,44	2,08	1,51
C2C3	1,43	1,47	1,55
C3C4	1,52	1,53	1,55
C3O7	1,25	1,23	1,21
C4O8	1,22	1,22	1,22
OaOb	1,22	1,25	1,32
$\theta_{C_2} (O1C2C3C_{CH_3})$	179,3	159,1	126,3

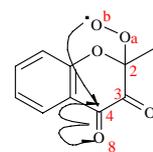
Pour cette étape d'initiation, l'énergie libre d'activation est de +9,1 kcal.mol⁻¹ (cf Figure 6). Comme nous le verrons par la suite cette étape n'est pas l'étape limitante. De plus en considérant le système catalytique dans son ensemble, on peut considérer que cette énergie d'activation sera légèrement diminuée.

**Figure 6** : Profil énergétique de la réaction d'oxygénolyse pour un modèle de quercétine déprotonée radicalaire.

Dans la suite de la réaction, l'atome d'oxygène Ob peut s'additionner soit sur le carbone 3 (cycloaddition 1,2) formant ainsi un cycle à quatre atomes, soit sur le carbone 4 (cycloaddition 1,3) formant un cycle à cinq atomes (cf. Figure 5).

I.2.3. Suite de la réaction : Cas de la cycloaddition 1,3 (intermédiaire endoperoxo)

I.2.3.a. Etape *II* → *I2*



La deuxième étape du processus réactionnel correspond à la création de la liaison C4Ob (cf. Tableau 3). Lors de la création de l'intermédiaire *I2*, l'angle dièdre θ_{C4} diminue, le carbone 4 devient à son tour tétraédrique. Simultanément, la liaison C2Oa est renforcée et la liaison OaOb n'est désormais plus qu'une simple liaison. La distance C3C4 augmente nettement, et sa valeur est trop élevée (1,71 Å) dans l'intermédiaire *I2* pour considérer une liaison entre ces atomes. En revanche ces deux atomes restent en interaction. Cette élongation entraîne une évolution différente de chacune des liaisons C=O de la quercétine. Alors que la distance C4O8 augmente très légèrement (+0,04 Å), la distance C3O7 diminue également très légèrement (-0,03 Å) entraînant une différenciation dans le comportement à venir de ces fonctions. Plus intéressante que ces évolutions est l'analyse de la valeur de la longueur de liaison C3O7. Alors que dans l'intermédiaire *II* sa valeur est de l'ordre de grandeur de celle d'une double liaison CO, dans l'intermédiaire *I2*, sa valeur est très proche de la distance CO dans le monoxyde de carbone.

Tableau 3 : Evolution des paramètres structuraux (en Å et en degrés) les plus pertinents.

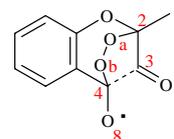
	<i>II</i>	<i>TS2</i>	<i>I2</i>	<i>TS3</i>	<i>I3</i>	<i>TS4</i>	<i>PDT₀</i>
C2Oa	1,51	1,42	1,41	1,41	1,40	1,33	1,21
C2C3	1,55	1,57	1,56	1,56	1,59	1,67	4,61
C3C4	1,55	1,64	1,71	1,88	3,21	3,53	4,56
C3O7	1,21	1,19	1,18	1,17	1,18	1,17	1,14
C4O8	1,22	1,22	1,26	1,24	1,21	1,22	1,26
C4Ob	3,67	1,86	1,47	1,46	1,38	1,35	1,27
OaOb	1,32	1,44	1,48	1,48	1,46	1,66	3,98
$\theta_{C4}(C5C4O8C3)$	178,3	148,4	120,1				
$\theta_{C4}(C5C4O8Ob)$			136,2	144,1	179,0		
$\theta_{C2}(O1C2OaC_{CH3})$					118,9	117,7	179,1

L'analyse de la distribution de charge NPA (Cf. le Tableau de charge de chaque structure en complément de ce chapitre) nous montre que les charges atomiques localisées sur Oa et Ob augmentent. Ces atomes sont désormais liés respectivement aux carbones 2 et 4. L'élongation de la distance C3C4 et le renforcement de la distance C3O7 s'accompagnent d'une modification importante

de la charge sur ces atomes. La structure de l'intermédiaire *I2* laisse présager une cassure de la liaison C₃C₄ et la libération du groupement C3O7.

Du point de vue énergétique, il s'agit de l'étape limitante. La barrière d'activation (+23,0 kcal.mol⁻¹) est importante pour un système biologique, mais reste toutefois relativement basse en absence de catalyseur. Notons également que le modèle que nous étudions ici ne possède pas de troisième cycle aromatique et que cette barrière pourrait être plus basse avec la présence de ce cycle. L'intermédiaire *I2* est beaucoup moins stable que le précédent, l'étape suivante devrait nécessiter une énergie d'activation plus faible.

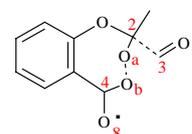
I.2.3.b. Etape *I2* → *I3*



La contribution majeure au mode normal associé à la fréquence imaginaire de l'état de transition *TS3* correspond à l'élongation de la liaison C3C4 (cf. Tableau 3). L'angle dièdre θ_{C4} augmente, le carbone C4 redevient sp². Les liaisons C4O8 et C4Ob sont renforcées, alors que la distance C2C3 augmente. On peut également noter la variation importante de la charge sur le carbone 4 : de +0,53e dans *I2* à +0,83e dans *I3*. Cette forte augmentation accompagne le renforcement des liaisons que forment cet atome avec O8 et Ob. Les charges sur les atomes C3 et O7 tendent vers des valeurs identiques à celles du monoxyde de carbone (+0,53e pour C et -0,53e pour O dans CO).

L'énergie de la barrière d'activation de cette étape est très faible : +0,3 kcal.mol⁻¹. Ceci s'explique par le fait que l'intermédiaire *I2* a une énergie élevée et que les atomes C3 et C4 ne forment déjà plus une véritable liaison. Cette valeur se situe nettement en dessous de la marge d'erreur de la méthode employée. Même si l'état de transition a bien été caractérisé, il est légitime de se demander si, en présence de catalyseur, cette étape ne serait tout simplement pas supprimée.

I.2.3.c. Etape *I3* → *PDT*₀

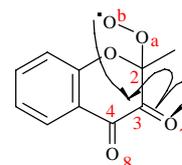


La dernière étape consiste en la formation des produits observés expérimentalement : formation de monoxyde de carbone et de l'ester d'acide benzoïque correspondant à l'oxydation du flavonoïde. Les liaisons C2C3 et OaOb (cf. Tableau 3) sont rompues. L'angle dièdre θ_{C2} augmente, le carbone 2 redevient sp². La longueur de la liaison C2Oa correspond bien à celle d'une double liaison. Dans le groupement carboxylate (C4O8Ob), les liaisons CO sont similaires. On peut supposer qu'il y a délocalisation de l'électron célibataire sur ce groupement et sur le cycle aromatique, d'autant que les

charges atomiques portées par Oa et Ob sont identiques. La distance C3O7 ainsi que la charge sur chacun de ces deux atomes sont du même ordre de grandeur que dans le monoxyde de carbone. Du point de vue énergétique, la dernière barrière est faible (+1,7 kcal.mol⁻¹). En revanche, les produits sont fortement stabilisés comme le reflète la variation d'énergie libre de cette étape (de l'ordre de 80 kcal.mol⁻¹).

I.2.4. Suite de la réaction : Cas de la cycloaddition 1,2 (intermédiaire dioxétane)

I.2.4.a. Etape *I1* → *I2'*



La cycloaddition 1,3 est en compétition avec la cycloaddition 1,2. Dans ce dernier cas, la suite de la réaction passe par la création de la liaison C3Ob (cf. Tableau 4). L'angle dièdre θ_{C3} diminue, les longueurs de liaison C2C3, C3C4 et C3O7 augmentent et le carbone 3 devient tétraédrique. Dans l'intermédiaire *I2'*, la liaison C2Oa est renforcée, ainsi que la liaison du groupement carbonyle C4O8. Dans le même temps, la liaison OaOb est affaiblie. On peut noter que le cycle dioxétane formé par les atomes C2C3ObOa n'est pas plan : l'angle dièdre formé par ces atomes est de 15,2°.

Tableau 4 : Evolution des paramètres structuraux (en Å et en degrés).

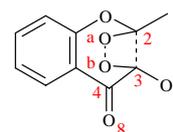
	<i>I1</i>	<i>TS2'</i>	<i>I2'</i>	<i>TS3'</i>	<i>PDT_{0'}</i>
C2C3	1,55	1,59	1,59	2,02	4,91
C2Oa	1,51	1,43	1,44	1,39	1,21
C3C4	1,55	1,63	1,68	1,57	1,55
C3O7	1,21	1,22	1,25	1,21	1,25
C3Ob	2,84	1,75	1,51	1,47	1,27
C4O8	1,22	1,20	1,20	1,22	1,22
OaOb	1,32	1,42	1,47	1,48	5,67
θ_{C3} (C4C3O7C2)	179,7	148,2	135,1		
$\theta_{C5C4C3Ob}$			99,3	76,9	5,3

Du point de vue électronique, les charges atomiques nettes portées par les atomes Oa et Ob augmentent. L'élongation des distances C3C4 et C2C3 et le renforcement de la liaison C4O8 s'accompagnent d'une modification importante de la charge sur ces atomes. La structure de

l'intermédiaire $I2'$ laisse anticiper la rupture de la liaison C3C4 lors de la prochaine étape. Mais on peut également prévoir une décomposition du dioxétane par la rupture de la liaison C2C3 ou OaOb.

Du point de vue énergétique, cette deuxième étape est l'étape limitante puisque l'énergie de la barrière d'activation est de $+15,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$. En revanche, l'énergie à fournir pour la cycloaddition 1,2 est moins importante que pour la cycloaddition 1,3 (différence d'environ 7 kcal.mol^{-1}).

I.2.4.b. Etape $I2' \rightarrow PDT_0'$



La dernière étape de l'oxydation du modèle suivant la cycloaddition 1,2 est l'ouverture du dioxétane (et non la rupture de la liaison C3C4). On obtient alors un seul produit de décomposition. Les longueurs de liaisons C3O7 et C3Ob tendent vers des valeurs similaires, tout comme la charge atomique sur O7 et Ob. La longueur de la liaison C2Oa et la charge sur ces atomes correspondent à celles d'une double liaison. L'angle dièdre formé par les atomes C5C4C3Ob montre que les groupements carboxylate et carbonyle ainsi que le cycle aromatique sont dans un même plan. Cet alignement autorise une meilleure délocalisation de l'électron célibataire.

Cette dernière étape nécessite une faible énergie d'activation de $4,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Même si le produit obtenu par la cycloaddition 1,2 n'est pas celui attendu (acide d'ester benzoïque), la variation d'enthalpie libre de cette dernière étape est de $-80,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$ montrant que la réaction est thermodynamiquement favorisée.

I.2.5. Conclusion partielle sur le mécanisme :

La Figure 5 illustre le fait que la barrière énergétique pour atteindre le deuxième état de transition est favorable à la formation du dioxétane (différence d'enthalpie libre d'environ 7 kcal.mol^{-1}) par rapport à l'intermédiaire de type endoperoxo. Toutefois nous n'avons pour l'instant pas considéré l'influence du système catalytique (centre métallique, ligands, environnement enzymatique, ...) sur la réaction. C'est ce que nous allons effectuer dans la suite de cette étude. Nous pouvons noter qu'il n'y a pas de libération de monoxyde de carbone lorsque la réaction passe par un intermédiaire dioxétane. Seule la formation d'un intermédiaire endoperoxo conduit à la formation de l'ester d'acide benzoïque et à la formation du monoxyde de carbone, produits caractérisés par les

expérimentateurs^{1,2,29}. Il est alors légitime de se demander comment l'enzyme peut influencer sur cette réaction.

I.3. Différences entre le modèle et la quercétine

Le modèle que nous avons étudié présentait les caractéristiques structurales du site 3-hydroxychromone de la quercétine. Afin de mieux comprendre le rôle des autres motifs structuraux du flavonoïde (fonction 5-OH, 7-OH et motif catéchol), nous avons choisi de compléter cette étude mécanistique par l'étude de l'oxygénolyse de la quercétine « complète ». Enfin, nous étendrons nos conclusions en étudiant également la dégradation d'autres flavonoïdes présentant le même motif 3-hydroxychromone.

I.3.1. Différences d'un point de vue énergétique

L'ensemble des points stationnaires des deux mécanismes de la réaction d'oxygénolyse ont été caractérisés. Une comparaison des profils énergétiques est présentée en Figure 7 (pour le mécanisme passant par l'intermédiaire endoperoxo) et en Figure 8 (pour le mécanisme passant par l'intermédiaire dioxétane).

L'étape limitante reste la formation de l'intermédiaire cyclique (à quatre ou cinq atomes). La formation de l'intermédiaire de type dioxétane reste thermodynamiquement favorisée par rapport à l'intermédiaire endoperoxo (différence d'enthalpie libre de 6,3 kcal.mol⁻¹). La réaction est thermodynamiquement favorisée puisque l'enthalpie libre de réaction est très négative (de l'ordre de 60 à 70 kcal.mol⁻¹).

La seule différence notable entre les profils énergétiques de la dégradation de la quercétine et du composé modèle concerne la première étape (formation de la première liaison quercétine-dioxygène). D'un point de vue énergétique, elle demande environ 3 kcal.mol⁻¹ de plus pour la quercétine par rapport au composé modèle. La suite de la réaction est sensiblement identique d'un point de vue énergétique, aussi bien pour la formation de l'intermédiaire dioxétane qu'endoperoxo.

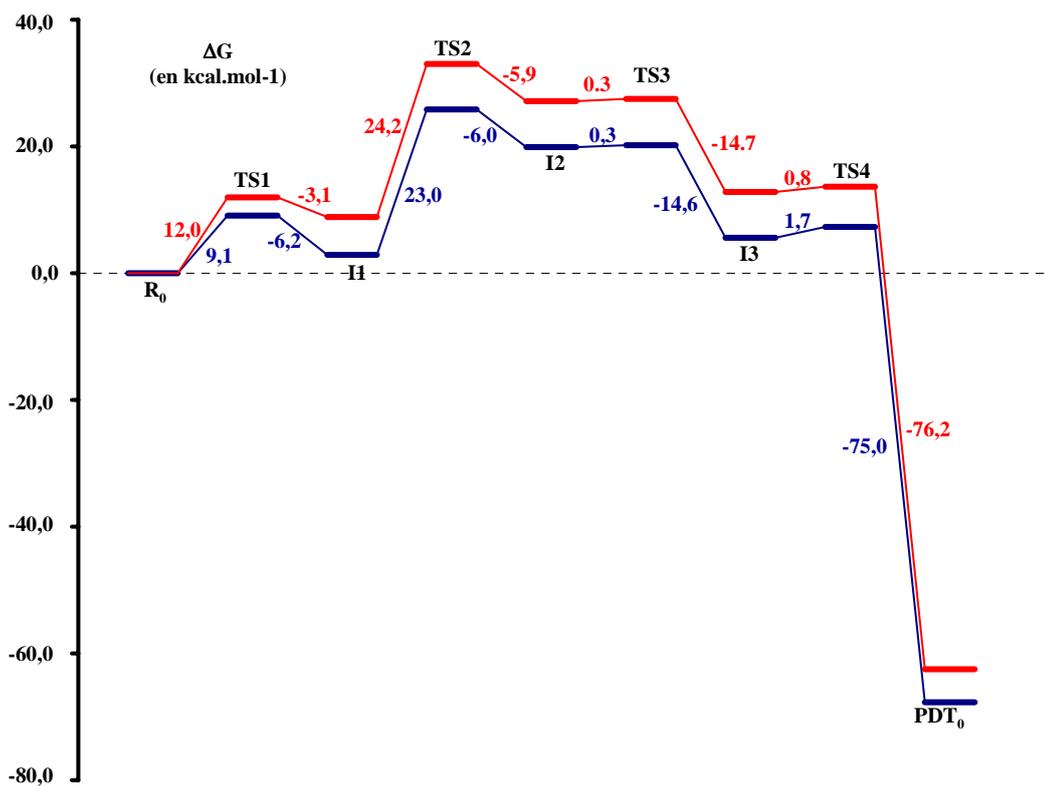


Figure 7 : Profil réactionnel de la réaction d'oxygénolyse (via l'intermédiaire endoperoxo) pour la quercétine (en rouge) et le modèle (en bleu).

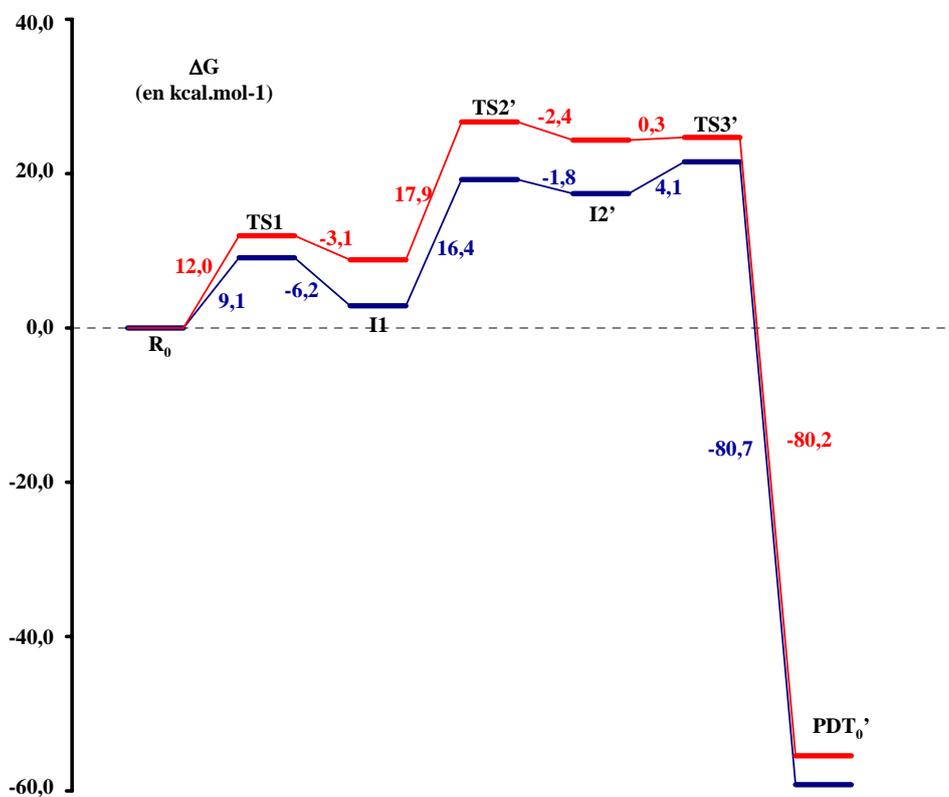


Figure 8 : Profil réactionnel de la réaction d'oxygénolyse (via l'intermédiaire dioxétane) pour la quercétine (en rouge) et le modèle (en bleu).

I.3.2. Différences structurales et électroniques

Les paramètres structuraux, énergétiques et électroniques évoluent au cours de la réaction de manière similaire à ceux rencontrés pour le composé modèle. Les différences les plus notables sont reportées pour l'étape $RI_0 \rightarrow TS1 \rightarrow I1$ et sont plus particulièrement dues à la présence du groupement catéchol plutôt qu'à la présence des groupements hydroxyles 5-OH et 7-OH.

En plus de la formation de la liaison C2Oa, les modifications structurales mises en jeu lors de la première étape font intervenir deux phénomènes : rotation du groupement catéchol et augmentation du caractère sp^3 pour l'atome de carbone C2 (pyramidalisation). La Figure 9 montre les structures des deux premiers états stables de la réaction et du premier état de transition.

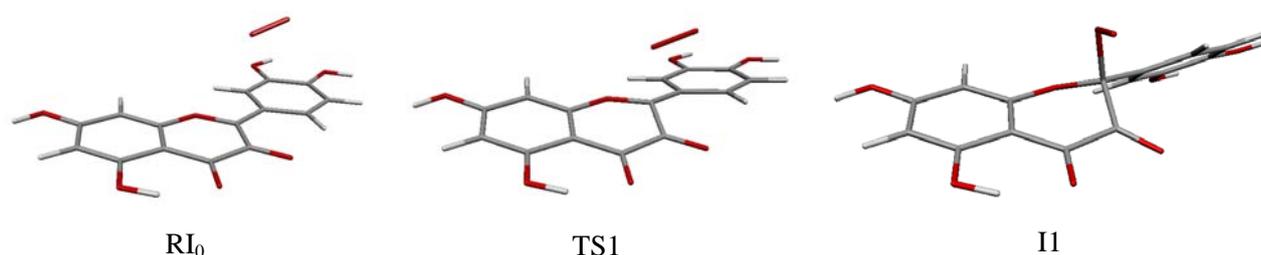


Figure 9 : Structures du complexe initial (RI_0) du premier état de transition ($TS1$) et du premier intermédiaire réactionnel ($I1$) de l'oxygénolyse de la quercétine.

Afin d'estimer l'importance de ces phénomènes structuraux sur l'énergie d'activation, nous avons caractérisé diverses structures successives de la quercétine en fonction de l'angle de rotation du catéchol (angle $O1C2C1'C2'$ variant de 0 à 20°) et de l'angle de pyramidalisation sur l'atome C2 (angle $O1C2C3C1'$ variant de 0 à 20°).

Une rotation de 20° du groupement catechol nécessite une énergie inférieure à $0,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Cette rotation n'entraîne pas la pyramidalisation de la position en C2 et n'influence pas la densité de spin atomique. En effet, Nous avons conclu dans le chapitre précédent qu'une déprotonation de la fonction 3-OH, suivie de la perte d'un électron faisait apparaître une densité de spin sur l'atome d'oxygène O3, mais surtout sur l'atome de carbone C2. Ici, la rotation du groupement catechol n'influe en rien sur cette répartition du spin.

En revanche, L'augmentation de l'angle dièdre θ_{C2} nécessite un peu moins de 6 kcal.mol^{-1} . Ce processus de pyramidalisation est accompagné d'une rotation du groupement catechol d'environ 20° par rapport à la quercétine initiale. Ce qui est d'autant plus intéressant, c'est l'évolution de la densité de spin atomique sur les atomes C2 et O3. En effet, la pyramidalisation de la position en C2 entraîne une augmentation du spin (d'environ 0,1) sur le carbone C2 et une diminution du spin (d'environ 0,05) sur l'atome O3.

Rappelons que l'énergie d'activation de la première étape a été estimée à 12,0 kcal.mol⁻¹ et qu'un peu moins de 6 kcal.mol⁻¹ sont nécessaires pour la seule pyramidalisation. En conséquence, nous pouvons supposer que la barrière énergétique de la première étape de l'oxygénolyse de la quercétine est essentiellement dépendante de la pyramidalisation de la position en C2. Cela pourrait avoir une importance dans le cas de la réaction catalysée par l'enzyme Quercétine 2,3-Dioxygénase. En effet, si le substrat, par le jeu d'interactions spécifiques avec l'enzyme, se retrouve dans une conformation proche d'une structure pyramidalisée, nous pourrions alors supposer que la quercétine sera activée par l'enzyme et susceptible de réagir directement avec le dioxygène.

I.3.3. Oxygénolyse d'autres flavonoïdes

Nous avons vu précédemment que la différence de réactivité entre la quercétine et le modèle est faible. Nous pouvons en déduire que seul le site réactif 3-hydroxychromone serait nécessaire à la réaction. Des résultats expérimentaux² ont pourtant montré que des taux de dégradation différents étaient obtenus au sein de l'enzyme 2,3-QD (Cf. Tableau 5). Ce taux est défini comme le rapport entre la quantité de substrat oxydée par minute et la quantité de quercétine oxydée par minute.

Tableau 5 : Taux de dégradation de quatre flavonoïdes (la quercétine est prise comme référence). La substitution du cycle B par des groupements hydroxyles est rappelée.

	Substitution du cycle B	taux de dégradation relatifs
Galangine	-	0,30
Kaempférol	4'	2,54
Quercétine	3' et 4'	1
Myricétine	3', 4', et 5'	0,87

Afin de savoir si la description du chemin réactionnel suffit à expliquer ces différences, nous avons caractérisé les intermédiaires et les états de transition de l'oxygénolyse de ces trois nouveaux flavonoïdes pour le mécanisme passant par la formation de l'intermédiaire endoperoxo. Il est inutile de présenter en détail l'ensemble des étapes tant les résultats sont proches d'un point de vue structural et électronique. Les valeurs d'énergie de transition sont très similaires d'un flavonoïde à l'autre et seule la première étape de la réaction fera l'objet d'une discussion dans le paragraphe suivant. Les deux premières barrières énergétiques (RI → TS1 et I1 → TS2) sont reportées en Figure 10 en regard des structures des flavonoïdes pour lesquelles elles ont été calculées. Est également présentée la structure

d'un autre composé modèle que nous appellerons flavonol, et sont également rappelées la structure de la quercétine et celle du premier composé modèle sur lequel nous avons basé notre première étude.

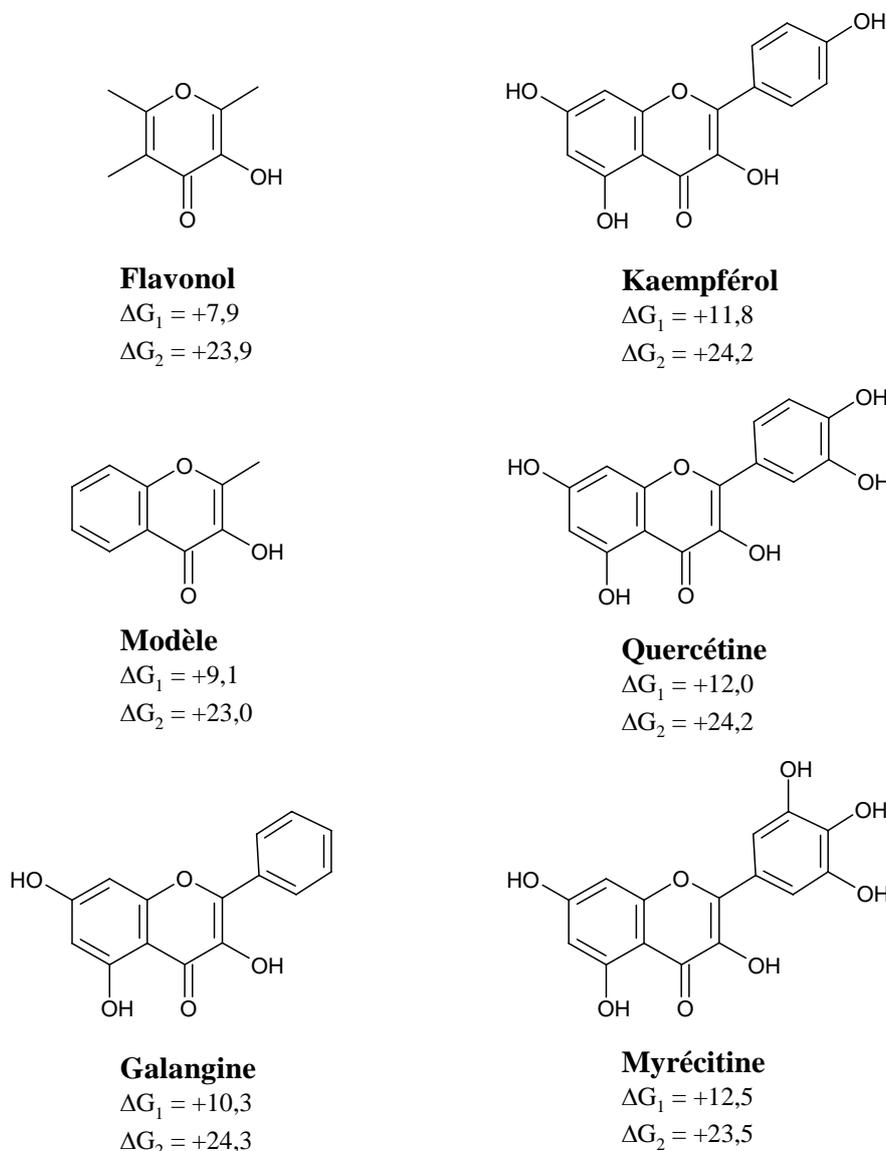


Figure 10 : Structures de composés présentant un motif 3-hydroxychromone et barrières énergétiques (en kcal.mol⁻¹) des deux premières étapes de leur oxygénolyse.

Comme le montrent ces résultats, le degré de fonctionnalisation du flavonoïde n'a que peu d'influence sur la barrière énergétique de l'étape limitante (ΔG_2). Les seules différences significatives sont reportées pour les énergies de la première étape (ΔG_1). On peut remarquer que plus le cycle B est substitué et plus l'addition du dioxygène sur l'atome de carbone C2 demande de l'énergie. Cette valeur d'énergie est en très bon accord avec le fait que la contribution au mode normal de vibration de la fréquence imaginaire du premier état de transition est essentiellement due à la pyramidalisation de la position en C2 et au mouvement du cycle catéchol. Si la structure du flavonoïde n'a que peu

d'influence sur le mécanisme réactionnel de l'oxygénolyse en l'absence de toute interaction directe (contrairement aux résultats expérimentaux montrant une différence significative du taux de dégradation), c'est que la reconnaissance du substrat par l'enzyme 2,3-QD doit certainement induire une modification de la surface de potentiel.

I.4. Rôle du cuivre

Un ion cuivre(II) est au centre du site actif de l'enzyme 2,3-QD. Nous avons jusqu'à présent considéré que le cuivre jouait uniquement un rôle d'oxydant vis-à-vis du substrat (transfert d'un électron) et effectué nos calculs sur un système déprotoné radicalaire. Pour mieux cerner le rôle du cuivre sur l'oxygénolyse de la quercétine, nous avons dans un premier temps ré-optimisé les géométries des intermédiaires réactionnels et des états de transition du modèle de quercétine en considérant que le transfert électronique vers le cuivre n'a pas eu lieu. Le système est alors uniquement déprotoné, la charge globale est de -1 et la multiplicité de spin de 3. Dans un deuxième temps, nous avons ajouté un ion Cu^{2+} sur les structures des intermédiaires réactionnels et comparé celles-ci aux structures précédemment obtenues.

I.4.1. Influence sur les barrières d'énergies

L'ensemble du chemin réactionnel (intermédiaire et état de transition du système déprotoné) a été caractérisé. Le profil réactionnel est relativement proche de celui présenté dans la Figure 6. D'un point de vue structural, cette réaction comporte de nombreuses similitudes avec celle du modèle déprotoné radicalaire. L'étape limitante est toujours constituée de la formation de l'intermédiaire cyclique, et la réaction est globalement très exothermique.

La formation de l'intermédiaire cyclique a pour conséquence l'appariement des deux électrons célibataires. La multiplicité de spin du système change donc au cours de la réaction, et le passage de l'intermédiaire de multiplicité 3 à celui de multiplicité 1 s'effectue par un phénomène de désexcitation. Le système est ainsi stabilisé de $46,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

En revanche, la différence essentielle entre l'oxygénolyse du système déprotoné radicalaire et celui uniquement déprotoné se situe au niveau de la barrière d'énergie de l'étape limitante. L'énergie nécessaire à la formation de l'intermédiaire cyclique de type endoperoxo est nettement plus élevée

dans le cas où le modèle est uniquement déprotoné (+38,2 contre +23,0 kcal.mol⁻¹). Cette information nous montre que l'oxydation de la quercétine par le cuivre facilite la réaction d'oxygénolyse.

I.4.2. Influence sur la compétition cycloaddition 1,2 vs 1,3

Le cuivre a également une influence sur les structures des intermédiaires réactionnels. Alors qu'en présence de cuivre nous avons caractérisé un intermédiaire cyclique de type endoperoxo, seule une forme ouverte correspondant à l'intermédiaire de type dioxétane a pu être localisée. Le chemin passant par l'intermédiaire endoperoxo était jusqu'à présent en compétition avec celui passant par l'intermédiaire dioxétane. Mais il est impossible d'avoir la réaction qui amènerait à l'ouverture du dioxétane si celui-ci n'est pas formé. Ce résultat est cohérent avec les résultats obtenus par les expérimentateurs qui observent un produit de dégradation unique (PDT₀ et non PDT₀').

I.4.3. Influence sur les paramètres électroniques

La densité de spin atomique sur le cuivre pour l'ensemble des intermédiaires réactionnels est proche de zéro. L'atome de cuivre conserve une charge constante de 0,92e tout au long de la réaction. Ces deux renseignements montrent qu'un transfert électronique a lieu dès la formation du complexe cuivre-quercétine. Pour le système étudié, la quercétine reste oxydée et le cuivre conserve une configuration électronique 4s⁰3d¹⁰. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la complexation avec le cuivre sur le site 3-hydroxychromone a pour effet d'activer la position en C2 de la quercétine.

Pour résumer, le cuivre joue un rôle d'oxydant de la quercétine. Cette oxydation a lieu avant l'addition du dioxygène sur la quercétine et cela permet d'activer la position en C2 et d'abaisser la barrière d'énergie de l'étape limitante de 15,2 kcal.mol⁻¹. De plus, le cuivre ne permet pas la formation de l'intermédiaire de type dioxétane.

Nous avons identifié les différentes étapes du chemin réactionnel et rationalisé le rôle du cuivre sur la dégradation de la quercétine. En revanche, nous ne savons toujours pas si le dioxygène s'additionne d'abord sur le cuivre puis sur la quercétine comme proposé par Siegbahn¹⁵ ou s'il réagit directement avec la quercétine. De plus, nous avons montré que le processus réactionnel était quasiment identique pour différentes flavonoïdes, ce qui est en contradiction avec les taux variables de dégradation de ces substrats au sein de l'enzyme. L'étude structurale de l'enzyme va nous permettre d'obtenir de nouvelles informations pour tenter de répondre à ces deux questions.

II. Etude structurale de l'enzyme

Lors de mécanismes de catalyse enzymatique, deux processus (reconnaissance et activation) jouent un rôle crucial sur la sélectivité et l'efficacité du système biomoléculaire. Les structures statiques, telles qu'obtenues par RX, apportent des informations précieuses quant à la position de l'inhibiteur ou du substrat dans l'enzyme et quant aux sites privilégiés d'interaction enzyme/substrat. Récemment les structures RX de la Quercétinase native (code PDB : 1JUH) et du complexe enzyme/substrat (code PDB : 1H1I) ont été résolues par l'équipe de R.A. Steiner^{14, 29}.

II.1. Méthodologie

Le site actif de l'enzyme est constitué d'un ion cuivre(II) coordonné à trois histidines et à un glutamate. Il semble acquis que le rôle de ce dernier serait de déprotoner la fonction 3-OH de la quercétine, et comme nous l'avons vu précédemment, il faut prendre en compte un transfert électronique depuis la quercétine vers le cuivre. La position du substrat, chélaté de façon monodentate au cuivre, indique que l'étape d'oxydoréduction évoquée précédemment doit avoir lieu. Enfin, la résolution de la structure de l'enzyme native sous atmosphère anaérobie n'a pas permis de savoir si l'entrée du dioxygène dans l'enzyme précède celle du substrat. Ce système moléculaire a été étudié en 2004 par des simulations de dynamique moléculaire³¹. Les auteurs ont rapporté de nombreuses indications relatives aux comportements de l'enzyme vide et des interactions enzyme/substrat. Toutefois, les réponses aux questions restées en suspens au terme de l'étude mécanistique n'ont pas été totalement apportées par cette étude. Cette partie résume les résultats les plus pertinents que nous avons obtenus lors de la production de plusieurs trajectoires de dynamiques moléculaire sur l'enzyme native ou le système enzyme/substrat.

II.1.1. Enzyme native et Système E/S

Les structures de départ ont été construites à partir d'un monomère de la structure expérimentale (cristallisé sous forme de tétramère) mise en ligne sur la Protein data Bank (1JUH et 1H1I pour respectivement l'enzyme native et le complexe enzyme/substrat noté E/S). La position des résidus numérotés 155 à 163 (1JUH) et 157-158 n'est pas définie dans les structures RX. Ils ont été ajoutés manuellement puis relaxés dans le module LEAP du programme AMBER³². Les molécules d'eau initialement présentes dans le site actif de l'enzyme ont été conservées : 8 dans le cas de l'enzyme native et 2 pour le complexe E/S. Le système a été neutralisé en ajoutant 17 contre-ions Na⁺,

placés dans les régions de l'espace où le potentiel électrostatique de l'enzyme était le plus négatif selon la procédure implémentée dans le module LEAP. Une boîte de solvant (modèle d'eau de type TIP3P³³) a été placée sur une distance de 15 Å autour de l'enzyme, correspondant à 17183 et 17319 molécules d'eau respectivement pour l'enzyme native et le complexe E/S.

II.1.2. Mise au point des paramètres van der Waals des atomes de Cuivre(I) et (II)

Il a été montré par ailleurs que la quercétine était oxydée dès sa complexation avec le site actif de l'enzyme. Le cuivre aura donc un état d'oxydation +I lorsque nous étudierons le complexe E/S et +II lorsque l'on étudiera l'enzyme native. Le métal a été considéré comme un cation et aucune contrainte sur une liaison métal-ligand n'a été appliquée. Les paramètres van der Waals du cuivre(II) ont été repris d'études traitant déjà d'un tel système^{34, 35}. En revanche de nouveaux paramètres van der Waals pour Cu(I) ont dû être mis au point. Nous avons optimisé les paramètres van der Waals du cuivre pour les quatre complexes : $[\text{Cu}(\text{NH}_3)]^+$, $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2]^+$, $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_3]^+$ et $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_3\text{OCHO}]$ afin d'obtenir une bonne adéquation sur les énergies de complexation et les distances métal-ligand entre les calculs quantiques au niveau B3LYP/6-311+G* et les calculs classiques. Nous nous sommes pour cela appuyés sur l'équation du potentiel van der Waals de type Lennard-Jones telle qu'elle est définie dans le champ de forces AMBER :

$$\sum_{i < j} \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right]$$

Les paramètres utilisés pour l'atome de cuivre sont les suivants : Cu(+I) : $q = +1$, $r_{\text{vdw}} = 0,960$, $\varepsilon_{\text{vdw}} = 0,065$; Cu(+II) : $q = +2$, $r_{\text{vdw}} = 1,200$, $\varepsilon_{\text{vdw}} = 0,050$.

II.1.3. Mise au point des paramètres de la quercétine

Nous avons considéré une molécule de quercétine déprotonée et oxydée. Les paramètres de liaison, d'angle de valence et de torsion ont été obtenus sur la base des structures optimisées au niveau B3LYP/6-31(+)-G* en utilisant le programme Gaussian98. Les charges atomiques de la quercétine déprotonée radicalaire ont été obtenues en suivant la procédure de calcul de charge RESP^{36, 37}. Le potentiel électrostatique a également été calculé au niveau B3LYP/6-31(+)-G*. Les types d'atomes et leurs charges RESP sont présentés dans le Tableau 6 et les paramètres structuraux et les constantes de forces associées dans le Tableau 7.

Tableau 6 : Types d'atome tels qu'ils sont définis dans le champ de forces AMBER pour la quercétine déprotonée radicalaire et charges RESP correspondantes.

	Type d'atome	Charge (en e)
O1	OS	-0,104
O3	O2	-0,538
O4	O	-0,478
O5	OH	-0,491
O7	OH	-0,500
O3'	OH	-0,579
O4'	OH	-0,525
C2	CM	0,184
C3	CM	0,325
C4	C	0,370
C5	CA	0,148
C6	CA	-0,164
C7	CA	0,135
C8	CA	-0,090
C9	CM	-0,067
C10	CM	-0,023
C1'	CA	-0,096
C2'	CA	-0,270
C3'	CA	0,157
C4'	CA	0,358
C5'	CA	-0,286
C6'	CA	-0,143
H5	HO	0,436
H6	HA	0,153
H7	HO	0,430
H8	HA	0,157
H2'	HA	0,225
H3'	HO	0,464
H4'	HO	0,453
H5'	HA	0,205
H6'	HA	0,154

Tableau 7 : Paramètres structuraux utilisés pour la quercétine.

	Constantes de force (en kcal.mol⁻¹)	Paramètres structuraux
CA-OH	300,0	1,355 Å
CM-OS	300,0	1,365 Å
CM-O2	300,0	1,244 Å
CA-CA-OH	100,0	119,6°
CA-CM-OS	100,0	114,7°
CA-OH-HO	100,0	108,3°
CA-CM-C	100,0	121,3°
CM-CA-OH	100,0	120,5°
CM-CM-OS	100,0	120,7°
CM-C-CM	100,0	117,0°
CM-OS-CM	100,0	123,3°
CM-CM-O2	100,0	123,3°
CM-CA-CA	100,0	121,1°
CM-CA-HA	100,0	121,4°
C-CM-O2	100,0	119,2°
X-CA-OH-X	10,0	180,0°
X-CM-OS-X	10,0	180,0°

II.1.4. Simulations de dynamique moléculaire

Les simulations ont été effectuées à l'aide du programme AMBER6³² et du champ de forces parm99.dat³⁸. Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées dans l'ensemble thermodynamique isotherme-isobare NPT à 310K et 1 atmosphère, en utilisant l'algorithme de contrainte de liaison SHAKE^{39, 40} qui permet de figer les liaisons impliquant les atomes d'hydrogène. Un pas d'intégration de 2 femto-secondes a été utilisé, et un cut-off de 8 Å a été appliqué sur les interactions van der Waals entre atomes non-liés (la liste de ces atomes a été mise à jour tous les 25 pas). Les conditions limites périodiques ont été définies en utilisant l'algorithme PME⁴¹⁻⁴⁴ (*Particle Mesh Ewald*).

Une fois les contre-ions et la boîte d'eau ajoutés à la structure initiale, 2000 pas de minimisation en gardant le soluté et les ions fixes, suivi de 2000 pas de minimisation en gardant le

solvant fixe ont été effectués. La phase de pré-équilibre du système a été poursuivie par une dynamique de 50 ps en conservant le soluté fixe. Puis, 2000 pas de minimisation et 50 ps de dynamique, en utilisant une contrainte de $30 \text{ kcal.}(\text{mol.}\text{Å}^2)^{-1}$ sur le soluté, ont été réalisés. Six nouvelles séquences de 2000 pas de minimisation et de dynamiques ont été effectués en réduisant à chaque séquence la contrainte de $5 \text{ kcal.}(\text{mol.}\text{Å}^2)^{-1}$ pour laisser au système le temps de se relaxer. Le système est ensuite lentement « chauffé » de 100 à 310K sur une période de 20 ps lors de la phase de thermalisation. La phase d'équilibration du système est poursuivie sur une période de 50 ps après la phase de thermalisation.

Afin d'échantillonner plus largement les phénomènes dynamiques opérant au sein du système, plusieurs phases de production possédant des conditions initiales différentes ont été produites. Pour l'enzyme native, nous avons lancés deux phases de production (pour un total de 5 ns) en prenant des vitesses initiales différentes. Pour le complexe enzyme/substrat, 5 simulations différentes (pour un total de 7,2 ns) ont été réalisées en considérant différentes conditions initiales (vitesses initiales et positions de la molécule d'eau dans la cavité). Une molécule d'eau est présente en fond de poche dans la structure RX (position 1 : entre la fonction 4'-OH de la quercétine et l'acide aminé Thr53). Une analyse des trajectoires nous a amené à considérer une position alternative pour cette molécule d'eau (position 2 : entre les fonctions 3'-OH et 4'-OH et l'acide aminé Asn74) mais aussi à considérer l'absence de celle-ci. Les conditions initiales et les temps de simulation sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Conditions initiales et temps de simulations pour chaque dynamique moléculaire
(a) : Cu(II) et Glu73. (b) : quercétine déprotonée radicalaire, Cu(I) et Glu73 protoné.

	Conditions initiales	Position de la molécule d'eau	Temps de simulation
N1	(a)	-	3 ns
N2	(a)	-	2 ns
ES1	(b)	Position 2	3 ns
ES2	(b)	Position 1 (RX)	1,5 ns
ES3	(b)	Position 1 (RX)	1,1 ns
ES4	(b)	Absente	1,1 ns
ES5	(b)	Absente	0,5 ns

II.1.5. Energie de complexation

Afin de déterminer les enthalpies libres de complexation, une analyse MM_PBSA, implémentée dans le logiciel AMBER, a été réalisée sur chaque système E/S. La procédure standard a été utilisée, et l'enthalpie libre de solvatation a été estimée en utilisant la méthode *Generalized Born Method* intégrée au module SANDER⁴⁵⁻⁴⁸. Nous avons eu besoin d'ajouter les paramètres GB/SA LCPO^{49, 50} du cuivre dans le fichier mdread.f. Pour cela, nous avons suivi la même démarche que pour l'ion Mg²⁺ tel que présenté dans ce même fichier. Nous avons tenté de faire varier ces paramètres mais l'énergie de complexation ne semble pas varier significativement. Nous avons donc conservé les paramètres présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : paramètres GB/SA pour l'ion cuivre(I)

GB/SA van der Waals	0,960 + 1,4
GB/SA LCPO (P1)	0,49392
GB/SA LCPO (P2)	-0,16038
GB/SA LCPO (P3)	-0,00015512
GB/SA LCPO (P4)	0,00016453

II.1.6. Calculs quantiques

Pour mieux comprendre le rôle des acides aminés constituant la cavité autour du site actif, nous avons extrait différentes structures des trajectoires et relaxé ces systèmes sur 2000 pas de minimisation. Des calculs « *Point Charge* »^{51, 52} de chimie quantique sans optimisation de géométrie ont été réalisés en prenant en compte la quercétine déprotonée radicalaire au niveau B3LYP/6-31(+)-G*. Les résidus (n° 33, 35, 51, 52, 53, 63, 67, 69, 73, 74, 75, 112, 123, 132, 135, 136, 139, 163, 169, 172, 175 et 176) autour de la quercétine, le centre métallique et les deux molécules d'eau au sein de la cavité ont été intégrés dans le calcul en tant que distribution de charge autour du substrat. Cette méthode nous a permis de quantifier la polarisation de la quercétine par l'environnement enzymatique puisque nous utilisons un champ de forces non-polarisable.

II.2. Analyse structurale

Nous avons vérifié que le système 2,3QD complexé ou non était bien représentatif de la structure expérimentale. Pour analyser la structure globale d'une protéine on fait souvent appel à l'écart quadratique moyen (*Root mean square deviation* ou RMSd) entre la structure au cours de la simulation et la structure cristallographique (ou de départ). Le RMSd entre deux structures 1 et 2 est calculé suivant l'équation suivante :

$$\text{RMSd} = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_i m_i \|r_{i,1} - r_{i,2}\|^2}$$

Nous avons vérifié que la phase de relaxation du système ne modifiait pas la structure de la Quercétinase en comparant les structures cristallographiques (1JUH et 1H1I) avec les structures de départ de chaque phase de production. Le RMSd est compris entre 1,04 et 1,35 Å pour les systèmes E/S alors qu'il est d'environ 1,97 Å pour les systèmes N1 et N2. Ces valeurs sont relativement faibles et montrent que l'enzyme n'a pas été dénaturée durant la phase d'équilibration/thermalisation. Le domaine N-terminal de l'enzyme contenant le site catalytique (en bleu et à droite sur chaque image) subit les plus faibles variations de structure. L'une des parties les plus mobiles correspond à la séquence d'acides aminés 146-204 (en jaune-vert à droite de chaque image). Il s'agit du *linker* (motif structural défini par Fusetti *et al.*¹⁴) reliant les deux sous-unités de l'enzyme. La Figure 11 illustre ces modifications structurales. Les valeurs de RMSd sont représentées par un code couleur allant du bleu au rouge respectivement pour les valeurs minimales et maximales.

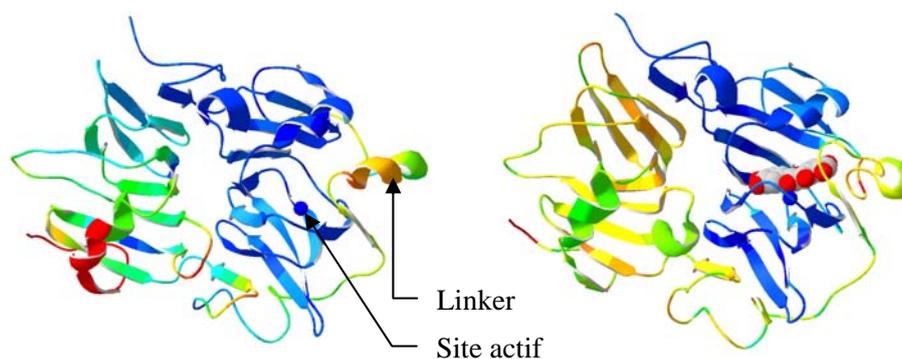


Figure 11 : Structure de départ de la phase de production de l'enzyme native (à gauche) et du complexe E/S (à droite). La structure secondaire de l'enzyme est colorée suivant les valeurs de RMSd.

II.2.1. Rôle du linker

En prenant comme référence la première structure de chaque simulation, la valeur du RMSd est inférieure à 2,5 Å pour chaque simulation, révélant ainsi la stabilité des systèmes au cours du temps. Une analyse plus fine des modifications structurales au cours des trajectoires a été effectuée à l'aide du calcul des fluctuations atomiques (RMSf) des C α du squelette carboné de l'enzyme. La Figure 12 montre les différences entre les systèmes natifs et complexés.

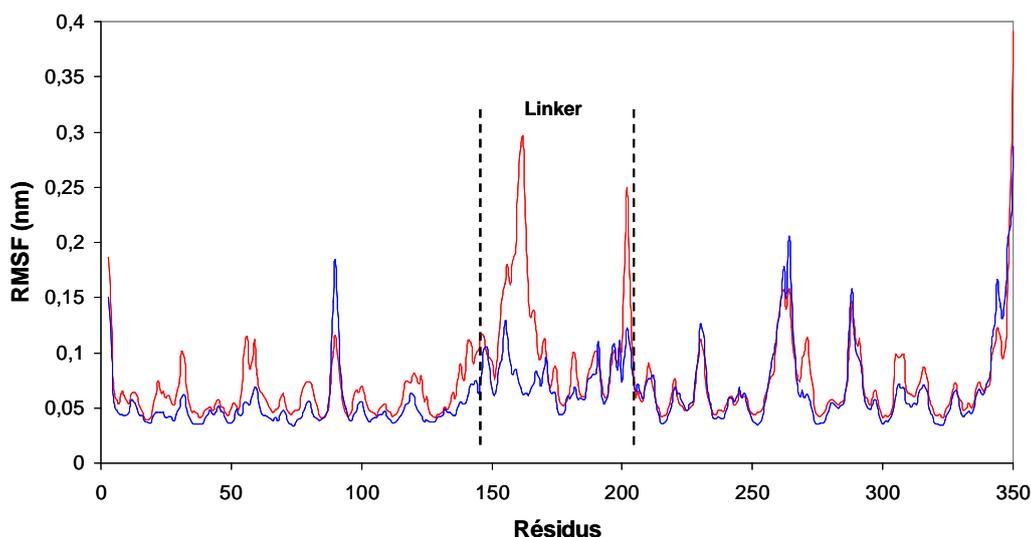


Figure 12 : RMSf du squelette carboné de la protéine native (en rouge) et du complexe E/S (en bleu)

On peut noter une nette baisse de mobilité du linker (résidus 146-204) lorsque le substrat est présent dans la cavité. Ces résultats sont en très bonne adéquation avec les simulations effectuées par van den Bosh *et al.*³¹ et l'indétermination structurale de cette région dans la structure expérimentale (position indéterminée de ces résidus dans la structure RX). Le linker peut être décomposé en plusieurs sous-parties. Deux zones présentent les caractéristiques de mobilité d'une boucle (résidus 146-153 et 170-199) en présence ou non du substrat. En revanche, les mobilités des zones définies par les résidus 154-169 et 200-204 dépendent de l'incorporation du substrat dans le site actif.

II.2.1.a. Fermeture de l'entrée de la cavité par la Pro164 et solvation de la cavité

Les acides aminés numérotés de 200 à 204 sont proches du domaine C-terminal de l'enzyme et n'interagissent pas directement avec le substrat. En revanche, la région définie par les résidus 154-164 contribue à bloquer le substrat au sein de la cavité de l'enzyme. Plus précisément, la Pro164 est située à l'entrée de la cavité et a déjà été décrite par van den Bosh *et al.*³¹ comme constituant un « verrou » permettant de maintenir le substrat dans l'enzyme. La distance moyenne Pro164-Leu139 (acide aminé

situé sur l'hélice alpha faisant face à la Pro164 à l'entrée de la cavité) confirme les différences rencontrées entre l'enzyme native ($d_{164-139} \approx 6,7 \text{ \AA}$) et le système E/S ($d_{164-139} \approx 4,7 \text{ \AA}$).

Cette perte de mobilité du linker reflète un étirement de celui-ci et une modification structurale de l'hélice alpha H3, élément constitutif du linker. Cette modification peut-être quantifiée par le calcul des distances moyennes entre l'atome d'oxygène O du résidu $i^{\text{ème}}$ et l'atome d'hydrogène H du résidu $i+4$. Ces grandeurs ont été calculées pour les acides aminés 162 à 175 et sont reportés en Figure 13.

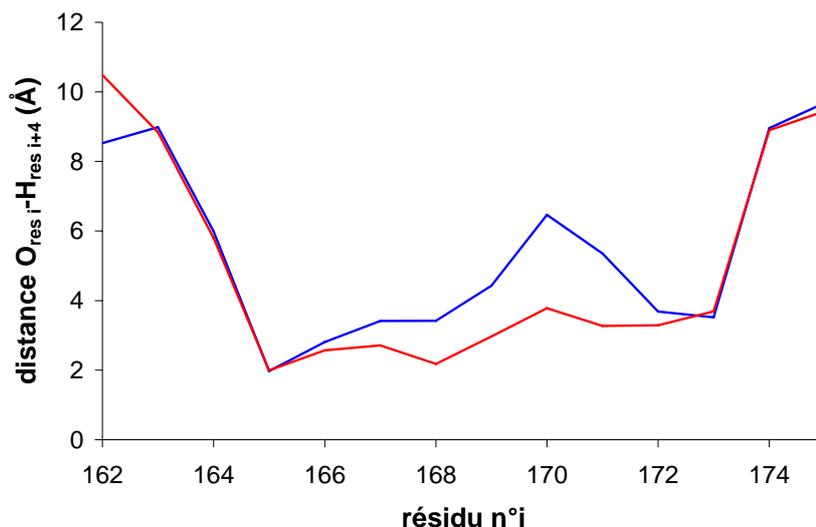


Figure 13 : distance moyenne entre l'atome O du résidu $i^{\text{ème}}$ et l'atome H du résidu $i+4$ pour l'enzyme native (en rouge) et pour le complexe E/S (en bleu).

La Figure 13 permet d'identifier facilement les résidus constitutifs de l'hélice alpha (résidus 165 à 173). La valeur de la distance entre les résidus 170 et 174 augmente significativement et montre que l'hélice alpha H3 se débobine en présence du substrat. Toutefois, la valeur moyenne de la distance $O_{\text{resi}}-H_{\text{resi}+4}$ est à nuancer puisque deux périodes différentes ont pu être identifiées au cours des dynamiques sur l'enzyme native. Durant une première période (allant de 0 à 700 ps) le nombre de molécules d'eau au sein de la cavité augmente de 8 à environ 13-14 puis fluctue autour de cette dernière valeur (cf Figure 14). Comme nous allons le voir, la solvataion de la cavité joue un rôle important dans la structure de l'enzyme.

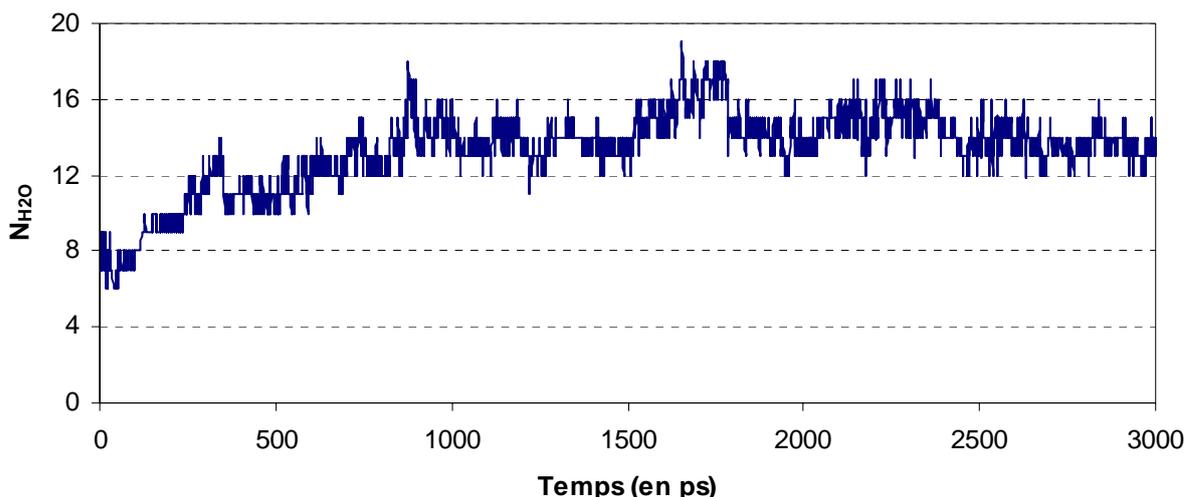


Figure 14 : Nombre de molécule d'eau (N_{H_2O}) dans un rayon de 9 Å autour du cuivre en fonction du temps (en ps) pour l'enzyme vide. Les molécules d'eau sont localisées dans la cavité accueillant le site actif.

II.2.1.b. Volume de cavité

Le module de calcul de cavité implémenté dans le logiciel Swiss-PDB viewer développé par Guex *et al.*⁵³ nous a permis d'obtenir le volume de la cavité pour l'ensemble des systèmes moléculaires étudiés (N1, N2 et ES1-ES5). La taille de la grille déterminant la précision du calcul a été fixée à 0,70 Å (qualité 3-4 dans SwissPDB). Le volume de la cavité dans la structure native augmente de 240 Å³ à une valeur estimée à 520 Å³ après 700 ps. Cette dernière valeur est très proche de celles calculées pour les structures E/S. Lorsque la quercétine est présente dans le site actif, le volume moyen de la cavité est d'environ 530 Å³.

La déformation de l'hélice alpha H3 a lieu durant les premières 1,2 ns de la simulation. Cette période (légèrement supérieure à celle du remplissage de la cavité par les molécules d'eau) est nécessaire à la relaxation de la structure de l'enzyme. Cette observation est confirmée par l'évolution de la distance $O_{Ser170}-H_{Ser174}$ qui varie autour de 2,6 Å entre 0 et 1,2 ns puis autour de 4,6 Å de 1,2 ns jusqu'à la fin de la simulation. Parallèlement, la distance Pro169-Leu139, qui reflète la fermeture de la cavité, évolue de façon similaire à la distance $O_{Ser170}-H_{Ser174}$. La distance moyenne est de 7,9 Å pour la première période et 5,6 Å pour la deuxième. Pour les systèmes E/S, les distances Pro169-Leu139 et $O_{Ser170}-H_{Ser174}$ sont constantes, respectivement autour des valeurs 4,7 Å et 6,5 Å.

Ces résultats mettent en avant un phénomène allostérique dû à la présence du substrat dans l'enzyme : lorsque le substrat est présent dans l'enzyme le volume de la cavité s'adapte au substrat et a pour conséquence d'accroître la tension du linker et de diminuer la mobilité de ce dernier.

II.2.2. Interactions Enzyme/substrat

Afin de rationaliser le processus d'activation et de reconnaissance du substrat par l'enzyme, nous avons étudié les interactions substrat/centre métallique et substrat/résidus du site actif. Pour cela nous avons décomposé cette étude en trois parties : une analyse structurale du site actif, une analyse des interactions hydrophobes et hydrophiles entre le substrat et l'enzyme, et enfin le calcul de l'enthalpie libre de complexation.

II.2.2.a. Analyse du site actif

Les enzymes à cuivre peuvent être classées selon trois catégories en fonction du nombre d'atomes de cuivre présents au sein du site actif, de son degré d'oxydation et du nombre de ligands⁵⁴. Les enzymes à cuivre de type I possèdent quasi-exclusivement une géométrie tétraédrique autour du centre métallique. Elles sont également appelées « *blue copper proteins* » pour leur forte absorbance dans la zone du spectre allant de 600 à 620 nm. Un site actif à base de cuivre de type II peut adopter plusieurs géométries : trigonal, plan-carré, bipyramide trigonale ou encore octaédrique déformé. Ces centres métalliques sont généralement impliqués dans des processus d'oxydation. Enfin les enzymes à cuivre de type III possèdent deux atomes de cuivre liés par un atome d'oxygène dans leur site actif, chaque atome de cuivre possédant généralement cinq ligands.

La 2,3-QD contient un centre métallique à base de cuivre de type II. Les études cristallographiques et spectroscopiques sur la quercétinase^{14,27-30} ont permis d'identifier deux coordinations différentes pour le cuivre (tétraédrique et bipyramide trigonale déformée) dans la structure native et une seule (bipyramide trigonale déformée) pour le complexe enzyme/substrat. La Figure 14 montre les deux modes de coordination du cuivre : dans le premier cas, le cation métallique est lié aux atomes N_{ε2} des trois histidines et à la molécule d'eau en position d (noté Wat_d sur la Figure 14), et dans le deuxième cas la chaîne latérale du Glu73 déplace la molécule d'eau en position b (Wat_b).

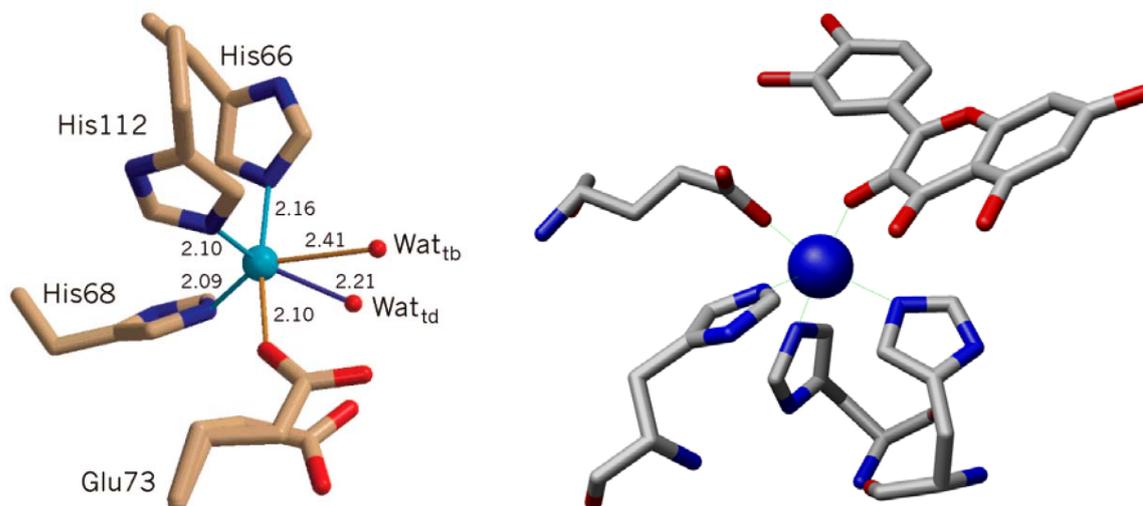


Figure 14 : Site actif de la quercétinase native (à gauche d'après la référence²⁸) et du complexe enzyme substrat (à droite d'après la référence²⁹).

Tout au long des dynamiques moléculaires, le cation Cu^{2+} ou Cu^+ respectivement pour l'enzyme vide et le complexe enzyme/substrat reste fortement lié aux ligands de sa première sphère de coordination. Quelle que soit la simulation, les distances moyennes Cu-His₆₆, Cu-His₆₈, Cu-His₁₁₂ varient peu et sont en accord avec celles rencontrées dans la structure expérimentale (environ 2,1-2,2 Å). La distance moyenne Cu-Glu₇₃ est légèrement plus courte (1,92 Å vs 2,1-2,3 Å) que la valeur expérimentale de l'enzyme native. La cinquième position autour du métal est occupée par des molécules d'eau dans l'enzyme vide et par la quercétine dans le complexe enzyme/substrat. En considérant l'enzyme native, le calcul de la fonction de distribution radiale des atomes d'oxygène des molécules d'eau autour du cuivre montre que deux molécules d'eau sont présentes à une distance d'environ 2,0 Å du cuivre. La deuxième sphère de solvation se situe à environ 4,2 Å. Comme nous allons le montrer par la suite, les interactions substrat/résidus constituant le site actif mènent à une coordination monodentate de la quercétine sur le cuivre. Le Tableau 10 rassemble l'ensemble de ces valeurs pour les sept dynamiques moléculaires effectuées et montre que la structure du site actif est en très bon accord avec les structures RX.

Tableau 10 : Distances moyennes métal-ligand (en Å) des sept simulations et distances métal-ligand dans les structures expérimentales.

	ES1	ES2	ES3	ES4	ES5	N1	N2	E/S RX	Native RX
Cu-His₆₆	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.1	2.2
Cu-His₆₈	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.2	2.2	2.1	2.1
Cu-His₁₁₂	2.2	2.1	2.1	2.1	2.2	2.2	2.2	2.1	2.1
Cu-Glu₇₃	2.1	2.1	2.2	2.1	2.1	1.92	1.92	2.3	2.1 (b)
Cu-O3 (a)	2.2	2.1	2.1	2.2	2.2	-	-	2.3	-
Cu-O4 (a)	3.8	3.6	3.6	3.7	3.7	-	-	3.5	-

(a) atomes d'oxygène de la quercétine.

(b) distance lorsque la coordination autour du cuivre est bipyramide trigonal.

II.2.2.b. Interactions hydrophiles et hydrophobes

Deux molécules d'eau, détectées dans la structure RX de l'enzyme co-cristallisées avec la quercétine, sont fortement impliquées dans les interactions enzyme/substrat. La première est située à l'entrée de la cavité et forme deux liaisons hydrogène, d'un côté avec la fonction 7-OH de la quercétine et d'un autre côté avec l'atome OE_{Gln33} ou avec l'atome O_{Gly62}. Quelle que soit la simulation, elle n'est jamais échangée avec une autre molécule d'eau provenant du milieu extérieur. La seconde molécule d'eau, initialement localisée en fond de poche, a changé de position au cours de la période de thermalisation ce qui nous conduit à considérer trois cas. Elle peut créer un pont hydrogène entre les fonctions 3'-OH et 4'-OH de la quercétine et la fonction hydroxyle de la chaîne latérale de l'acide aminé Thr53 ou avec la fonction 4'-OH et l'atome O_{Asn74} (Cf. Figure 15). Dans le dernier cas, nous avons supprimé la molécule d'eau du site actif.

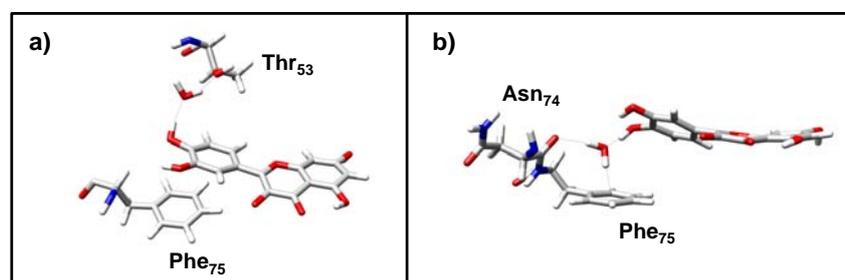


Figure 15 : Positions alternatives de la molécule d'eau en fond de poche.

La première conséquence de la position de cette molécule d'eau est d'induire un léger déplacement du centre métallique vers le fond de la poche dans le cas (a) ou en l'absence de cette molécule. La distance moyenne entre l'atome de cuivre et l'atome O du résidu Asn74 en fond de

poche est d'environ 8,8 Å dans le cas (b), et d'environ 7,9 Å dans le cas (b) ou en l'absence de molécule d'eau. Néanmoins, le mode de coordination du substrat reste toujours monodentate.

La cavité de la 2,3-QD est essentiellement de nature hydrophobe et semble parfaitement adaptée à des substrats comme les flavonoïdes présentant un système π délocalisé. Bien qu'individuellement relativement faible, plusieurs interactions sont à l'origine de la stabilisation du ligand au sein de la cavité. La figure 16 illustre les différentes interactions hydrophobes entre la quercétine et les chaînes latérales des résidus du site actif.

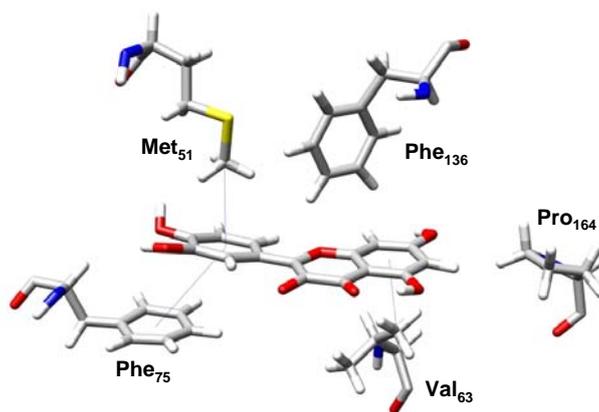


Figure 16 : Interactions hydrophobes enzyme/substrat au sein du site actif.

Les acides aminés Phe75 et Met51 sont en interaction directes avec le cycle B du substrat. Les distances moyennes (des cinq simulations E/S) entre le centre de masse des atomes de carbone du cycle B de la quercétine et de la chaîne latérale du résidu Phe75 sont comprises entre 4,3 et 5,2 Å. Ces valeurs correspondent à une interaction de type π -stacking. Les valeurs des distances moyennes entre l'atome CE_{Met51} et le centre de masse du cycle B est de l'ordre de 3,6-3,8 Å, illustrant une interaction de type σ - π entre le groupement méthyle du résidu Met51 et le motif catechol de la quercétine. D'autres interactions faibles sont reportées entre le cycle A de la quercétine et la chaîne latérale du résidu Phe136 (interaction de type T-shape), et entre le cycle C de la quercétine et le résidu Val63 (interaction de type σ - π).

Toutes ces interactions jouent un rôle crucial dans la reconnaissance et la stabilisation du substrat par l'enzyme. Bien que faibles, elles sont suffisamment spécifiques pour induire une discrimination entre différents substrats de la famille des flavonoïdes.

II.2.2.c. ΔG de complexation

Nous avons calculé l'enthalpie libre de complexation enzyme/substrat à l'aide du script MM_PBSA inclus dans le logiciel AMBER tel que détaillé dans la méthodologie. Nous avons effectué deux calculs différents pour chaque système E/S. L'analyse énergétique a été réalisée en traitant les deux molécules d'eau du site actif comme faisant partie du récepteur (l'enzyme) ou en excluant celles-ci du calcul. Ces deux approches nous ont permis d'estimer la contribution de la micro-solvation du site actif dans l'enthalpie libre de complexation. Le Tableau 11 contient l'ensemble des valeurs de ΔG .

Tableau 11: Enthalpie libre de complexation et contribution des interactions hydrophiles des molécules d'eau avec le substrat.

	ΔG (en kcal.mol ⁻¹)	Contribution de la micro- solvation (en kcal.mol ⁻¹ et en %)
ES1	-38,1	-8,9 (23,4%)
ES2	-38,3	-7,1 (18,5%)
ES3	-38,6	-7,0 (18,1%)
ES4	-36,0	-2,8 (7,8%)
ES5	-35,3	-2,8 (7,9%)

L'énergie de complexation est relativement élevée et montre que la quercétine est fortement liée à l'enzyme 2,3-QD. La position de la molécule d'eau en fond de poche entraîne de faibles variations de l'enthalpie libre de complexation totale puisque celle-ci varie entre -35 et -38 kcal.mol⁻¹. Les interactions protéine/solvant et substrat/solvant identifiées précédemment ont une contribution non négligeable dans la stabilisation du substrat au sein de la cavité. En effet, ces interactions représentent environ 20% de l'enthalpie libre totale lorsque le système comporte deux molécules d'eau dans le site actif (ES1, ES2, ES3). Cette contribution de la micro-solvation est plus élevée lorsque la molécule d'eau en fond de poche est positionnée entre la quercétine et le résidu Asn74 (ES1) en comparaison à la position entre la quercétine et le résidu Thr53 (ES2 et ES3) bien que l'enthalpie libre de complexation soit sensiblement la même. Si cette molécule de solvant est retirée du système catalytique, la contribution de la micro-solvation diminue environ de moitié.

II.3. Conclusion sur l'activation et la reconnaissance du substrat par l'enzyme

Sur la base des résultats de l'analyse structurale de l'enzyme et de ceux de l'étude mécanistique de l'oxygénolyse, il semble difficile d'analyser séparément le processus d'activation du substrat et le processus de reconnaissance/stabilisation de la quercétine par la Quercétine 2,3-Dioxygénase. L'étude mécanistique avait montré que l'addition de O₂ pouvait s'effectuer selon deux mécanismes différents : activation du dioxygène par le cuivre suivie de l'addition sur la quercétine (étude réalisée par P.E.M Siegbahn¹⁵) ou addition directe du dioxygène sur l'atome de carbone C2 (Cf. Partie I). Les deux études n'ont pas pris en compte les contraintes stériques et la polarisation induite par l'environnement enzymatique autour de la quercétine, mais ont uniquement considéré l'influence du centre métallique sur l'oxygénolyse de la quercétine.

Nous avons montré que la quercétine était fortement liée à l'enzyme via des interactions hydrophiles et hydrophobes. Bien que la micro-solvatation du site actif joue un rôle important, la présence de la molécule d'eau en fond de poche n'est pas primordiale à la stabilisation du substrat dans l'enzyme. En effet, nous avons montré que la cavité pouvait s'adapter au substrat pour conserver le caractère monodentate de la complexation cuivre/quercétine.

Le rôle des résidus de la cavité sur la polarisation de la quercétine a été analysé en comparant la fluctuation de la charge atomique du substrat. Nous avons réalisé des calculs ponctuels, au niveau B3LYP/6-31(+)*G** sur la quercétine dans un environnement de charge correspondant aux positions des atomes constituant l'enzyme. Les charges de cette même structure de quercétine ont été calculées sans l'influence de ces charges. La polarisation du substrat induite par l'enzyme est faible puisque la variation de charge sur ce dernier n'excède jamais $\pm 0,04e$, sauf pour les atomes présents dans la sphère de coordination du cuivre et ceux en interaction avec les deux molécules d'eau.

D'après les résultats du chapitre précédent, la complexation métal/substrat est associée à un transfert de charge. Cette interaction électrostatique forte ($\Delta G_{\text{complexation}} = 500,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ au niveau B3LYP/6-31(+)*G**) illustre le rôle du cuivre sur l'activation de la quercétine mais surtout sa fonction de point d'ancrage à l'intérieur de la protéine, augmentant ainsi la reconnaissance du substrat. Les interactions avec les acides aminés de la cavité complètent ce processus de reconnaissance. Ils jouent cependant un rôle supplémentaire sur la réaction d'oxygénolyse. Comme indiqué dans l'étude mécanistique, les modifications structurales associées à l'addition du dioxygène sur la quercétine sont la pyramidalisation du substrat en C2 et la rotation du groupement catechol. L'analyse de l'angle dièdre θ_{C2} et de l'angle de torsion C3C2C1'C2' pour l'ensemble des cinq dynamiques a montré que

ces valeurs fluctuaient respectivement autour de $\pm 10^\circ$ et $\pm 15^\circ$. Ces fluctuations sont induites par les mouvements des acides aminés de la cavité, tels que Met51 et Phe75 qui entraînent une oscillation de la structure de la quercétine autour des points d'ancrages que sont le centre métallique et les molécules d'eau. Bien que plane dans sa conformation la plus stable, la quercétine a été co-cristallisée avec l'enzyme dans une conformation déformée proche de celles rencontrées dans nos simulations.

Alors que l'étude mécanistique ne pouvait nous permettre de comprendre la différence entre les taux de dégradation de quatre flavonoïdes (pour rappel, la quercétine est prise comme référence avec une valeur de 1, 0,30 pour la galangine, 2,54 pour le kaempférol, et 0,87 pour la myricétine), les renseignements obtenus par l'analyse structurale de l'enzyme vide et du complexe enzyme/substrat peuvent nous éclairer sur l'origine de ces différences. Nous pensons que la substitution du cycle B est l'un des facteurs discriminant dans la reconnaissance du substrat par l'enzyme. Le meilleur taux de dégradation est rencontré pour le kaempférol qui possède une unique fonction hydroxyle 4'-OH. L'interaction en fond de poche semble très importante puisque pour la galangine (qui ne possède pas de fonction OH sur le cycle B) ce taux diminue considérablement. Au-delà d'une seule substitution (2 fonction OH pour la quercétine et 3 pour la myricétine) le taux diminue également, certainement dû à l'augmentation de la gêne stérique avec les chaînes latérales des résidus Met51 et Phe75 empêchant la libre rotation du cycle B.

III. Etude du canal à Dioxygène

Bien que les différentes étapes du processus de dégradation de la quercétine au sein de la 2,3-QD soient désormais bien identifiées, la manière dont le dioxygène entre dans le site actif n'a toujours pas été établie. Le dioxygène n'a pas été identifié dans la structure expérimentale de l'enzyme native ce qui laisse supposer que dans un premier temps le substrat se complexe à l'enzyme et dans un deuxième temps le dioxygène pénètre dans la cavité et réagit avec le substrat. Deux évènements, apparus au cours des dynamiques de la partie précédente, nous ont amené à nous poser la question de l'existence d'un canal à dioxygène. Celui-ci connecterait le site catalytique de l'enzyme avec le milieu extérieur.

Dans cette partie, plusieurs techniques de modélisation moléculaire ont permis d'élucider la façon dont le dioxygène entre dans l'enzyme. Dans un premier temps, nous avons complété l'analyse des dynamiques de l'enzyme native et du complexe enzyme/substrat de la partie précédente (cf. II.1. Méthodologie de l'analyse structurale). La diffusion d'une petite molécule comme O_2 est un évènement stochastique ne pouvant être échantillonné aisément au cours de dynamiques moléculaires

classiques. Dans un deuxième temps, la méthode *umbrella sampling* permettant d'obtenir le potentiel de force moyenne⁵⁵ le long d'une coordonnée de réaction a été mise en œuvre pour estimer la variation d'enthalpie libre lors de l'entrée du dioxygène dans le canal. Enfin, la méthode LES^{56, 57} permettant un échantillonnage plus important d'une petite partie de l'enzyme a également été mise en œuvre pour mieux comprendre les mouvements des résidus du supposé canal à dioxygène.

III.1. Définition du canal

L'analyse structurale des dynamiques de l'enzyme native de la partie précédente a montré que la cavité se remplissait de molécules d'eau pendant les 700 premières picosecondes de simulation. L'évolution de la solvataion du site actif au cours du temps a entraîné une modification structurale sur le linker, et plus précisément sur l'hélice alpha H3 définie par les résidus 162-175. Une analyse détaillée de la solvataion a montré l'existence d'un canal connectant l'intérieur de la cavité au milieu extérieur. Cette région est délimitée par les chaînes latérales des acides aminés Phe132, Leu135, Phe136 et Phe175 (Cf. Figure 17a). A trois reprises durant les simulations N1 et N2 et pendant 50 à 70 ps, les molécules de solvant ont formé une chaîne continue de molécules dans le canal (Cf. Figure 17b).

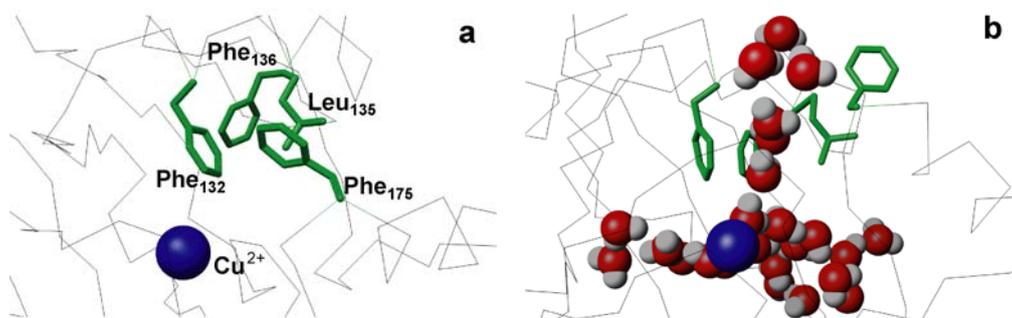


Figure 17 : Acides aminés délimitant la région du canal (a) et chaîne de molécule d'eau (b) dans le canal. En vert sont représenté les chaînes latérales des acides aminés, en bleu l'ion Cu²⁺ et en gris/rouge les molécules d'eau.

Durant cet évènement, la chaîne latérale du résidu Leu135 pivote le long de l'axe C_αC_β et n'est plus en interaction avec la chaîne latérale du résidu Phe132. La chaîne aromatique de la Phe175, initialement en interaction avec les résidus Phe132 et Leu135 s'externalise de la structure et se retrouve située dans le milieu aqueux extérieur. Ce mouvement intervient simultanément avec l'augmentation du nombre de molécules d'eau dans la cavité pendant les 700 premières ps. Comme le

montre la Figure 18, la distance Phe132-Phe175 augmente au bout de cette première période et reste constante jusqu'au terme de la simulation. L'évènement « molécule(s) d'eau dans le canal » est rencontré uniquement lorsque le nombre de molécules d'eau dans la cavité est suffisant, donc lorsque la chaîne latérale du résidu Phe175 est externalisée.

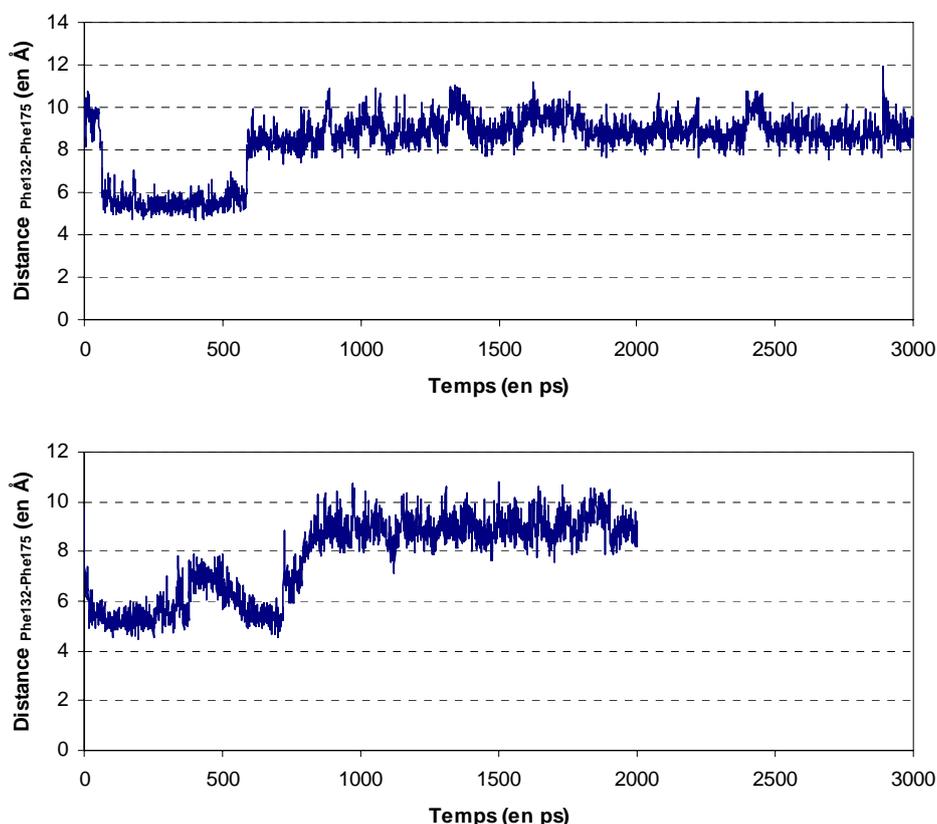


Figure 18 : Distances entre le centre de masse des atomes de carbone du cycle aromatique des chaînes latérales des résidus Phe132 et Phe175 pour les simulations N1 (en haut) et N2 (en bas) au cours du temps.

L'acide aminé Phe175 joue ainsi le rôle d'une porte : lorsque celle-ci est ouverte (c.-à-d. lorsque la chaîne latérale n'est plus en interaction avec les résidus Phe132 et Leu135) elle laisse la possibilité aux molécules d'eau d'entrer dans le canal depuis l'extérieur. Un second évènement, plus long que le précédent, intervient alors que l'entrée du canal est bloquée par la chaîne latérale du résidu Phe175. Les molécules d'eau initialement présentes dans la cavité se déplacent entre les chaînes latérales des acides aminés Phe132 et Leu135 et sont retenues dans le canal pendant environ 250 ps (Cf. Figure 19). Cet évènement confirme le rôle de « porte » du résidu Phe175 et la mobilité des résidus Phe132 et Leu135.

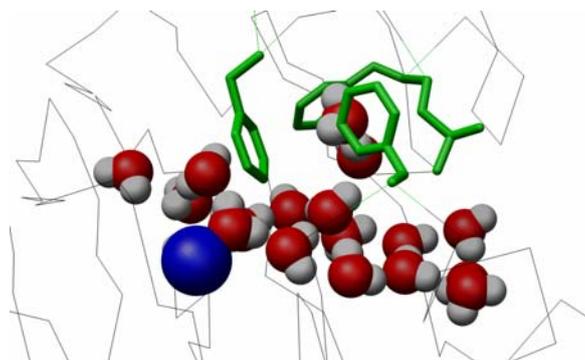


Figure 19 : Molécules d'eau dans le canal alors que la « porte-Phe175 » est fermée.

Si nous considérons maintenant les simulations sur le système enzyme/substrat (ES1-ES5), les analyses révèlent que la quercétine remplit complètement la cavité et qu'aucune molécule d'eau n'entre dans le site actif. En revanche, la chaîne latérale du résidu Phe175 est externalisée et les molécules de solvant peuvent pénétrer dans le canal et interagir avec les acides aminés Phe132 et Leu135. Le temps de résidence d'une molécule d'eau à l'entrée du canal est d'environ 400 ps, et la plus courte distance entre une molécule d'eau et l'ion Cu(I) ou l'atome C2 de la quercétine est de respectivement 5,8 Å et 6,8 Å.

III.2. Etude énergétique

III.2.1. Méthodologie

Ces évènements nous ont permis d'identifier un canal connectant directement le site actif et le milieu extérieur. Pour avoir une estimation de l'énergie nécessaire au passage du dioxygène dans le canal, nous avons calculé le potentiel de force moyenne (*Potential of Mean Force* ou PMF⁵⁵) associé au processus d'entrée de O₂ dans l'enzyme. Nous avons ensuite préparé un système où le dioxygène était positionné à l'entrée du canal et effectué des simulations sans contraintes dans lesquels une partie de l'enzyme subissait un échantillonnage plus important (*Local Enhanced Sampling* ou LES^{56,57}).

III.2.1.a. Potentiel de Force Moyenne (PMF)

L'enthalpie libre d'un processus biomoléculaire tel que le passage d'une petite molécule à travers un canal, ne peut être déterminée via des simulations de dynamiques moléculaires classiques.

Une estimation précise du potentiel de force moyenne associé à ce processus requiert un échantillonnage suffisamment long de la surface d'énergie potentielle le long de la cette coordonnée de réaction. La mise en œuvre de simulation sous contraintes, également appelée *Umbrella Sampling* permet un meilleur échantillonnage de la surface d'énergie potentielle. Pour cela, le système est simulé en présence d'une contrainte artificielle, notée $w(\zeta)$, sur l'ensemble de la trajectoire. La trajectoire est découpée pour l'occasion en plusieurs fenêtres d'échantillonnage où le système est confiné dans une région de la surface de potentiel correspondant à la coordonnée de la réaction ζ . La contrainte correspond à un potentiel harmonique de la forme $w_i(\zeta) = k(\zeta - \zeta_i)^2$ centré sur les valeurs successives de ζ . Pour assurer un bon recouvrement des fenêtres (les valeurs successives de la coordonnée de réaction ne doivent pas être trop différentes), nous avons choisi de faire varier la distance contrainte par pas de 0,5 Å. Une phase d'équilibration de 20 ps a précédé chaque fenêtre de production. Une constante de force de $k = 8 \text{ kcal.}(\text{mol.}\text{Å}^2)^{-1}$ a été appliquée sur la distance contrainte. Après l'échantillonnage de la trajectoire représentant le chemin réactionnel envisagé, les dynamiques sous contraintes ont été analysées en utilisant la méthode *weighted-average histogram method*^{58, 59} (WHAM) pour obtenir les PMF associées au passage du dioxygène dans le canal.

Dans le cas présent, la définition de la coordonnée de réaction n'est pas évidente. Nous ne savons pas si le dioxygène s'additionne directement sur la quercétine ou si cette étape est précédée d'une activation de O_2 par le centre métallique. Trois cas différents ont été choisis. Dans les trois cas, la structure de départ a été choisie alors que le dioxygène se situe proche du résidu Phe175 à l'entrée du canal (Cf. Figure 20).

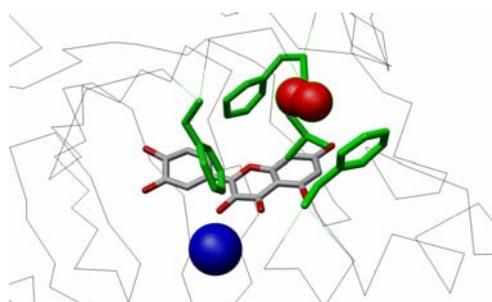


Figure 20 : Position initiale du dioxygène (en rouge) à l'entrée du canal avant les dynamiques sous contraintes.

Dans la première simulation, la contrainte est appliquée entre O_2 et le centre de masse de la chaîne latérale du résidu Phe136 (résidu en interaction avec la quercétine). Dans la deuxième simulation, la contrainte est fixée entre le dioxygène et l'atome N_{Gln83} (résidu se situant à l'opposé du canal dans la cavité). Enfin, la dernière contrainte implique le dioxygène et l'atome C2 de la quercétine. Chaque fenêtre des phases de production a été réalisée pendant 20 ps puis intégrée suivant la procédure WHAM.

III.2.1.b. Local Enhanced Sampling (LES)

La technique d'échantillonnage LES, initialement définie par les travaux de Elber *et al.*^{56, 57}, est un puissant outil qui peut notamment être utilisée pour étudier la diffusion de petites molécules dans les protéines. Dans cette approche, une partie du système est dupliquée de telle sorte que la simulation contienne N copies de ce fragment n'interagissant pas entre elles. Le reste du système perçoit chacune de ces N copies à travers des interactions pondérées par un facteur 1/N. Les points de départ des simulations LES ont été extraits après 10 ps de simulations sous contraintes. Le dioxygène se situe respectivement à 6 et 6,5 Å du centre de masse de la chaîne latérale du résidu Phe136. Deux simulations LES sans contraintes ont été réalisées pendant 200 ps pour un système comprenant 10 copies pour O₂ et les résidus Phe132, Leu135, Phe136, Phe175. Cela nous permettra d'échantillonner dix événements de diffusion du dioxygène simultanément, et d'obtenir ainsi une meilleure compréhension du passage du dioxygène dans le canal.

III.2.2. Résultats

Dans les trois dynamiques sous-contraintes, le dioxygène traverse le canal en passant entre les résidus Phe132 et Leu135 pour se situer dans la cavité en fin de simulation. Quand la contrainte est appliquée entre O₂ et le centre de masse de la chaîne latérale du résidu Phe136, la rotation de la chaîne latérale du résidu Leu135 permet à O₂ de passer dans le canal et de se retrouver proche du système π -délocalisé de la quercétine. Lorsque la contrainte est appliquée entre O₂ et le résidu Gln83 ou la quercétine, la chaîne latérale de l'acide aminé Phe132 change de position (se rapproche de la chaîne latérale du résidu Leu135) et permet à O₂ de glisser vers le cuivre. La figure 21 montre les deux structures correspondant à ces deux événements.

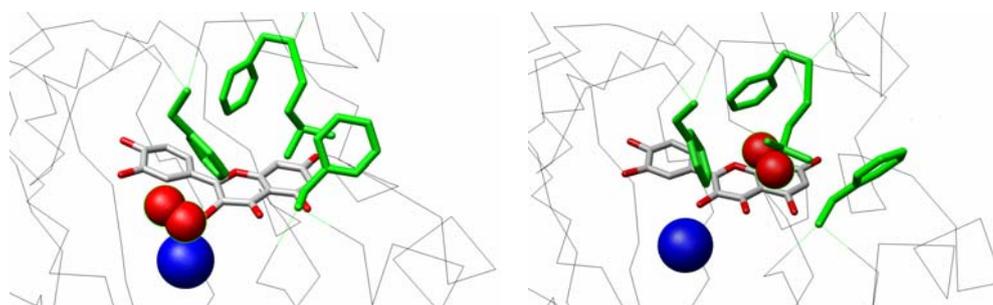


Figure 21 : Position du dioxygène proche de l'atome C2 de la quercétine (à gauche) et proche du centre métallique (à droite) après son entrée dans la cavité via le canal.

Les trois profils de PMF, exposés dans la Figure 22, présentent des caractéristiques similaires. Lorsque O_2 est situé dans le « bulk », le profil énergétique est relativement plat correspondant à des modifications structurales peu coûteuses en énergie. La valeur de PMF où O_2 est situé le plus loin de la cavité est utilisée comme référence (0 kcal.mol⁻¹) pour calculer les variations d'enthalpie libre. Puis O_2 passe à travers le canal et l'énergie augmente, caractérisant ainsi la barrière énergétique du processus réactionnel. Enfin quand O_2 est dans la cavité, le système replonge dans un puits de potentiel caractéristique d'un minimum conformationnel.

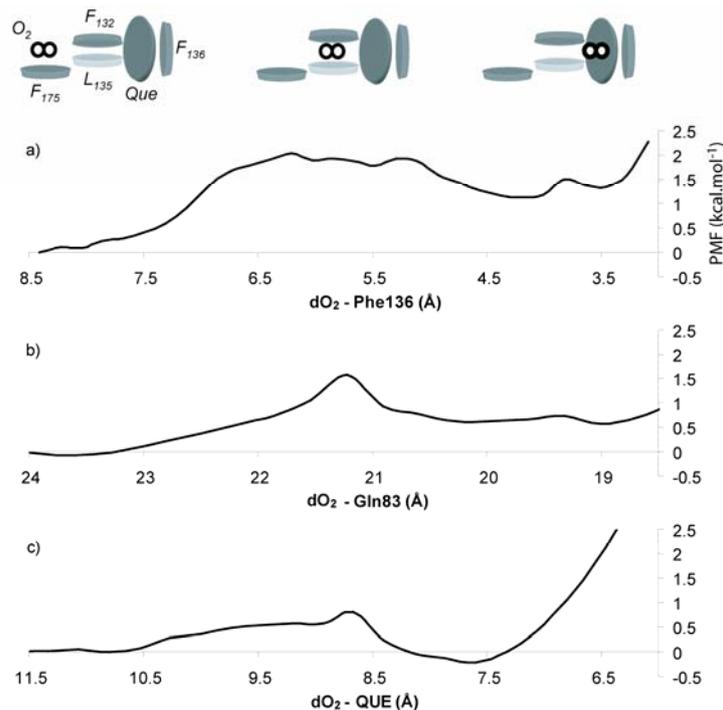


Figure 22 : Profil énergétique (en kcal.mol⁻¹) en fonction de la distance entre O_2 et (a) le centre de masse de la chaîne latérale du résidu Phe136, (b) l'atome N du résidu Gln83, (c) l'atome C2 de la quercétine. La position du dioxygène est schématisée au long de la coordonnée de réaction : O_2 est à l'entrée du canal (correspondant à la valeur la plus élevée de la distance), puis O_2 est positionnée entre les résidus Phe132 et Leu135 au milieu du canal, et finalement O_2 est à l'intérieur de la cavité proche de l'atome C2 (a) et proche du cuivre (b,c).

Quelle que soit la coordonnée de réaction choisie, la barrière énergétique du processus d'entrée du dioxygène dans le canal est de l'ordre de 2,5 kcal.mol⁻¹. Cette valeur faible laisse supposer que O_2 est capable de traverser le canal à température ambiante, et ce même sans la contrainte imposée lors des simulations de type *umbrella sampling*. Pour confirmer cette hypothèse, deux dynamiques moléculaires sans contraintes et deux simulations de type LES ont été réalisées en prenant comme point de départ O_2 initialement localisé à l'entrée du canal.

Les deux dynamiques non contraintes confirment la faisabilité du processus. O₂ entre dans la cavité en traversant le canal en un temps d'environ 40 ps. Cette valeur suggère que l'évènement d'entrée du dioxygène ne constitue pas l'étape limitante du processus de dégradation de la quercétine dans l'enzyme.

Concernant les simulations LES, 80% des copies du dioxygène diffusent dans le canal pour finalement se retrouver dans la cavité, et 20% d'entre elles diffusent dans le solvant. Les structures finales de ces deux dynamiques ont montré que lorsque O₂ traversait le canal, il pouvait se retrouver en interaction soit avec le centre métallique (10% des copies) soit avec la quercétine (90%).

Les différentes techniques de dynamiques moléculaires mises en œuvre sur l'enzyme 2,3-QD ont permis de valider l'hypothèse de l'existence d'un canal à dioxygène. En effet, plusieurs résultats vont dans le sens de la diffusion de O₂ à travers le canal : (1) Le canal est orienté directement vers le site catalytique de l'enzyme (atome de cuivre ou atome C2 de la quercétine), (2) la traversée du canal semble possible pour des petites molécules, (3) le canal est essentiellement constitué de résidus hydrophobes, (4) le profil énergétique de l'entrée de O₂ dans la cavité via ce canal révèle que cet évènement est thermodynamiquement et cinétiquement faisable.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons effectué l'étude de la dégradation de la quercétine au sein de la Quercétine 2,3-Dioxygénase, et étendu les conclusions du processus de catalyse enzymatique à d'autres composés de la famille des flavonoïdes. L'emploi de toute une panoplie de méthodes de chimie théorique nous a permis d'aborder les différents aspects que peuvent apporter ces méthodes dans l'étude d'un tel système.

Les méthodes de chimie quantique nous ont permis de caractériser les intermédiaires de réaction et les états de transition servant à proposer un mécanisme réactionnel cohérent avec les résultats expérimentaux. Nous avons choisi d'effectuer cette étude par étapes afin de mieux sérier les rôles des différentes entités participant à cette réaction. Le cuivre joue son rôle d'oxydant de la quercétine avant la réaction, permettant ainsi d'activer la position en C2, et facilitant l'addition du dioxygène sur le substrat. L'oxygénolyse du flavonoïde nécessite la formation d'un intermédiaire cyclique à cinq atomes de type endoperoxo et la valeur de la barrière énergétique associée à la création de cet intermédiaire montre qu'il s'agit de l'étape limitante de la réaction. L'étude d'un composé modèle, puis de la quercétine complète, a montré que seul le site réactionnel 3-hydroxychromone était indispensable à la réaction en phase gazeuse. En effet, le site 3-hydroxychromone semble être

indépendant des autres d'un point de vue de la réactivité, confirmant ainsi les conclusions du chapitre 2.

Les simulations de dynamique moléculaire nous ont permis d'apporter de nouveaux renseignements sur l'oxygénolyse des flavonoïdes au sein de l'enzyme. L'identification des modes d'interactions entre le substrat et le récepteur a aidé à la compréhension du processus de reconnaissance et d'activation du flavonoïde par l'enzyme. Les molécules d'eau présentes au sein de l'enzyme, ainsi que le centre métallique jouent le rôle de point d'ancrage pour le substrat. Les interactions faibles de type π -stacking, σ - π et T-shape entre la quercétine et les résidus de la cavité laissent supposer que ces derniers jouent un rôle à la fois dans la reconnaissance et l'activation du substrat, en favorisant la pyramidalisation du substrat en position C2 et la rotation du cycle B. La substitution du cycle B d'un flavonoïde semble être le facteur déterminant dans la rotation du cycle B, et permettrait d'expliquer les différences observées des taux de dégradation des flavonoïdes.

Enfin, l'utilisation de différentes techniques de modélisation moléculaire, telles que l'approche *umbrella sampling* et la technique LES, nous ont permis de confirmer la présence d'un deuxième site d'entrée dans l'enzyme. La taille, l'orientation et le caractère hydrophobe du canal laisse supposer qu'il serait dédié à des petites molécules comme le dioxygène. Les calculs d'estimation de l'enthalpie libre montrent que ce processus est thermodynamiquement possible. Dès que les deux ligands sont présents dans l'enzyme, le système est prêt pour que la réaction d'oxygénolyse ait lieu. La première étape (addition sur le cuivre ou sur la quercétine) reste toujours un sujet de débat bien que l'ensemble des étapes du mécanisme biochimique soit désormais élucidé. La Quercétinase possède deux entrées distinctes, une pour le flavonoïde et une pour le dioxygène, et la structure de l'enzyme semble être optimisée pour accueillir les deux protagonistes nécessaires à la réaction.

Suite à cette étude, nous pouvons proposer un mécanisme de dégradation d'un flavonoïde au sein de la Quercétinase (Cf. Figure 23). (a) Le processus biochimique débute par l'entrée du substrat dans l'enzyme, la formation du complexe E/S et l'activation de la position en C2 du flavonoïde via la déprotonation et l'oxydation de la quercétine et les interactions E/S. (b) La présence du flavonoïde induit une augmentation du volume de la cavité et un étirement du linker permettant d'ouvrir la trappe (Phe175) du canal à dioxygène. (c) Le dioxygène diffuse alors dans le canal et vient s'ajouter sur la quercétine : c'est la première étape du processus d'oxygénolyse de la quercétine. (d) Les produits ainsi formés (acide d'ester benzoïque et monoxyde de carbone) sont ensuite libérés le système catalytique est alors régénéré.

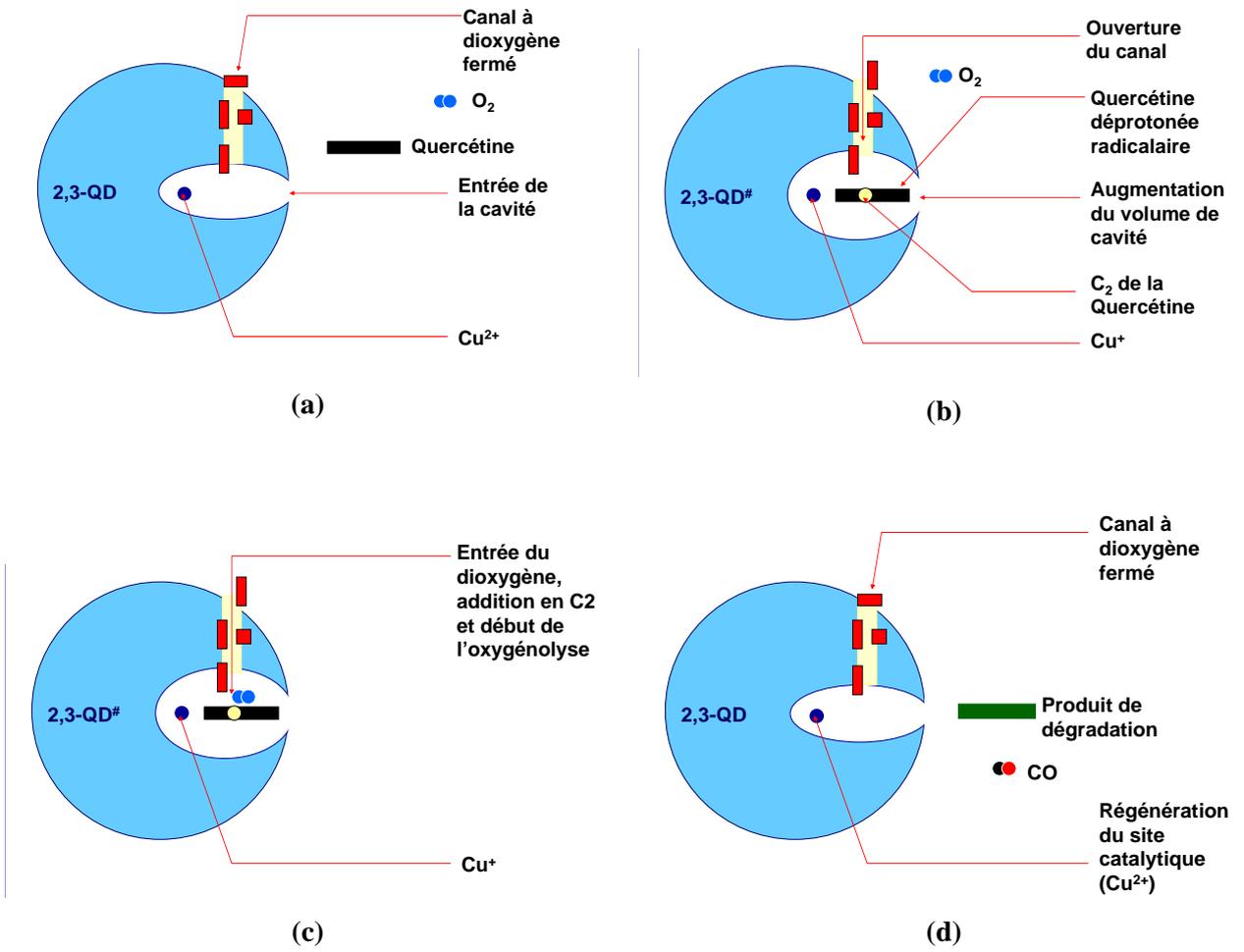


Figure 23 : Schéma global de la dégradation de la quercétine par la Quercétinase

V. Références

- [1] Krishnamurty, H.G.; Simpson, F.J. Degradation of Rutin by *Aspergillus flavus*. Studies with oxygen 18 on the action of a dioxygenase on quercetin. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 1467-1471.
- [2] Oka, T.; Simpson, F.J.; Krishnamurty, H.G. Degradation of rutin by *Aspergillus flavus*. Studies on specificity, inhibition, and possible mechanism of quercetinase. *Can. J. Microbiol.* **1972**, *18*, 493-508.
- [3] Dunwell, J.M.; Khuri, S.; Gane, P.J. Microbial relatives of the seed storage proteins of higher plants: conservation of structure and diversification of function during evolution of the cupin superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*(1), 153-79.
- [4] Balogh-Hergovich, E.; Kaizer, J.; Pap, J.; Speier, G.; Huttner, G.; Zsolnai, L. Copper-mediated oxygenolysis of flavonols via endoperoxide and dioxetan intermediates; synthesis and oxygenation of [CuII(phen)₂(fla)]ClO₄ and [CuII(L)(fla)₂] [flaH = flavonol; L = 1,10-phenanthroline (phen), 2,2'-bipyridine (bpy), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TMEDA)] complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, (9), 2287-2295.
- [5] Balogh-Hergovich, E.; Kaizer, J.; Speier, G.; Fuleop, V.; Parkanyi, L. Quercetin 2,3-Dioxygenase Mimicking Ring Cleavage of the Flavonolate Ligand Assisted by Copper. Synthesis and Characterization of Copper(I) Complexes [Cu(PPh₃)₂(fla)] (fla = Flavonolate) and [Cu(PPh₃)₂(O-bs)] (O-bs = O-Benzoylsalicylate). *Inorg. Chem.* **1999**, *38*(17), 3787-3795.
- [6] Balogh-Hergovich, E.; Kaizer, J.; Speier, G.; Huttner, G.; Jacobi, A. Preparation and Oxygenation of (Flavonolato)copper Isoindoline Complexes with Relevance to Quercetin Dioxygenase. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*(19), 4224-4229.
- [7] Balogh-Hergovich, E.; Kaizer, J.; Speier, G.; Huttner, G.; Zsolnai, L. Copper-mediated oxygenation of flavonolate in the presence of a tridentate N-ligand. Synthesis and crystal structures of [Cu(fl a)(idpaH)]ClO₄ and [Cu(idpaH)(O-bs)]ClO₄, [fl a = flavonolate, idpaH = 3,3'-iminobis(N,N-dimethylpropylamine), O-bs = O-benzoylsalicylate]. *Inorg. Chim. Acta.* **2000**, *304*(1), 72-77.
- [8] Barhacs, L.; Kaizer, J.; Pap, J.; Speier, G. Kinetics and mechanism of the stoichiometric oxygenation of [CuII(fl a)(idpa)]ClO₄ [fl a=flavonolate, idpa=3,3'-imino-bis(N,N-dimethylpropylamine)] and the [CuII(fl a)(idpa)]ClO₄-catalysed oxygenation of flavonol. *Inorg. Chim. Acta.* **2001**, *320*(1-2), 83-91.
- [9] Lippai, I.; Speier, G. Quercetinase model studies. The oxygenation of flavonol catalyzed by a cationic 2,2'-bipyridine copper(II) flavonolate complex. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1998**, *130*(1-2), 139-148.
- [10] Kaizer, J.; Speier, G. Radical-initiated oxygenation of flavonols by dioxygen. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2001**, *171*(1-2), 33-36.
- [11] Barhacs, L.; Kaizer, J.; Speier, G. Kinetics and mechanism of the stoichiometric oxygenation of the ionic zinc(II) flavonolate complex [Zn(fl a)(idpa)]ClO₄ (fl a=flavonolate; idpa=3,3'-iminobis(N,N-dimethylpropylamine)). *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2001**, *172*(1-2), 117-125.
- [12] Balogh-Hergovich, E.; Kaizer, J.; Speier, G. Kinetics and mechanism of the Cu(I) and Cu(II) flavonolate-catalyzed oxygenation of flavonol. Functional quercetin 2,3-dioxygenase models. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2000**, *159*(2), 215-224.

- [13] Kaizer, J.; Pap, J.; Speier, G.; Reglier, M.; Giorgi, M. Synthesis, properties, and crystal structure of a novel 3-hydroxy-(4H)-benzopyran-4-one containing copper(II) complex, and its oxygenation and relevance to quercetinase. *Transition Met. Chem.* **2004**, 29(6), 630-633.
- [14] Fusetti, F.; Schroter, K.H.; Steiner, R.A.; van Noort, P.I.; Pijning, T.; Rozeboom, H.J.; Kalk, K.H.; Egmond, M.R.; Dijkstra, B.W. Crystal structure of the copper-containing quercetin 2,3-dioxygenase from *Aspergillus japonicus*. *Structure.* **2002**, 10(2), 259-268.
- [15] Siegbahn, P.E.M. Hybrid DFT Study of the Mechanism of Quercetin 2,3-Dioxygenase. *Inorg. Chem.* **2004**, 43(19), 5944-5953.
- [16] Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5642.
- [17] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B: Condens. Matter.* **1988**, 37, 785-789.
- [18] Hehre, W.J.; Ditchfield, R.; Pople, J.A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1972**, 56, 2257-2261.
- [19] Chandrasekhar, J.; Andrade, J.G.; Schleyer, P.v.R. Efficient and Accurate Calculation of Anion Proton Affinities. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 5609-5612.
- [20] Hariharan, P.C.; Pople, J.A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chem. Acc.* **1973**, 28, 213-222.
- [21] Hay, P.J.; Wadt, W.R. *Ab initio* effective core potential for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 299-310.
- [22] Hay, P.J.; Wadt, W.R. *Ab initio* effective core potential for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 270-283.
- [23] Hay, P.J.; Wadt, W.R. *Ab initio* effective core potential for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* **1985**, 82, 284-298.
- [24] *Gaussian98*, Revision A7; M. J. Frisch, G.W.T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, V. G. Zakrzewski, J. A. Montgomery, Jr., R. E. Stratmann, J. C. Burant, S. Dapprich, J. M. Millam, A. D. Daniels, K. N. Kudin, M. C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G. A. Petersson, P. Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. Cioslowski, J. V. Ortiz, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, J. L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E. S. Replogle, and J. A. Pople, Gaussian, Inc. Pittsburg PA, 1998.
- [25] Reed, A.E.; Weinstock, R.B.; Franck, W. Natural population analysis. *J. Chem. Phys.* **1985**, 83, 735-746.
- [26] Reed, A.E.; Franck, W. Natural localized molecular orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, 83, 1736-1740.
- [27] Steiner, R.A.; Kooter, I.M.; Dijkstra, B.W. Functional Analysis of the Copper-Dependent Quercetin 2,3-Dioxygenase. 1. Ligand-Induced Coordination Changes Probed by X-ray Crystallography: Inhibition, Ordering Effect, and Mechanistic Insights. *Biochemistry.* **2002**, 41(25), 7955-7962.

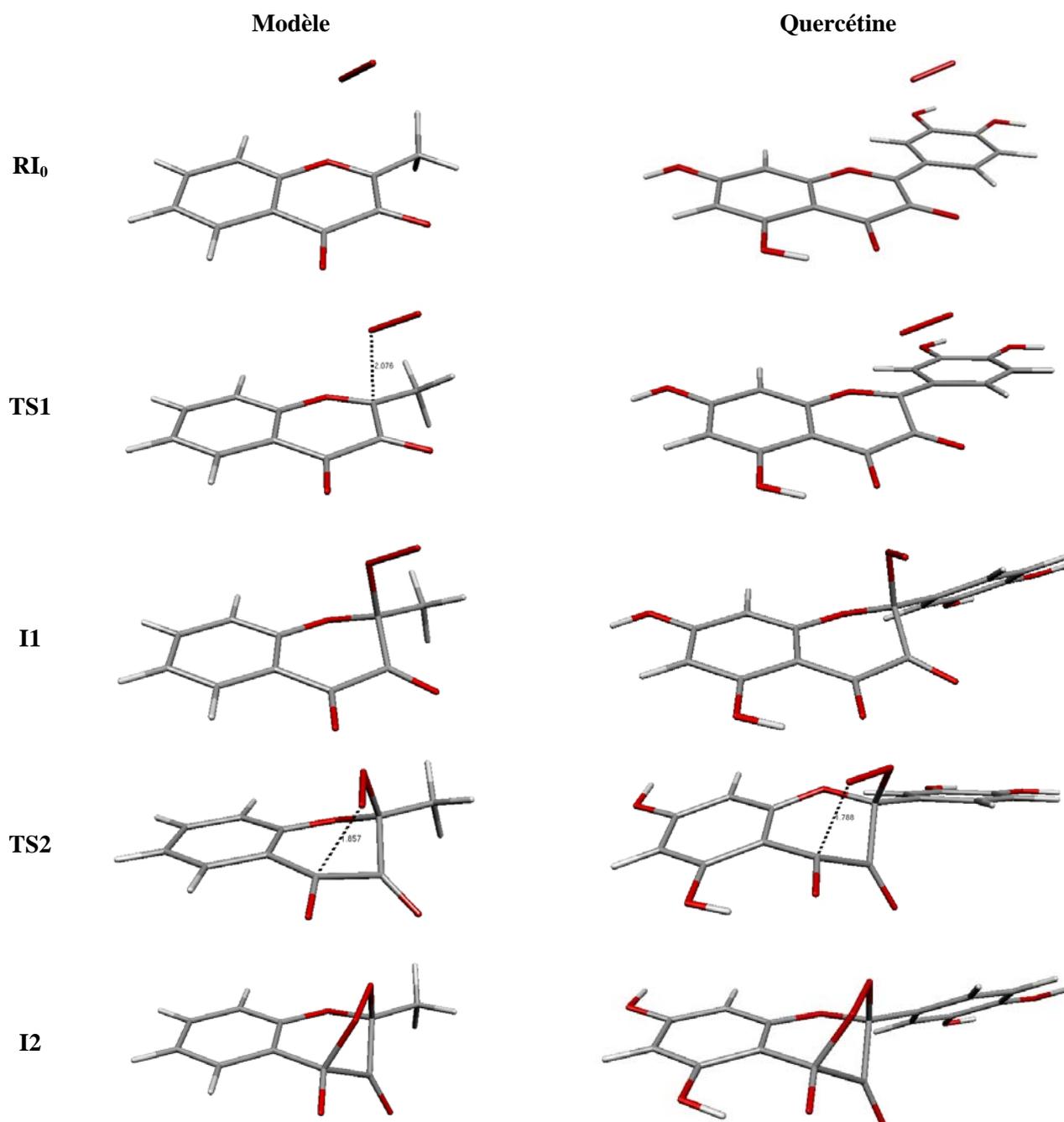
- [28] Steiner, R.A.; Meyer-Klaucke, W.; Dijkstra, B.W. Functional Analysis of the Copper-Dependent Quercetin 2,3-Dioxygenase. 2. X-ray Absorption Studies of Native Enzyme and Anaerobic Complexes with the Substrates Quercetin and Myricetin. *Biochemistry*. **2002**, 41(25), 7963-7968.
- [29] Steiner, R.A.; Kalk, K.H.; Dijkstra, B.W. Anaerobic enzyme-substrate structures provide insight into the reaction mechanism of the copper-dependent quercetin 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(26), 16625-16630.
- [30] Kooter, I.M.; Steiner, R.A.; Dijkstra, B.W.; van Noort, P.I.; Egmond, M.R.; Huber, M. EPR characterization of the mononuclear Cu-containing *Aspergillus japonicus* quercetin 2,3-dioxygenase reveals dramatic changes upon anaerobic binding of substrates. *Eur. J. Biochem.* **2002**, 269(12), 2971-2979.
- [31] Van den Bosch, M.; Swart, M.; Van Gunsteren, W.F.; Canters, G.W. Simulation of the Substrate Cavity Dynamics of Quercetinase. *J. Mol. Biol.* **2004**, 344(3), 725-738.
- [32] Pearlman, D.A.; Case, D.A.; Caldwell, J.W.; Ross, W.S.; Cheatham, T.E., III; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P. "AMBER", a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to stimulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, 91(1-3), 1-42.
- [33] Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.; Klein, M.L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1998**, 79, 926-935.
- [34] De Kerpel, J.O.A.; Ryde, U. Protein strain in blue copper proteins studied by free energy perturbations. *Proteins*. **1999**, 36(2), 157-174.
- [35] Jorgensen, W.L.; Maxwell, D.S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(45), 11225-11236.
- [36] Bayly, C.I.; Cieplak, P.; Cornell, W.D.; Kollman, P. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints For Determining Atom-Centered Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 10269-10280.
- [37] Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Kollman, P. Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies and free energies of solvation. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9620-9631.
- [38] Ponder, J.W.; Case, D.A. Force fields for protein simulations. *Adv. Prot. Chem.* **2003**, 66, 27-85.
- [39] Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, 23, 327-341.
- [40] Miyamoto, S.; Kollman, P. An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 952-962.
- [41] Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particulate mesh Ewald--an Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 10089-10092.
- [42] Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M.L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L.G. A smooth particulate mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, 8577-8593.

- [43] Crowley, M.F.; Darden, T.A.; Cheatham, T.E., III; Deedfield, D.W., II. Adventures in improving the scaling and accuracy of a parallel molecular dynamics program. *J. Super-comput.* **1997**, 11, 255-278.
- [44] Toukmaji, A.; Sagui, C.; Board, J.; Darden, T. Efficient particle-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions. *J. Chem. Phys.* **2000**, 113, 10913-10927.
- [45] Hawking, G.D.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Pairwise solute descreening of solute charges from a dielectric medium. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 246, 122-129.
- [46] Hawking, G.D.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute charges from a dielectric medium. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 19824-19839.
- [47] Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D.A. Modifications of the Generalized Born Model Suitable for Macromolecules. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, 104, 3712-3720.
- [48] Feig, M.; Onufriev, A.; Lee, M.; Im, W.; Case, D.A.; Brooks III, C.L. Performance comparison of the Generalized Born and Poisson Methods in the Calculation of the Electrostatic Solvation Energies for Protein Structures. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1978-1988.
- [49] Weiser, J.; Shenkin, P.S.; Still, W.C. Approximate Atomic Surfaces from Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO). *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 217-230.
- [50] Weiser, J.; Shenkin, P.S.; Still, W.C. Fast, Approximate Algorithm for Detection of Solvent Inaccessible Atoms. *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 586-596.
- [51] Hall, G.G.; Smith, C.M. Fitting electron densities of molecules. *Int. J. Quantum Chem.* **1984**, 25, 881-890.
- [52] Smith, C.M.; Hall, G.G. The approximation of electron densities. *Theor. Chem. Acc.* **1986**, 69, 63-69.
- [53] Guex, N.; Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* **1997**, 18(15), 2714-2723.
- [54] Ross, L.; Barclay, C.; Vinqvist, M.R., Copper Enzymes. In *Bioinorganic Chemistry*, Roat-Malone, R. M., Ed. John Wiley & Sons: Washington, 2002; pp 187-230.
- [55] Roux, B. The calculation of the potential of mean force using computer simulations. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, 91(1-3), 275-282.
- [56] Elber, R.; Karplus, M. Enhanced sampling in molecular dynamics: use of the time-dependent Hartree approximation for a simulation of carbon monoxide diffusion through myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 9161-9175.
- [57] Elber, R.; Karplus, M. Modeling side chains in peptides and proteins: Application of the locally enhanced sampling and the simulated annealing methods to find minimum energy conformations. *J. Chem. Phys.* **1991**, 95, 9277-9287.
- [58] Kumar, S.; Bouzida, D.; Swendsen, R.H.; Kollman, P.A.; Rosenberg, J.M. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 1011-1021.

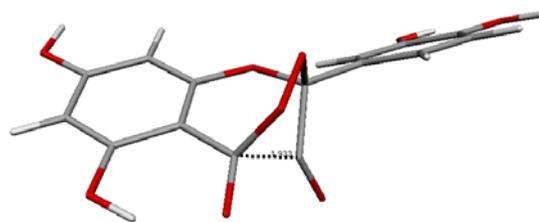
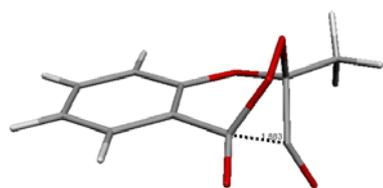
[59] Kumar, S.; Rosenberg, J.M.; Bouzida, D.; Swendsen, R.H.; Kollman, P.A. Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method. *J. Comput. Chem.* **1995**, 16, 1339-1350.

VI. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 3

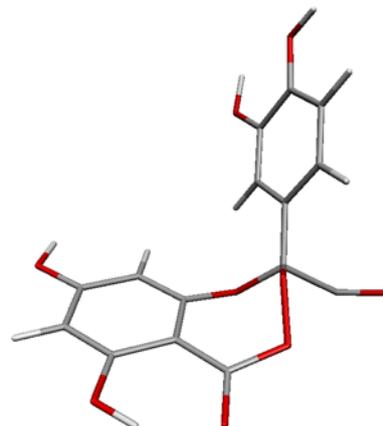
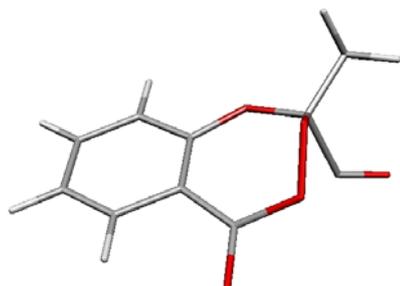
VI.1. Structures des intermédiaires réactionnels et des états de transition de la réaction d'oxygénolyse de la quercétine (à gauche le modèle et à droite la quercétine complète)



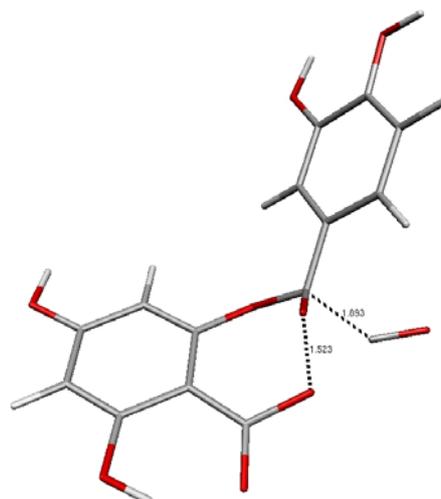
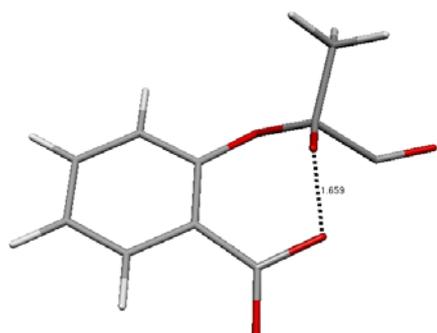
TS3



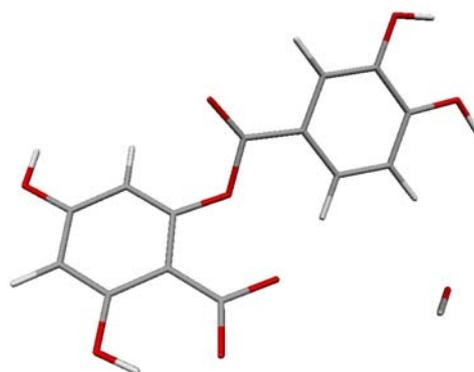
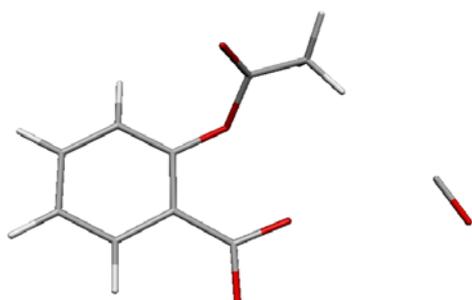
I3



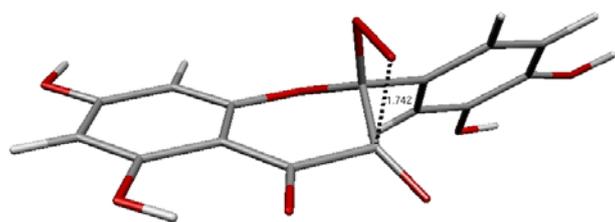
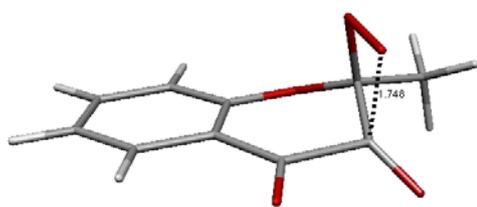
TS4



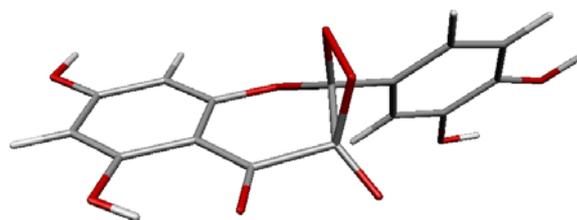
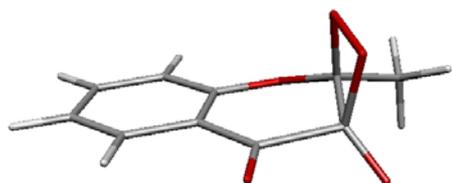
PDT₀



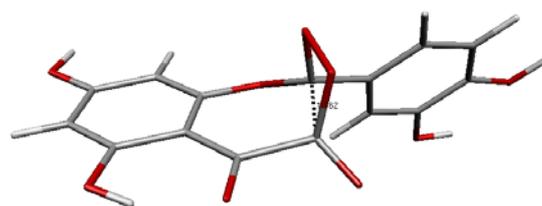
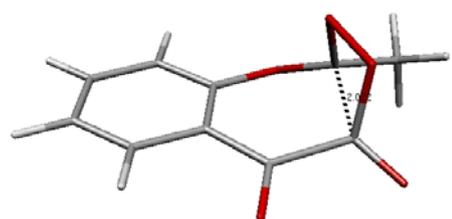
TS2'



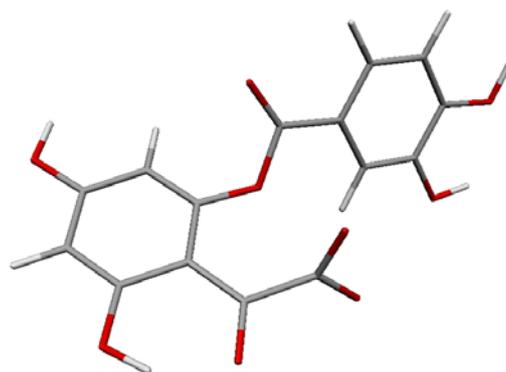
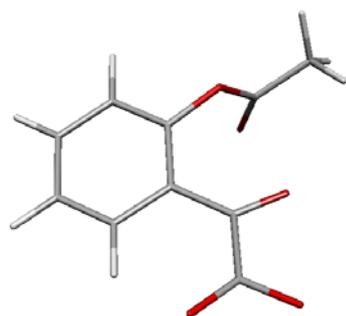
I2'



TS3'



PDT₀'



VI.2. Charges NPA des atomes du composé modèle au cours de la réaction

	RI0	TS1	I1	TS2	I2	TS3	I3	TS4	PDT0	TS2'	I2'	TS3'	PDT0'
O1	-0,48	-0,49	-0,55	-0,54	-0,54	-0,55	-0,57	-0,59	-0,57	-0,54	-0,54	-0,52	-0,58
C2	0,41	0,43	0,51	0,54	0,51	0,50	0,49	0,52	0,86	0,56	0,57	0,64	0,86
C3	0,28	0,38	0,48	0,57	0,62	0,62	0,52	0,60	0,52*	0,48	0,50	0,60	0,73
C4	0,48	0,48	0,48	0,5	0,53	0,60	0,83	0,83	0,80	0,56	0,60	0,52	0,47
C5	-0,20	-0,21	-0,22	-0,18	-0,16	-0,18	-0,26	-0,23	-0,22	-0,23	-0,24	-0,21	-0,19
C6	0,34	0,34	0,36	0,35	0,33	0,33	0,36	0,35	0,36	0,37	0,38	0,35	0,37
O7	-0,51	-0,50	-0,46	-0,43	-0,41	-0,40	-0,47	-0,46	-0,51*	-0,51	-0,49	-0,53	-0,43
O8	-0,54	-0,52	-0,51	-0,49	-0,51	-0,55	-0,56	-0,56	-0,45	-0,46	-0,45	-0,51	-0,48
Oa	-0,02	-0,11	-0,20	-0,32	-0,32	-0,32	-0,30	-0,35	-0,59	-0,27	-0,31	-0,31	-0,59
Ob	0,02	-0,08	-0,15	-0,28	-0,29	-0,28	-0,28	-0,34	-0,39	-0,24	-0,29	-0,29	-0,39

Chapitre 4

*La quercétine comme
inhibiteur de la Lipoxygénase-3*

I. Etude mécanistique de la dégradation de la quercétine.....	141
I.1. METHODOLOGIE.....	141
I.1.1. Différentes formes activées envisagées.....	141
I.1.2. Différents chemins réactionnels étudiés.....	143
I.1.3. Choix de la méthode et de la base d'orbitale atomique.....	144
I.2. ETUDE DU MECANISME REACTIONNEL LORS DE L'ACTIVATION EN O7.....	145
I.2.1. Etape 1 : Addition de O ₂ en C2.....	145
I.2.2. Etape 2 : Formation de l'intermédiaire endoperoxo.....	146
I.2.3. Etape 3 : Ouverture du cycle et formation des produits.....	147
I.3. ETUDE DU MECANISME REACTIONNEL LORS DE L'ACTIVATION EN O4'.....	148
I.3.1. Etape 1 : Addition de O ₂ en C3.....	148
I.3.2. Etape 2 : Formation de l'intermédiaire dioxétane.....	149
I.3.3. Etape 3 : Ouverture du cycle et formation des produits.....	150
I.4. RAPPEL DU MECANISME LORS DE L'ACTIVATION EN O3.....	150
I.5. COMPARAISON DES DIFFERENTS CHEMINS.....	151
II. Etude du site Actif de l'enzyme.....	153
II.1. METHODOLOGIE.....	153
II.2. PRINCIPAUX RESULTATS.....	155
III. Etude structurale de l'enzyme.....	158
III.1. METHODOLOGIE.....	158
III.1.1. Système E/S.....	159
III.1.2. Paramètres du résidu C-terminal, de la quercétine et de l'ion fer.....	159
III.1.3. Dynamiques moléculaires.....	163
III.1.4. Energie de complexation.....	164
III.2. ETUDE STRUCTURALE.....	164
III.2.1. Particularités de l'activation en O3.....	166
III.2.2. Particularités de l'activation en O7.....	168
III.2.3. Particularités de l'activation en O4'.....	170
III.2.4. Energie de complexation.....	173
III.2.5. Comparaison des interactions enzyme/substrat.....	174
IV. Conclusion / proposition de mécanisme.....	174
V. Références.....	176
VI. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 4.....	180
VI.1. EVOLUTION DES PARAMETRES STRUCTURAUX (EN Å ET EN °) DE LA QUERCETINE ACTIVEE EN POSITION O7 AU COURS DE L'OXYDATION PAR LE DIOXYGENE.....	180
VI.2. EVOLUTION DE LA CHARGE ATOMIQUE (EN E) DE LA QUERCETINE ACTIVEE EN POSITION O7' AU COURS DE L'OXYDATION PAR LE DIOXYGENE.....	181
VI.3. STRUCTURES DES INTERMEDIAIRES ET ETATS DE TRANSITION DE L'OXYDATION DE LA QUERCETINE PAR LA LIPOXYGENASE, ACTIVATION EN POSITION O7'.....	182

VI.4. ÉVOLUTION DES PARAMÈTRES STRUCTURAUX (EN Å ET EN °) DE LA QUERCÉTINE ACTIVÉE EN POSITION O4' AU COURS DE L'OXYDATION PAR LE DIOXYGÈNE.....	183
VI.5. ÉVOLUTION DE LA CHARGE ATOMIQUE (EN E) DE LA QUERCÉTINE ACTIVÉE EN POSITION O4' AU COURS DE L'OXYDATION PAR LE DIOXYGÈNE.	184
VI.6. STRUCTURES DES INTERMÉDIAIRES ET ÉTATS DE TRANSITION DE L'OXYDATION DE LA QUERCÉTINE PAR LA LIPOXYGÉNASE, ACTIVATION EN POSITION O4'	185

Les lipoxigénases constituent une classe d'enzyme à fer non-hème, présentes dans les règnes végétal et animal, responsables de la dioxygénation régiosélective et stéréospécifique des acides gras polyinsaturés, selon la réaction : *acide gras* + $O_2 \rightarrow$ *hydroperoxyde d'acide gras*¹⁻¹⁰. L'hydroperoxyde ainsi produit entre dans divers processus cellulaires en fonction de l'acide gras initial et de la lipoxigénase considérée. Par exemple, les leucotriènes, molécules impliquées dans les processus de réponses inflammatoires, sont formées à partir du linoléate au sein de la 5-lipoxigénase.

Les structures cristallographiques de la lipoxigénase du lapin¹¹ (15-LOX) et du soja^{12, 13} (les isozymes LOX-1 et LOX-3) ont été résolues. La protéine comporte un petit domaine N-terminal en comparaison au domaine C-terminal qui contient le site catalytique. Le domaine N-terminal est constitué d'un tonneau de 8 feuillets β antiparallèles. Il est structurellement proche d'un domaine de type C2 de liaison à une membrane présent dans de nombreuses protéines comme les kinases ou les phospholipases^{11, 14}. Le domaine C-terminal contient de 18 à 22 hélices alpha et un (enzyme du lapin) ou deux (soja) feuillet(s) béta antiparallèle(s). Les deux longues hélices alpha au centre de l'enzyme traversent le site catalytique et comportent les trois résidus histidines coordonnées au centre métallique. Dans les lipoxigénases des végétaux, les deux domaines peuvent être clivés enzymatiquement en deux fragments toujours en interaction alors que l'enzyme reste active. En revanche, si le domaine C-terminal est complètement séparé du domaine N-terminal, l'enzyme perd son activité.

En plus des liaisons avec les atomes NE des trois histidines, l'ion fer(III), au centre du site actif, est lié à l'un des atomes d'oxygène de la fonction carboxylate du résidu C-terminal et à un ion hydroxyle. L'activation du substrat par le site catalytique, engendre une modification de la géométrie autour du métal : une sixième position peut être occupée par la chaîne latérale d'un résidu asparagine (dans le soja) ou histidine (lapin). La coordination du fer est donc soit de type bipyramide trigonale, pyramide à plan carré ou octaédrique en fonction de la lipoxigénase considérée et de son état (active ou non).

- *Inhibition de la Lipoxigénase par la quercétine : un cas particulier*

Bien que le cycle catalytique des lipoxigénases ait été très étudié et le mécanisme d'oxydation des acides gras soit relativement bien connu, leur inhibition par des flavonoïdes a fait l'objet d'études récentes. L'équipe de Skrzypczak-Jankun ont obtenus les structures cristallisées de la LOX-3 en présence du substrat quercétine¹⁵ et épigallocatechine gallate¹⁶ (noté EGCG). Le résultat le plus surprenant de cette étude est que ces deux flavonoïdes sont dégradés dans la lipoxigénase. Il semblerait que le composé inhibiteur de la LOX-3 soit le produit de dégradation du flavonoïde et non la substance initiale, l'acide protocatechique et l'épigallocatechine, respectivement dans le cas de la

quercétine et de l'EGCG (Cf. Figure 1). Il est intéressant de noter que l'acide protocatéchique pourrait être obtenu par hydrolyse de la fonction ester du produit de dégradation de la quercétine déjà rencontré lors de l'oxygénolyse au sein de la Quercétinase (Cf. Chapitre 3).

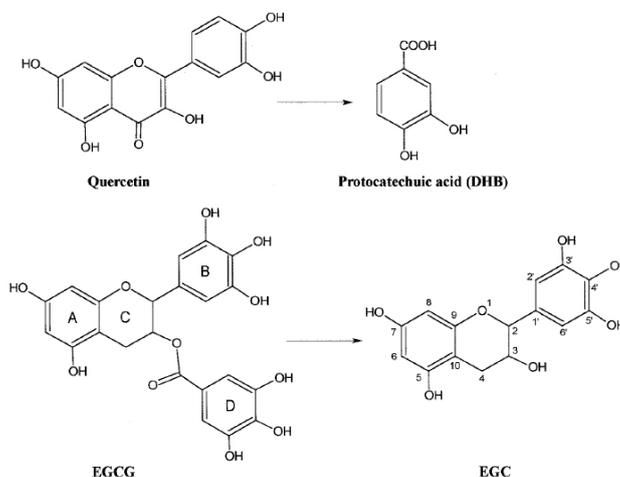


Figure 1 : Structure du flavonoïde et de l'inhibiteur de la LOX-3 correspondant, selon la référence¹⁶.

Une meilleure connaissance des interactions LOX-3/flavonoïde et des chemins de dégradation menant à l'inhibition de la réaction catalysée par cette enzyme est alors essentielle dans le cadre de l'étude des potentialités anti-oxydantes et anti-radicalaires de cette classe de composé. L'oxydation des acides gras polyinsaturés dans la LOX-3 passe par la formation d'un intermédiaire de type peroxyde lié au métal via la liaison Fe-O, où l'atome d'oxygène impliqué dans la liaison provient du dioxygène (Cf. Figure 2). Cet intermédiaire est caractérisé par l'apparition de couleur violette (bande d'absorption aux alentours de 600 nm) dans la solution contenant le complexe enzyme/substrat^{3, 17-19}. Les cristallographes ne signalent pas de changement de couleur lorsque la quercétine est co-cristallisée avec la LOX-3¹⁵, laissant supposer que la formation d'une liaison Fe-O_{dioxygène} n'a pas eu lieu.

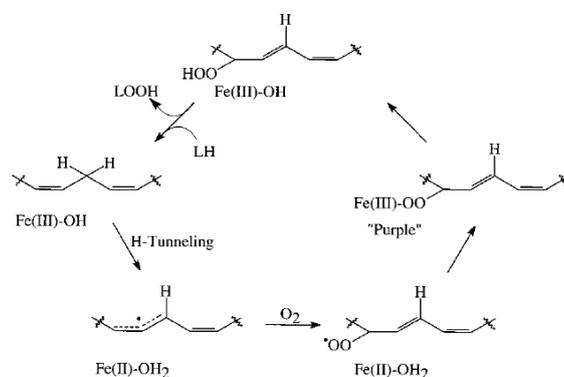


Figure 2 : Schéma de la dioxygénation des acides gras polyinsaturés au sein de la lipoxygénase¹⁹.

Nous connaissons également le mode de coordination de l'acide protocatéchuique. La fonction hydroxyle en position para de la fonction acide carboxylique est liée au centre métallique. L'atome d'oxygène se situe à une distance de 2,7 Å du fer dans la structure RX. Toutefois, cette molécule est relativement petite en regard du volume de la cavité et peut donc se réorienter sous l'effet des interactions avec les acides aminés environnants. Le mode de complexation de la quercétine pose toujours problème. Si nous imaginons une réaction de dégradation similaire à celle rencontrée dans la quercétinase, le site 3-hydroxychromone pourrait être lié au fer. Si nous nous basons uniquement sur la position de l'acide protocatéchuique, nous pouvons penser que le motif catéchol est impliqué dans la complexation. Mais un autre mode de complexation pourrait être envisagé. En effet, la position de l'épigallocatechine gallate dans la LOX-3 montre une possible liaison entre la fonction 7-OH et le centre métallique.

Il est également légitime de se demander quel est le composé qui déprotone et active le substrat quercétine : un ion hydroxyle ou le résidu C-terminal. En effet, dans la lipoxygénase, il semble admis que l'abstraction d'un hydrogène d'un acide gras polyinsaturé provient de l'ion hydroxyle présent dans la première sphère de coordination du fer^{1, 19}. Le peroxyde d'acide gras peut alors être formé par addition du dioxygène sur le radical alkyl. Il est postulé que la molécule d'eau formée lors de l'activation de l'acide gras reste coordonnée au centre métallique. Or dans la structure co-cristallisée de la LOX-3 avec le peroxyde d'acide gras aucune molécule d'eau n'est liée au fer. Il en est de même dans les structures RX de la LOX-3 avec les produits de dégradation de la quercétine et de l'EGCG^{15, 16}. Dans la sphère de coordination du fer, est également présent la fonction carboxylate du résidu C-terminal (Ile857). Comme dans le cas de la Quercétinase, cette fonction pourrait déprotone la quercétine et faciliter la complexation du substrat au site actif.

Dans cette partie, nous nous sommes attachés à décrire ces phénomènes à l'aide de méthodes de chimie quantique et de dynamiques moléculaire. Ainsi dans un premier temps, seront présentés les mécanismes réactionnels, puis, dans un deuxième temps, les différents modes d'interactions enzyme/substrat.

I. Etude mécanistique de la dégradation de la quercétine

I.1. Méthodologie

La formation de l'acide protocatéchuique (composé 3 sur la Figure 3), provient de l'hydrolyse de la fonction ester des produits de dégradation de la quercétine (composés 1 et 2) telle que présentée dans le chapitre 3. La formation de ce produit semble indépendante du chemin réactionnel de l'oxydation de la quercétine (ouverture du cycle central après formation d'un intermédiaire de type endoperoxo ou dioxétane). Cette hypothèse est cohérente avec d'autres mécanismes proposés dans la littérature^{20,21} faisant mention de la formation de l'acide protocatéchuique.

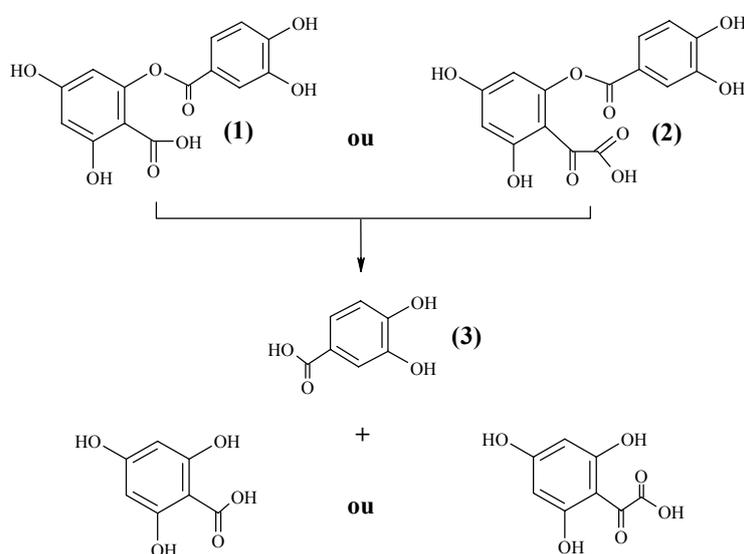


Figure 3 : Formation de l'acide protocatéchuique (3) à partir des esters d'acide benzoïque provenant de l'oxydation de la quercétine (1 et 2).

I.1.1. Différentes formes activées envisagées

L'obtention des composés (1) et (2) provient d'un mécanisme de déprotonation/oxydation de la quercétine au sein du site actif. Les différents modes de complexation possibles de la quercétine dans la LOX-3 nous ont amenés à envisager plusieurs chemins réactionnels. La déprotonation peut impliquer les fonctions hydroxyles 3-OH, 7-OH ou 4'-OH. Sur la base des résultats des chapitres 2 et 3 et sachant que la lipoxygénase active le substrat avant l'addition du dioxygène, nous avons également supposé qu'un transfert électronique a eu lieu entre la quercétine et le site actif. Trois formes semiquinones amenées à réagir avec le dioxygène peuvent alors être envisagées (Cf. Figure 4).

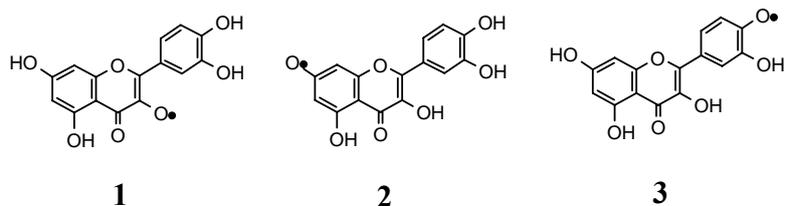


Figure 4 : Espèces susceptibles de réagir avec le dioxygène, activées en position 3-OH (forme n°1), 7-OH (2) ou 4'-OH (3) par le site actif de la LOX-3.

En re-considérant la forme n°1, nous pouvons écrire les deux structures limites pour lesquelles l'électron célibataire est localisé sur un seul atome (Cf. Figure 5). La structure de ces formes tautomères est cohérente avec l'activation de la position en C2 lors de la perte d'un hydrogène sur la fonction 3-OH. Dans le chapitre précédent, nous avons vu que cette activation du substrat facilitait l'addition du dioxygène sur l'atome de carbone C2 de la quercétine.

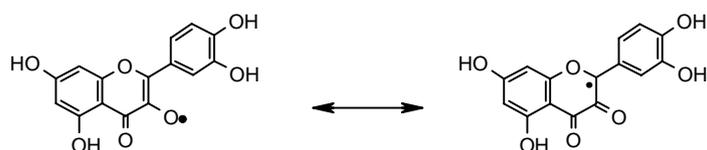


Figure 5 : Formes tautomères de l'espèce semiquinone n°1.

Concernant la forme 2, seuls les atomes C6, C8 et C10 présentent une densité de spin atomique significative (Cf. Chapitre 2). Une forme limite sur laquelle l'électron est formellement localisé en position 2 a donc du être considérée pour la suite de cette étude (Cf. figure 6). Concernant la forme 3, l'atome du cycle central présentant la plus forte densité de spin est l'atome de carbone C3.

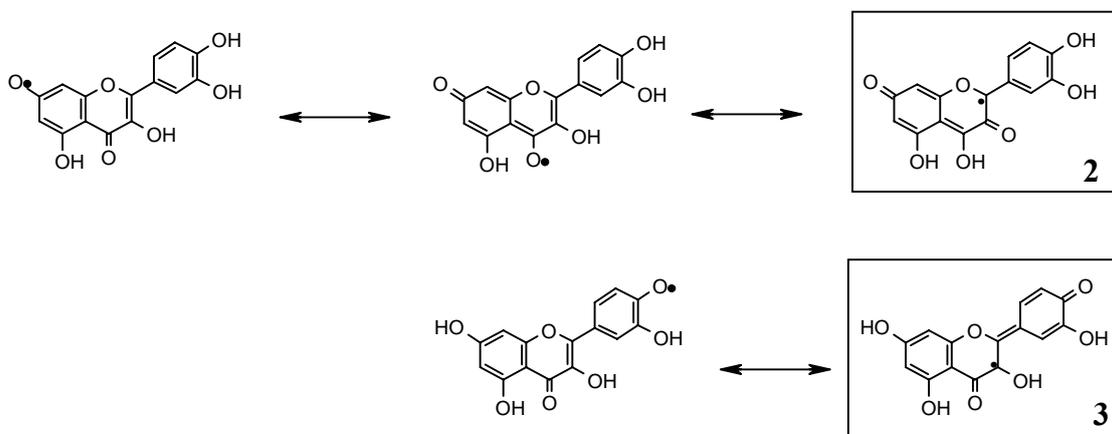


Figure 6 : Formes tautomères des espèces semiquinones 2 et 3.

I.1.2. Différents chemins réactionnels étudiés

Comme pour le chapitre 3, notre système d'étude consistera en une forme activée de la quercétine déprotonée radicalaire en interaction avec le dioxygène et en absence de l'enzyme. La charge globale et la multiplicité de spin du système sont respectivement de 0 et de 2. Le chemin réactionnel sera dépendant de la forme activée considérée. Dans le cas de l'activation du substrat en position 7, la formation d'un intermédiaire de type dioxétane ou de type endoperoxo est possible, contrairement à l'activation de la position 4' où seule la formation de l'intermédiaire dioxétane est prévisible. Les Figures 7 et 8 présentent les chemins réactionnels respectivement après une activation de la quercétine en position 7 et 4'.

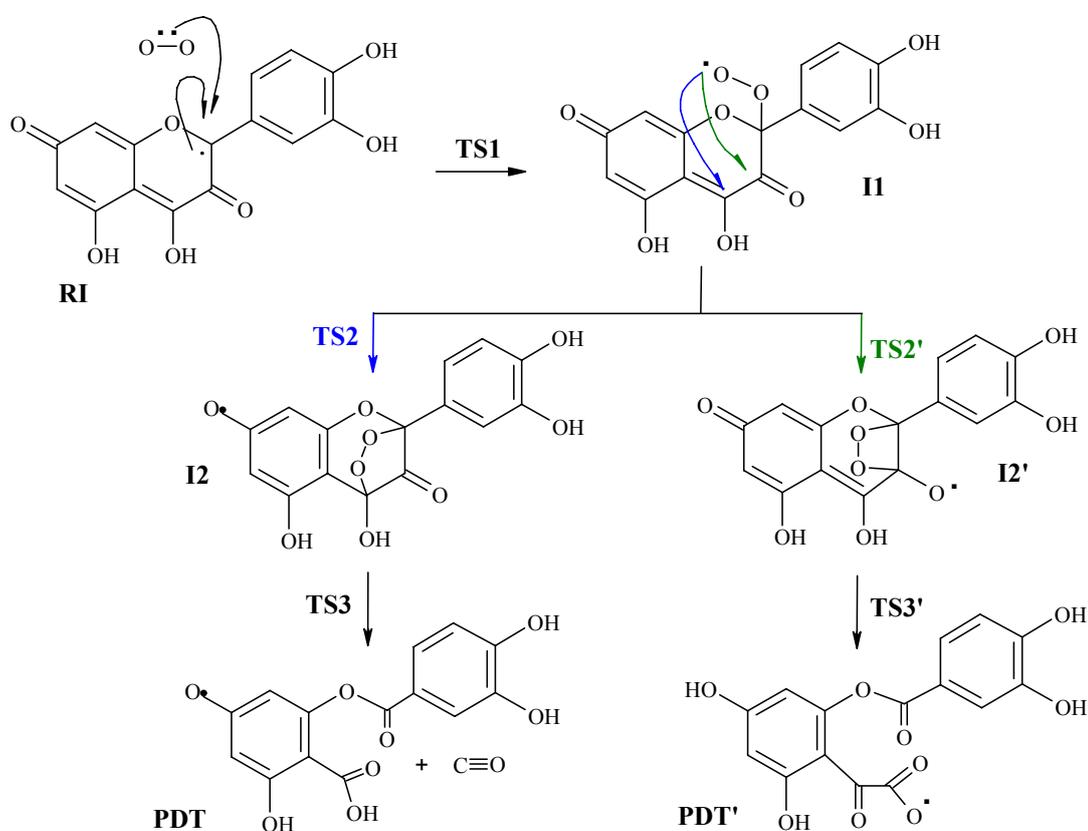


Figure 7 : Proposition de mécanisme réactionnel de l'oxydation de la quercétine dans la LOX-3 avant l'hydrolyse des produits et la formation de l'acide protocatéchique (activation en position 7).

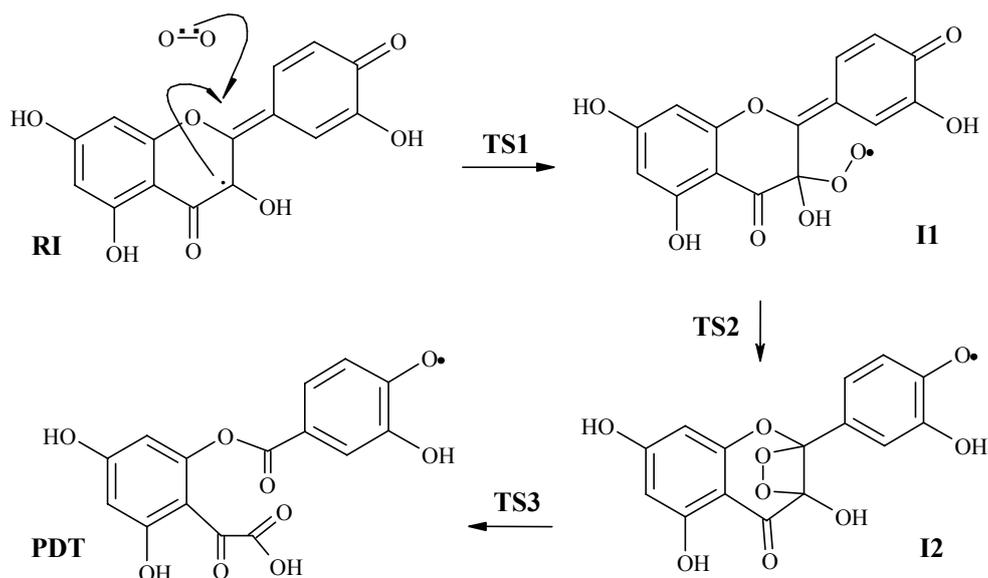


Figure 8 : Proposition de mécanisme réactionnel de l'oxydation de la quercétine dans la LOX-3 avant l'hydrolyse des produits et la formation de l'acide protocatéchique (activation en position 4').

I.1.3. Choix de la méthode et de la base d'orbitale atomique

Comme pour les chapitres précédents, la méthode employée dans cette étude sera la méthode B3LYP^{22, 23} puisqu'associée à une base d'orbitale atomique de type triple dzêta, elle reproduit correctement l'enthalpie de dissociation du dioxygène ainsi que les paramètres structuraux de la quercétine. Nous conservons également la base d'orbitales atomiques alliant une description 6-31+G*²⁴⁻²⁶ pour les atomes d'oxygène et 6-31G* pour les atomes d'hydrogène et les atomes de carbone. Nous conservons également la notation 6-31(+)G* pour cette base.

Les intermédiaires réactionnels ont fait l'objet d'une optimisation de géométrie à l'aide du programme Gaussian03²⁷. Les calculs de fréquence ont été effectués au même niveau de calcul que les optimisations de géométrie et ont permis d'obtenir les corrections thermodynamiques à 298K et 1 atm. Chaque état de transition a également fait l'objet d'un calcul de fréquences afin de vérifier qu'il s'agissait bien d'un point selle d'ordre 1 sur la surface de potentiel. Les grandeurs énergétiques de la réaction seront présentées en variation d'enthalpie libre. Les charges atomiques ont été calculées à l'aide de la procédure NPA implémentée dans le module NBO^{28, 29} de Gaussian03.

I.2. Etude du mécanisme réactionnel lors de l'activation en O7

I.2.1. Etape 1 : Addition de O₂ en C2

La première étape du processus d'oxydation correspond à la création de la liaison C2Oa. La contribution majeure au mode normal associé à la fréquence imaginaire de l'état de transition (TS1) consiste en la diminution de la distance C2Oa, passant de 3,29 à 1,52 Å. Dans le même temps, on note une augmentation du caractère sp³ autour de l'atome C2 (l'angle dièdre θ_{C2} défini par les atomes C2C3O1C1' augmente de 0° à 31,1°) et une rotation du groupement catéchol (d'environ 10°). Les liaisons C2C3 et OaOb sont affaiblies, la longueur de ces liaisons augmente de 0,1 Å.

D'un point de vue électronique, seuls les atomes impliqués dans la création de la liaison C2Oa subissent des variations de charges significatives. Les charges atomiques de Oa et Ob diminuent respectivement de 0,21e et 0,11e alors que celles de C2, C3 et O3 augmentent respectivement de 0,15e, 0,16e et 0,11e.

Cette première étape nécessite une énergie d'activation de 15,6 kcal.mol⁻¹ (Cf. Figure 9) et constitue l'étape limitante de l'oxydation de la quercétine. Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'une pyramidalisation de 20° de la position en C2 nécessitait un peu moins de 8 kcal.mol⁻¹. Dans le cas présent, la pyramidalisation est encore plus importante (environ 30°) et est certainement responsable de l'augmentation de l'énergie d'activation de la première étape (pour rappel lors de l'oxygénolyse de la quercétine avec une activation en O3, $\Delta G_1 = +12,0$ kcal.mol⁻¹).

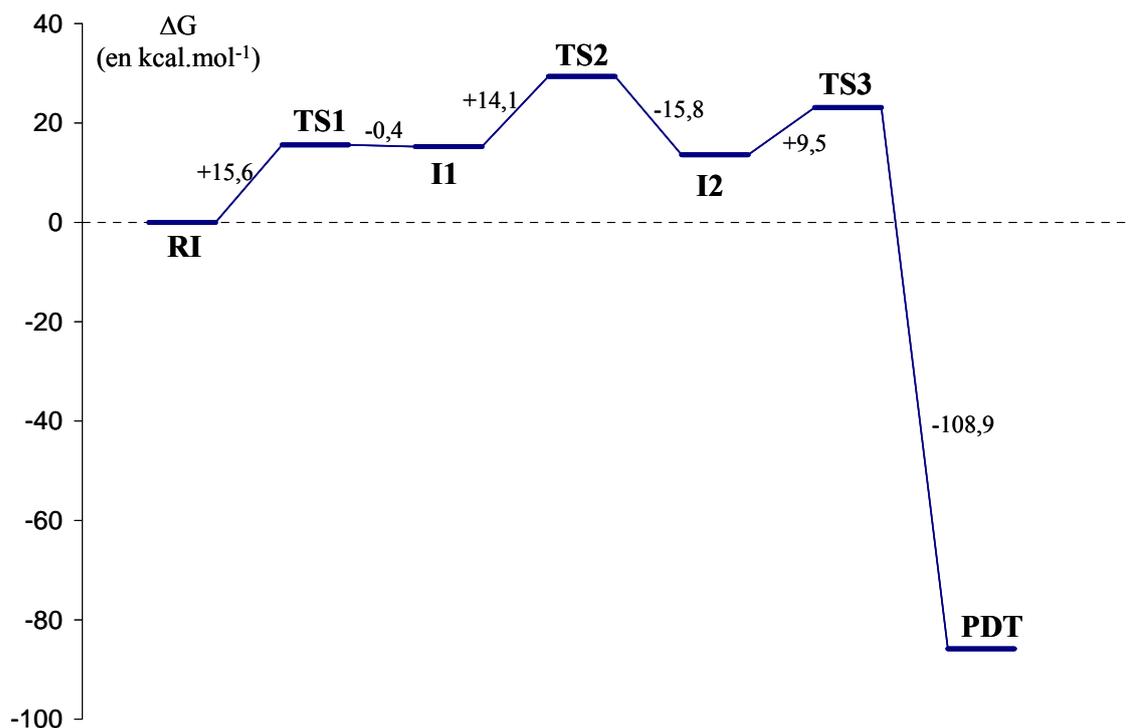


Figure 9 : profil énergétique de l'oxydation de la quercétine activée en position O7.

I.2.2. Etape 2 : Formation de l'intermédiaire endoperoxo

Seul le mécanisme réactionnel impliquant la formation d'un intermédiaire de type endoperoxo a été caractérisé. En effet, aucune forme intermédiaire stable de type dioxétane n'a pu être caractérisé en dépit d'une exploration exhaustive de la surface de potentiel. Seul le chemin réactionnel passant par l'intermédiaire I2 sera détaillé.

La deuxième étape consiste en la formation de l'intermédiaire cyclique de type endoperoxo. La formation de la liaison C4Ob contribue en majeure partie au mode normal de vibration associée à la fréquence imaginaire de l'état de transition (TS2). La longueur de la liaison C3O3 se rapproche celle de la liaison CO dans le monoxyde de carbone. La longueur de la liaison C3O3 était de 1,27 Å dans la structure RI, de 1,23 Å pour I1 et est désormais de 1,20 Å pour l'intermédiaire cyclique. Simultanément à la création de la liaison C4Ob, on note une pyramidalisation de la position en C4. L'angle dièdre θ_{C4} défini par les atomes C4C3O4C10 augmente de 1,80° (I1) à 30,90° (I2). On note également un affaiblissement des liaisons C3C4, C4C10 et OaOb.

Comme lors de la première étape, seuls les atomes concernés par la création de la liaison C4Ob subissent des variations de charges notables. Les charges des atomes de carbone C3 et C4

augmentent respectivement de 0,08e et de 0,19 alors celles des atomes d'oxygène Oa et Ob continuent de diminuer ($\Delta q_{Oa} = -0,08e$ et $\Delta q_{Ob} = -0,19e$). On peut également noter une augmentation de la charge de 0,05e sur les atomes C6 et O3.

La deuxième étape nécessite une énergie d'activation de $+14,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$ proche de celle obtenue pour la première étape. La formation de l'intermédiaire cyclique demande, dans le cas d'une quercétine activée en position O7, moins d'énergie que la formation du même intermédiaire dans le cas de la quercétine radicalaire et déprotonée en position O3 ($14,1$ contre $24,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$). En revanche, en prenant les réactifs (RI) comme référence, nous obtenons une différence d'enthalpie libre avec le deuxième état de transition proche pour les deux systèmes : $+29,4$ et $+33,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ respectivement lors de l'activation en O7 et en O3. Cela s'explique en partie par le fait que l'intermédiaire II est très proche de l'état de transition TS1 d'un point de vue énergétique.

I.2.3. Etape 3 : Ouverture du cycle et formation des produits

La dernière étape consiste en l'ouverture du cycle par cassure simultanée de trois liaisons formant le cycle endoperoxo : C2C3, C3C4, OaOb. Cela entraîne la libération du groupement C3O3, proche d'un point de vue structural ($d_{C3O3} = 1,14 \text{ \AA}$) et électronique ($q_{O3} = -0,52e$ $q_{C3} = +0,52e$) du monoxyde de carbone. Le groupement catechol et la fonction ester (R-C2OaO1-R') créée lors de cette étape sont quasiment dans le même plan (angle de torsion de $171,8^\circ$), facilitant ainsi la délocalisation électronique entre ces deux fonctions et stabilisant les produits. La rotation de la fonction acide carboxylique (-C4ObO4H4-), également formée lors de cette étape entraîne la formation d'une liaison hydrogène stabilisant d'autant plus les produits. La distance entre l'atome d'oxygène O1 et l'atome d'hydrogène H4 est de $1,76 \text{ \AA}$.

L'ouverture du cycle central s'effectue ici en une seule étape, et la valeur de la barrière énergétique de cette dernière étape est de $+9,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Elle est beaucoup plus importante que lors de l'oxygénolyse de la quercétine activée en position O3, bien que celle-ci se déroule en deux étapes ($+0,3$ puis $+0,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour ces deux dernières étapes). La réaction globale est fortement exothermique ($\Delta G = -108,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

I.3. Etude du mécanisme réactionnel lors de l'activation en O4'

I.3.1. Etape 1 : Addition de O₂ en C3

Comme nous l'avons vu précédemment, la perte d'un hydrogène sur la fonction 4'-OH rend possible l'addition du dioxygène sur l'atome de carbone C3. Une addition sur la position C2 semble impossible, d'autant plus que nous avons tenté d'optimiser un tel intermédiaire et que la distance C2Oa augmente et le cycle à quatre atome n'est pas conservé lors de l'optimisation de géométrie

La formation de la liaison C3Oa contribue donc en majeure partie au mode normal de vibration associé à la fréquence imaginaire de l'état de transition TS1. La distance entre les atomes C3 et Oa diminue de 3,50 Å à 1,63 Å respectivement dans les structures RI et I1. L'augmentation du caractère sp³ de l'atome de carbone C3 est illustrée par la pyramidalisation de cette position. Dans l'intermédiaire I1, l'angle dièdre θ_{C3} défini par les atomes C3C2O3C4 est de 25,50°. On note également une augmentation de la longueur de la liaison C2C3 ($\Delta d_{C2C3} = +0,11$ Å), une diminution de celle de la liaison C2C1' ($\Delta d_{C2C1'} = -0,7$ Å) et une légère rotation du groupement catéchol ($\Delta\theta_{O1C2C1'C2'} = 5,9^\circ$).

D'un point de vue électronique, les atomes impliqués dans la formation de la liaison C3Oa subissent la plus forte variation de charge. On note une diminution des charges sur les atomes O4', Oa et Ob (respectivement de -0,08e, -0,18e et de -0,14e) en même temps qu'une augmentation des charges des atomes C3, C4 et C4' (respectivement de +0,19e, +0,06e et de +0,06e).

L'addition du dioxygène sur la quercétine nécessite une énergie d'activation faible (+2,7 kcal.mol⁻¹) en comparaison avec celle des autres chemins envisagés (+12,0 et +15,6 kcal.mol⁻¹ respectivement lors d'une activation en position O3 et O7). La faible rotation du groupement catechol est l'une des raisons de cette différence. La Figure 10 présente le profil réactionnel de l'oxydation de la quercétine alors que la déprotonation a eu lieu sur la fonction 4'-OH.

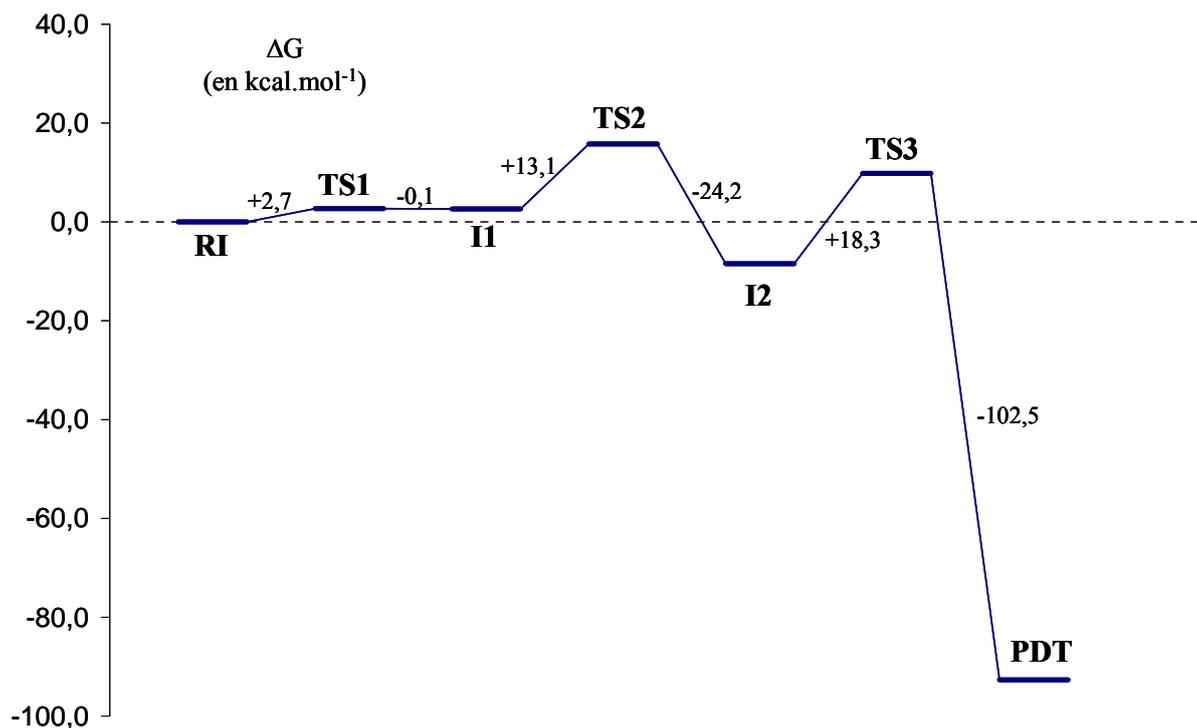


Figure 10 : profil énergétique de l'oxydation de la quercétine activée en position O4'.

I.3.2. Etape 2 : Formation de l'intermédiaire dioxétane

La deuxième étape consiste en la formation de l'intermédiaire cyclique à quatre atomes de type dioxétane par création de la liaison C2Ob. Cette longueur de liaison diminue de 3,55 Å à 1,44 Å entre les intermédiaires I1 et I2. Dans le même temps, on note une pyramidalisation de la position en C2 ($\theta_{C2} = 28,20^\circ$), une rotation du groupement catéchol beaucoup plus importante que lors de la première étape ($\theta_{O1C2C1'C2'} = 144,90^\circ$), et un affaiblissement des liaisons C2C1', C2C3 et OaOb qui possèdent désormais des longueurs de liaison caractéristiques d'une liaison simple.

Une nouvelle fois, seuls les atomes directement concernés par la création de la liaison lors de cette étape présentent les variations de charges les plus significatives. On note une augmentation de la charge sur les atomes C2 ($\Delta q_{C2} = +0,22e$) et C3 ($\Delta q_{C3} = +0,07e$) et une diminution sur les atomes Oa ($\Delta q_{Oa} = -0,11e$) et Ob ($\Delta q_{Ob} = -0,17e$). Les autres atomes présentent une variation de charge inférieure en valeur absolue à 0,02e excepté pour les atomes C3' ($\Delta q_{C3'} = +0,06e$) et C4' ($\Delta q_{C4'} = -0,08e$).

La barrière énergétique de cette étape est de +13,1 kcal.mol⁻¹. L'énergie d'activation est plus faible dans le cas de la quercétine radicalaire déprotonée en position O3 (+17,9 kcal.mol⁻¹ pour la formation de l'intermédiaire dioxétane) et la formation de l'intermédiaire I2 est

thermodynamiquement favorisée puisqu'il est plus stable d'un point de vue énergétique que les réactifs initiaux.

I.3.3. Etape 3 : Ouverture du cycle et formation des produits

L'ouverture du cycle central par la rupture simultanée des liaisons C2C3 et OaOb contribue majoritairement au mode normal de vibration de la fréquence imaginaire du dernier état de transition. D'un point de vue structural, excepté le renforcement des liaisons C2Ob et C3Oa, les autres longueurs de liaison varient peu. La valeur de l'angle de torsion O1C2C1'C2' (176,80°) montre que la fonction ester (R-O1C2Ob-R'), créée lors de cette dernière étape, et le groupement catéchol sont coplanaires. On note une diminution de charge sur les atomes Oa, Ob et C1' en même temps qu'une augmentation sur les atomes C2 et C3, dûe à la formation des fonctions ester et acide carboxylique. L'ouverture du cycle dioxétane est relativement coûteuse en énergie. L'énergie d'activation de +18,3 kcal .mol⁻¹ est la plus importante de ce chemin réactionnel. La réaction est très exothermique ($\Delta G = -102,5$ kcal.mol⁻¹)

I.4. Rappel du mécanisme lors de l'activation en O3

Nous n'allons pas détailler l'ensemble du chemin réactionnel de l'oxydation par le dioxygène de la quercétine radicalaire déprotonée en position O3. Cette étude a été largement commentée dans le chapitre précédent. Nous nous contenterons de faire un rappel des principaux résultats obtenus tant d'un point de vue électronique, structural qu'énergétique et tenterons d'extrapoler au cas présent en mettant en avant les différences éventuelles.

La densité de spin de la forme semiquinone montre que l'addition du dioxygène peut s'effectuer sur le carbone C2. Cela était cohérent avec le chemin envisagé et les résultats expérimentaux. Pour la suite de la réaction nous avons dû envisager deux cas : la formation d'un intermédiaire cyclique de type dioxétane (addition du deuxième atome de O2 sur l'atome de carbone C3) ou d'un intermédiaire cyclique de type endoperoxo (addition du deuxième atome de O2 sur l'atome de carbone C4). La barrière d'énergie de l'étape limitante est thermodynamiquement favorable à la formation de l'intermédiaire dioxétane (chemin réactionnel en rouge sur la Figure 11) par rapport à l'intermédiaire de type endoperoxo (en bleu sur la Figure 11). Comme pour les deux chemins réactionnels présentés dans ce chapitre, la réaction est fortement exothermique.

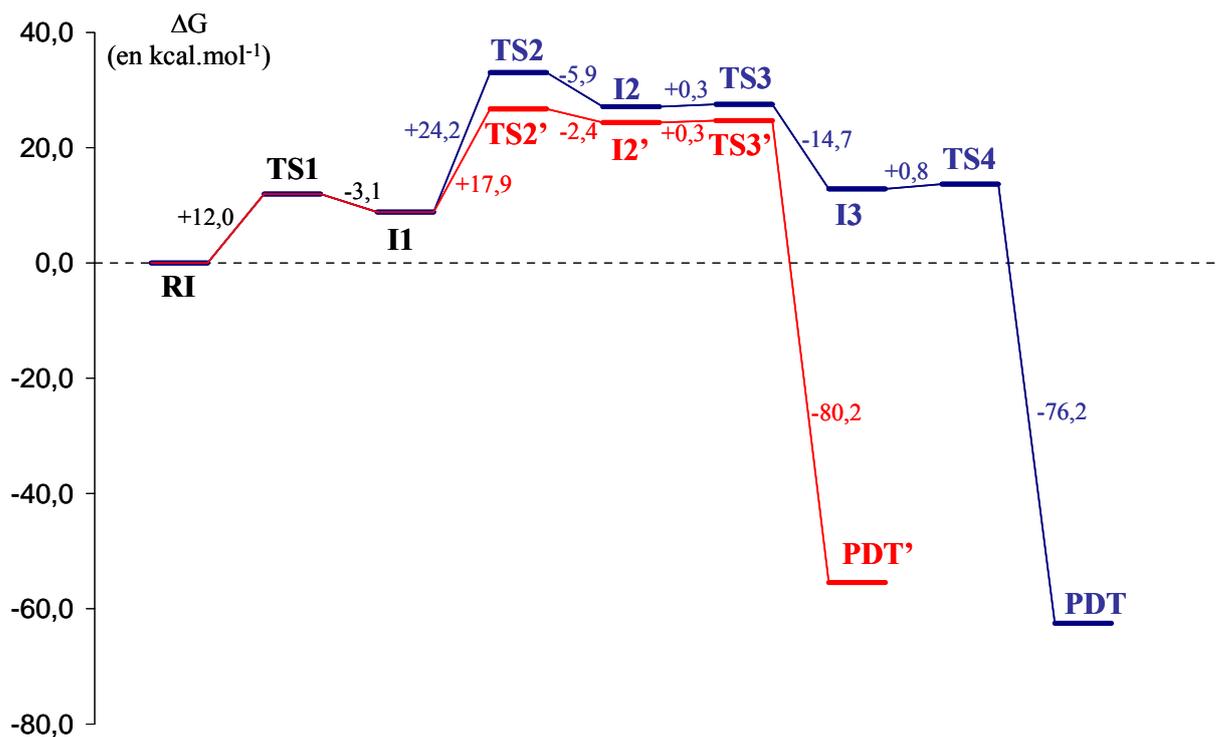


Figure 11 : Profils des chemins réactionnels de l'oxygénolyse de la quercétine, avec la formation de l'intermédiaire dioxétane (en rouge) et endoperoxo (en bleu).

La Quercétinase joue un rôle très important dans le mécanisme réactionnel. En plus de son rôle sur la polarisation du substrat, le métal empêche la formation de l'intermédiaire dioxétane. En revanche, le centre métallique (Cu^{2+}) est différent de celui de la LOX-3. Nous n'avons pas caractérisé ces chemins réactionnels en présence de fer. La question du chemin réactionnel passant par l'intermédiaire dioxétane dans la LOX-3 reste ouverte. Même si le fer va également polariser la quercétine, nous ne pouvons présager de la formation d'un tel intermédiaire. De plus, la reconnaissance du substrat, par le jeu d'interactions de type π -stacking et σ - π entre les chaînes latérales des résidus du site actif de l'enzyme et le motif catéchol de la quercétine, permet de préparer le substrat en activant la position en C2. Cela a une importance non négligeable sur la première étape du mécanisme réactionnel puisque les modifications structurales lors de cette étape font intervenir la rotation du groupement catéchol et la pyramidalisation de la position en C2.

I.5. Comparaison des différents chemins

Les profils énergétiques obtenus pour les trois mécanismes de dégradation de la quercétine au sein de l'enzyme LOX-3 présentent des différences importantes et il apparaît difficile de privilégier un

mécanisme par rapport à un autre. Ceci est d'autant plus difficile que les étapes limitantes font intervenir des processus différents : addition du dioxygène pour l'activation en O7 (première étape), formation de l'intermédiaire cyclique pour l'activation en O3 (étape 2) et ouverture du cycle pour l'activation en O4' (étape 3). Concernant les étapes limitantes, la barrière énergétique la plus faible apparaît lors du mécanisme élaboré pour l'activation en O7 ($\Delta G = +15,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Toutefois, comme il a été précisé dans le texte, si l'on prend pour ce mécanisme l'intermédiaire RI comme référence, il apparaît alors que l'énergie requise pour obtenir l'état de transition TS2 est de $29,4 \text{ kcal.mol}^{-1}$, qui est alors comparable à l'énergie requise pour obtenir ce même état de transition pour le mécanisme impliquant une activation en O3. Le même protocole appliqué pour le mécanisme correspondant à une activation en O4' ne mène qu'à une activation de $15,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Il paraît difficile de pousser plus en avant ces comparaisons tant les mécanismes réactionnels présentent des caractéristiques différentes.

L'étape d'addition du dioxygène (étape 1) peut toutefois être comparée pour les trois mécanismes. Les deux mécanismes, activation en O3 et en O7, entraînent une addition sur le carbone C2 et présentent des énergies comparables ($+12,0$ et $+15,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ respectivement) alors que l'activation en O4' entraîne une addition en C3 associée à une première barrière de transition de $2,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

L'évolution de la distance C2Oa lors de la première étape est comparable pour les deux premiers mécanismes ($3,20$ et $3,29 \text{ \AA}$ pour RI ; $1,93$ et $1,88 \text{ \AA}$ pour TS1 ; $1,50$ et $1,52 \text{ \AA}$ pour I1 concernant les activations en O3 et O7 respectivement). L'analyse de cette distance pour le mécanisme d'addition en C3, selon le schéma d'activation en O4', donne des valeurs légèrement différentes : $3,50 \text{ \AA}$ pour RI, $1,78 \text{ \AA}$ pour TS1 et $1,63 \text{ \AA}$ pour I1. Si l'on analyse l'évolution de cette distance en regard des énergies d'activation, il est surprenant de constater que la plus grande évolution est associée à l'énergie la plus basse (mécanisme d'activation en O4').

Toutefois, si l'on se base sur les énergies absolues des trois intermédiaires RI pour les trois mécanismes, il apparaît que celui produit par l'activation en O4' est le moins stable. Cet intermédiaire est effectivement $9,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ plus haut en énergie par rapport à l'intermédiaire RI provenant de l'activation en O3 et, à titre de comparaison, l'intermédiaire RI provenant de l'activation en O7 est $7,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$ plus haut en énergie que celui provenant de l'activation en O3. Les énergies absolues des deux états de transition TS1 provenant des activations en O3 et O4' sont alors comparables.

Par contre, au niveau de cet intermédiaire TS1, deux nouvelles tendances sont également rapportées. Concernant les activations en O3 et O7, qui mènent à l'addition sur le même carbone C2, les angles de pyramidalisation sont de $17,6^\circ$ et $15,4^\circ$ et les fréquences imaginaires de -268 et -241 cm^{-1} alors que la pyramidalisation en C3 dans le cas de l'activation en O4' est de $21,10^\circ$ pour une fréquence imaginaire de seulement -151 cm^{-1} . Ces deux dernières caractéristiques mettent en avant que la pyramidalisation en C3 est beaucoup plus aisée (dû notamment au fait que cet atome de carbone n'est

pas lié au groupement lourd qu'est le catéchol) et permettent d'apporter un élément de réponse quant à la différence importante d'énergie d'activation pour cette première étape.

L'étude structurale de l'enzyme va nous apporter de nouveaux renseignements sur le chemin réactionnel le plus probable, mais sur la base de ces résultats quantiques nous ne pouvons discriminer tel ou tel mécanisme. Une analyse expérimentale des produits de dégradation de la quercétine au sein de la LOX-3 pourrait apporter de précieux renseignements. En effet, la décomposition du dioxétane émet de la lumière à une longueur d'onde bien particulière dont la mise en évidence permettrait d'écarter les mécanismes passant par la formation d'un intermédiaire de type endoperoxo. Le dégagement de monoxyde de carbone laisserait au contraire penser à la formation de ce même intermédiaire.

II. Etude du site Actif de l'enzyme

Sur la base des considérations structurales et des hypothèses mécanistiques présentés précédemment (déprotonation de la quercétine par l'acide aminé C-terminal ou par l'ion hydroxyle), nous avons retenu un modèle de site actif comprenant les chaînes latérales des résidus coordonnés au fer (His518, His523, His709, Asn713 et Ile857). La sphère de coordination du fer a été complétée soit par un ion hydroxyle, soit par la quercétine. Comme nous allons le voir par l'analyse de ces structures quantiques, la chaîne latérale du résidu Leu773 semble jouer un rôle important dans le positionnement et la stabilisation de la quercétine au sein du site actif.

II.1. Méthodologie

Le modèle de site actif comprenant l'ion hydroxyle a été construit sur la base de la structure cristallographique de la LOX-3 native (code PDB : 1LNH)¹³. Cette même structure a servi de base pour l'élaboration du modèle de site actif impliquant la quercétine. Le substrat a été ajouté manuellement en retirant l'ion hydroxyle afin que le fer se coordonne à la quercétine via le site 3-hydroxychromone et que l'atome d'hydrogène H3 se situe proche de l'acide aminé C-terminal. Les chaînes latérales des acides aminés histidines, et asparagine ont été remplacées par des structures équivalentes : respectivement imidazole substitué par une chaîne alkyle correspondant aux atomes de carbone C α et C β , et un propionamide. La fonction carboxylate du résidu C-terminal a été remplacée par un acétate. Pour conserver une géométrie proche de celle rencontrée dans la structure cristallographique, nous avons choisi de figer la position des carbones C α des chaînes latérales de chaque résidu.

L'objectif étant de savoir si le résidu C-terminal était susceptible de déprotoner la quercétine, nous avons donc choisi d'optimiser plusieurs complexes différents. Dans un premier cas, la quercétine est protonée et le résidu C-terminal ne l'est pas, et inversement dans un deuxième cas. Nous avons fait de même pour les structures contenant l'ion hydroxyle. Dans ce cas, nous avons supposé que l'ion hydroxyle avait préalablement récupéré le proton d'un substrat absent de ce complexe. La Figure 12 présente les quatre complexes étudiés ; la charge globale et la multiplicité de spin sont respectivement de +2 et de 6 pour l'ensemble des systèmes.

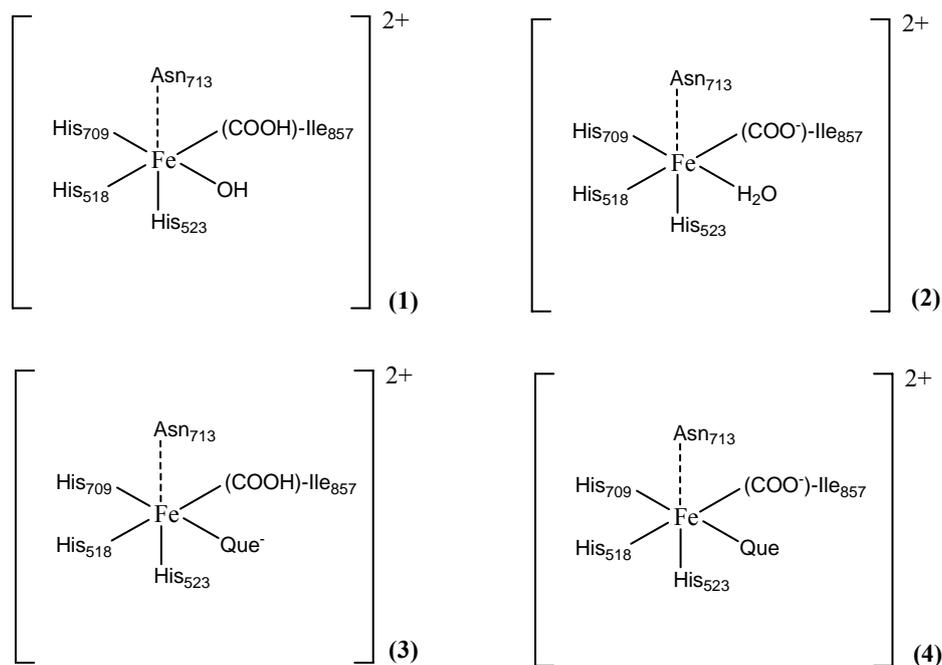


Figure 12 : Structures des quatre complexes étudiés.

Dans les composés (1) et (3), le résidu C-terminal est protoné, contrairement au composé (2) et (4).

Les structures des quatre complexes ont été optimisés au niveau de calcul B3LYP/3-21G*^{30, 31} à l'aide du programme Gaussian03. Pour les structures ne comportant pas la quercétine, nous avons étendu le jeu de fonction de base. Ces structures ont été optimisées au niveau B3LYP/6-31G*. Les calculs de fréquence ont permis de vérifier que les structures correspondaient bien à des minima de la surface d'énergie potentielle et ont permis d'obtenir les corrections thermodynamiques à 298K et 1atm.

II.2. Principaux résultats

La première information importante concerne la structure (1) dans laquelle le résidu C-terminal est protoné. L'optimisation de ce composé donne exactement la même structure optimisée que le composé (2). En effet, l'ion hydroxyle récupère le proton de la fonction acide carboxylique. Les distances métal-ligand, proches de celles rencontrées dans la structure RX, indiquent une géométrie octaédrique déformée autour du fer. La molécule d'eau forme une liaison hydrogène avec le résidu C-terminal. La Figure 13 présente la structure optimisée du complexe. La déprotonation du résidu C-terminal par l'ion hydroxyle semble cohérente avec le fait que l'ion hydroxyle est plus basique qu'une fonction carboxylate.

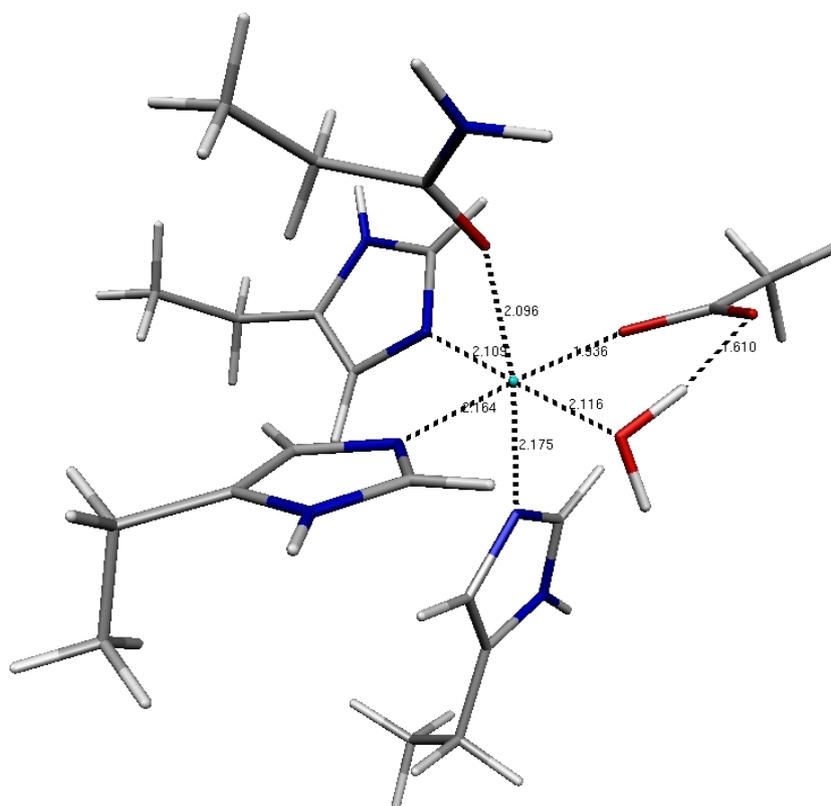


Figure 13 : Structure optimisée du complexe 2 et distance métal ligand (en Å).

La quercétine s'étant avérée être un substrat de la LOX-3, aucune structure du complexe enzyme/substrat non dégradé n'a encore été résolue par cristallographie. Les structures actuellement disponibles à la *Protein Data Bank* ne donnent que des indications fragmentaires et indirectes du mode de complexation. Sur la base de nos travaux antérieurs (Chapitre 3 et partie quantique de ce chapitre), nous avons choisi de lier la quercétine via l'atome d'oxygène O3. Lorsque la quercétine est protonée,

nous avons choisi de conserver l'atome O3 dans la sphère de coordination du fer et donc de former une fonction 4-OH. Les structures optimisées des composés 3 et 4 sont présentées dans la Figure 14.

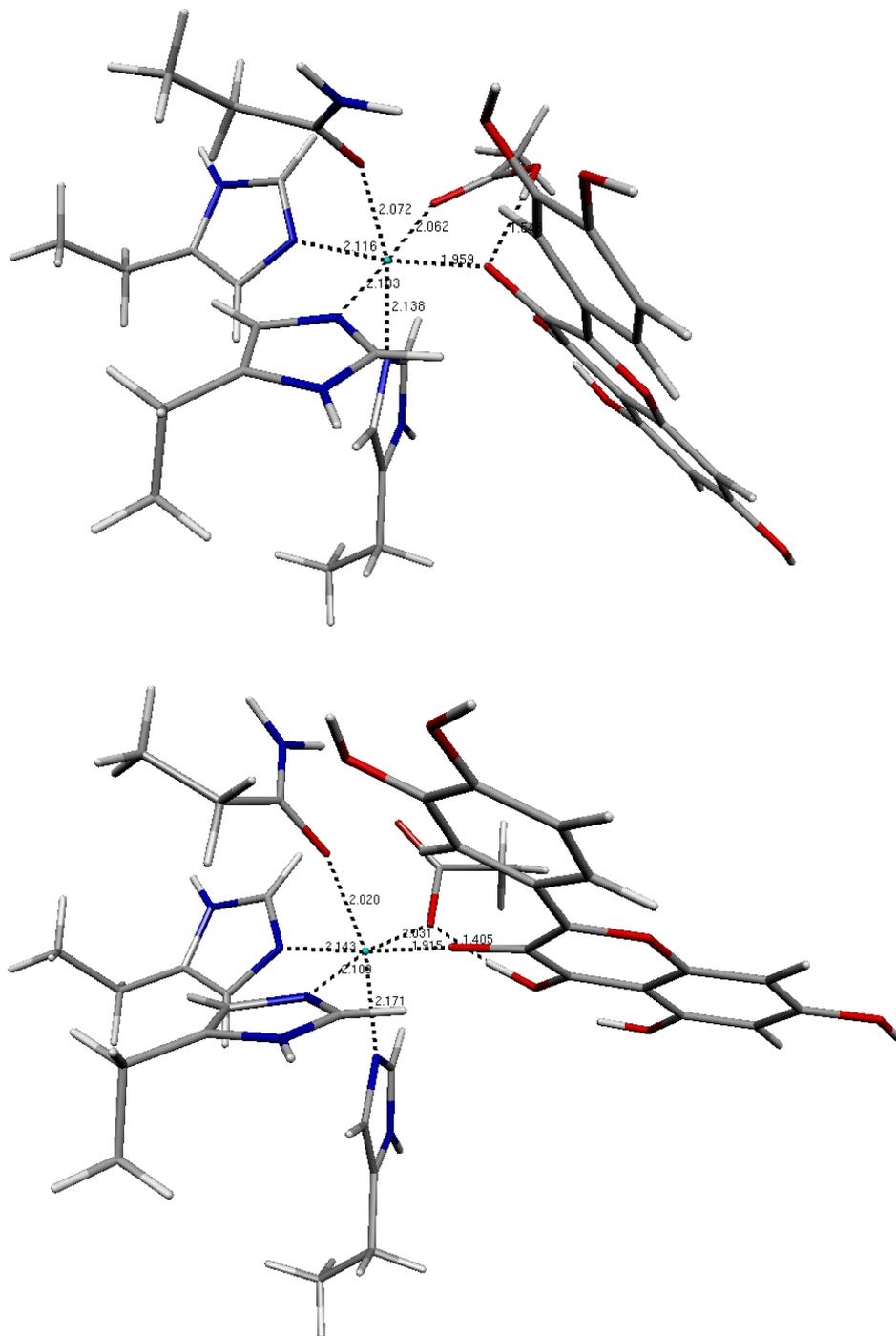


Figure 14 : Structures optimisées des composés 3 (en haut) et 4 (en bas).

Les distances métal-ligand sont proches celles de la structure RX et la coordination autour du fer est sensiblement la même que dans le complexe (2). L'énergie du complexe (3) est sensiblement inférieure ($\Delta E = 2,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$) à celle du complexe (4). Nous pouvons supposer que la fonction

carboxylate du résidu C-terminal est plus basique qu'une fonction hydroxyle de la quercétine. Cela est toutefois à considérer avec précaution puisque les calculs ont été effectués en phase gazeuse donc sans prendre en compte l'influence du pH sur le site actif.

L'inconvénient majeur de cette structure est que le cycle B a effectué une rotation et se situe désormais au dessus du résidu His518 et en interaction avec la fonction amide du résidu Asn713. Nous avons ré-optimisé la structure (3) en présence de la chaîne latérale du résidu Leu773 afin de prendre en compte la gêne stérique engendrée par la présence de cet acide aminé dans l'environnement proche du centre métallique. Cette introduction engendre une interaction enzyme/substrat de type σ - π (plus précisément de type CH- π) qui pourrait être cruciale pour un bon positionnement du substrat dans la cavité, et engendrer une meilleure conversion en les produits attendus. La Figure 15 montre la structure optimisée de ce nouveau complexe.

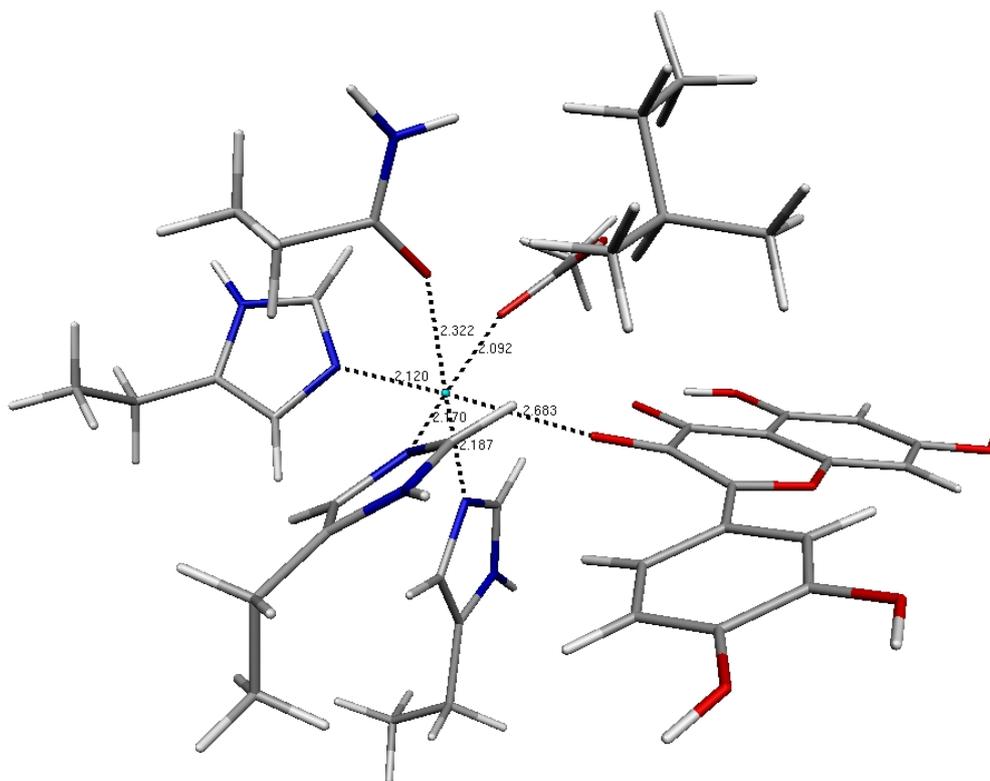


Figure 15 : Structure optimisée du composé 4 en présence de la chaîne latérale du résidu Leu773.

La chélation de la quercétine au métal peut paraître relativement faible au regard de la longueur de liaison Fe-O : 2,7 Å. Toutefois, les paramètres structuraux développés ci-après nous confortent dans le fait que cette interaction est suffisante pour activer le substrat en vue de sa dégradation.

Une analyse de la distribution de spin sur ces complexes nous apporte une précieuse information sur l'activation du substrat par le site actif. Alors que la densité de spin atomique de Mulliken était quasiment entièrement localisée sur l'atome de fer (densité de spin d'environ 4,8) pour les complexes (1) à (4), le métal ne présente plus qu'une densité de spin atomique de 3,9 dans le dernier complexe (en présence de la Leu773). La répartition du spin sur la quercétine est quasiment nulle dans les complexes (3) et (4), alors que l'atome C2 présente une densité de spin atomique de 0,71 dans la structure présentée dans la Figure 15.

Au niveau structural, l'interaction entre la chaîne latérale de la Leu773 et la quercétine engendre une rotation d'environ 20° du motif catéchol. Comme lors du chapitre 3, cette rotation engendrée par les interactions spécifiques enzyme/substrat pourrait avoir une influence sur la barrière énergétique d'addition du dioxygène.

Les calculs effectués sur ces modèles nous ont confortés dans le fait que la quercétine était suffisamment activée par le site actif : déprotonation par la fonction carboxylate de le résidu C-terminal, transfert électronique sur le métal. Bien que ces calculs aient été effectués en phase gazeuse, ils apportent de précieuses informations sur l'état de la quercétine complexé à la LOX-3. Les analyses vont nous permettre de nous focaliser sur certains paramètres structuraux cruciaux lors de nos études par simulations de dynamiques moléculaires.

III. Etude structurale de l'enzyme

III.1. Méthodologie

Différentes structures cristallisées par diffraction RX de la lipoxygénase-3 sont disponibles à la *Protein Data Bank*. Le mode de complexation de la quercétine au sein du site actif n'étant pas connu, il a été nécessaire de reconstruire manuellement trois complexes enzyme/substrat que nous noterons ES1, ES2 et ES3 respectivement pour un substrat lié au fer via l'atome O3, O7 et O4'. Pour la première position (ES1), le flavonoïde a été placé dans la cavité pour suivre au mieux les indications données par Borbulevych *et al.*¹⁵ Ces auteurs ont réalisé une étude de docking pour connaître la position privilégiée de la quercétine dans le site actif. La meilleure orientation semble faire intervenir l'atome O3 dans la sphère de coordination du fer et l'atome O5 proche du résidu C-terminal. Pour la deuxième structure (ES2), nous avons placé les atomes de la quercétine pour correspondre au mieux à la position des atomes de l'inhibiteur EGC lui-même lié au fer via l'atome

O7. Pour la dernière structure (ES3), nous avons inversé la position du cycle B et C par rapport à la structure précédente.

III.1.1. Système E/S

Les structures de départ ont été construites à partir de la structure expérimentale co-cristallisée avec l'inhibiteur EGC¹⁶ (1JNQ). Dans les trois structures ES1, ES2 et ES3, la quercétine remplace le composé EGC. Les 511 molécules d'eau initialement présentes dans la structure RX ont été conservées. Le système a été neutralisé en ajoutant 10 contre-ions Na⁺, placés dans les régions de l'espace où le potentiel électrostatique de l'enzyme était le plus négatif, selon la procédure implémentée dans le module LEAP du programme AMBER³². Une boîte de solvant (modèle d'eau de type TIP3P³³) a été étendue sur une distance de 9,5 Å autour de l'enzyme, ce qui correspond à l'introduction de 27763 (en plus des 511 molécules initiales) molécules d'eau pour les systèmes ES1 et ES2 et 27764 molécules d'eau pour le système ES3.

III.1.2. Paramètres du résidu C-terminal, de la quercétine et de l'ion fer

Notre hypothèse concernant l'activation de la quercétine implique de considérer le résidu ILE_{C-terminal} comme étant protoné. Afin d'obtenir les charges atomiques pour ce résidu et les intégrer dans le champ de forces, nous avons testé différentes méthodes sur le composé ACE-ILE (Cf. Figure 16). ACE correspond à un groupement acétyl et permet de compléter la valence de l'atome d'azote du résidu ILE. La structure a été optimisée en utilisant la procédure antechamber implémentée dans AMBER8³². Les charges AM1BCC³⁴ obtenues par défaut n'étaient pas satisfaisantes. Le caractère polaire de certaines liaisons nous a paru trop faible, nous avons donc choisi les charges CM2³⁵ (Cf. Tableau 1). Les types d'atomes du nouveau résidu étant dépendant du champ de force GAFF³⁶, nous avons eu besoin de définir les paramètres de liaison, d'angle et de torsion à la frontière entre le champ de force parm99.dat³⁷ et GAFF (Cf. Tableau 2).

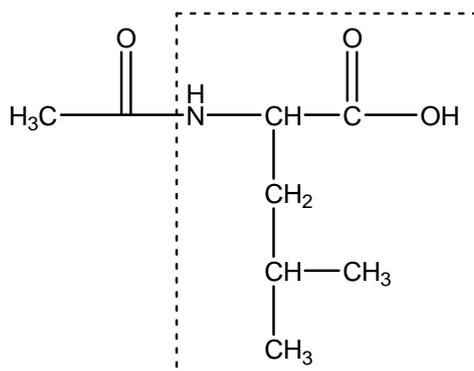


Figure 16 : Structure du composé ACE-ILE permettant d'obtenir les paramètres du résidu C-terminal. Les atomes dans la zone en pointillée correspondent au résidu ILE

Concernant la quercétine, suivant le même protocole que celui établi lors du chapitre 3, nous avons considéré que ce substrat était déprotoné par la fonction carboxylate du résidu C-terminal et que le transfert électronique vers le métal était effectif. Nous avons dû mettre aux points 3 jeux de paramètres en fonction du mode de complexation de la quercétine. Les paramètres de liaisons, d'angles et de torsions ont été obtenus sur la base des structures optimisées au niveau B3LYP/6-31(+) G^* en utilisant le programme Gaussian03. Les charges atomiques de chaque quercétine déprotonée radicalaire ont été obtenues en suivant la procédure de calcul de charge RESP^{38, 39}. Le potentiel électrostatique a également été calculé au niveau B3LYP/6-31(+) G^* (Cf. Tableau 3 et 4).

Tout comme l'ion cuivre dans la Quercétinase, le fer a été considéré comme un cation et aucune contrainte de liaison, d'angle et de torsion avec ses ligands n'a été appliquée. Les paramètres utilisés pour représenter l'ion fer(+II) sont les suivants : $q_{Fe} = +2$; $r_{vdw} = 1,200$; $\epsilon_{vdw} = 0,05$.

Tableau 1 : Type d'atome et charge CM2 du résidu C-terminal.

Atome	Type d'atome	Charge CM2
N	n	-0,712
H	hn	0,408
CA	c3	0,156
HA	hc	0,151
CB	c3	-0,086
HB	hc	0,097
CG2	c3	-0,159
HG11	hc	0,077
HG22	hc	0,071
HG33	hc	0,061
CG1	c3	-0,121
HG12	hc	0,071
HG13	hc	0,083
CD1	c3	-0,146
HD11	hc	0,060
HD12	hc	0,064
HD13	hc	0,062
C	c	0,453
O2	oh	-0,495
O1	o	-0,476
H2	ho	0,384

Tableau 2 : Paramètres structuraux utilisés pour définir la frontière entre les atomes définis dans le champ de forces GAFF et ceux du champ de forces Parm99.

	Constantes de force (en kcal.mol ⁻¹)	Paramètres structuraux
C-n	490,0	1,335
C-n-hn	50,0	120,0
C-n-c3	50,0	121,9
CT-C-n	70,0	116,6
O-C-n	80,0	122,9
O-C-n-hn	180,0	10,0
O-C-n-c3	180,0	10,0
CT-C-n-hn	180,0	10,0
CT-C-n-c3	180,0	10,0

Tableau 3 : Types d'atome tels qu'ils sont définis dans le champ de forces AMBER pour les trois structures de quercétine déprotonée radicalaire et charges RESP correspondantes.

Activation en O3		Activation en O7		Activation en O4'		
Type d'atome	Charge	Type d'atome	Charge	Type d'atome	Charge	
O1	OS	-0,104	OS	-0,123	OS	-0,119
O3	O2	-0,538	OH	-0,550	OH	-0,578
O4	O	-0,478	O	-0,490	O	-0,556
O5	OH	-0,491	OH	-0,546	OH	-0,535
O7	OH	-0,500	O2	-0,354	OH	-0,555
O3'	OH	-0,579	OH	-0,631	OH	-0,579
O4'	OH	-0,525	OH	-0,626	O2	-0,451
C2	CM	0,184	CM	0,136	CM	0,107
C3	CM	0,325	CM	0,094	CM	0,194
C4	C	0,370	C	0,462	C	0,412
C5	CA	0,148	CA	0,158	CA	0,226
C6	CA	-0,164	CA	-0,187	CA	-0,282
C7	CA	0,135	CA	0,375	CA	0,256
C8	CA	-0,090	CA	-0,120	CA	-0,180
C9	CM	-0,067	CM	-0,048	CM	-0,029
C10	CM	-0,023	CM	-0,006	CM	-0,037
C1'	CA	-0,096	CA	-0,023	CA	-0,050
C2'	CA	-0,270	CA	-0,192	CA	-0,170
C3'	CA	0,157	CA	0,153	CA	0,156
C4'	CA	0,358	CA	0,362	CA	0,522
C5'	CA	-0,286	CA	-0,244	CA	-0,271
C6'	CA	-0,143	CA	-0,198	CA	-0,114
H3	-	-	HO	0,424	HO	0,447
H5	HO	0,436	HO	0,430	HO	0,448
H6	HA	0,153	HA	0,169	HA	0,171
H7	HO	0,430	-	-	HO	0,451
H8	HA	0,157	HA	0,138	HA	0,166
H2'	HA	0,225	HA	0,160	HA	0,206
H3'	HO	0,464	HO	0,466	HO	0,440
H4'	HO	0,453	HO	0,466	-	-
H5'	HA	0,205	HA	0,191	HA	0,170
H6'	HA	0,154	HA	0,152	HA	0,137

Tableau 4 : Paramètres structuraux utilisés pour la quercétine déprotonée radicalaire.

	Constantes de force (en kcal.mol⁻¹)	Paramètres structuraux
CA-OH	300,0	1,355 Å
CM-OS	300,0	1,365 Å
CM-O2	300,0	1,244 Å
CA-CA-OH	100,0	119,6°
CA-CM-OS	100,0	114,7°
CA-OH-HO	100,0	108,3°
CA-CM-C	100,0	121,3°
CM-CA-OH	100,0	120,5°
CM-CM-OS	100,0	120,7°
CM-C-CM	100,0	117,0°
CM-OS-CM	100,0	123,3°
CM-CM-O2	100,0	123,3°
CM-CA-CA	100,0	121,1°
CM-CA-HA	100,0	121,4°
C-CM-O2	100,0	119,2°
X-CA-OH-X	10,0	180,0°
X-CM-OS-X	10,0	180,0°

III.1.3. Dynamiques moléculaires

Les simulations ont été effectuées à l'aide du programme AMBER8 et du champ de forces parm99.dat. Les dynamiques moléculaires ont été réalisées dans l'ensemble thermodynamique isotherme-isobare NPT à 310K et 1 atmosphère, en utilisant l'algorithme de contrainte des liaisons SHAKE^{40, 41} afin de figer les liaisons impliquant les atomes d'hydrogène. Un pas d'intégration de 2 femto-secondes a été utilisé, et un cut-off de 8 Å a été appliqué sur les interactions van der Waals entre atomes non-liés (la liste de ces atomes a été mise à jour tous les 25 pas). Les conditions limites périodiques ont été définies en utilisant l'algorithme PME⁴²⁻⁴⁵ (*Particule Mesh Ewald*).

Une fois les contre-ions et la boîte d'eau ajoutés à la structure initiale, 2000 pas de minimisation en gardant le soluté et les ions fixes, suivi de 2000 pas de minimisation en gardant le solvant fixe ont été effectués. La phase de pré-équilibre du système a été poursuivie par une dynamique de 50 ps en conservant le soluté fixe. Puis, 2000 pas de minimisation et 50 ps de

dynamique, en utilisant une contrainte de $30 \text{ kcal.}(\text{mol.}\text{Å}^2)^{-1}$ sur le soluté, ont été réalisés. Six nouvelles séquences de 2000 pas de minimisation et de dynamiques ont été effectués en réduisant à chaque séquence la contrainte de $5 \text{ kcal.}(\text{mol.}\text{Å}^2)^{-1}$ pour laisser au système le temps de se relaxer. Le système est ensuite lentement « chauffé » de 100 à 310K sur une période de 20 ps lors de la phase de thermalisation. La phase d'équilibration du système continue sur une période de 50 ps après la phase de thermalisation. Les trois systèmes ont été échantillonnés pendant 3 ns lors de la phase de production.

III.1.4. Energie de complexation

Afin de déterminer les enthalpies libres de complexation, l'analyse MM_PBSA, implémentée dans le logiciel AMBER, a été réalisée sur chaque système E/S. La procédure standard a été utilisée, et l'enthalpie libre de la solvation a été estimée en utilisant la méthode *Generalized Born Method*⁴⁶⁻⁴⁹ intégrée au module SANDER. Nous avons pris soin d'ajouter les paramètres GB/SA LCPO^{50, 51} du fer dans le fichier mdread.f. Nous avons suivi la même démarche que lors du chapitre précédent pour les paramètres du cuivre. Le Tableau 5 résume les paramètres GB/SA utilisé pour l'ion fer(II).

Tableau 5 : paramètres GB/SA pour l'ion fer(II)

GB/SA van der Waals	1,200 + 1,4
GB/SA LCPO (P1)	0,49392
GB/SA LCPO (P2)	-0,16038
GB/SA LCPO (P3)	-0,00015512
GB/SA LCPO (P4)	0,00016453

III.2. Etude structurale

Nous avons vérifié que la phase de relaxation n'a pas entraîné de modification de la structure de chaque complexe enzyme/substrat en calculant le RMSd entre la structure de départ de chaque phase de production et la structure cristallographique (1JNQ). La valeur de RMSd est faible pour les trois simulations : 1,46 Å, 1,62 Å et 1,80 Å respectivement pour ES1, ES2 et ES3. La zone la plus mobile est la partie non structurée du domaine N-terminal définie par les résidus 20 à 56. La plus grande mobilité du domaine N-terminal (résidus 1 à 167) par rapport au domaine C-terminal avait déjà été identifiée sur la LOX-1 (isozyme de la LOX-3) et doit être mise en relation avec la capacité de la lipoxygénase de rester active alors que les deux domaines sont séparés. Le site catalytique conserve

son intégrité structurale alors que le domaine N-terminal, structurellement proche d'un domaine de type C2 de liaison à la membrane, peut interagir avec d'autres entités biologiques. Cette analyse est similaire pour les trois systèmes étudiés. La Figure 17 illustre les faibles modifications structurales du complexe ES1. Les valeurs de RMSd sont représentées par un code couleur allant du bleu au rouge respectivement pour les valeurs minimales et maximales.

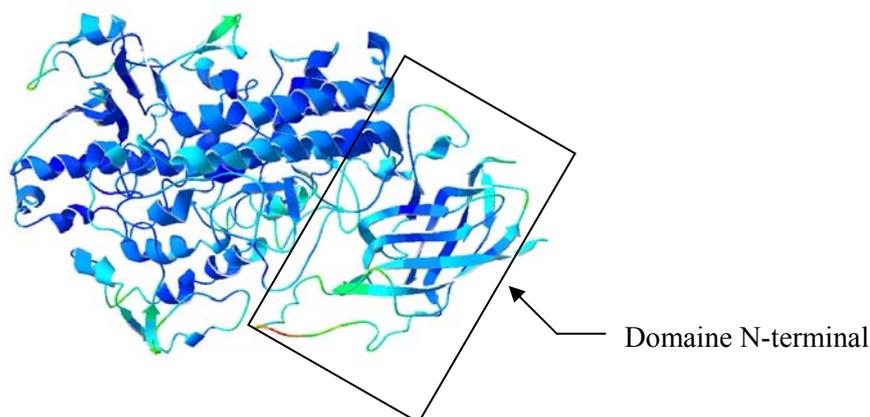


Figure 17 : Structure de la LOX-3 après la phase de thermalisation/équilibre. La structure secondaire est colorée suivant les valeurs de RMSd.

La lipoxigénase contient un site à fer non-hème coordonné à trois résidus histidine et à la fonction carboxylate de l'acide aminé C-terminal. Dans la structure native, avec une distance Fe-O d'environ 3 Å, l'atome d'oxygène OD1 du résidu Asn713 est faiblement lié au fer. Solomon *et al.*¹ ont montré que la réduction du fer(III) en fer(II) lors du transfert d'hydrogène entre le substrat et le site actif engendrait une diminution de la distance Fe-Asn713 et donc un changement de coordination du fer. Un ion hydroxyle est également présent dans le site actif à une distance d'environ 4 Å du centre métallique et joue le rôle d'accepteur d'hydrogène lors de la dégradation des acides gras.

Les distances métal-ligands pour les trois simulations E/S sont reportées dans le Tableau 6. Dans ce tableau sont également rappelées les valeurs de ces mêmes distances obtenues suite à la résolution structurale de l'enzyme native (1LNH) et complexée à l'epigallocatechine (1JNQ). Les distances entre l'atome de fer et les trois ligands histidine restent constantes au cours de chaque simulation et sont en bon accord avec les structures cristallographiques. Les atomes O1 et O2 du résidu C-terminal échangent leur position et sont alternativement liés au fer au cours des simulations ES2 et ES3. Pour ces deux systèmes, la distance Fe-Ile857 reportée dans le Tableau 6 correspond à la distance entre l'ion fer et l'atome d'oxygène O1 ou O2 le plus proche au cours de la simulation. Contrairement à la structure 1JNQ dans laquelle le résidu Asn713 est relativement éloigné du centre métallique, les distances Fe-OD1_{Asn713} sont plus courtes dans les trois systèmes étudiés. Cela s'explique par le fait que le fer est dans son degré d'oxydation +II et que la quercétine est dégradée par l'enzyme contrairement au composé EGC qui est un inhibiteur de l'enzyme.

Tableau 6 : Distances moyennes métal-ligand (en Å) dans les structures ES1, ES2 et ES3 et distances statiques dans la structure RX co-cristallisée avec l'inhibiteur EGC (1JNQ) et dans la structure RX native (1LNH).

	Distances (en Å)				
	ES1	ES2	ES3	1JNQ	1LNH
Fe-NE2 _{His518}	2,21	2,20	2,27	2,23	2,23
Fe-NE2 _{His523}	2,19	2,14	2,13	2,24	2,21
Fe-NE2 _{His709}	2,14	2,13	2,15	2,23	2,26
Fe-O1 _{Ile857}	2,10	2,11*	2,17*	2,68	2,13
Fe-OD1 _{Asn713}	2,09	2,09	2,01	3,82	3,01
Fe-Wat	-	-	2,07**	-	4,02
Fe-O3 _{Que}	2,09	-	-	-	-
Fe-O7 _{Que}	-	3,35	-	-	-
Fe-O4' _{Que}	-	-	5,71	-	-
Fe-O7 _{EGC}	-	-	-	2,27	-

* : la valeur indique la distance moyenne entre l'atome de fer et l'atome OD1 ou OD2 le plus proche.

** : valeur moyenne après 398 ps de temps de simulation (Cf. III.2.3.a).

La reconnaissance du substrat par l'enzyme implique différents résidus en fonction du mode de complexation de la quercétine, nous allons détailler chaque site actif et les interactions enzyme/substrat dans la suite de cette étude.

III.2.1. Particularités de l'activation en O3

III.2.1.a. Analyse du site actif

Tout au long de la simulation de dynamique moléculaire ES1, l'atome d'oxygène O3 de la quercétine reste lié au fer. Les distances métal-ligand, dont les valeurs moyennes sont reportées dans le Tableau 6 fluctuent peu au cours de la simulation. La valeur de la distance moyenne fer-quercétine (Cf. Tableau 6) montre qu'en présence d'un substrat, le site actif de la LOX-3 adopte une géométrie octaédrique déformée. La Figure 18 montre la première sphère de coordination autour du centre métallique.

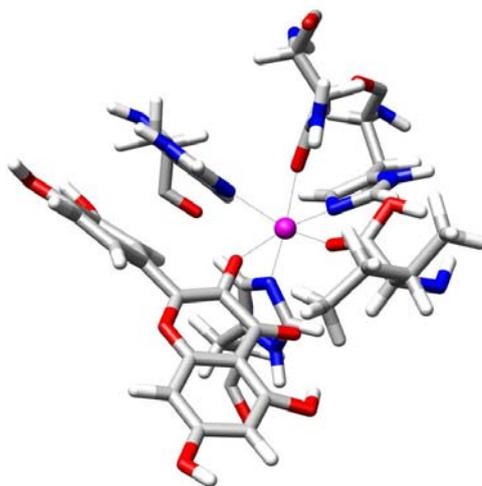


Figure 18 : Site actif de la LOX-3 dans la simulation ES1.

III.2.1.b. Analyse des Interactions Enzyme/substrat

La quercétine complexée au fer via l'atome d'oxygène O3 forme plusieurs liaisons hydrogène avec des résidus du site actif. L'atome d'oxygène O du résidu Thr274 est à une distance moyenne de 2,89 Å de l'atome d'oxygène O7 de la quercétine. La fonction 4'-OH du groupement catechol est en interaction avec l'atome OE1 du résidu Gln514 (distance moyenne de 2,71 Å) mais également avec une molécule de solvant (comme indiqué sur la Figure 19). Enfin la fonction 3'-OH forme une liaison hydrogène non directionnelle avec l'atome O du résidu Gln514. La distance moyenne $O3'_{\text{quercétine}}-O_{\text{Gln514}}$ est de 3,21 Å.

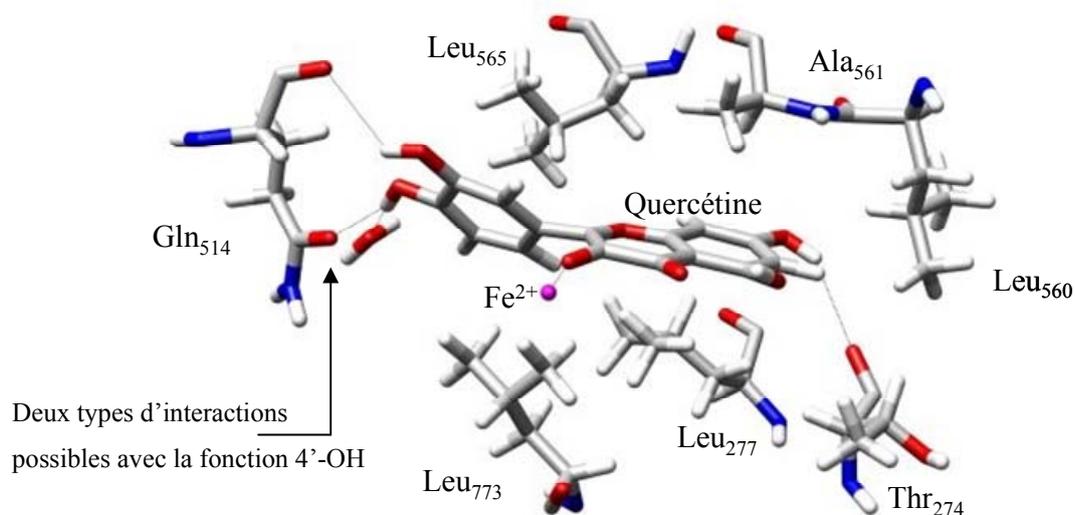


Figure 19 : Interactions hydrophiles et hydrophobes dans le complexe enzyme/substrat ES1.

La quercétine présente plusieurs interactions hydrophobes avec les résidus du site actif. Les chaînes latérales de quatre résidus leucine et d'un résidu alanine stabilisent la structure du substrat dans une conformation similaire à celle rencontrée dans la Quercétinase. En effet, l'analyse de l'angle de torsion O1C2C1'C2' montre que la rotation moyenne du groupement catechol est de 35,9°. De plus, l'angle de torsion autour du carbone C2 varie entre $\pm 10^\circ$ et montre une pyramidalisation possible sur cette position en vue d'une addition directe d'une molécule de dioxygène (Cf. Figure 19).

III.2.2. Particularités de l'activation en O7

III.2.2.a. Analyse du site actif

Plusieurs phases se différenciant par le mode de complexation des ligands au métal sont reportées au cours de cette simulation. Notons tout d'abord le mode de coordination particulier de la quercétine. A la fin de la période d'équilibration/thermalisation, la distance Fe-O7 est importante (environ 5 Å). Cette distance diminue par palier pour atteindre une valeur d'environ 2,2 Å entre 400 ps et 900 ps. S'ensuit une période où cette distance fluctue de manière importante pour finalement se stabiliser à une valeur d'environ 4 Å jusqu'à la fin de la simulation. L'évolution au cours du temps de la distance fer-quercétine est présentée dans la Figure 20.

En parallèle de ces fluctuations, nous notons également un comportement particulier de la chélation de l'Ile_{C-terminal} au métal. Pendant les 400 premières pico secondes, les deux atomes O1 et O2 du résidu C-terminal sont à une distance d'environ 2,2 Å de l'atome de fer. S'ensuit une période, entre 400 ps et 1400 ps pendant laquelle seul l'atome O2 reste constamment coordonné au fer. Lors de la dernière période, la quercétine s'est éloignée du site actif et seul l'atome O1 est lié au fer. La Figure 21 montre le site actif de la LOX-3 complexée avec la quercétine activée en position O7 dans la dernière période de la simulation.

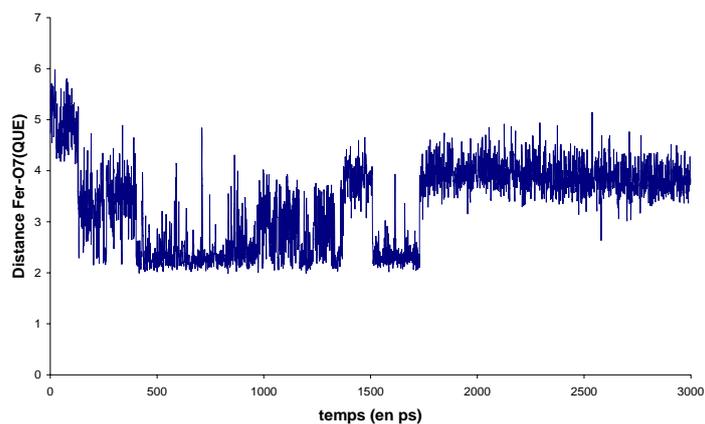


Figure 20 : Evolution de la distance métal-quercétine au cours du temps pour la simulation ES2.

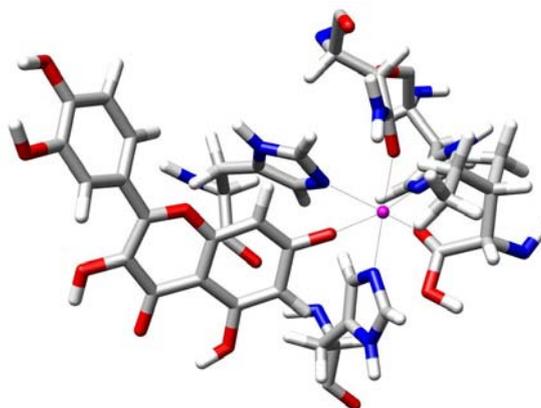


Figure 21 : Site actif de la LOX-3 dans la simulation ES2.

III.2.2.b. Analyse des Interactions Enzyme/substrat

Les fonctions OH du cycle B de la quercétine sont impliquées dans un réseau de liaison hydrogène. L'atome OD1 de la fonction carboxylate du résidu Asp766 se situe à une distance moyenne de 2,59 Å de l'atome O3' de la quercétine. Deux molécules d'eau complètent ce réseau d'interaction (Cf. Figure 22). Elles sont situées dans le canal d'entrée du substrat classique de la LOX-3 (canal n°2 défini par Skrzypczak-Jankun *et al.*¹³).

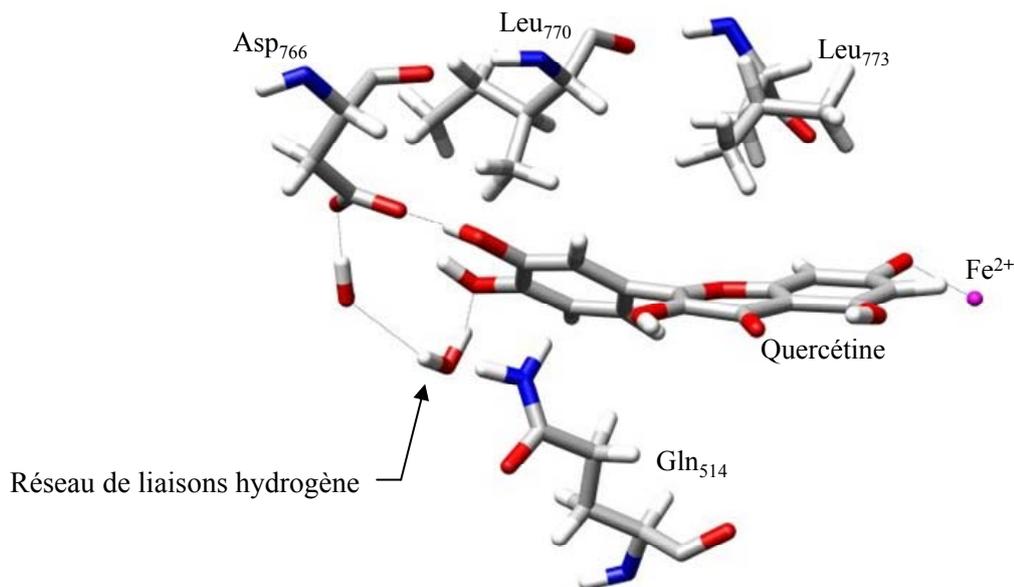


Figure 22 : Interactions hydrophiles et hydrophobes dans le complexe enzyme/substrat ES2.

La même remarque que pour le complexe ES1 peut être faite pour le complexe ES2. La quercétine est stabilisée dans la cavité par deux interactions faibles de type CH- π avec les résidus Leu773 et Ile770 et avec une interaction de type NH- π avec le résidu Gln514. La position en C2 peut également être pyramidalisée (θ_{C2} varie entre $\pm 10^\circ$) et le groupement catechol tourne le long de l'axe C2C1'. La valeur de l'angle de torsion O1C2C1'C2' varie beaucoup au début de la simulation (valeur moyenne de $33,8^\circ$), alors que la quercétine est encore proche du centre métallique, puis oscille autour de cette valeur lorsque la distance fer-quercétine est plus importante en fin de simulation.

III.2.3. Particularités de l'activation en O4'

III.2.3.a. Etude du site actif

Pendant les 400 premières picosecondes, les atomes O1 et O2 du résidu C-terminal sont liés ensemble au centre métallique puis s'échangent dans la première sphère de coordination du fer. Au début de la simulation (pendant 400 ps environ) la quercétine est encore en interaction avec le métal même si la distance Fe-O4' est relativement importante (environ $4,5 \text{ \AA}$). Puis l'arrivée d'une molécule d'eau (au bout de 410 ps) dans la sphère de coordination du fer favorise d'autant plus l'éloignement de la quercétine du site actif et vient compléter la géométrie octaédrique autour du métal. La molécule d'eau entre dans l'enzyme par le canal n°1 déjà défini par Skrzypczak-Jankun *et al.*¹³. Ce canal est considéré comme la voie d'entrée privilégiée du dioxygène dans l'enzyme. Les Figures 23 et 24

montrent respectivement les distances Fe-Ile_{C-term} et Fe-Que. La Figure 25 représente le site actif de la LOX-3 lorsque la sixième position autour du fer est remplie par la molécule de solvant et que la quercétine se retrouve « expulsée » de la première sphère de coordination du métal.

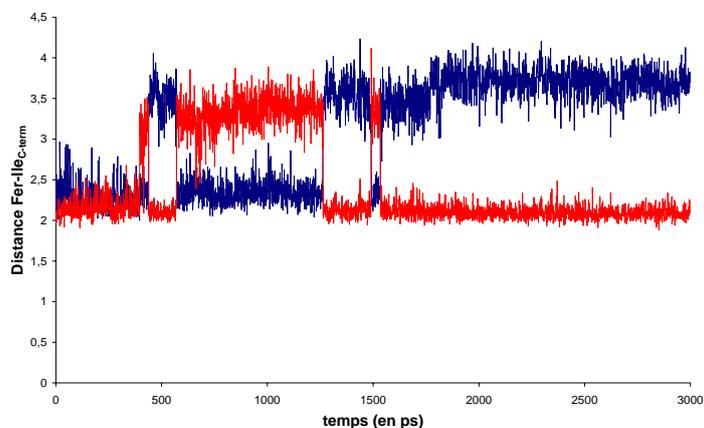


Figure 23 : Evolution de la distance métal-Ile_{C-terminal} (avec l'atome O1 en bleu et O2 en rouge) au cours du temps pour la simulation ES3.

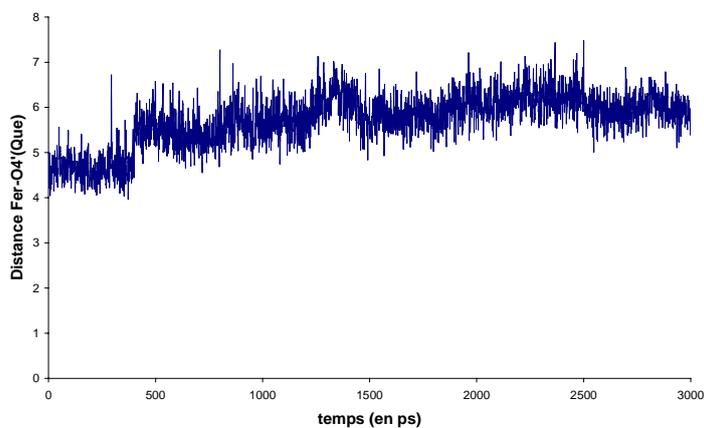


Figure 24 : Evolution de la distance métal-quercétine au cours du temps pour la simulation ES3.

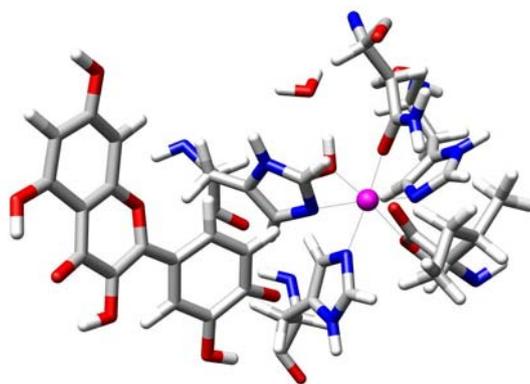


Figure 25 : Site actif de la LOX-3 dans la simulation ES3.
Les deux premières molécules d'eau dans le canal sont représentées

III.2.3.b. Analyse des Interactions Enzyme/substrat

Une molécule d'eau dans le canal n°2 forme un pont de liaisons hydrogène avec les chaînes latérales des résidus Gln716 et Asp766. La fonction 7-OH de la quercétine est également impliquée dans ce réseau de liaisons hydrogène (distance moyenne $O7_{\text{quercétine}}-OD1_{\text{Asp766}} = 2,62 \text{ \AA}$) et stabilise la position de la quercétine dans l'enzyme. Alors que la distance entre l'atome d'oxygène de la fonction 7-OH et l'atome OD1 du résidu Asp766 est constante au cours de la simulation, la distance avec entre la quercétine et le résidu Gln716 diminue au cours du temps parallèlement à l'augmentation de la distance fer-quercétine.

Les chaînes latérales des résidus Ile772, Leu773, Ile572 et Val566 interagissent avec la quercétine et favorisent la pyramidalisation de la position en C2 (θ_{C2} varie entre $\pm 10^\circ$) et la rotation du groupement catéchol. Lorsque la quercétine est relativement éloignée du centre métallique, la position normalement occupée par le substrat est libre et l'espace ainsi libéré permet au groupement catéchol de se positionner préférentiellement dans le même plan que les cycles A et C de la quercétine. La valeur de l'angle de rotation oscille en fin de simulation autour de 0° avec une amplitude de $\pm 20^\circ$. La Figure 26 illustre les interactions enzyme/substrat du complexe ES3.

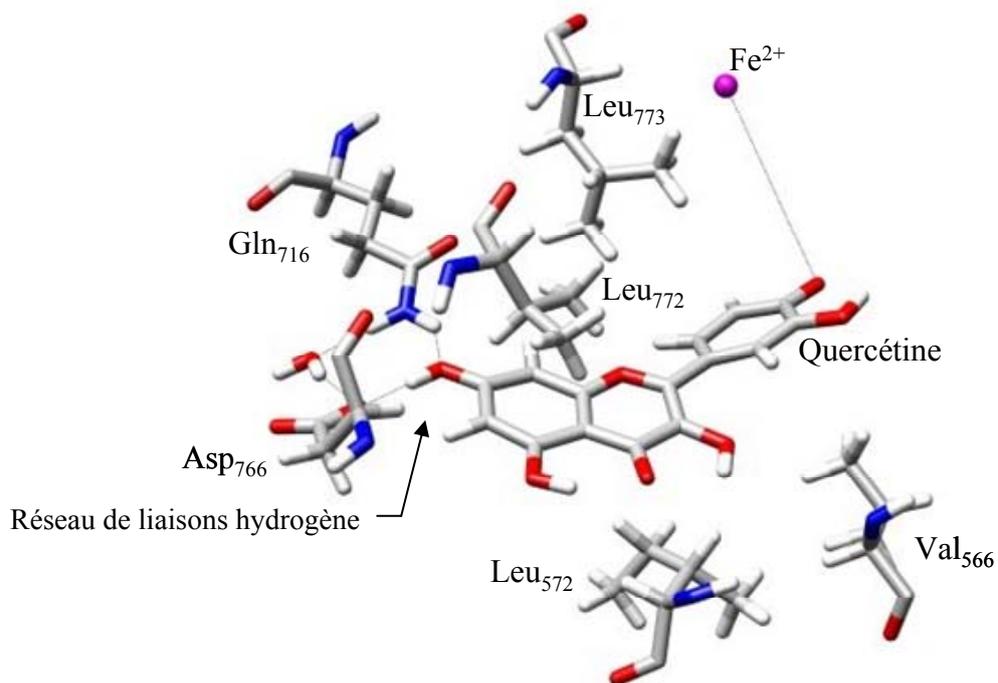


Figure 26 : Interactions hydrophiles et hydrophobes dans le complexe enzyme/substrat ES3.

III.2.4. Energie de complexation

Nous avons calculé les énergies de complexation des trois systèmes suivant la procédure MM_PBSA implémentée dans AMBER8. Cela nous a permis de quantifier, d'un point de vue énergétique, les différences engendrées par les différents modes de complexation. Les valeurs d'enthalpie libre de complexation sont reportées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Enthalpie libre de complexation pour chaque système étudié.

	ΔG (en kcal.mol ⁻¹)
ES1	-34,8 ± 3,2
ES2	-26,6 ± 3,2
ES3	-25,9 ± 2,5

Au vu des interactions enzyme/substrat, la différence sur les valeurs d'énergie de complexation provient essentiellement de l'interaction entre la quercétine et l'ion fer. Plus la quercétine est proche du centre métallique et plus le substrat est stabilisé dans l'enzyme. En effet, la composante électrostatique à l'enthalpie libre de solvatation est environ deux fois plus importante dans

le système ES1 que dans ES2 et environ quatre fois plus importante dans ES1 que dans ES3. En revanche, la contribution répulsive est plus importante dans ES1 que dans ES2 et ES3. Cela tend à niveler les différences sur l'enthalpie libre globale de complexation entre les trois systèmes.

Il est important d'ajouter que la mise en œuvre de simulations de dynamique moléculaire implique des choix dans les conditions initiales du système et notamment ici sur les paramètres électroniques de la quercétine. Nous avons choisi une forme semiquinone (déprotonée et radicalaire) pour représenter la quercétine au sein de l'enzyme. Il est alors légitime de se demander si la quercétine redevient chargée lorsque celle-ci s'éloigne du centre métallique. La prise en compte d'une quercétine chargée aurait pour conséquence d'augmenter l'énergie de complexation dans les systèmes ES2 et ES3.

III.2.5. Comparaison des interactions enzyme/substrat

La reconnaissance et l'activation de la quercétine par la LOX-3 par des résidus différents en fonction du mode de complexation montre que la cavité est suffisamment souple pour s'adapter à la structure du substrat. Quelques similitudes sont toutefois à noter. Les chaînes latérales des résidus hydrophobes stabilisent mais surtout pré-organisent la structure de la quercétine en vue de l'addition du dioxygène (pyramidalisation en C2 et rotation du cycle B). La rotation du groupement catéchol est plus importante lorsque la quercétine est proche du centre métallique (ES1 et ES2). La différence avec le système ES3 provient de l'interaction plus faible entre la Leu773 et la quercétine. Comme nous l'avons déjà vu avec les optimisations par calculs quantiques de modèles de site actif, le résidu Leu773 stabilise la position de la quercétine et favorise son activation.

IV. Conclusion / proposition de mécanisme

La complémentarité des approches de chimie quantique et des méthodes de dynamiques moléculaires nous a permis d'éclaircir le mécanisme de dégradation de la quercétine dans la lipoxygénase. D'un point de vue purement thermodynamique, les barrières d'énergie du processus de dioxygénation sont plus faibles lorsque la déprotonation de la quercétine a lieu sur le site catéchol (activation de la fonction 4'-OH). Ceci n'est vrai que si nous considérons uniquement le substrat et le dioxygène. En revanche, lorsque le système catalytique est présent, de nouveaux facteurs influencent la réaction. Tout d'abord, la reconnaissance du substrat par l'enzyme est meilleure lorsque la quercétine est complexée au site actif via l'atome d'oxygène O3. La distance quercétine-centre métallique est plus faible et l'enthalpie libre de complexation est plus importante dans ce cas. Cela

prouve que le complexe enzyme/substrat est d'avantage stabilisé lorsque la quercétine est complexée au métal via le site 3-hydroxychromone. Enfin, Les interactions enzyme/substrat permettent d'activer la position en C2 facilitant ainsi l'addition du dioxygène sur le flavonoïde.

Nous devons tout de même modérer nos conclusions puisque les simulations de dynamiques moléculaires sont dépendantes des conditions initiales de simulation. La quercétine, représentée par sa forme semiquinone au sein de l'enzyme, redevient-elle chargée lorsque celle-ci s'éloigne du centre métallique ? Cela modifierait certainement l'énergie de complexation lorsque la quercétine est activée via la fonction 7-OH et 4'-OH.

L'hypothèse selon laquelle la déprotonation du flavonoïde provient de la fonction carboxylate du résidu C-terminal n'est pas en contradiction avec l'activation et la reconnaissance du substrat. Un tel phénomène a déjà été rencontré dans la Quercétinase avec la chaîne latérale d'un résidu glutamate. L'analyse des sites actif a montré que la protonation du résidu C-terminal ne modifiait pas de façon significative la structure et la géométrie autour du centre métallique.

Toutefois, la position d'une molécule d'eau servant à activer le substrat et donc à occuper la sixième position autour du métal n'est pas à exclure. Les effets conjoints de stabilisation et de répulsion du substrat au sein de la cavité entraîne un placement particulier de la quercétine et dans le cas d'une activation de la fonction 7-OH ou 4'-OH libère une position pour un petit ligand autour du centre métallique. Une molécule d'eau servirait alors à connecter le substrat au site catalytique lorsque la quercétine est relativement éloignée du métal. La présence de cette molécule d'eau rendrait d'avantage possible la déprotonation de la fonction 4'-OH de la quercétine.

Sur la base de ces résultats, nous ne sommes pas en mesure de trancher entre tel ou tel mécanisme. En revanche, nous pensons qu'une analyse de tous les produits de dégradation de la quercétine dans la LOX-3 apporterait des renseignements cruciaux sur le processus de dioxygénation. Comme nous l'avons vu dans l'étude mécanistique, la formation d'intermédiaire de type endoperoxo ou dioxétane ne conduit pas à la formation des mêmes produits. De plus, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la décomposition du dioxétane est détectable de façon expérimentale et l'ouverture du cycle endoperoxo s'accompagne d'un dégagement de monoxyde de carbone. En conséquence, la détection de tel ou tel phénomène dans la dégradation de la quercétine par la LOX-3 discriminerait l'un des deux intermédiaires.

V. Références

- [1] Solomon, E.I.; Zhou, J.; Neese, F.; Pavel, E.G. New insights from spectroscopy into the structure/function relationships of lipoxygenases. *Chem. Biol.* **1997**, 4(11), 795-808.
- [2] Prigge, S.T.; Boyington, J.C.; Faig, M.; Doctor, K.S.; Gaffney, B.J.; Amzel, L.M. Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie.* **1997**, 79(11), 629-636.
- [3] Nelson, M.J.; Chase, D.B.; Seitz, S.P. Photolysis of "purple" lipoxygenase: Implications for the structure of the chromophore. *Biochemistry.* **1995**, 34(18), 6159-6163.
- [4] Glickman, M.H.; Klinman, J.P. Nature of Rate-Limiting Steps in the Soybean Lipoxygenase-1 Reaction. *Biochemistry.* **1995**, 34(43), 14077-14092.
- [5] Segraves, E.N.; Holman, T.R. Kinetic Investigations of the Rate-Limiting Step in Human 12- and 15-Lipoxygenase. *Biochemistry.* **2003**, 42(18), 5236-5243.
- [6] Que, L., Jr.; Ho, R.Y.N. Dioxygen activation by enzymes with mononuclear non-heme iron active sites. *Chem. Rev.* **1996**, 96(7), 2607-2624.
- [7] Knapp, M.J.; Rickert, K.; Klinman, J.P. Temperature-Dependent Isotope Effects in Soybean Lipoxygenase-1: Correlating Hydrogen Tunneling with Protein Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(15), 3865-3874.
- [8] Olsson, M.H.M.; Siegbahn, P.E.M.; Warshel, A. Simulations of the Large Kinetic Isotope Effect and the Temperature Dependence of the Hydrogen Atom Transfer in Lipoxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(9), 2820-2828.
- [9] Coffa, G.; Imber, A.N.; Maguire, B.C.; Laxmikanthan, G.; Schneider, C.; Gaffney, B.J.; Brash, A.R. On the Relationships of Substrate Orientation, Hydrogen Abstraction, and Product Stereochemistry in Single and Double Dioxygenations by Soybean Lipoxygenase-1 and Its Ala542Gly Mutant. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280(46), 38756-38766.
- [10] Coffa, G.; Brash, A.R. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101(44), 15579-15584.
- [11] Gillmor, S.A.; Villasenor, A.; Fletterick, R.; Sigal, E.; Browner, M.F. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 1003-1009.
- [12] Minor, W.; Steczko, J.; Stec, B.; Otwinowski, Z.; Bolin, J.T.; Walter, R.; Axelrod, B. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution. *Biochemistry.* **1996**, 35(33), 10687-10701.
- [13] Skrzypczak-Jankun, E.; Amzel, L.M.; Kroa, B.A.; Funk, M.O., Jr. Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme. *Proteins.* **1997**, 29(1), 15-31.
- [14] Oldham, M.L.; Brash, A.R.; Newcomer, M.E. Insights from the X-ray crystal structure of coral 8R-lipoxygenase: calcium activation via a C2-like domain and a structural basis of product chirality. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 39545-39552.

- [15] Borbulevych, O.Y.; Jankun, J.; Selman, S.H.; Skrzypczak-Jankun, E. Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 Å resolution. *Proteins*. **2004**, 54(1), 13-19.
- [16] Skrzypczak-Jankun, E.; Zhou, K.; Jankun, J. Inhibition of lipoxygenase by (-)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead. *Int. J. Mol. Med.* **2003**, 12, 415-422.
- [17] Nelson, M.J.; Cowling, R.A. Observation of a peroxy radical in samples of "purple" lipoxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 2820-2821.
- [18] Nelson, M.J.; Seitz, S.P.; Cowling, R.A. Enzyme-Bound Pentadienyl and Peroxy Radicals in Purple Lipoxygenase. *Biochemistry*. **1990**, 29, 6897-6903.
- [19] Skrzypczak-Jankun, E.; Bross, R.A.; Carroll, R.T.; Dunham, W.R.; Funk, M.O., Jr. Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(44), 10814-10820.
- [20] Makris, D.P.; Rossiter, J.T. Hydroxyl Free Radical-Mediated Oxidated Degradation of Quercetin and Morin: A preliminary Investigation. *J. Food Comp. Anal.* **2002**, 15, 103-113.
- [21] Krishnamachari, V.; Levine, L.H.; Pare, P.W. Flavonoid Oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(15), 4357-4363.
- [22] Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5642.
- [23] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.* **1988**, 37, 785-789.
- [24] Hehre, W.J.; Ditchfield, R.; Pople, J.A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1972**, 56, 2257-2261.
- [25] Chandrasekhar, J.; Andrade, J.G.; Schleyer, P.v.R. Efficient and Accurate Calculation of Anion Proton Affinities. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 5609-5612.
- [26] Hariharan, P.C.; Pople, J.A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chem. Acc.* **1973**, 28, 213-222.
- [27] *Gaussian03*, Revision C.02; M. J. Frisch, G.W.T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc. Wallingford CT, 2003.
- [28] Reed, A.E.; Weinstock, R.B.; Franck, W. Natural population analysis. *J. Chem. Phys.* **1985**, 83, 735-746.

- [29] Reed, A.E.; Franck, W. Natural localized molecular orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, 83, 1736-1740.
- [30] Binkley, J.S.; Pople, J.A.; Hehre, W.J. Self-consistent molecular orbital methods. 21. Small split-valence basis sets for first-row elements. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 939-947.
- [31] Gordon, M.S.; Binkley, J.S.; Pople, J.A.; Pietro, W.J.; Hehre, W.J. Self-consistent molecular-orbital methods. 22. Small split-valence basis sets for second-row elements. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 2797-2803.
- [32] Pearlman, D.A.; Case, D.A.; Caldwell, J.W.; Ross, W.S.; Cheatham, T.E., III; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P. "AMBER", a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to stimulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, 91(1-3), 1-42.
- [33] Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.; Klein, M.L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1998**, 79, 926-935.
- [34] Jakalian, A.; Bush, B.L.; Jack, D.B.; Bayly, C.I. Fast, Efficient Generation of High-Quality Atomic Charges. AM1-BCC Model: I.Method. *J. Comput. Chem.* **2000**, 21, 132-146.
- [35] Li, J.; Zhu, T.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. New Class IV Charge Model for Extracting Accurate Partial Charges from Wave Functions. *J. Phys. Chem. A.* **1998**, 102(10), 1820-1831.
- [36] Duan, Y.; Wu, C.; Chowdhury, S.; Lee, M.C.; Xiong, G.; Zhang, W.; Yang, R.; Cieplak, P.; Luo, R.; Lee, T. A Point-Charge Force Field for Molecular Mechanics Simulations of Proteins. *J. Comput. Chem.* **2003**, 24, 1999-2012.
- [37] Ponder, J.W.; Case, D.A. Force fields for protein simulations. *Adv. Prot. Chem.* **2003**, 66, 27-85.
- [38] Bayly, C.I.; Cieplak, P.; Cornell, W.D.; Kollman, P. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints For Determining Atom-Centered Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 10269-10280.
- [39] Cornell, W.D.; Cieplak, P.; Bayly, C.I.; Kollman, P. Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies and free energies of solvation. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9620-9631.
- [40] Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, 23, 327-341.
- [41] Miyamoto, S.; Kollman, P. An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* **1992**, 13, 952-962.
- [42] Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particule mesh Ewald--an Nlog(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 10089-10092.
- [43] Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M.L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L.G. A smooth particule mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **1995**, 103, 8577-8593.
- [44] Crowley, M.F.; Darden, T.A.; Cheatham, T.E., III; Deerdfield, D.W., II. Adventures in improving the scaling and accuracy of a parralel molecular dynamics program. *J. Super-comput.* **1997**, 11, 255-278.

- [45] Toukmaji, A.; Sagui, C.; Board, J.; Darden, T. Efficient particule-mesh Ewald based approach to fixed and induced dipolar interactions. *J. Chem. Phys.* **2000**, 113, 10913-10927.
- [46] Hawking, G.D.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Pairwise solute descreening of solute charges from a dielectric medium. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 246, 122-129.
- [47] Hawking, G.D.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute charges from a dielectric medium. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 19824-19839.
- [48] Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D.A. Modifications of the Generalized Born Model Suitable for Macromolecules. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, 104, 3712-3720.
- [49] Feig, M.; Onufriev, A.; Lee, M.; Im, W.; Case, D.A.; Brooks III, C.L. Performance comparison of the Generalized Born and Poisson Methods in the Calculation of the Electrostatic Solvation Energies for Protein Structures. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1978-1988.
- [50] Weiser, J.; Shenkin, P.S.; Still, W.C. Approximate Atomic Surfaces from Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO). *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 217-230.
- [51] Weiser, J.; Shenkin, P.S.; Still, W.C. Fast, Approximate Algorithm for Detection of Solvent Inaccessible Atoms. *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 586-596.

VI. COMPLEMENTS DU CHAPITRE 4

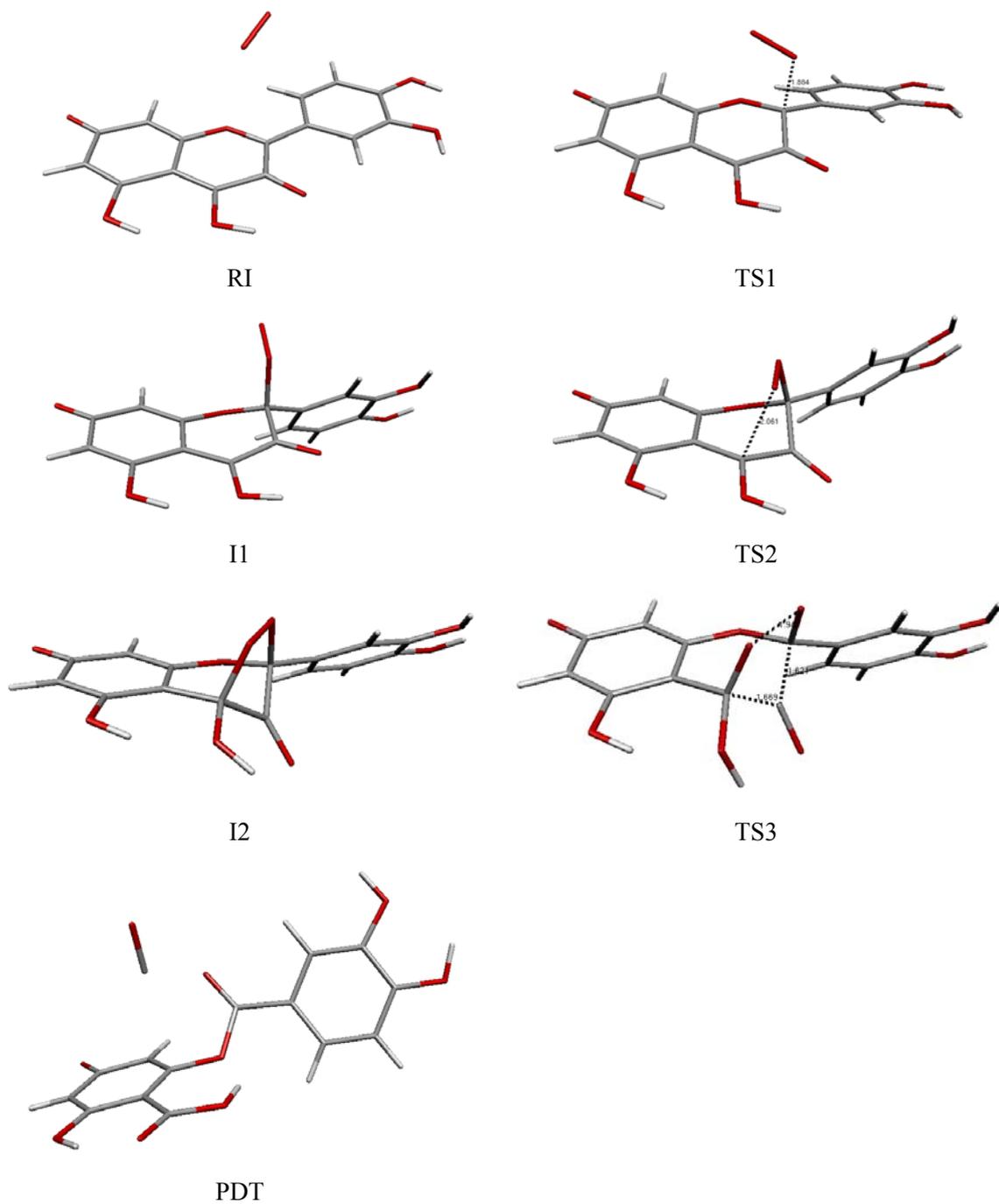
VI.1. Evolution des paramètres structuraux (en Å et en °) de la quercétine activée en position O7 au cours de l'oxydation par le dioxygène.

	RI	TS1	I1	TS2	I2	TS3	PDT
OaOb	1,22	1,27	1,32	1,42	1,51	1,94	5,51
O1C2	1,35	1,35	1,39	1,43	1,43	1,44	1,41
C2C3	1,43	1,49	1,54	1,54	1,53	1,62	3,94
C3C4	1,46	1,47	1,46	1,49	1,53	1,67	3,52
C4C10	1,37	1,37	1,37	1,41	1,51	1,52	1,49
C10C5	1,46	1,47	1,47	1,44	1,42	1,42	1,44
C5C6	1,36	1,36	1,36	1,37	1,39	1,38	1,39
C6C7	1,46	1,46	1,46	1,46	1,45	1,45	1,44
C7C8	1,47	1,47	1,48	1,40	1,45	1,45	1,45
C8C9	1,36	1,35	1,35	1,35	1,37	1,37	1,37
C9C10	1,44	1,45	1,46	1,45	1,43	1,43	1,43
C2C1'	1,44	1,47	1,50	1,50	1,50	1,53	1,47
C1'C2'	1,42	1,41	1,41	1,40	1,40	1,40	1,41
C2'C3'	1,38	1,38	1,39	1,39	1,39	1,39	1,38
C3'C4'	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41
C4'C5'	1,40	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39
C5'C6'	1,39	1,39	1,40	1,39	1,39	1,40	1,39
C6'C1'	1,42	1,41	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
C3O3	1,27	1,24	1,23	1,21	1,20	1,17	1,14
C4O4	1,35	1,35	1,35	1,34	1,38	1,41	1,34
C5O5	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36	1,34
C7O7	1,24	1,24	1,24	1,25	1,26	1,26	1,26
C3'O4'	1,38	1,39	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38
C4'O4'	1,35	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36
C2Oa	3,29	1,88	1,52	1,44	1,42	1,30	1,21
C4Ob	4,85	3,46	4,37	2,06	1,45	1,31	1,23
$\theta_{C2}(C2C3O1C1')$	0,10	17,60	31,10	30,70	29,70	36,90	-
$\theta_{C4}(C4C3O4C10)$	-1,00	0,30	1,80	8,40	30,90	35,70	-
O1C2C1'C2'	178,30	175,60	165,20	155,20	161,10	151,00	171,80

VI.2. Evolution de la charge atomique (en e) de la quercétine activée en position O7' au cours de l'oxydation par le dioxygène.

	RI	TS1	I1	TS2	I2	TS3	PDT
O1	-0,48	-0,50	-0,54	-0,55	-0,55	-0,56	-0,61
C2	0,37	0,45	0,52	0,53	0,51	0,53	0,84
C3	0,32	0,44	0,48	0,52	0,56	0,65	0,52
C4	0,35	0,32	0,30	0,40	0,49	0,52	0,84
C5	0,36	0,36	0,36	0,36	0,34	0,34	0,36
C6	-0,34	-0,33	-0,33	-0,28	-0,25	-0,26	-0,24
C7	0,45	0,47	0,48	0,45	0,40	0,40	0,40
C8	-0,29	-0,29	-0,28	-0,29	-0,27	-0,27	-0,26
C9	0,34	0,34	0,34	0,34	0,32	0,32	0,32
C10	-0,20	-0,15	-0,15	-0,16	-0,15	-0,15	-0,21
C1'	-0,13	-0,14	-0,13	-0,12	-0,12	-0,10	-0,20
C2'	-0,25	-0,26	-0,27	-0,27	-0,27	-0,28	-0,24
C3'	0,26	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27	0,26
C4'	0,34	0,32	0,31	0,31	0,31	0,31	0,33
C5'	-0,27	-0,27	-0,27	-0,26	-0,26	-0,26	-0,27
C6'	-0,19	-0,20	-0,21	-0,21	-0,21	-0,22	-0,20
O3	-0,66	-0,59	-0,55	-0,54	-0,50	-0,43	-0,52
O4	-0,72	-0,72	-0,72	-0,70	-0,76	-0,76	-0,70
O5	-0,71	-0,70	-0,70	-0,70	-0,71	-0,71	-0,71
O7	-0,58	-0,56	-0,55	-0,53	-0,50	-0,50	-0,48
O3'	-0,75	-0,75	-0,75	-0,75	-0,75	-0,74	-0,74
O4'	-0,70	-0,70	-0,71	-0,71	-0,71	-0,71	-0,70
Oa	-0,01	-0,14	-0,22	-0,29	-0,30	-0,39	-0,58
Ob	0,01	-0,13	-0,12	-0,25	-0,31	-0,39	-0,64

VI.3. Structures des intermédiaires et états de transition de l'oxydation de la quercétine par la lipoxygénase, activation en position O7'



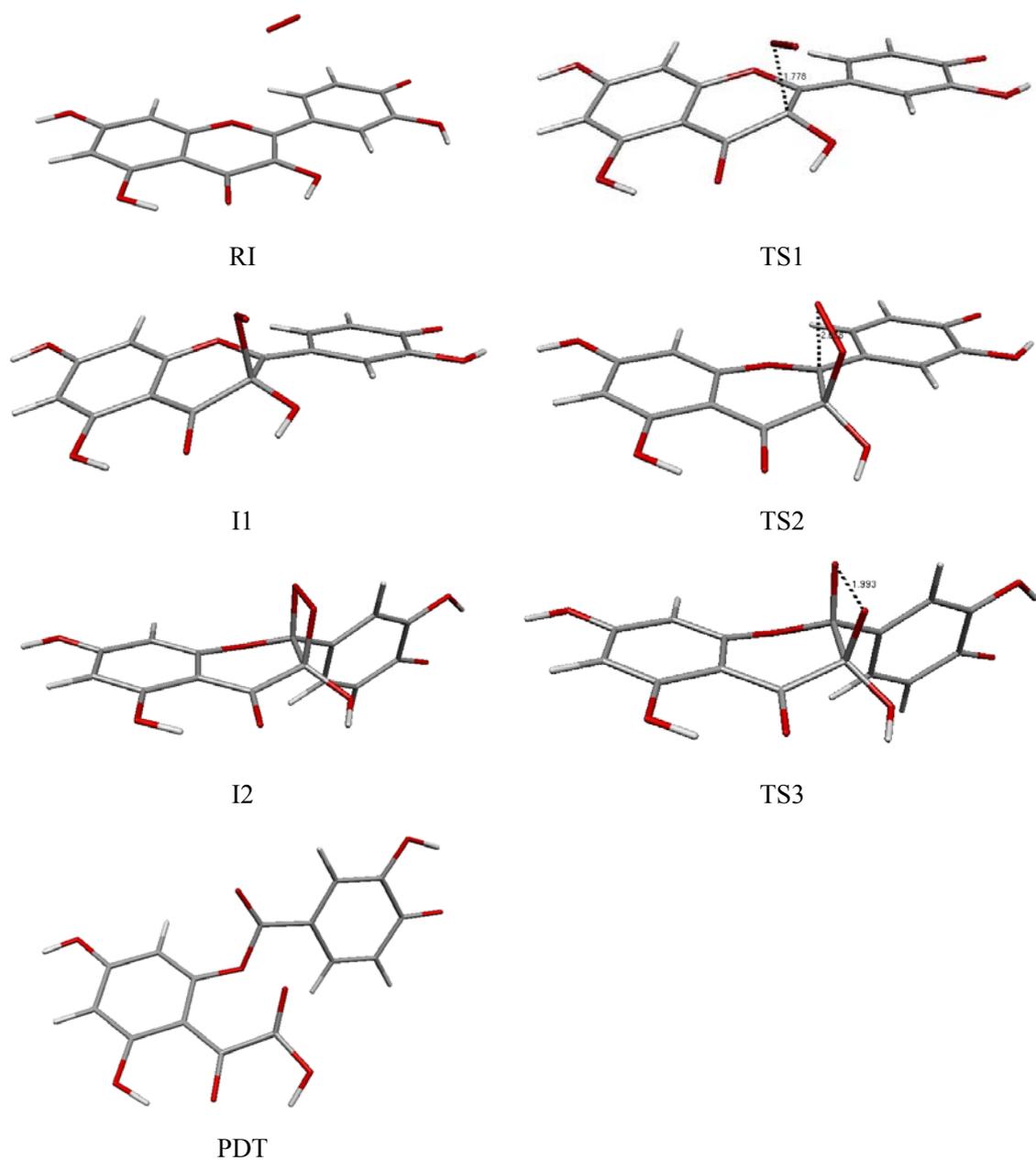
VI.4. Evolution des paramètres structuraux (en Å et en °) de la quercétine activée en position O4' au cours de l'oxydation par le dioxygène.

	RI	TS1	I1	TS2	I2	TS3	PDT
OaOb	1,22	1,28	1,30	1,40	1,49	1,99	3,41
O1C2	1,38	1,38	1,38	1,35	1,41	1,42	1,38
C2C3	1,38	1,47	1,49	1,54	1,55	1,61	3,57
C3C4	1,46	1,51	1,53	1,54	1,53	1,55	1,55
C4C10	1,43	1,42	1,42	1,43	1,43	1,43	1,44
C10C5	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43	1,43	1,44
C5C6	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,39	1,40
C6C7	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40	1,39
C7C8	1,40	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41	1,41
C8C9	1,39	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38	1,38
C9C10	1,41	1,41	1,42	1,41	1,42	1,42	1,43
C2C1'	1,45	1,38	1,38	1,41	1,51	1,50	1,49
C1'C2'	1,42	1,45	1,45	1,43	1,39	1,40	1,40
C2'C3'	1,38	1,36	1,36	1,37	1,39	1,39	1,39
C3'C4'	1,47	1,48	1,48	1,48	1,47	1,48	1,47
C4'C5'	1,46	1,46	1,46	1,45	1,44	1,45	1,44
C5'C6'	1,37	1,35	1,35	1,36	1,37	1,37	1,37
C6'C1'	1,44	1,46	1,46	1,45	1,43	1,44	1,43
C3O3	1,35	1,33	1,35	1,37	1,36	1,39	1,34
C4O4	1,26	1,25	1,25	1,25	1,25	1,24	1,25
C5O5	1,35	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34
C7O7	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36	1,36
C3'O4'	1,35	1,35	1,35	1,34	1,34	1,33	1,33
C4'O4'	1,25	1,24	1,24	1,25	1,26	1,25	1,26
C3Oa	3,50	1,78	1,63	1,46	1,47	1,37	1,21
C2Ob	3,44	3,54	3,55	2,06	1,44	1,39	1,21
θ_{C3}(C3C2C4O4)	0,10	21,10	25,50	28,70	24,20	30,00	-
θ_{C2}(C2C3O1C1')	0,30	2,70	3,00	7,40	28,20	33,20	-
O1C2C1'C2'	178,70	173,80	172,80	171,80	144,90	147,60	176,80

VI.5. Evolution de la charge atomique (en e) de la quercétine activée en position O4' au cours de l'oxydation par le dioxygène.

	RI	TS1	I1	TS2	I2	TS3	PDT
O1	-0,49	-0,50	-0,50	-0,49	-0,55	-0,55	-0,57
C2	0,31	0,34	0,35	0,45	0,57	0,53	0,84
C3	0,25	0,40	0,44	0,49	0,51	0,49	0,79
C4	0,45	0,50	0,51	0,52	0,51	0,53	0,45
C5	0,42	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,43
C6	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38	-0,38
C7	0,39	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
C8	-0,35	-0,34	-0,34	-0,34	-0,34	-0,34	-0,33
C9	0,40	0,40	0,40	0,39	0,40	0,40	0,39
C10	-0,27	-0,30	-0,31	-0,30	-0,30	-0,30	-0,28
C1'	-0,06	-0,09	-0,09	-0,09	-0,04	-0,01	-0,10
C2'	-0,31	-0,29	-0,28	-0,27	-0,28	-0,28	-0,26
C3'	0,34	0,30	0,30	0,32	0,36	0,37	0,36
C4'	0,39	0,44	0,45	0,42	0,37	0,39	0,38
C5'	-0,24	-0,27	-0,27	-0,27	-0,25	-0,25	-0,25
C6'	-0,23	-0,18	-0,17	-0,19	-0,22	-0,20	-0,21
O3	-0,71	-0,70	-0,72	-0,74	-0,74	-0,76	-0,71
O4	-0,69	-0,64	-0,63	-0,64	-0,64	-0,63	-0,65
O5	-0,71	-0,70	-0,69	-0,69	-0,70	-0,70	-0,70
O7	-0,70	-0,69	-0,69	-0,69	-0,69	-0,69	-0,69
O3'	-0,67	-0,70	-0,70	-0,69	-0,67	-0,66	-0,67
O4'	-0,52	-0,60	-0,60	-0,59	-0,57	-0,57	-0,57
Oa	-0,01	-0,16	-0,19	-0,28	-0,30	-0,34	-0,58
Ob	0,00	-0,13	-0,14	-0,24	-0,31	-0,32	-0,58

VI.6. Structures des intermédiaires et états de transition de l'oxydation de la quercétine par la lipoxygénase, activation en position O4'



Chapitre 5

Conclusion générale

Les flavonoïdes sont des composés naturels présents dans une large variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'être humain. En plus de leur rôle dans la pigmentation des végétaux, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêt, telles que des actions anti-radicalaires et antioxydantes. En effet, par complexation avec des enzymes spécifiques, les flavonoïdes sont capables, par exemple, de métaboliser le dioxygène et l'oxyde nitrique ou de stopper l'action de radicaux tels que l'anion superoxyde. En revanche, sous certaines conditions, ils peuvent présenter une activité prooxydante responsable de la peroxydation lipidique et de l'altération de l'ADN et de certaines protéines.

La quercétine est l'une des flavonoïdes les plus représentatives de cette famille de composés en cela qu'elle intervient dans l'ensemble des processus biologiques, et pharmacologiques décrit précédemment. Nous avons choisi ce représentant afin de pouvoir étendre nos conclusions à un panel de structure plus large. Bien que de nombreuses études biochimiques et pharmacologiques aient été menées sur cette molécule, peu d'analyses théoriques de ses propriétés ont été effectuées.

Dans ce mémoire, nous avons présenté de nouvelles études menées sur les flavonoïdes, et plus particulièrement sur la quercétine, considérée comme modèle, afin de mieux comprendre l'implication de ses différents motifs structuraux sur sa réactivité et de caractériser son rôle dans divers processus biologiques. Nous avons entrepris des études de mécanique quantique, en utilisant les méthodes basées sur la théorie de la fonctionnelle de la densité, pour avoir accès à différentes propriétés physico-chimiques comme l'énergie de complexation ou la densité de spin atomique mais surtout pour nous permettre de caractériser différents mécanismes réactionnels. D'un point de vue théorique, ces investigations sont représentatives de l'état gazeux, c'est pourquoi elles ont été complétées par des études de dynamique moléculaire afin d'étudier en phase solvant explicite les systèmes enzymatiques mis en jeu lors de ces processus biologiques, et affiner les connaissances sur les interactions enzyme/substrat de ce type de système.

La première étude a porté sur la caractérisation des propriétés électroniques, structurales et énergétiques de la quercétine et de ses formes activées (déprotonées, doublement déprotonées, semiquinones, semiquinones déprotonées et quinones) à l'aide des méthodes de chimie quantique. En effet, la quercétine présente une activité antioxydante, prooxydante ou d'inhibition et dans chaque cas une forme différente de la quercétine est mise en jeu. L'examen de l'évolution de ces différents paramètres a permis de mieux cerner la réactivité de chaque forme activée. Le résultat essentiel est que la quercétine présente plusieurs sites réactifs indépendants les uns des autres (3-hydroxychromone, 5-hydroxychromone et motif catéchol). Bien que la structure de la quercétine soit plane et présente un caractère aromatique, si nous prenons l'exemple des formes semiquinone, la densité de spin se répartit uniquement sur quelques atomes souvent proches d'un seul site réactif. Cette indépendance des sites réactifs et la diversité des formes activées pourraient être l'une des explications du large spectre

d'action de la quercétine. Nous avons également étudié l'influence d'un cation métallique sur les différents paramètres des formes activées. Le centre métallique joue le rôle d'activateur de la quercétine et diminue l'énergie nécessaire à l'obtention des différentes formes activées. Enfin, l'étude d'espèces co-réactives et la constitution de cycles thermodynamiques nous ont permis d'établir des propositions de mécanismes sur la base des valeurs des enthalpies de formation. Cependant, ces cycles thermodynamiques doivent être considérés avec précaution puisqu'ils ne tiennent pas compte de l'ensemble des facteurs intervenant dans un processus biologique (solvant, enzyme, etc.), mais donnent des indices supplémentaires pour mieux comprendre la réactivité des formes activées de la quercétine.

Nous nous sommes ensuite penchés sur l'étude de la quercétine en tant que substrat de l'enzyme Quercétine 2,3-Dioxygénase. Nous avons effectué cette étude par étape en nous focalisant sur les trois protagonistes de cette réaction : la quercétine, le dioxygène et l'enzyme.

A l'aide des méthodes de chimie quantique, nous avons caractérisé un chemin réactionnel permettant de rendre compte des résultats expérimentaux. L'ion cuivre(II) situé au centre du site actif de l'enzyme active la position en C2 en vue de l'addition du dioxygène sur la quercétine. L'étude de la réaction sur un composé modèle, puis sur d'autres flavonoïdes, a montré que seul le site réactionnel 3-hydroxychromone était nécessaire à la réaction. Cela a également permis de confirmer la validité du choix du composé modèle et d'étendre les conclusions de cette étude à l'ensemble des flavonoïdes présentant un site 3-hydroxychromone.

A l'aide de simulations de dynamiques moléculaires effectuées sur l'enzyme native et sur le complexe enzyme/substrat, l'influence du système catalytique sur la réaction de dégradation de la quercétine a été examinée. L'analyse des différences structurales, en présence ou non du substrat, a confirmé le rôle du linker sur la stabilisation de la quercétine dans l'enzyme et montré que la forme de la cavité pouvait s'adapter au substrat. L'identification des modes d'interaction enzymes/substrat a permis de mieux cerner le rôle joué par les résidus du site actif sur la reconnaissance et l'activation de la quercétine. Les interactions faibles en fond de poche (de type π -stacking, σ - π et T-shape) préparent le substrat en pyramidalisant la position en C2 et en favorisant la rotation du groupement catéchol. La substitution du cycle B d'un flavonoïde semble être le facteur déterminant dans la rotation du cycle B, et permettrait d'expliquer les différences observées entre les taux de dégradation des flavonoïdes dans l'enzyme.

Nous avons également identifié un canal au sein de l'enzyme qui permettrait à un petit ligand, de préférence hydrophobe, de passer directement du milieu extérieur à l'intérieur de la cavité. L'orientation du canal laisse supposer qu'il serait dédié à l'arrivée du dioxygène. Pour confirmer cette hypothèse nous avons calculé l'enthalpie libre d'un tel processus à l'aide de la méthode *umbrella sampling*. Le potentiel de force moyenne associé est faible ($< 3 \text{ kcal.mol}^{-1}$) et nous montre qu'un tel événement est bel et bien susceptible de se produire dans des conditions classiques de température et de pression.

Au-delà de l'établissement du mécanisme d'oxygénolyse et de la caractérisation du canal servant à la diffusion de O₂ au sein de l'enzyme, une idée s'impose à la fin de cette partie. Il est effectivement apparu que les processus d'activation et de reconnaissance du substrat au sein de l'enzyme étaient intimement liés. La connaissance de la réactivité des formes actives de la quercétine doit alors être complétée par les influences de l'environnement si l'on désire cerner au mieux tous les facteurs permettant de moduler la surface de potentiel du mécanisme d'oxygénolyse, bien que ceux-ci, considérés indépendamment, puissent avoir chacun une contribution apparaissant comme mineure.

Enfin, nous nous sommes ensuite penchés sur l'étude de la quercétine en tant qu'inhibiteur de la lipoxigénase-3. L'inhibition de l'enzyme n'est pas directement due à la quercétine mais à un composé de dégradation de la quercétine au sein de l'enzyme. L'acide protocatéchuique responsable de l'inhibition de l'enzyme peut être formé par hydrolyse des produits de dégradation de la quercétine déjà identifiés dans l'étude de la Quercétinase. Comme aucune proposition de mécanisme n'a jusqu'alors été avancée, nous avons envisagé plusieurs modes d'activation et de complexation de la quercétine au sein de l'enzyme. Les mécanismes réactionnels associés à la dégradation de la quercétine activée sur la fonction 3-OH, 7-OH et 4'-OH ont été caractérisés. D'un point de vue thermodynamique, l'activation de la quercétine sur la fonction 4'-OH est la plus favorable. Les résultats sur des modèles de site actif nous ont permis d'émettre l'hypothèse que l'acide aminé C-terminal serait en mesure de déprotoner la quercétine. Etant donné qu'aucune structure expérimentale de la LOX-3 co-cristallisée avec la quercétine n'est disponible, nous nous sommes basés sur cette hypothèse pour l'activation de la quercétine.

Dans la dernière partie de cette étude, nous avons étudié les interactions enzyme/substrat et quantifié l'énergie de complexation du flavonoïde dans l'enzyme à l'aide des méthodes de dynamique moléculaire. Une analyse des distances entre le fer et les chaînes latérales des résidus entrant dans la première sphère de coordination du fer montre que les différentes structures de site actif sont cohérentes avec les structures RX. En revanche, la distance métal-quercétine est fortement fonction de l'activation du substrat, tout comme d'ailleurs le mode d'interaction enzyme/substrat. Une activation de la fonction 3-OH engendre une stabilisation du complexe enzyme/substrat plus importante qu'une activation de la fonction 7-OH ou 4'-OH. La contribution coulombienne à l'enthalpie de complexation est en effet plus importante lorsque la distance fer-quercétine est plus faible. Enfin, comme dans la quercétinase, les interactions hydrophiles et hydrophobes entre le substrat et l'enzyme sont en partie responsables de la stabilisation de la quercétine dans le site actif mais surtout de la pré-organisation du substrat en vue de l'attaque du dioxygène (pyramidalisation en C2 et rotation du groupement catéchol).

Tous ces résultats sont basés sur l'hypothèse de déprotonation de la quercétine par le résidu C-terminal. Toutefois, la présence d'une molécule d'eau dans le site actif ne peut être exclue. La position d'un tel ligand sur le centre métallique permettrait alors de combler l'espace entre le site actif et la quercétine lorsque celle-ci se trouve éloignée du fer et rendrait alors possible la déprotonation du

substrat sur la fonction 4'-OH. Sur la base de ces résultats, l'activation de la fonction 3-OH reste néanmoins la première étape du mécanisme réactionnel que nous proposons.

Les résultats expérimentaux tirés de la littérature nous ont permis de proposer plusieurs hypothèse de travail mais ne nous permettent pas de tirer des conclusions définitives sur le mécanisme de dégradation le plus probable susceptible d'amener à l'inhibition de l'enzyme. De cette partie et de la précédente, il apparaît toutefois clairement que l'utilisation combinée de méthode de chimie quantique et de dynamique moléculaire est nécessaire pour une meilleure élaboration de schémas mécanistiques.

L'objectif de ce travail était de rationaliser la réactivité de la quercétine et de caractériser des processus biologiques impliquant ce flavonoïde, d'un côté en tant que substrat et de l'autre en tant qu'inhibiteur. Nous avons souhaité étendre le plus possible ces résultats à la famille des flavonoïdes. L'indépendance des sites réactifs de la quercétine nous amène à penser que les composés présentant les mêmes motifs structuraux (en l'occurrence le site 3-hydroxychromone dans les deux processus présentés ici) ont sensiblement la même réactivité. En revanche, la structure du site de reconnaissance d'une enzyme est suffisamment complexe pour engendrer des différences d'affinité entre les substrats. C'est, par exemple, ce qui nous est apparu lorsque nous avons étudié la Quercétinase. La complémentarité des méthodes de chimie quantique et de modélisation moléculaire permettant de rationaliser les propriétés physico-chimiques d'un composé, d'identifier différents chemins réactionnels et de comprendre l'influence d'une enzyme sur le chemin emprunté par les réactifs nous paraît être un atout majeur lorsqu'il s'agit d'obtenir des réponses sur un problème de catalyse enzymatique.

Annexe

Les méthodes de chimie

théorique

I. Méthodes de chimie quantique.....	193
I.1. APPROXIMATIONS FONDAMENTALES	193
<i>I.1.1. L'approximation Born-Oppenheimer.....</i>	<i>194</i>
<i>I.1.2. L'approximation d'Orbitales Moléculaires</i>	<i>194</i>
I.2. METHODE HARTREE-FOCK	195
<i>I.2.1. Equation de Hartree-Fock</i>	<i>196</i>
<i>I.2.2. L'approximation CLOA</i>	<i>196</i>
<i>I.2.3. La procédure SCF.....</i>	<i>197</i>
I.3. METHODES BASEES SUR LA THEORIE DE LA FONCTIONNELLE DE LA DENSITE (DFT).....	198
I.4. ENERGIE DE CORRELATION.....	199
I.5. CHOIX DE LA BASE D'ORBITALES ATOMIQUES	200
I.6. CORRECTIONS THERMODYNAMIQUES.....	200
II. Exploration de la surface de potentiel, application à la réactivité chimique.....	201
<i>II.1.1. Recherche d'état stationnaire.....</i>	<i>203</i>
<i>II.1.2. Recherche d'état de transition.....</i>	<i>203</i>
III. La mécanique moléculaire.....	204
III.1. LA DYNAMIQUE MOLECULAIRE.....	205
III.2. METHODE LOCALLY ENHANCED SAMPLING (LES)	207
III.3. ESTIMATION DE L'ENERGIE LIBRE.....	207
<i>III.3.1. Umbrella Sampling et Potentiel de force moyenne</i>	<i>207</i>
<i>III.3.2. Méthodes GB/SA et PB/SA</i>	<i>208</i>
IV. Références	209

Nous présentons ici les méthodes de chimie théorique qui ont été utilisées au cours de cette thèse. Il ne s'agit pas d'une description exhaustive et il est possible de consulter de nombreux ouvrages spécialisés pour plus de détails¹⁻⁵.

I. Méthodes de chimie quantique

I.1. Approximations Fondamentales

Le premier axiome de la théorie quantique stipule que tout état d'un système n'évoluant pas dans le temps constitué de N particules est complètement décrit par une fonction mathématique Ψ , appelée *fonction d'onde*, qui dépend des coordonnées de chacune des particules. Même si la fonction d'onde ne possède aucune signification physique, la quantité $|\Psi|^2$ permet de déterminer la probabilité de présence des particules dans un élément de volume.

Le second axiome énonce que l'action d'un opérateur mathématique hermitique sur cette fonction permet d'atteindre la grandeur physique observable correspondante. Ainsi l'opérateur associé à l'énergie E est l'opérateur Hamiltonien H. La fonction d'onde exacte est fonction propre de l'opérateur Hamiltonien complet :

$$H \Psi = E \Psi \quad (1)$$

Des approximations doivent être adoptées puisque cette équation ne peut pas se résoudre pour des systèmes moléculaires, y compris les plus simples. Les deux premières approximations en chimie quantique sont de considérer l'équation de Schrödinger non relativiste et indépendante du temps où l'Hamiltonien est défini par :

$$H_T = -\frac{1}{2} \sum_i \Delta_i - \frac{1}{2} \sum_A \Delta_A - \sum_i \sum_A \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \quad (2)$$

Dans l'expression (2), les indices qui apparaissent sous les symboles de sommation s'appliquent aux électrons (i et j) et aux noyaux (A et B). Les deux premiers termes correspondent aux opérateurs associés à l'énergie cinétique des électrons et des noyaux, le troisième terme représente l'attraction coulombienne entre les noyaux et les électrons, tandis que les deux derniers décrivent la répulsion entre les électrons et entre les noyaux.

Trois autres approximations sont couramment employées : l'approximation de Born-Oppenheimer, l'approximation d'orbitales moléculaires et l'approximation C.L.A.O. (Combinaison

Linéaire d'Orbitales Atomiques, LCAO en anglais). Cette dernière approximation sera illustrée dans la description de la méthode Hartree-Fock.

I.1.1. L'approximation Born-Oppenheimer

Les noyaux ayant une masse beaucoup plus importante que celle des électrons, il est alors possible, selon l'approximation de Born-Oppenheimer⁶, de considérer leurs mouvements comme étant très lent par rapport à celui des électrons. Les électrons se déplacent alors dans un champ de noyaux fixes. Dans ce cadre, l'énergie cinétique des noyaux peut être supposée constante et nulle et la répulsion entre les différentes paires de noyaux considérées également comme constante. En négligeant ces termes, il est alors possible de réécrire l'équation (2) pour obtenir l'Hamiltonien électronique :

$$H_e = -\frac{1}{2} \sum_i \Delta_i - \sum_i \sum_A \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} = \sum_i H^c(i) + \sum_i \sum_{j>i} \frac{1}{r_{ij}} \quad (3)$$

Cet Hamiltonien est alors utilisé pour résoudre l'équation de Schrödinger électronique :

$$H_e \cdot \Psi_e = E_e \cdot \Psi_e \quad (4)$$

Ψ_e est la fonction d'onde électronique. Elle dépend *explicitement* des coordonnées électroniques et *paramétriquement* des coordonnées nucléaires. Selon le principe de Pauli⁷, la fonction d'onde doit changer de signe lors de la permutation des coordonnées de deux électrons.

E_e représente l'énergie électronique. Pour obtenir l'énergie totale E' dans un champ de noyaux fixes, on ajoute un terme de répulsion nucléaire à l'énergie électronique :

$$E' = E_e + \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \quad (5)$$

Dans la suite de ce manuscrit les symboles H , Ψ et E désignerons respectivement l'Hamiltonien électronique, la fonction d'onde électronique et l'énergie totale calculée pour des positions fixes des noyaux.

I.1.2. L'approximation d'Orbitales Moléculaires

La fonction d'onde la plus simple qui respecte le principe de Pauli peut s'écrire sous la forme d'un déterminant, appelé *déterminant de Slater*⁸. Ce déterminant pondéré par un facteur de normalisation est construit à partir d'un ensemble de fonctions monoélectroniques, ou spinorbitales χ , définies comme le produit d'une fonction spatiale, ou orbitale moléculaire (OM) Ψ , par une fonction de spin α ou β :

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \chi_1(1) & \chi_2(1) & \dots & \chi_n(1) \\ \chi_1(2) & \chi_2(2) & \dots & \chi_n(2) \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \chi_1(n) & \chi_2(n) & \dots & \chi_n(n) \end{vmatrix} \quad (6)$$

$$\chi_i(x) = \Psi_i(x) \cdot \alpha_i(x) \quad (7)$$

$$\chi_j(x) = \Psi_j(x) \cdot \alpha_j(x) \quad (8)$$

Ce déterminant peut également s'écrire plus simplement :

$$\Psi = |\chi_1 \chi_2 \dots \chi_n| \quad (9)$$

I.2. Méthode Hartree-Fock

Dans la méthode Hartree-Fock^{9,10}, l'équation de Schrödinger est résolue selon le principe variationnel. On cherche les orbitales moléculaires donnant une énergie minimale du système en s'appuyant sur la condition d'extremum par résolution itérative des équations de Hartree-Fock (méthode du champ auto-cohérent ou *Self-Consistent-Field*). En appliquant l'approximation LCAO aux équations de Hartree-Fock, on exprime les orbitales moléculaires à l'aide d'une combinaison linéaire d'orbitales atomiques. On obtient ainsi les équations de Roothaan¹¹. Dans le formalisme restreint (RHF) on raisonne en terme d'orbitales atomiques et non en terme de spinorbitales. On travaille en couches fermées. Dans le cas du formalisme non restreint (UHF) on sépare les électrons de spin α et β et ceci conduit à un ensemble d'équations pratiquement analogues (connues sous le nom d'équations de Berthier-Pople-Nesbet^{12, 13}) à celle du formalisme RHF.

Pour décrire la méthode de Hartree-Fock, nous nous placerons dans le cas d'un système à couches fermées.

I.2.1. Equation de Hartree-Fock

La fonction d'onde $\Psi = |\chi_1 \chi_2 \dots \chi_n|$ construite sous la forme d'un déterminant de Slater est utilisée pour résoudre l'équation (4) et calculer l'énergie électronique correspondante :

$$E = \sum_i \langle \chi_i(1) | H^c(1) | \chi_i(1) \rangle + \sum_i \sum_{j < i} \left[\langle \chi_i(1) \chi_j(2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_i(1) \chi_j(2) \rangle - \langle \chi_i(1) \chi_j(2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_j(1) \chi_i(2) \rangle \right] \quad (10)$$

La fonction d'onde multiélectronique qui minimise cette énergie peut-être approchée en cherchant les spinorbitales solution des équations de Hartree-Fock :

$$F(1)\Psi_i(1) = \varepsilon_i \Psi_i(1) \quad (11)$$

Où ε_i est l'énergie de l'orbitale Ψ_i correspondante et F l'opérateur de Fock défini selon l'équation:

$$F(1) = H^c(1) + \sum_i J_i(1) - K_i(1) \quad (12)$$

$H^c(1)$ est l'hamiltonien de cœur relatif à un électron, qui comprend l'énergie cinétique et l'énergie d'attraction de l'électron par les noyaux (voir équation (3)). J et K sont respectivement les opérateurs coulombien et d'échange défini selon les équations :

$$J_i(1) = \int \Psi_i^*(2) \frac{1}{r_{12}} \Psi_i(2) d\tau_2 \quad (13)$$

$$K_i(1)\Psi_j(1) = \Psi_i(1) \int \Psi_i^*(2) \frac{1}{r_{12}} \Psi_j(2) d\tau_2 \quad (14)$$

I.2.2. L'approximation CLOA

Une des méthodes permettant de résoudre les équations (11) consiste à développer les Orbitales Moléculaires en combinaisons linéaires de fonctions de base. Le choix de ces fonctions de base se porte généralement sur les orbitales atomiques (OA) du système et conduit à l'*approximation C.L.O.A.* (Combinaison Linéaire d'Orbitales Atomiques) :

$$\Psi_i = \sum_v C_{vi} \Phi_v \quad (15)$$

Dans le cadre de cette approximation, il s'agit de trouver les meilleurs coefficients C_{vi} qui minimisent l'énergie électronique E . En substituant l'équation (15) dans l'expression (11) et en multipliant chaque membre par ϕ_μ^* , on aboutit aux *équations de Roothaan* :

$$\sum_v F_{\mu\nu} C_{vi} = \epsilon_i \sum_v S_{\mu\nu} C_{vi} \quad (16)$$

où $S_{\mu\nu}$ est un élément de la matrice de recouvrement et $F_{\mu\nu}$ un élément de la matrice de Fock qui s'écrit :

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^c + \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} \left[\langle \mu\sigma | \nu\lambda \rangle - \frac{1}{2} \langle \mu\sigma | \lambda\nu \rangle \right] \quad (17)$$

$P_{\lambda\sigma}$ est un élément de la matrice densité définie par :

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_i^{\text{occ}} c_{\lambda i}^* c_{\sigma i} \quad (18)$$

I.2.3. La procédure SCF

Pour définir les opérateurs J et K des équations de Hartree-Fock, il est nécessaire de connaître les spinorbitales, elles-mêmes solutions de l'équation (11). Ces équations doivent être résolues de manière itérative selon la procédure du champ auto-cohérent (ou SCF pour *Self-Consistent-Field*).

Dans un premier temps, le choix des spinorbitales initiales, donc d'une matrice densité P , doit être envisagé. Dans un deuxième temps, les équations HF sont résolues et donnent un nouvel jeu de spinorbitales. Ces nouvelles spinorbitales vont à leur tour servir à définir de nouveaux opérateurs J et K et donc un nouvel ensemble de fonctions propres de F .

Cette procédure est répétée jusqu'à ce que la cohérence interne soit atteinte, c'est-à-dire jusqu'à ce que la nouvelle matrice densité P soit la même que la précédente, en tenant compte d'un seuil minimal fixé.

I.3. Méthodes basées sur la théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT)

La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) se distingue des méthodes *ab initio* basées sur les équations HF car elle s'appuie sur la notion de densité électronique $\rho(\mathbf{r})$ et non sur celle de fonction d'onde multiélectronique. Cette approche est basée sur deux théorèmes dûs à Hohenberg et Kohn¹⁴.

Le premier stipule que "*l'énergie totale d'un système dans son état fondamental ne dépend que de sa seule densité électronique $\rho(\mathbf{r})$* " (l'énergie est donc une fonctionnelle de la densité électronique). Toute propriété de l'état fondamental, dont l'énergie, peut s'écrire comme une fonctionnelle de la densité électronique. Le second théorème est l'analogie du principe variationnel appliqué à la densité et montre que la densité est stationnaire pour l'état fondamental.

Kohn et Sham¹⁵ ont proposé ensuite une méthode pour obtenir la densité et l'énergie d'un système. Pour un potentiel externe $v(\mathbf{r})$ donné, la fonctionnelle énergie électronique de l'état fondamental d'un système s'écrit comme la somme de plusieurs termes :

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T[\rho(\mathbf{r})] + \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})d\mathbf{r} + v_{ee}[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (19)$$

où $T[\rho(\mathbf{r})]$ est l'énergie cinétique d'un système d'électrons sans interaction possédant la même densité $\rho(\mathbf{r})$ que le système réel. Les deux termes suivants caractérisent respectivement l'énergie d'attraction noyaux-électrons et l'énergie de répulsion biélectronique. Le dernier terme $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$ est l'*énergie d'échange-corrélation*. Il contient les contributions d'échange et de corrélation ainsi que la différence entre $T[\rho(\mathbf{r})]$ et l'énergie cinétique réelle du système d'électrons en interaction.

En considérant que $E[\rho(\mathbf{r})]$ doit être stationnaire lors d'une légère variation de la densité électronique et qu'elle doit être soumise à la condition de normalisation, le principe variationnel conduit alors à des équations auto-cohérentes analogues aux équations de Hartree-Fock, les équations de Kohn-Sham :

$$\left[-\frac{1}{2}\Delta + v(\mathbf{r}) + v_{ee}[\rho(\mathbf{r})] + v_{xc}[\rho(\mathbf{r})] \right] \Psi_i = \varepsilon_i \Psi_i \quad (20)$$

Ces équations seraient exactes si le potentiel d'échange-corrélation v_{xc} était connu. La précision de la méthode réside donc dans le choix des fonctionnelles $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$. Trois principaux types de fonctionnelles existent :

- Les *fonctionnelles locales (LDA)* qui dépendent uniquement de la densité électronique en chaque point du système et négligent toute influence de l'inhomogénéité du système. Cette approximation est correcte lorsque la densité varie suffisamment lentement. Ces fonctionnelles (S^{16} , $X\alpha^{16}$, VWN^{17}) ne sont plus utilisées à présent de façon régulière.
- Les *fonctionnelles à correction de gradient (GGA)* qui introduisent dans leur expression le gradient de la densité permettent de tenir compte de l'inhomogénéité de la distribution électronique. Les fonctionnelles les plus employées sont : Becke88¹⁸, PW91¹⁹, P86²⁰ et LYP²¹.
- Les *fonctionnelles hybrides HF-DFT*, apparues récemment, qui incluent pour l'énergie d'échange un mélange Hartree-Fock et DFT tandis que l'énergie de corrélation reste purement DFT. Ces fonctionnelles apparaissent comme étant les plus fiables du moment. La fonctionnelle que nous avons employée dans nos calculs est la fonctionnelle hybride B3LYP^{21, 22} couramment utilisée dans la littérature.

I.4. Energie de corrélation

L'énergie de corrélation est la différence entre l'énergie exacte non relativiste et l'énergie Hartree-Fock. La prise en compte de cette énergie est en général nécessaire pour une bonne description des systèmes et processus chimiques.

La méthode la plus répandue pour calculer cette énergie, consiste à effectuer un calcul de perturbation sur la fonction d'onde SCF. Cette méthode est connue sous le nom de Møller-Plesset²³ et est en générale conduite aux ordres 2 ou 4 (notées respectivement MP2, MP4). La deuxième méthode est basée sur le principe variationnel. On utilise l'espace des configurations pour développer une expression approchée des fonctions propres de l'Hamiltonien. Cette méthode porte le nom d'interaction de configuration²⁴. Le nombre de configurations étant très important (nombre de façons de répartir n électrons sur N niveaux), on se limite souvent aux mono et diexcitations.

L'approche DFT possède l'avantage d'introduire les effets de corrélation électronique à un coût moindre par rapport aux méthodes *ab initio* traditionnelles. Très souvent, la qualité d'un calcul B3LYP se situe au niveau de ceux obtenus au niveau MP2, voire même MP4, mais aucune règle générale n'est connue. Néanmoins elles restent des méthodes très attractives en raison de leur très bon rapport précision / rapidité.

I.5. Choix de la base d'orbitales atomiques

D'un point de vue mathématique, les orbitales de Slater sont bien adaptées pour représenter les OA ϕ_i de l'expression (15). Cependant le calcul des intégrales multicentriques $\langle \mu\sigma | \nu\lambda \rangle$ pose des problèmes en raison de la présence du terme exponentiel $e^{-\zeta r}$. Le moyen de contourner cette difficulté est de remplacer les orbitales de Slater par une combinaison de plusieurs fonctions de type « gaussienne » de la forme $e^{-\alpha r^2}$.

La précision des résultats dépend évidemment du nombre de fonctions gaussiennes utilisées pour développer chaque OA. Les bases les plus couramment employées sont les bases double-zéta 6-31G²⁵ (une combinaison de 6 fonctions gaussiennes pour les représenter les électrons de cœur et 3+1 fonctions pour les électrons de valence) et triple-zéta 6-311G²⁶ contenues dans les logiciels de type Gaussian²⁷. Dans le but de mieux décrire les systèmes ioniques ou radicalaires et mieux rendre compte de la dissymétrie du nuage électronique par rapport aux noyaux, on peut inclure des fonctions diffuses (+)²⁸ ou de polarisation (*)²⁹ supplémentaires.

L'utilisation de bases incomplètes induit une erreur dans le calcul des énergies de réaction ou de complexation. L'origine de cette erreur, appelée *BSSE (Basis Set Superposition Error)*, provient du fait que, dans un complexe par exemple, chaque orbitale moléculaire est développée sur une base plus étendue que dans les molécules séparées. La tendance qu'ont les électrons associés à un atome à utiliser les fonctions de base de l'atome voisin pour diminuer l'énergie du système génère une « surstabilisation » du système.

I.6. Corrections thermodynamiques

Les mesures expérimentales sont faites sur les molécules à température finie, alors que les molécules effectuent des mouvements de vibration, de rotation ou encore de translation. Afin de pouvoir comparer les calculs théoriques (réalisés pour une structure optimisée à $T = 0\text{K}$) aux données expérimentales, des corrections thermodynamiques doivent alors être appliquées. Ces corrections nécessitent en outre la connaissance des modes normaux de vibration de la molécule. Les fréquences ν_i sont calculées, dans l'approximation harmonique, à partir de la matrice des constantes de force (dérivées seconde de l'énergie par rapport aux coordonnées nucléaires) et des masses atomiques. On a alors :

$$G = H - TS$$

$$H = U + RT$$

$$U(T) = U(0) + U_{\text{trans}} + U_{\text{rot}} + U_{\text{vib}}$$

$$S(T) = S_{\text{trans}} + S_{\text{rot}} + S_{\text{vib}} + R[\ln N - 1]$$

$U(0)$ est l'énergie de point zéro, donnée par :

$$E_{\text{zpe}} = \sum_{i=1}^N \frac{h\nu_i}{2} \quad (21)$$

où N est le nombre de modes normaux de vibration. Les autres grandeurs pour une mole, sont définies par

$$\begin{aligned} U_{\text{trans}} &= \frac{3}{2}RT \\ S_{\text{trans}} &= \frac{5}{2}R + R \ln \left(\frac{V}{N_A} \left(\frac{2\pi M k_B T}{h^2} \right)^{3/2} \right) \\ U_{\text{rot}} &= \frac{3}{2}RT \\ S_{\text{rot}} &= \frac{1}{2}R \left[3 + \ln \left(\frac{\sqrt{\pi}}{\sigma} \left(\frac{8\pi^2 M k_B T}{h^2} \right)^{3/2} \sqrt{I_1 I_2 I_3} \right) \right] \\ U_{\text{vib}} &= R \sum_{i=1}^{3N-6} \left(\frac{h\nu_i}{k_b} \frac{1}{e^{h\nu_i/k_b T} - 1} \right) \\ S_{\text{vib}} &= R \sum_{i=1}^{3N-6} \left(\frac{h\nu_i}{k_b T} \frac{1}{e^{h\nu_i/k_b T} - 1} - \ln \left(1 - e^{-h\nu_i/k_b T} \right) \right) \end{aligned} \quad (22)$$

II. Exploration de la surface de potentiel, application à la réactivité chimique

Les chimistes s'intéressent non seulement aux grandeurs thermodynamiques (stabilité relative des différentes espèces, etc.) associées à un processus réactionnel mais également aux grandeurs cinétiques (coefficient de vitesse, etc.) du système étudié.

D'un point de vue thermodynamique, pour qu'une réaction s'effectue spontanément, il faut que la variation d'enthalpie de la réaction soit négative ($\Delta G_{\text{réaction}} < 0$) ; on parle alors de réaction exothermique. Dans le cas contraire, la réaction est endothermique. Le calcul des énergies d'activation (ΔG^\ddagger), correspondant à la différence entre l'énergie d'un état stationnaire et celle d'un état de

transition, permet d'accéder aux différentes grandeurs cinétiques. Lorsqu'un processus réactionnel se décompose en plusieurs étapes, on parle d'étape cinétiquement déterminante pour l'étape présentant l'énergie d'activation la plus élevée (par exemple ΔG^\ddagger_1 sur la Figure 1). D'un point de vue mécanistique, une réaction bien que thermodynamiquement favorisée peut être cinétiquement défavorisée si l'énergie d'activation de l'étape cinétiquement déterminante est beaucoup trop élevée.

Pour mieux appréhender un processus chimique et les grandeurs énergétiques associées, il est commode de représenter son profil énergétique en deux dimensions comme sur la Figure 1.

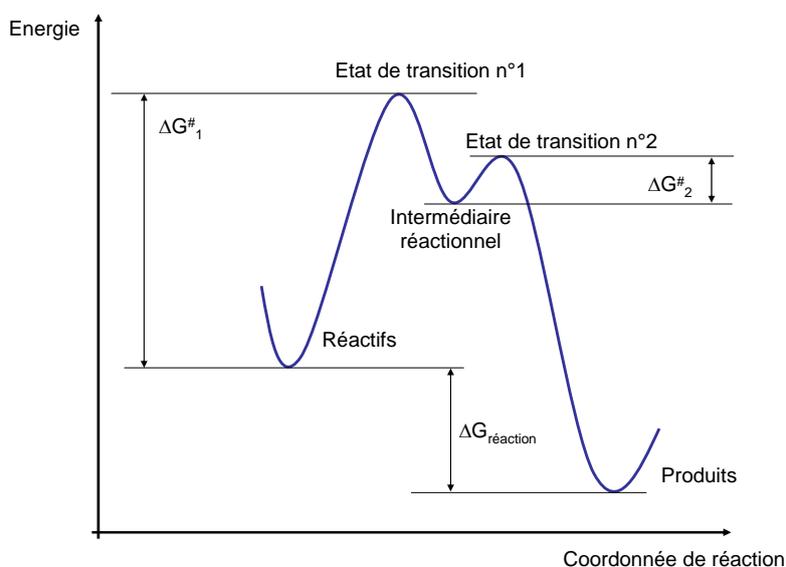


Figure 1 : Profil énergétique d'une réaction chimique en deux étapes.

L'exploration de la surface de potentiel n'est pas si évidente puisque pour un système comportant N atomes, l'énergie est fonction de $3N-6$ coordonnées internes. C'est pour cela que la surface de potentiel est également appelée hypersurface de potentiel. La Figure 2 suivante illustre une surface d'énergie potentielle plus complexe que la précédente, sur laquelle sont représentés l'ensemble des cas possibles présentés précédemment. Les réactifs, les intermédiaires réactionnels, et les produits d'une réaction chimique correspondent à des minima locaux (ou globaux) de la surface de potentiel alors que les états de transition sont eux caractérisés par des points selles (à la fois minimum et maximum selon la coordonnée choisie).

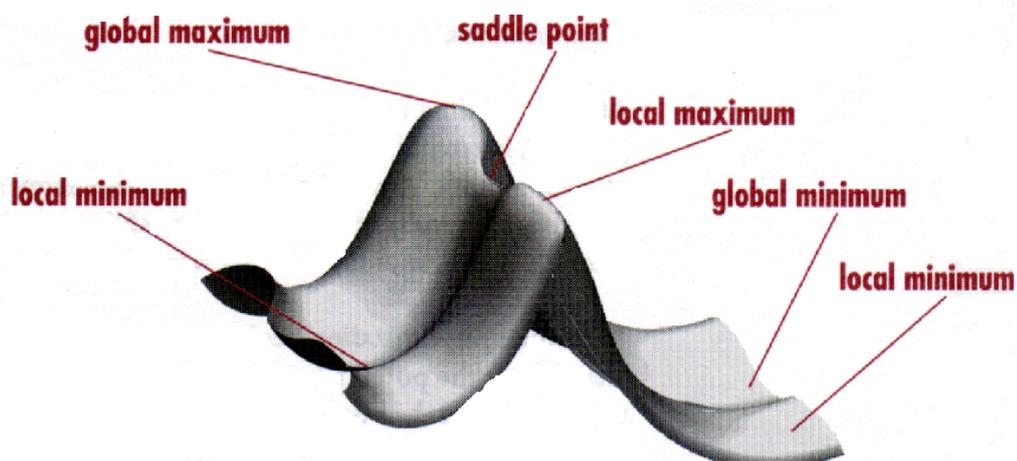


Figure 2 : Surface d'énergie potentielle extrait du livre de Foresman et Frisch³⁰.

II.1.1. Recherche d'état stationnaire

La chimie quantique et les méthodes de minimisation d'énergie permettent d'explorer la surface de potentiel et de caractériser les minima d'énergie d'un système moléculaire. Formellement, les méthodes de minimisation sont basées sur le calcul des dérivées premières et secondes de l'énergie. Pour localiser un minimum, il faut que la dérivée première de l'énergie soit nulle et la dérivée seconde soit positive (E correspond à la fonction énergie et x_i les coordonnées du système) :

$$\frac{\partial E}{\partial x_i} = 0 \text{ et } \frac{\partial^2 E}{\partial x_i^2} > 0$$

L'accès aux dérivées premières ou secondes peut se faire par résolution analytique ou numérique. De nombreuses méthodes sont couramment utilisées, comme la méthode steepest descent, la méthode du gradient conjugué, la méthode Newton-Raphson, etc. Nous ne détaillerons pas ces méthodes mais pour de plus amples informations, il est possible de parcourir de nombreux ouvrages de références^{31,5}.

II.1.2. Recherche d'état de transition

Pour localiser un état de transition, il est préférable de connaître à l'avance la structure optimisée des intermédiaires encadrant cet état de transition. La première méthode consiste à une interpolation de la structure de l'état de transition à partir des deux points stationnaires proches. Cette méthode s'appelle *synchronous transit-guided quasi-Newton* (QST)³². En cas d'échec de cette méthode, il faut procéder à une exploration de la surface en suivant une grille de point, c.-à-d. faire

varier quelques coordonnées géométriques pertinentes. La structure de l'état de transition sera alors proche de celle de plus haute énergie. La difficulté est alors d'affiner la structure pour obtenir l'état de transition recherché.

Les algorithmes de recherche d'état de transition utilisent alors les modes normaux associés à la fois aux fréquences positives et négatives. En effet, alors qu'un minimum est caractérisé par $3N-6$ modes normaux de fréquence positive, un état de transition est lui caractérisé par $3N-5$ modes normaux de fréquence positive et un mode normal de fréquence « négative » (fréquence imaginaire, non observable expérimentalement).

Pour vérifier que la structure ainsi optimisée est représentative de la coordonnée de réaction souhaitée, il est nécessaire d'effectuer une vérification de la structure de l'état de transition. L'algorithme IRC (*Internal Reaction Coordinate*)³³ permet, à partir de la structure de l'état de transition, de descendre la pente vers les intermédiaires en suivant la direction indiquée par le mode normal de vibration de la fréquence imaginaire.

III. La mécanique moléculaire

Pour des systèmes de taille importante ou lorsqu'une étude *dynamique* d'un système moléculaire est envisagée, l'utilisation de méthodes de la chimie quantique peut s'avérer trop coûteuse en temps de calcul. Les méthodes de mécanique moléculaire utilisent un potentiel d'interaction simplifié appelé *champ de force*, et conduisent à une expression de l'énergie totale dépendante des coordonnées nucléaires. Les paramètres du champ de force sont optimisés sur des données expérimentales ou des calculs de niveau très élevés sur des fragments de molécules.

Typiquement, les modèles de mécanique moléculaires consistent en des atomes sphériques reliés par des ressorts qui représentent les liaisons. Les forces internes considérées dans la structure modélisée sont décrites en utilisant de simples fonctions mathématiques. La loi de Hooke est généralement employée pour décrire les interactions de liaison. Les atomes peuvent être traités comme des sphères dures non-élastiques ou ils peuvent interagir selon le potentiel de Lennard-Jones ou de Buckingham.

L'énergie du champ de force résulte de différentes contributions à l'énergie totale que l'on l'écrit :

$$E_{MM} = E_{\text{liaisons}} + E_{\text{angles}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{électrostatique}} + (E_{\text{croisés}}) \quad (23)$$

Les trois premiers termes correspondent à la déformation des liaisons, des angles et des angles dièdres. Les termes E_{vdW} et $E_{\text{électrostatique}}$ représentent respectivement les interactions de van der Waals et électrostatique entre les atomes non liés. Enfin, le dernier terme correspond aux termes croisés entre ces différentes contributions. Les conformations stables de systèmes moléculaires correspondent aux minima énergétiques de cette énergie en fonction des coordonnées nucléaires.

Un potentiel simple, ne contenant que des potentiels harmoniques sur les interactions liées, auxquels s'ajoutent un potentiel coulombien et un potentiel de van der Waals du type Lennard-Jones pour les interactions non liées, est typiquement celui du champ de forces AMBER³⁴. Dans ce cas, le potentiel d'interaction de van der Waals représenté par une fonction de type Lennard-Jones « 6-12 » et un terme d'interaction de coulomb standard.

$$E_{\text{pot}} = \sum_{\text{liaisons}} k_r (r - r_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{angles}} K_\theta (\theta - \theta_{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{dièdre}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\phi - \gamma)) + \sum_{\text{non liés}} \left[\frac{q_i q_j}{r_{ij}} + \epsilon_{ij} \left(\left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{ij}^*}{r_{ij}} \right)^6 \right) \right] \quad (24)$$

Le faible coût de ces méthodes permet de réaliser un nombre important de calculs portant sur différentes conformations moléculaires ou d'étudier de gros systèmes chimiques ou biochimiques, par exemple.

III.1. La dynamique moléculaire

Une simulation de dynamique moléculaire consiste à calculer l'évolution d'un système de particules au cours du temps. Dans ces simulations, le temps évolue de manière discrète et l'on souhaite connaître la position et la vitesse des particules à chaque pas de temps. Le calcul des forces d'interaction entre les particules permet de déterminer l'évolution des vitesses, et donc des positions, en utilisant les lois de la dynamique classique de Newton. L'énergie est constituée de l'énergie potentielle et cinétique du système considéré. Les forces correspondantes sont obtenues à partir des dérivées premières de l'énergie. Les équations du mouvement de Newton ($F = ma$) doivent être résolues, elles peuvent s'écrire sous la forme :

$$-\frac{dV}{dr} = m \frac{d^2 r}{dt^2} \quad (25)$$

où V est l'énergie potentielle à la position r . Le vecteur r contient les coordonnées de toutes les particules du système.

Plusieurs algorithmes peuvent être invoqués pour résoudre les équations du mouvement. En général les positions à un temps $t+\Delta t$ sont obtenues par extension en une série de Taylor impliquant la vitesse et l'accélération des particules. Pour plus de détails, le lecteur peut consulter l'ouvrage d'Allen & Tildesley³⁵.

Le pas d'intégration Δt d'une dynamique moléculaire est considéré en fonction du mouvement moléculaire le plus rapide. Pour les systèmes moléculaires courants, le mouvement le plus rapide est l'élongation des liaisons impliquant un atome d'hydrogène. Dans notre travail, nous avons fait l'hypothèse que ce degré de liberté n'influence que très peu les propriétés calculées dans les simulations des complexes en solution. Nous avons donc choisi de fixer ces liaisons afin de pouvoir augmenter le pas d'intégration Δt . Ceci est possible grâce aux algorithmes de type *SHAKE*^{36, 37} ou *RATTLE*³⁸.

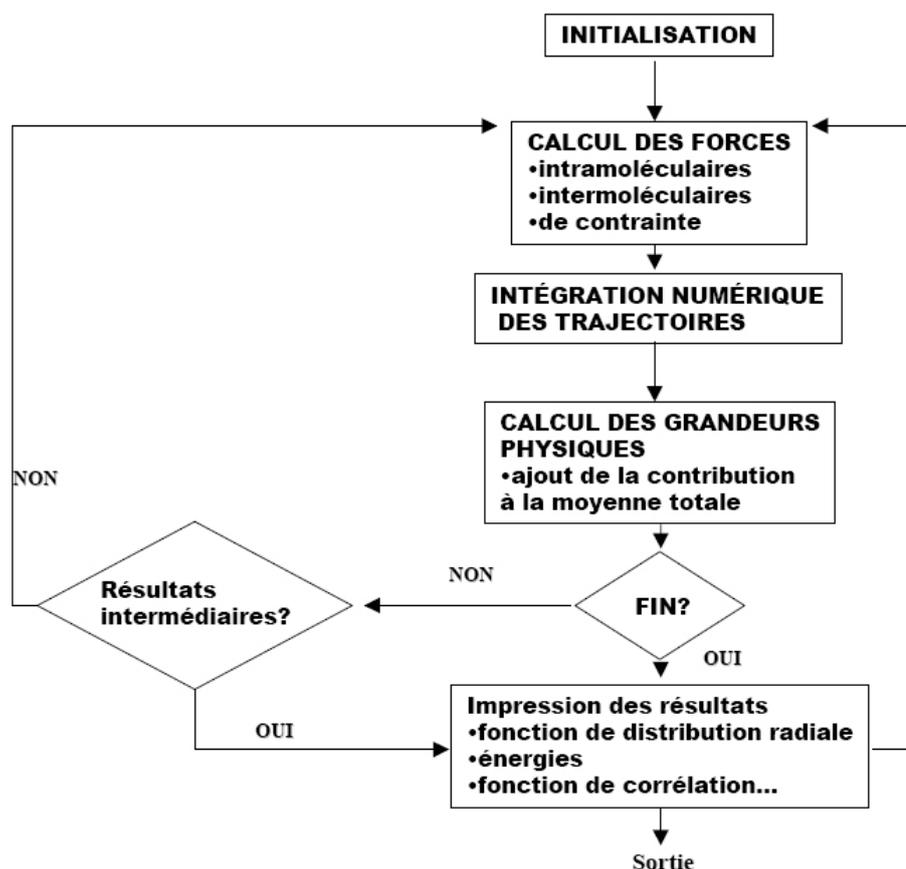


Figure 3 : Principe général d'une simulation de Dynamique Moléculaire.

La dynamique moléculaire s'applique aussi bien à l'étude structurale des molécules qu'à des systèmes en interaction de grande taille. Néanmoins, les capacités de calcul étant limitées, le nombre de particules dans une simulation l'est aussi. Afin de réduire le nombre de molécules étudiées, tout en

simulant un système le plus proche possible d'une phase condensée, la boîte contenant le système moléculaire est répliquée dans les trois directions de l'espace, formant ainsi un réseau infini (Conditions Limites Périodiques ou PBC en anglais). Si une particule quitte la boîte « par le haut », elle est immédiatement introduite par le bas. De plus, les interactions entre particules sont tronquées à une distance égale au maximum à la moitié de la taille de la boîte, afin qu'une particule n'interagisse jamais avec une seule de ses images (convention de l'image minimum), on parle alors de distance de troncature (*cut-off*).

III.2. Méthode Locally Enhanced Sampling (LES)

Les simulations de dynamiques moléculaires classiques ont des difficultés pour échantillonner aisément un évènement tel que le changement de conformation d'un édifice moléculaire ou la diffusion de petites molécules dans les protéines. Il est alors nécessaire de faire appel à des techniques permettant d'explorer d'autres régions de la surface d'énergie potentielle (recuit simulé, LES, etc.).

La technique d'échantillonnage LES, initialement définie par les travaux de Elber *et al.*^{39, 40}, est un puissant outil permettant d'augmenter l'échantillonnage d'une partie d'un système moléculaire en remplaçant cette région par de multiples copies d'elle même. Dans cette approche basée sur le principe de champ moyen, la zone d'intérêt est dupliquée de telle sorte que la simulation contienne N copies de ce fragment n'interagissant pas entre elles et que le reste du système perçoive chacune de ces N copies à travers des interactions pondérées par un facteur 1/N.

III.3. Estimation de l'énergie libre

III.3.1. *Umbrella Sampling* et Potentiel de force moyenne

La variation d'enthalpie libre associée à un processus biomoléculaire ne peut être déterminée via des simulations de dynamiques moléculaires classiques. Plusieurs méthodes sont à notre disposition pour réaliser ce type d'étude : Intégration Thermodynamique (TI), Perturbation de l'Energie Libre (FEP), l'approche *Umbrella Sampling*, etc. La mise en œuvre de simulation sous contraintes, également appelé *Umbrella Sampling* permet un meilleur échantillonnage de la surface d'énergie potentielle dans une région réduite de l'espace des phases. Pour cela, le système est simulé en présence d'une contrainte artificielle $w(\zeta)$ sur l'ensemble de la trajectoire. La trajectoire est découpée pour l'occasion en plusieurs fenêtres d'échantillonnage où le système est confiné dans une

région de la surface de potentiel correspondant à la coordonnée de la réaction ζ . La contrainte correspond souvent à un potentiel harmonique de la forme $w_i(\zeta)=k(\zeta-\zeta_i)^2$ centrée sur les valeurs successives de ζ .

Une estimation précise du potentiel de force moyenne⁴¹ associé à ce processus requiert un échantillonnage suffisamment long de la surface d'énergie potentielle le long de la cette coordonnée de réaction. De plus, pour assurer un bon recouvrement des fenêtres, les valeurs successives de la coordonnée de réaction ne doivent pas être trop différentes. Après l'échantillonnage de la trajectoire représentant le chemin réactionnel envisagé, les dynamiques sous contraintes peuvent être analysées en utilisant la méthode *weighted-average histogram method* (WHAM)^{42, 43} pour obtenir les PMF associées au processus souhaité.

III.3.2. Méthodes GB/SA et PB/SA

L'approche MM-GBSA/PBSA implémenté dans le logiciel AMBER permet d'évaluer l'enthalpie libre de complexation ligand/récepteur ou de calculer l'enthalpie libre absolue d'une molécule en solution. Un jeu de structures est collecté lors des simulations de dynamique moléculaire. La méthode MM-GBSA/PBSA combine les énergies obtenues par mécanique moléculaire avec une approche de type continuum pour représenter le solvant. L'enthalpie libre de solvation ΔG_{sol} peut être décomposée en trois termes :

$$\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{vdW}} + \Delta G_{\text{cav}}$$

ΔG_{elec} représente la contribution électrostatique à l'enthalpie libre de solvation, calculée soit par la méthode de Poisson-Boltzmann⁴⁴ (PB) soit par la résolution des équations de Born généralisées (GB)⁴⁵⁻⁴⁸. Les termes ΔG_{vdW} et ΔG_{cav} représentent la contribution hydrophobique (terme de van der Waals et de cavité) de l'enthalpie libre de solvation, et est généralement déterminée par le calcul de l'aire de surface accessible au solvant (SASA pour *Solvent Accessible Surface Area*).

IV. Références

- [1] McWeeny, R.; Sutcliffe, B.T. *Methods of Molecular Quantum Mechanics*. Academic Press: London and New York, 1969.
- [2] Atkins, P.W. *Molecular Quantum Mechanics*. Oxford University Press: Oxford, 1983.
- [3] Szabo, O.; Ostlund, N.S. *Modern Quantum Chemistry*. Macmillan: New York, 1982.
- [4] Rivail, J.L. *Eléments de Chimie Quantique à l'Usage des Chimistes*. InterEditions: Paris, 1994.
- [5] Leach, A.R. *Molecular Modeling. Principles and applications*. Addison Wesley Longman: Essex, England, 1996.
- [6] Born, M.; Oppenheimer, J.R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann. Physik* **1927**, 84, 457-484.
- [7] Pauli Jr., W. *Z. Physik* **1925**, 31, 765.
- [8] Slater, J.C. The Theory of Complex Spectra. *Phys. Rev.* **1929**, 34, 1293-1322.
- [9] Fock, V. *Z. Physik* **1930**, 61, 126-148.
- [10] Hartree, D.R. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* **1928**, 24, 89-111.
- [11] Roothaan, C.C.J. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev. Mod. Phys.* **1951**, 23, 69-89.
- [12] Pople, J.A.; Nesbet, R.K. Self-Consistent Orbitals for Radicals. *J. Chem. Phys.* **1954**, 22, 571-572.
- [13] Berthier, G. *J. Chim. Phys.* **1954**, 51, 363.
- [14] Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, 136, B864-B871.
- [15] Kohn, W.; Sham, L.J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* **1965**, 140, A1133-A1138.
- [16] Slater, J.C. *Quantum Theory of Molecular and Solids. Vol. 4: The Self-Consistent Field for Molecular and Solids*. McGraw-Hill: New York, 1974.
- [17] Vosko, S.H.; Wilk, L.; Nusair, M. *Canadian J. Phys.* **1980**, 58, 1200.
- [18] Becke, A.D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A.* **1988**, 38, 3098-3100.
- [19] Perdew, J.P.; Wang, Y. Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy. *Phys. Rev. B.* **1992**, 45, 13244-13249.
- [20] Perdew, J.P.; Wang, Y. Accurate and simple density functional for the electronic exchange energy: Generalized gradient approximation. *Phys. Rev. B.* **1986**, 33, 8800-8802.
- [21] Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.* **1988**, 37, 785-789.
- [22] Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5642.

- [23] Moller, C.; Plesset, M.S. Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems. *Phys. Rev.* **1934**, 46, 618-622.
- [24] Foresman, J.B.; Head-Gordon, M.; Pople, J.A.; Frisch, M.J. Toward a systematic molecular orbital theory for excited states. *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 135-149.
- [25] Hehre, W.J.; Ditchfield, R.; Pople, J.A. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-Type Basis Sets for Use in Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1972**, 56, 2257-2261.
- [26] Krishnan, R.; Binkley, J.S.; Seeger, R.; Pople, J.A. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 650-654.
- [27] *Gaussian03*, Revision C.02; M. J. Frisch, G.W.T., H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, Gaussian, Inc. Wallingford CT, 2003.
- [28] Chandrasekhar, J.; Andrade, J.G.; Schleyer, P.v.R. Efficient and Accurate Calculation of Anion Proton Affinities. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 5609-5612.
- [29] Hariharan, P.C.; Pople, J.A. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chem. Acc.* **1973**, 28, 213-222.
- [30] Foresman, J.B.; Frisch, M.J. *Exploring chemistry with Electronic Structure Methods*. Gaussian, Inc.: Pittsburg, PA, 1996.
- [31] Schlick, T., Optimization Methods in Computational Chemistry. In *Reviews in Computational chemistry*, Lipkowitz, K. B.; Boyd, D. B., Eds. VCH Publisher: New-York, 1992; pp 1-71.
- [32] Peng, C.; Ayala, P.Y.; Schlegel, H.B.; Frisch, M.J. Using redundant internal coordinates to optimize equilibrium geometries and transition states. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, 49-56.
- [33] Gonzalez, C.; Schlegel, H.B. An improved algorithm for reaction path following. *J. Chem. Phys.* **1989**, 90, 2154-2161.
- [34] Pearlman, D.A.; Case, D.A.; Caldwell, J.W.; Ross, W.S.; Cheatham, T.E., III; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P. "AMBER", a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to stimulate the structural and energetic properties of molecules. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, 91(1-3), 1-42.
- [35] Allen, M.P.; Tildesley, D.J. *Computer Simulations of Liquids*. Oxford University Press: Oxford, 1987.
- [36] Ryckaert, J.-P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, 23, 327-341.

- [37] Miyamoto, S.; Kollman, P. An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 952-962.
- [38] Andersen, H.C. Rattle: A "velocity" version of the Shake algorithm for molecular dynamics calculations. *J. Comput. Phys.* **1983**, *52*, 24-34.
- [39] Elber, R.; Karplus, M. Enhanced sampling in molecular dynamics: use of the time-dependent Hartree approximation for a simulation of carbon monoxide diffusion through myoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9161-9175.
- [40] Elber, R.; Karplus, M. Modeling side chains in peptides and proteins: Application of the locally enhanced sampling and the simulated annealing methods to find minimum energy conformations. *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*, 9277-9287.
- [41] Roux, B. The calculation of the potential of mean force using computer simulations. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*(1-3), 275-282.
- [42] Kumar, S.; Bouzida, D.; Swendsen, R.H.; Kollman, P.A.; Rosenberg, J.M. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13*, 1011-1021.
- [43] Kumar, S.; Rosenberg, J.M.; Bouzida, D.; Swendsen, R.H.; Kollman, P.A. Multidimensional free-energy calculations using the weighted histogram analysis method. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1339-1350.
- [44] Honig, B.; Nicholls, A. Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* **1995**, *268*, 1144-1149.
- [45] Hawking, G.D.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Pairwise solute descreening of solute charges from a dielectric medium. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *246*, 122-129.
- [46] Hawking, G.D.; Cramer, C.J.; Truhlar, D.G. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute charges from a dielectric medium. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19824-19839.
- [47] Onufriev, A.; Bashford, D.; Case, D.A. Modifications of the Generalized Born Model Suitable for Macromolecules. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, *104*, 3712-3720.
- [48] Feig, M.; Onufriev, A.; Lee, M.; Im, W.; Case, D.A.; Brooks III, C.L. Performance comparison of the Generalized Born and Poisson Methods in the Calculation of the Electrostatic Solvation Energies for Protein Structures. *J. Comput. Chem.* **2004**, *98*, 1978-1988.

RESUME :

L'intérêt grandissant porté sur les flavonoïdes provient du fait que ces composés présentent de nombreuses actions biologiques bénéfiques telles que des activités anti-oxydantes et anti-radicalaires. A l'aide de méthodes de chimie théorique, nous avons étudié, à travers le choix d'un composé modèle, la quercétine, divers mécanismes biologiques pour lesquels les flavonoïdes pouvaient être considérés comme des substrats ou des inhibiteurs.

A l'aide des méthodes de la chimie quantique et de dynamique moléculaire, nous nous sommes attaché à décrire ses caractéristiques électroniques, structurales et énergétiques et nous avons caractérisé deux processus biologiques l'impliquant : substrat de l'enzyme Quercétine 2,3-Dioxygénase, et inhibiteur de l'enzyme Lipoxygénase-3.

Ces études ont mis l'accent sur la complémentarité des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire et nos conclusions pourront être étendues à des composés présentant le site 3-hydroxychromone.

Mots Clés : Flavonoïde, Quercétine, Antioxydant, Antiradicalaire, Métalloprotéine, Catalyse enzymatique, Chimie quantique, Dynamique moléculaire, Mécanisme réactionnel, Interactions enzyme/substrat.

ABSTRACT:

The growing interest in flavonoid compounds arises from the broad spectrum of positive physiological activities to which they participate, such as anti-oxidant and antiradical potencies. By means of various theoretical chemistry approaches, we have studied, using quercetin as a model compound for this family, biological mechanisms for which flavonoids could be considered as substrates or inhibitors.

Using quantum chemistry methods and molecular dynamic simulations, we have described the electronic, structural and energetic properties of this compound and we have characterised two biological processes in which quercetin is implied: as a substrate in the Quercetin 2,3-Dioxygenase enzyme, and as an inhibitor for the Lipogygenase-3 enzyme.

These studies emphasize the complementarity of quantum chemistry and molecular dynamic methods, and our conclusions could be extended to other compounds presenting the 3-hydroxychromone site.

Keywords : Flavonoid, Quercetin, Antioxidant, Antiradical, Metalloprotein, enzymatic catalysis, Quantum chemistry, Molecular dynamic, Reaction mechanism, Enzyme/substrate interactions.