



**HAL**  
open science

# Etude théorique de la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun

Ophélie Kwasnieski

► **To cite this version:**

Ophélie Kwasnieski. Etude théorique de la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun. Chimie théorique et/ou physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : . tel-00796723

**HAL Id: tel-00796723**

**<https://theses.hal.science/tel-00796723>**

Submitted on 4 Mar 2013

**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.



**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE

Ecole Doctorale de Chimie Moléculaire de Paris Centre (ED 406)

Présentée par

**Ophélie KWASNIESKI**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Etude théorique de la réactivation de l'AChE inhibée par  
le tabun**

soutenue le 17 décembre 2010

devant le jury composé de :

Professeur	<b>Max</b>	<b>MALACRIA</b>	Directeur de thèse
Professeur	<b>Carme</b>	<b>ROVIRA</b>	Rapporteur
Docteur	<b>Nohad</b>	<b>GRESH</b>	Rapporteur
Docteur	<b>Etienne</b>	<b>DERAT</b>	Examineur
Docteur	<b>Patrick</b>	<b>MASSON</b>	Examineur
Professeur	<b>Mathieu</b>	<b>SOLLOGOUB</b>	Examineur
Docteur	<b>Laurent</b>	<b>VERDIER</b>	Examineur



**THESE DE DOCTORAT DE  
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE

Ecole Doctorale de Chimie Moléculaire de Paris Centre (ED 406)

Présentée par

**Ophélie KWASNIESKI**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de la thèse :

**Etude théorique de la réactivation de l'AChE inhibée par  
le tabun**

soutenue le 17 décembre 2010

devant le jury composé de :

Professeur	<b>Max</b>	<b>MALACRIA</b>	Directeur de thèse
Professeur	<b>Carme</b>	<b>ROVIRA</b>	Rapporteur
Docteur	<b>Nohad</b>	<b>GRESH</b>	Rapporteur
Docteur	<b>Etienne</b>	<b>DERAT</b>	Examineur
Docteur	<b>Patrick</b>	<b>MASSON</b>	Examineur
Professeur	<b>Mathieu</b>	<b>SOLLOGOUB</b>	Examineur
Docteur	<b>Laurent</b>	<b>VERDIER</b>	Examineur

# **ABBREVIATIONS**

ACh : acétylcholine  
AChE : acétylcholinestérase  
BChE : butyrylcholinestérase  
CIAC : Convention Internationale sur les Armes Chimiques  
DCM : dichlorométhane  
DFT : théorie de la fonctionnelle de la densité  
DMP : Dess-Martin périodinane  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
DTNB : acide 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoïque  
EVB : Empirical Valence Bond  
GGA : Generalized Gradient approximation  
HF : Hartree-Fock  
IFC : Induced Conformation Fit  
LDA : Local-density Approximation  
LD50 : Lethal Dose 50  
LSCF : Local Self-Consistent Field  
MM : Mécanique Moléculaire  
2-PAM : Pralidoxime  
PCC : chlorochromate de pyridinium  
PCM : Polarizable Continuum Model  
PDB : Protein Data Bank  
QM : Mécanique Quantique  
RX : Rayons X  
SCF : Self-Consistent Field

Acides aminés :

Ala : alanine	His : histidine	Sec : sélénocystéine
Arg : arginine	Ile : isoleucine	Ser : sérine
Asn : Asparagine	Leu : leucine	Thr : thréonine
Asp : aspartate	Lys : lysine	Trp : tryptophane
Cys : cystéine	Met : méthionine	Tyr : tyrosine
Gln : glutamine	Phe : phénylalanine	Val : valine
Glu : glutamate	Pro : proline	
Gly : glycine	Pyl : pyrrolysine	

# **SOMMAIRE**

---

<b>Introduction générale</b> .....	5
<b>Chap. 1 : Présentation de l'AChE</b> .....	7
I. Présentation de l'acétylcholinestérase (AChE).....	7
I.1. Rôle de l'AChE .....	7
I.2. Structure de l'AChE .....	8
I.3. Mécanisme d'hydrolyse.....	13
II. Dysfonctionnements de l'AChE .....	18
II.1. Les organophosphorés .....	18
II.2. Historique .....	19
II.3. Structure et activité des principaux organophosphorés .....	21
III. Réactivation de l'AChE inhibée .....	27
III.1. Traitements utilisés.....	27
III.2. Etude de différentes oximes .....	29
III.3. Mécanisme de réactivation par les oximes .....	36
IV. Conclusion .....	40
<b>Chap. 2 : Présentation de la chimie théorique</b> .....	41
I. Introduction.....	41
II. Mécanique Moléculaire .....	41
II.1. Energie des déformations liées .....	41
II.2. Déformation des liaisons .....	42
II.2.1. Déformation des angles.....	42
II.2.2. Déformation des angles dièdres .....	42
II.3. Energie des interactions non liées .....	43
II.3.1. Energie de Lennard-Jones .....	43
II.3.2. Interactions électrostatiques .....	44
III. Mécanique quantique .....	44
III.1. L'équation de Schrödinger .....	44
III.2. Méthode Hartree-Fock.....	46
III.3. Théorie de la Fonctionnelle de la densité (DFT).....	50
III.4. Mécanique Quantique/Mécanique Moléculaire (QM/MM) .....	54

---

IV. Conclusion .....	58
<b>Chap. 3 : Etude théorique de l'hydrolyse de l'ACh par l'AChE.....</b>	<b>59</b>
I. Introduction.....	59
II. Etude du cycle complet de l'hydrolyse de l'acétylcholine en QM/MM par Nemukhin et al.....	59
II.1. Méthodologie.....	59
II.2. Résultats obtenus par Nemukhin et al. ....	61
III. Travaux effectués.....	62
III.1. Méthodologie.....	62
III.2. Etude de l'acylation.....	63
III.3. Etude de la déacylation.....	65
III.4. Comparaison acylation et déacylation (PDB 1F8U) .....	66
III.5. Etude à partir des structures de Nemukhin et al. ....	67
IV. Etude de Zhang et al. ....	72
IV.1. Etude de l'acylation.....	73
IV.2. Etude de la déacylation.....	75
V. Conclusion .....	77
<b>Chap. 4 : Etude théorique de l'inhibition de l'AChE par le tabun.....</b>	<b>80</b>
I. Introduction.....	80
I.1. Réactivité du tabun au sein de l'AChE.....	80
I.2. Règles de Cahn-Ingold-Prelog pour le phosphore.....	81
II. Description du modèle utilisé .....	82
III. Fixation du sarin .....	88
IV. Fixation du tabun .....	93
IV.1. Résultats avec le PDB 2C0P.....	93
IV.2. Comparaison des PDB 2C0P et 3DL7.....	96
IV.3. Résultats avec le PDB 3DL7 .....	97
V. Fixation d'analogues du tabun.....	101
V.1. Fixation de l'analogue fluoré.....	104
V.2. Fixation de l'analogue méthyle .....	108
V.3. Analogue isopropyle.....	112

---

VI. Conclusion .....	118
<b>Chap. 5 : Etude théorique de la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun et conception d'un nouveau réactivateur.....</b>	<b>120</b>
I. Introduction.....	120
II. Etude méthodologique .....	123
II.1. Description du modèle.....	124
II.2. Réactivation par l'anion formoximate.....	126
II.2.1. Etude QM.....	126
II.2.2. Etude QM/MM.....	128
II.3. Réactivation par l'anion phényloximate.....	130
II.3.1. Etude QM.....	130
II.3.2. Etude QM/MM.....	134
III. Etude QM sur le mécanisme de la réactivation .....	137
III.1. Etude QM sur des nucléophiles simples.....	138
III.2. Etude QM sur la 2-PAM et ses dérivés .....	139
IV. Etude QM/MM de la réactivation par la 2-PAM.....	141
V. Conception d'un nouveau réactivateur .....	143
V.1. Etude QM/MM de la réactivation par la 2-PAMCH <sub>2</sub> .....	144
V.2. Synthèse de la 2-PAMCH <sub>2</sub> .....	145
V.2.1. Première stratégie de synthèse : à partir du 2-(pyridin-2-yl)acetaldehyde.....	145
V.2.2. Deuxième stratégie de synthèse : à partir de la 2-éthynylpyridine .....	150
V.3. Mesure expérimentale du pKa.....	150
V.4. Tests <i>in vitro</i> de la réactivation par la 2-PAMCH <sub>2</sub> de l'AChE inhibée par le tabun.....	151
VI. Conclusion .....	154
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>156</b>
<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>158</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme clé de la neurotransmission. En hydrolysant le neurotransmetteur cationique acétylcholine, elle permet aux neurones cholinergiques de retrouver leur état de repos, et notamment aux muscles de cesser de se contracter après la transmission de l'influx nerveux.

Cette enzyme est la cible des neurotoxiques organophosphorés utilisés comme agents de guerre tels que le sarin ou le tabun (Schéma 1). En inhibant irréversiblement l'AChE, ces neurotoxiques peuvent entraîner la mort par asphyxie. Malgré la Convention Internationale contre les Armes Chimiques (CIAC) signée en 1993, la menace terroriste persiste comme nous le rappelle les attaques au sarin du métro japonais en 1995.

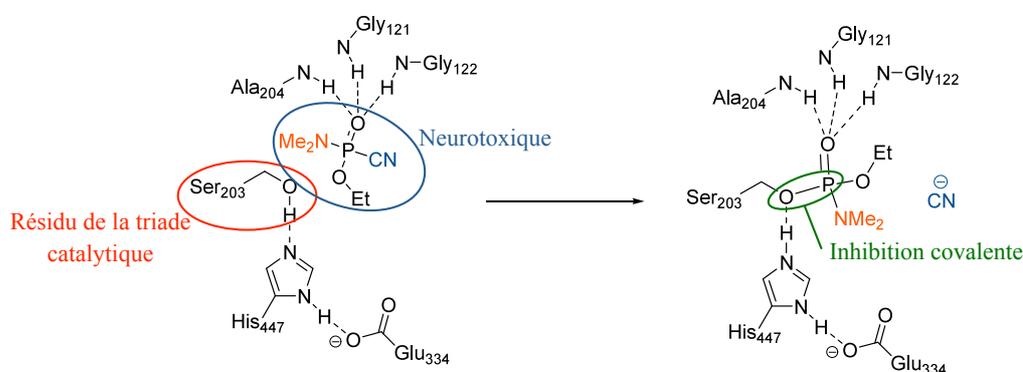


Schéma 1 : Inhibition de l'AChE par le tabun

Des antidotes à ces organophosphorés existent : il s'agit d'oximes, qui sont des nucléophiles puissants (Schéma 2). Malheureusement, aucune oxime n'est universelle. Notamment, aucune oxime à l'heure actuelle n'est capable de restaurer l'activité de l'AChE inhibée par le tabun. C'est pourquoi nous nous sommes particulièrement intéressés au complexe AChE-tabun.

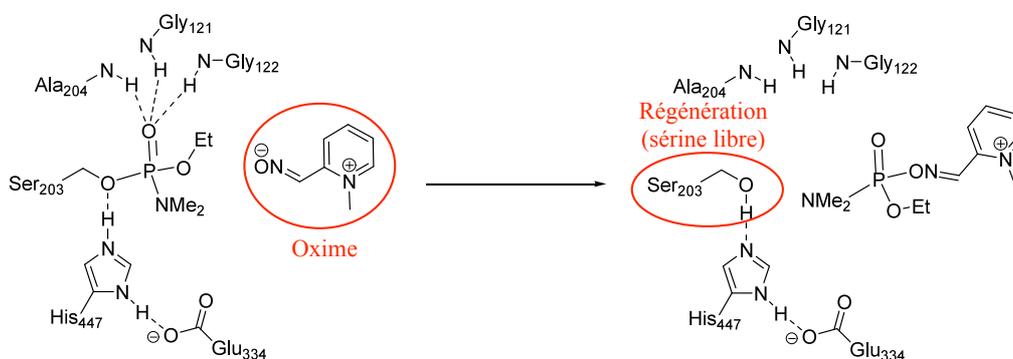


Schéma 2 : Réactivation du complexe AChE-tabun par la 2-PAM

Nous avons pour cela choisi d'utiliser la chimie théorique avec une méthodologie hybride Mécanique Quantique/Mécanique Moléculaire (QM/MM) présentée dans le chapitre 2 afin de prendre en compte l'environnement chimique du site actif de l'enzyme.

Avant de nous pencher sur la réactivation du complexe AChE-tabun, nous avons défini notre modèle théorique sur l'étude de l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE dans le chapitre 3. Ce mécanisme a déjà été étudié d'un point de vue théorique selon deux méthodologies QM/MM. Les différences observées entre les études menées nous ont fait nous interroger sur la flexibilité de l'AChE et la façon d'interpréter les résultats obtenus.

Nous avons ensuite affiné notre modèle sur le substrat sur lequel porte notre étude, à savoir le complexe AChE-tabun, en modélisant la fixation du tabun dans l'AChE dans le chapitre 4. Notre étude nous a permis de déterminer la configuration de l'isomère le plus actif du tabun et certains paramètres influençant la réactivité du tabun dans le site actif.

Munis de ces informations, nous avons exploré la réactivation de ce complexe dans le chapitre 5, d'abord sur des substrats classiques, puis nous avons modélisé un nouveau réactivateur que nous avons synthétisé et testé *in vitro* pour voir son efficacité.

# **CHAPITRE 1**

## **PRESENTATION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE**

## I. Présentation de l'acétylcholinestérase (AChE)

### I.1. Rôle de l'AChE

L'acétylcholinestérase est une enzyme clé pour la neurotransmission qui permet aux neurones cholinergiques de retrouver leur état de repos en hydrolysant l'acétylcholine (ACh) (Figure 1).<sup>1</sup> Elle est principalement associée aux nerfs et aux muscles et se trouve au niveau des synapses dans les neurones et les cellules gliales du cerveau.<sup>2</sup>

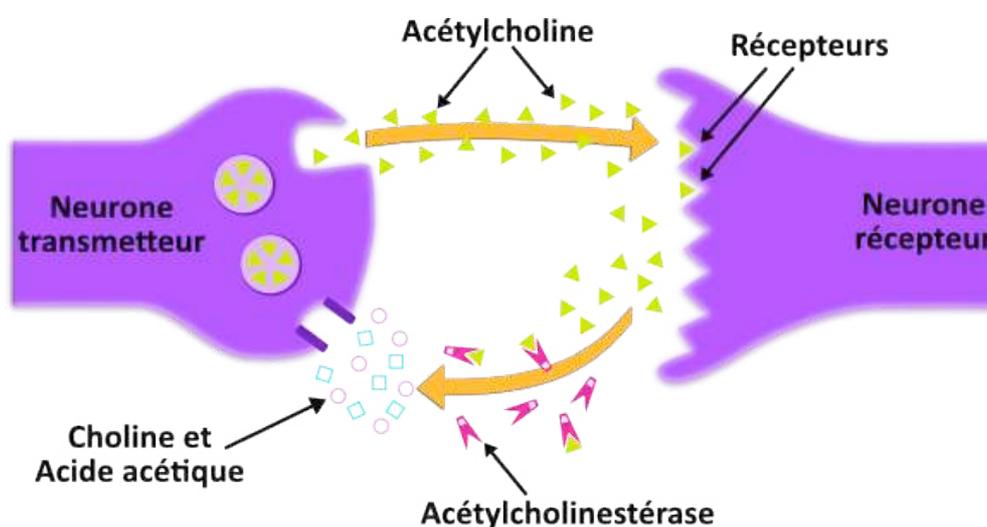


Figure 1 : Rôle de l'AChE au niveau des synapses

Les principales fonctions physiologiques de l'acétylcholinestérase sont bien connues. Elle intervient dans les systèmes nerveux périphérique et central et joue ainsi un rôle majeur au niveau de la transmission de l'influx nerveux en éliminant l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur cationique.<sup>3</sup> L'ACh est libéré par le neurone présynaptique sous l'effet d'un potentiel d'action et diffuse dans la synapse pour se fixer à un récepteur cholinergique. Le potentiel d'action est ainsi transmis au neurone postsynaptique. A ce moment, l'AChE hydrolyse rapidement l'ACh, interrompant la transmission de l'influx nerveux (Schéma 1).<sup>4</sup>

Dans le système nerveux périphérique, lorsque l'ACh se lie à l'un de ses récepteurs sur les fibres musculaires notamment, des canaux à calcium s'ouvrent dans la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée d'ions calcium dans la cellule. S'ensuit alors une série d'étapes qui mènent à la contraction musculaire. Dans le système nerveux central, l'acétylcholine intervient notamment dans

<sup>1</sup> Taylor, P.; Radic, Z.; Hosca, N. A.; Camp, S.; Marchot P.; Berman, H. A.; *Toxicol. Lett.* **1995**, 82, 453.

<sup>2</sup> Giacobini, E.; *Pharmacol. Res.* **2004**, 50, 433.

<sup>3</sup> Taylor, P. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4025.

<sup>4</sup> Quinn, D. M. *Chem. Rev.* **1987**, 87, 955.

l'apprentissage et la mémoire à court terme.

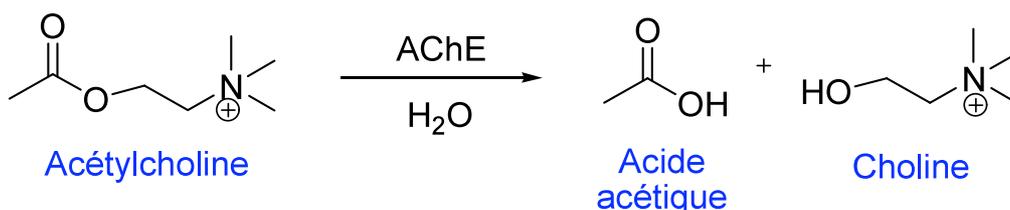


Schéma 1 : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE

## I.2. Structure de l'AChE

Comme toute protéine, l'AChE possède quatre niveaux de structuration :

- La structure primaire correspond à la succession linéaire des acides aminés constituant la protéine.
- La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale de la protéine (hélice  $\alpha$ , feuillet  $\beta$ ...).
- La structure tertiaire ou tridimensionnelle correspond au repliement de la structure secondaire dans l'espace.
- La structure quaternaire des protéines regroupe l'association d'au moins deux chaînes polypeptidiques, identiques ou différentes, par des liaisons non covalentes (liaison H, liaison ionique, interactions hydrophobes et force de Van der Waals).

L'AChE de *torpedo californica* a été la première dont la structure primaire a été déterminée.<sup>5</sup> Quelques années plus tard, la structure primaire de l'AChE humaine a aussi été caractérisée.<sup>6</sup> Sussman et al. en 1991 ont été les premiers à caractériser par diffraction des RX la structure tridimensionnelle de l'AChE de *torpedo californica*.<sup>7</sup> Les structures primaires des différentes AChE sont très proches : plus de 60% des résidus sont identiques entre l'AChE de *torpedo californica* et celle de mammifères, et en particulier au niveau du site actif.<sup>8</sup>

L'AChE de mammifères contient 543 résidus. Elle est cristallisée sous une forme homodimérique et constituée de 12 feuillets  $\beta$  entourant 14 hélices  $\alpha$  (Figure 2). Nous ne parlerons par la suite que de l'AChE de mammifères, avec la numérotation des résidus associée.

<sup>5</sup> Schumacher, M.; Camp, S.; Maulet, Y.; Newton, M.; MacPhee-Quigley, K.; Taylor, S. S.; Friedmann, T.; Taylor, P.; *Nature* **1986**, 319, 407.

<sup>6</sup> Soreq, H.; Ben-Aziz, R.; Prody, C. A.; Seidman, S.; Gnat, A.; Neville, L.; Lieman-Hurwitz, J.; Lev-Lehman, E.; Ginzberg, D.; Lapidot-Lifson, Y.; Zakut, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, 87, 9688.

<sup>7</sup> Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, 253, 872.

<sup>8</sup> Delfino, R. T.; Ribeiro, T. S.; Figueroa-Villar, J. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, 20, 407.

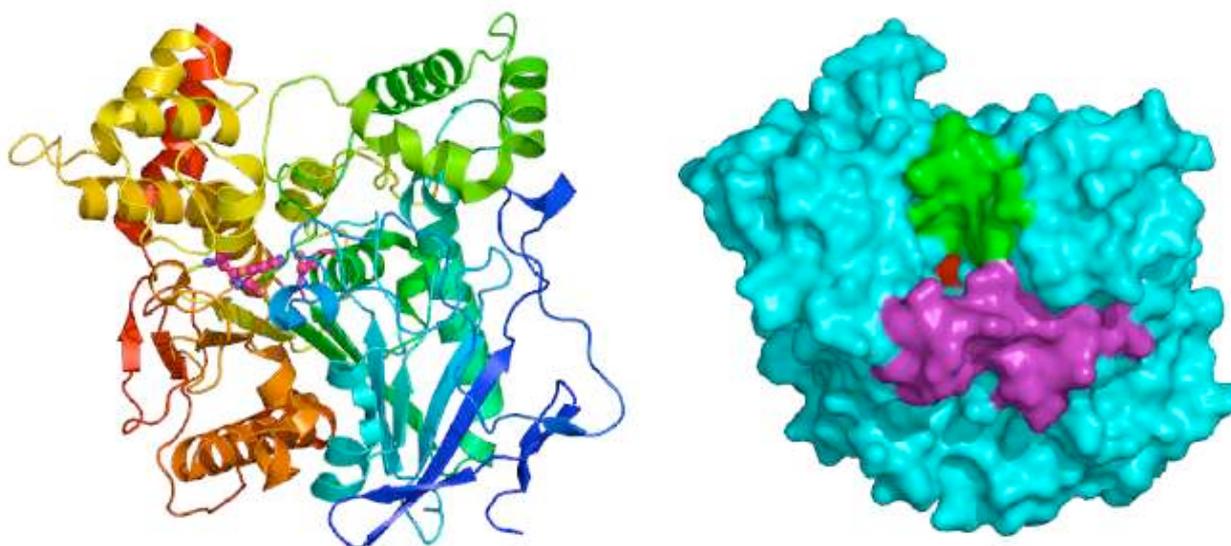


Figure 2 : Structures globales de monomère de la *TcAChE*. À gauche : structure 3D avec représentation des hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  et résidus du site actif. La coloration en arc-en-ciel va du domaine C-terminal en rouge à domaine N-terminal en bleu. À droite : Représentation de la surface de la protéine avec vue plongeante de la gorge jusqu'au site catalytique en rouge. Les boucles acyle et  $\Omega$  entourant la gorge sont respectivement colorées en vert et violet. (PDB 1ea5)<sup>9</sup>

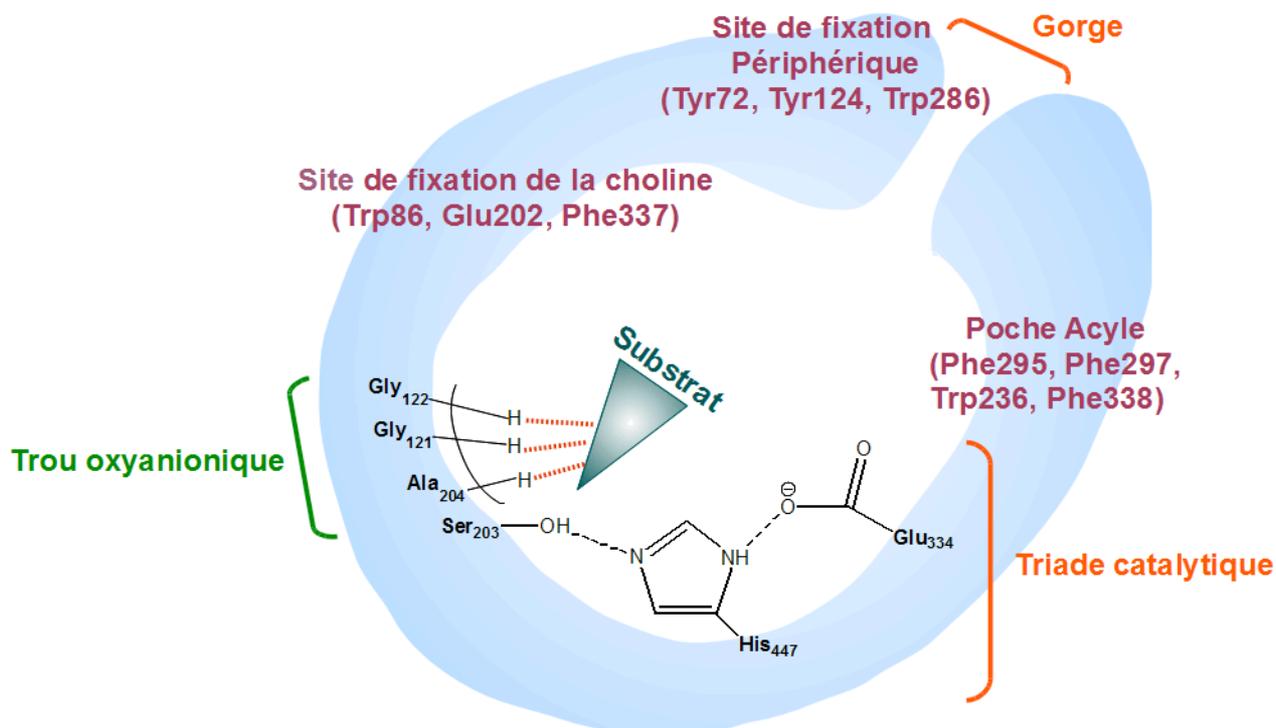


Figure 3 : Représentation schématique du site actif de l'AChE<sup>10</sup>

<sup>9</sup> (a) d'après : Thèse de doctorat d'Eugénie Carletti (b) Dvir, H.; Jiang, H.L.; Wong, D.M.; Harel, M.; Chetrit, M.; He, X.C.; Jin, G.Y.; Yu, G.L.; Tang, X.C.; Silman, I.; Bai, D.L.; Sussman, J.L. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10810.

<sup>10</sup> D'après : Soreq, H.; Seidman, S. *Nature Reviews : Neurosciences* **2001**, *2*, 295.

Le site actif de l'AChE est principalement organisé autour de la triade catalytique constituée des résidus Ser203, His447 et Glu334 (Figure 3).<sup>11</sup> La fonction de ces résidus a été montrée par mutagenèse : si l'on remplace l'un de ces trois résidus par une alanine, une baisse importante de l'activité de l'enzyme est observée.<sup>12</sup> Cette triade est similaire à celles des sérines hydrolases et protéases, dans lesquelles le glutamate est remplacé par un aspartate. La triade catalytique est au fond d'une étroite gorge de 20 Å de profondeur.<sup>13</sup> Pour que l'hydrolyse ait lieu, il faut donc que l'acétylcholine pénètre d'abord dans cette gorge et se positionne correctement vis-à-vis de la triade catalytique. Des interactions  $\pi$ -cations avec les résidus aromatiques qui tapissent la gorge facilitent la pénétration du substrat dans celle-ci.

Au-delà de la triade catalytique, trois principales régions peuvent être définies au niveau du site actif :

- Le sous-site anionique ou site de fixation de la choline est constitué du Trp86, Glu202 et Phe337. Il stabilise les charges positives, et notamment l'ammonium de l'acétylcholine par des interactions  $\pi$ -cations.<sup>14</sup> Le Trp86 est particulièrement important dans la fixation du substrat puisque l'affinité de l'enzyme pour le substrat est divisée par 1000 lorsque le Trp86 est remplacé par une alanine. Par contre, si l'on remplace le Glu202 par une glutamine, l'activité de l'enzyme ne diminue que d'un facteur 5, ce qui semble montrer que le Glu202 n'a pas de rôle direct dans la catalyse.<sup>10</sup>
- La poche acyle, région hydrophobe proche du site actif, permet de stabiliser la partie méthyle du groupe acyle et de délimiter la position du substrat. Elle est constituée des résidus Ph295, Phe297, Trp236, Phe338. Ceux-ci sont responsables de la sélectivité de l'AChE vis-à-vis de l'acétylcholine. En effet, du fait de l'encombrement stérique qu'ils induisent, seuls des groupements acétyl ou propanoyl peuvent venir s'y fixer.<sup>15</sup> Ces résidus servent également à stabiliser l'His447, et participent donc par ce biais à

<sup>11</sup> Shafferman, A.; Kronman, C.; Flashner, Y.; Leitner, M.; Grosfeld, H.; Ordentlich, A.; Gozes, Y.; Cohen, S.; Ariel, N.; Barak, D.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Velan, B. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17640.

<sup>12</sup> (a) Fuxreiter, M.; Warshel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 183. (b) Shafferman, A.; Velan, B.; Ordentlich, A.; Kronman, C.; Grosfeld, H.; Leitner, M.; Flashner, Y.; Cohen, S.; Barak, D.; Ariel, N. *EMBO J.* **1992**, *11*, 3561.

<sup>13</sup> Dodson, G.; Wlodawer, A. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 347.

<sup>14</sup> (a) Harel, M.; Schalk, I.; Ehret-Sabatier, L.; Bouet, F.; Goeldner, M.; Hirth, C.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 9031. (b) Selwood, T.; Feaster, S. R.; States, M. J.; Pryor, A. N.; Quinn, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10477. (c) Ordentlich, A.; Barak, D.; Sod-Moriah, G.; Kaplan, D.; Mizhari, D.; Segall, Y.; Kronman, C.; Karton, Y.; Lazar, A.; Marcus, D.; Velan, B.; Shafferman, A. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11255. (d) Ma, J. C.; Dougherty, D. A. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303. (e) Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Ariel, N.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19509.

<sup>15</sup> (a) Vellom, D. C.; Radic, Z.; Li, Y.; Pickering, N. A.; Camp, S.; Taylor, P. *Biochemistry* **1993**, *32*, 12. (b) Hosea, N. A.; Berman, H. A.; Taylor, P. *Biochemistry* **1995**, *34*, 11528

l'efficacité catalytique de l'AChE.<sup>16</sup>

- Le trou oxyanionique, composé des résidus Gly121, Gly122 et Ala204, est une zone très importante pour la réactivité de l'AChE. Ces résidus établissent des liaisons hydrogènes avec le substrat, et stabilisent fortement l'intermédiaire acyl-enzyme, et la charge négative sur l'oxygène.<sup>17</sup>

Une quatrième région peut également être définie. Il s'agit du site périphérique anionique qui se lie aux substrats cationiques, et notamment aux ligands trop gros pour pénétrer dans la gorge. Ce site est notamment constitué des résidus Tyr72, Tyr124 et Trp286. Il permet au substrat de se fixer avant de glisser vers le site actif où il sera hydrolysé.<sup>18</sup>

Pour que le substrat puisse pénétrer correctement dans l'AChE, celle-ci doit faire preuve de flexibilité du fait de l'étroitesse de la gorge.<sup>19</sup> Des simulations de dynamique moléculaire ont mis en évidence l'existence d'une boucle, dite « boucle  $\Omega$  », proche du site actif de l'AChE qui servirait de porte de sortie pour les produits (Figure 4).<sup>20</sup> Lorsqu'on rigidifie la boucle  $\Omega$  par des ponts salins ou disulfures, aucun effet significatif n'est noté sur l'activité de l'enzyme, ce qui suggère que la sortie des produits par cette porte annexe n'est pas la voie principale pour la libération des produits et/ou que les mouvements de la boucle  $\Omega$  sont de très faibles amplitudes.<sup>21</sup>

Cependant, l'activité enzymatique résiduelle après fixation de la fasciculine au niveau du site périphérique, bloquant la libération des produits d'hydrolyse, suggère que la porte de sortie annexe devient la voie de passage principale quand l'entrée de la gorge est bloquée.<sup>22</sup>

---

<sup>16</sup> Barak, D.; Kaplan, D.; Ordentlich, A.; Ariel, N.; Velan, B.; Shafferman, A. *Biochemistry* **2002**, *41*, 8245.

<sup>17</sup> Harel, M.; Quinn, D. M.; Nair, H. K.; Silman, I.; Sussman, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2340.

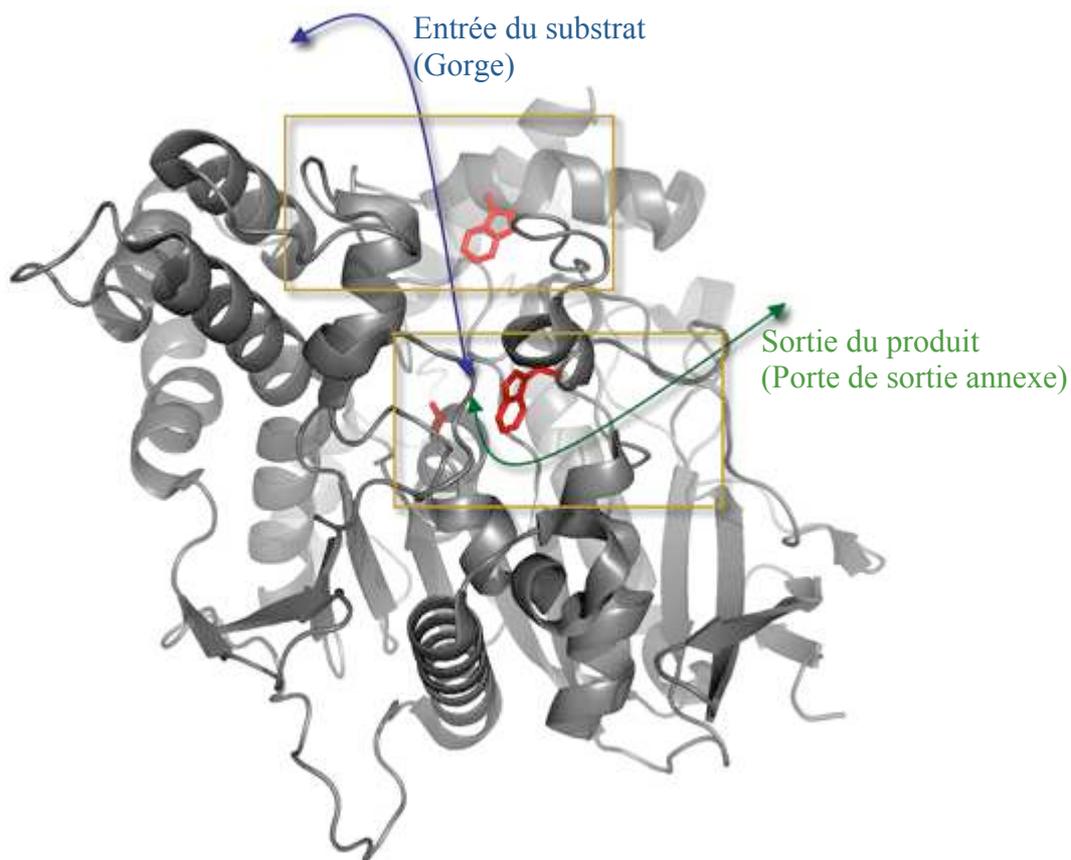
<sup>18</sup> Taylor, P.; Radic, Z. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1994**, *34*, 281.

<sup>19</sup> (a) Axelsen, P. H.; Harel, M.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 188. (b) Fuxreiter, M.; Warshel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 183. (c) Gonçalves, A. S.; França, T. C. C.; Wilter, A.; Figueroa-Villar, J. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 968. (d) Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 5128. (e) Tan, R. C.; Truong, T. N.; McCammon, J. A. Sussman, J. L.; *Biochemistry* **1993**, *32*, 401. (f) Shen, T.; Tai, K.; Henchman, R. H.; McCammon, J. A. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 332.

<sup>20</sup> Gilson, M. K.; Straatsma, T. P.; McCammon, J. A.; Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Science* **1994**, *263*, 1276.

<sup>21</sup> (a) Faerman, C.; Ripoll, D.; Bon, S.; Le Feuvre, Y.; Morel, N.; Massoulie, J.; Sussman, J. L.; Silman, I. *FEBS Lett.* **1986**, *386*, 65. (b) Kronman, C.; Ordentlich, A.; Barak, D.; Velan, B.; Shafferman, A. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 27819.

<sup>22</sup> (a) Szegletes, T.; Mallender, W. D.; Thomas, P. J.; Rosenberry, T. L. *Biochemistry* **1999**, *38*, 122. (b) Golicnik, M.; Stojan, J. *Biochim Biophys Acta* **2002**, *1597*, 164.



**Figure 4 : Représentation du chemin d'accès d'entrée du substrat (bleu) par la gorge et de sortie du produit (vert) par la porte de sortie annexe<sup>23</sup>**

Cependant, aucune preuve formelle n'a été apportée au sujet de l'importante flexibilité de l'enzyme autour de la gorge ou de l'existence de cette porte de sortie annexe pour la choline. Certaines études semblent même montrer que seules des molécules d'eau passeraient par cette porte.<sup>24</sup> Elle ne semble en tout cas pas jouer un rôle essentiel dans la libération des produits d'hydrolyse.

Ces études montrent que nous ne comprenons pas encore tout au fonctionnement de l'AChE.

<sup>23</sup> Colletier, J. P., Bourgeois, D.; Sanson, B.; Fournier, D.; Sussman, J. L.; Silman, I.; Weik, M. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2008**, *105*, 11742.

<sup>24</sup> (a) Koellner, G.; Kryger, G.; Millard, C. B.; Silman, I.; Sussman, J. L.; Steiner, T. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 713. (b) Nachon, F.; Stojan, J.; Fournier, D. *FEBS J.* **2008**, *275*, 2659. (c) Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10572

### I.3. Mécanisme d'hydrolyse

Intéressons nous maintenant d'un peu plus près à l'aspect mécanistique de l'hydrolyse de l'ACh par l'AChE. Celle-ci se déroule en deux étapes représentées sur la figure 5.

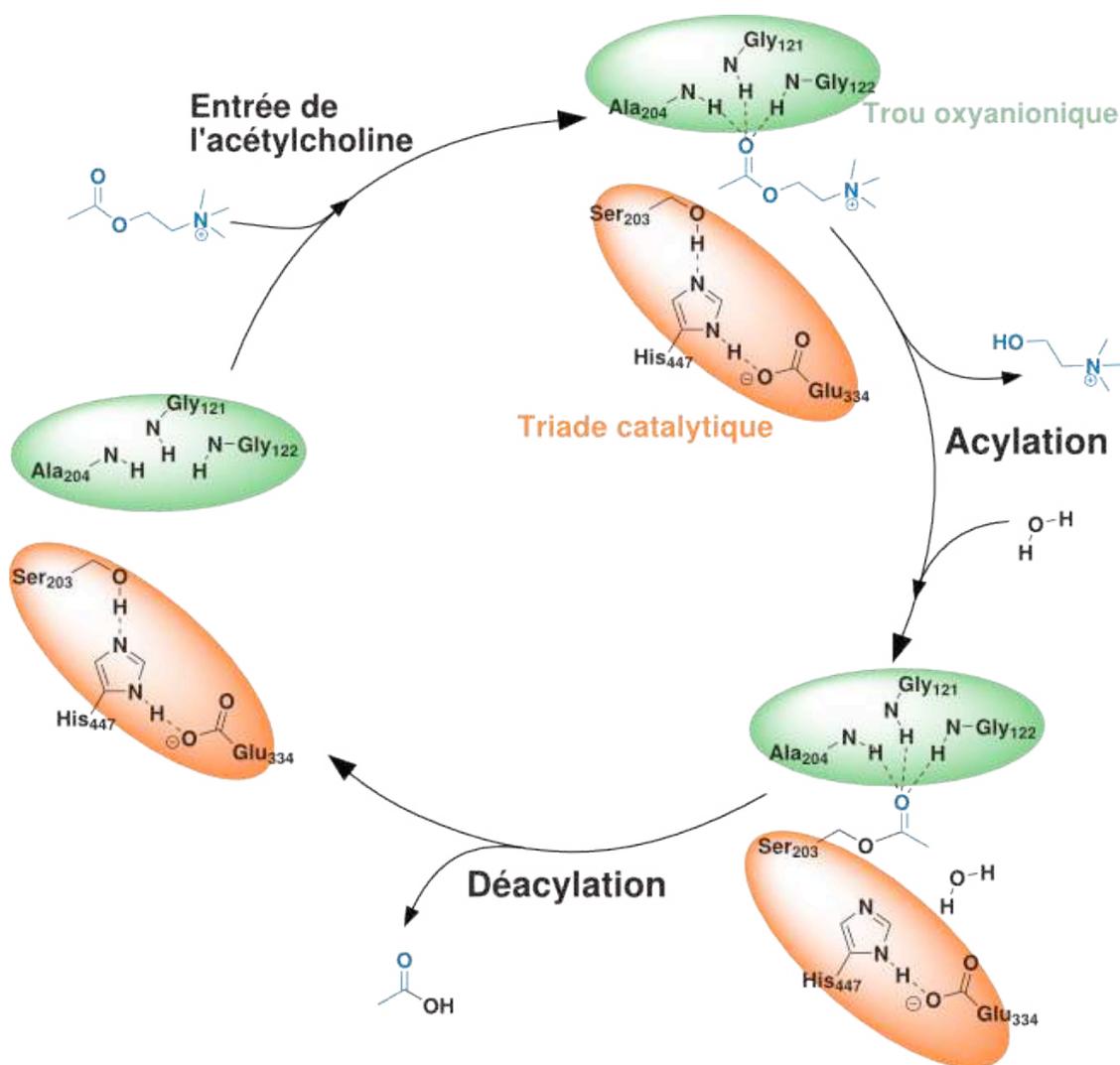
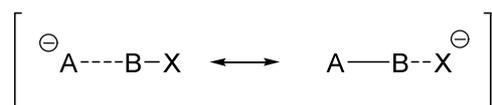


Figure 5 : Cycle catalytique de l'hydrolyse de l'Acétylcholine

Une fois l'acétylcholine stabilisée dans le site actif, une étape d'acylation a lieu par un mécanisme d'addition élimination : addition de l'oxygène de la sérine sur le carbonyle de l'ACh, puis élimination de la choline. L'histidine de la triade catalytique permet le déplacement de cette étape vers la formation du complexe acyl-enzyme en captant le proton de la sérine 203. Ce proton va ensuite être capté par la choline qui quitte le site actif. Le complexe acyl-enzyme tétraédrique obtenu est stabilisé par le trou oxyanionique. Une molécule d'eau s'ajoute alors sur ce complexe, et l'acide acétique est éliminé : c'est l'étape de déacylation.

D'un point de vue cinétique, l'hydrolyse de l'ACh se fait très rapidement puisque le turnover de l'AChE varie de 10000 à 20000 molécules hydrolysées par seconde, et son efficacité catalytique ( $k_{cat}/K_m$ ) est d'environ  $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . L'étape cinétiquement déterminante de l'hydrolyse est la diffusion de l'acétylcholine vers le site actif.<sup>25</sup>

L'origine du pouvoir catalytique a été étudiée d'un point de vue théorique par Warshel et al.<sup>26</sup> Ils ont ainsi montré que la grande efficacité de cette enzyme provient de l'optimisation de la réaction chimique et non de la diffusion des résidus vers le site catalytique. Pour cela ils ont utilisé la méthode « Empirical Valence Bond » (EVB).<sup>27</sup> Cette méthode permet de traiter les effets de l'environnement sur la réaction chimique, et notamment de comparer la réaction dans l'eau et au sein du site actif d'une enzyme. La méthode EVB représente le système comme une superposition de structures limites ioniques et covalentes (Schéma 2).



**Schéma 2 : Superposition des formes limites ioniques et covalentes**

En effet, l'environnement chimique d'une réaction joue sur les interactions électrostatiques des structures limites ioniques et de cet environnement. Ainsi, l'énergie relative entre l'état ionique et l'état covalent est modifiée selon l'environnement.

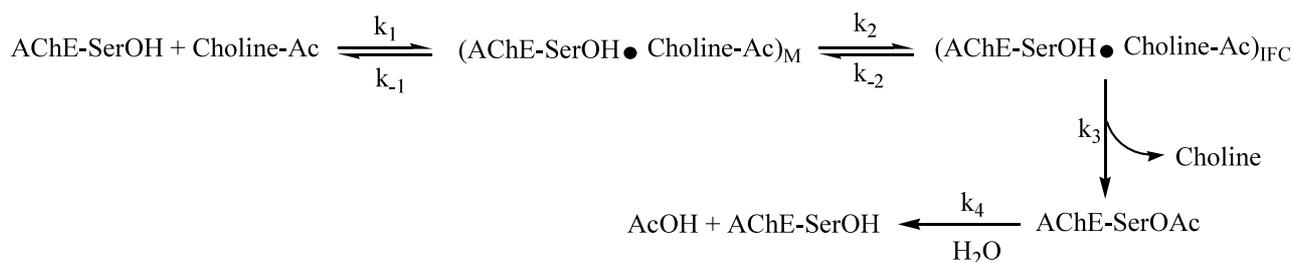
Le mécanisme d'hydrolyse de l'ACh peut être représenté par un modèle cinétique de Michaelis-Menten, comme celui proposé par Rosenberry dans les années 70 (Figure 6).<sup>28</sup> La première étape est la formation du complexe de Michaelis-Menten entre l'enzyme et le substrat (M). Puis un ajustement conformationnel (IFC) a lieu après la fixation du substrat mais avant la catalyse. Enfin, les deux étapes de la catalyse se produisent : formation du complexe acyl-enzyme et déacylation de ce complexe.

<sup>25</sup> Colletier, J.-P.; Weik, M. *Ann. Pharm. Fr* **2007**, *65*, 108.

<sup>26</sup> Fuxreiter, M.; Warshel, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 183.

<sup>27</sup> (a) Warshel, A.; Weiss, R.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6218. (b) Aqvist, J.; Warshel, A. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2523.

<sup>28</sup> Rosenberry, T. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, *72*, 3834.



**Figure 6 : Modèle cinétique du mécanisme d'hydrolyse de l'acétylcholine proposé par Rosenberry (M : Complexe de Michaelis-Menten, IFC : Induced-Fit Complex)**

L'AChE a aussi été étudiée en chimie théorique. Le rôle de la triade catalytique et du trou oxyanionique ont ainsi été mis en évidence en Mécanique Quantique/Mécanique Moléculaire (QM/MM) par Mc Cammon et al.<sup>29</sup> Ils se sont intéressés à l'étape d'acylation afin de déterminer notamment le rôle du Glu334. Ils ont ainsi montré que le Glu334 participait à l'efficacité catalytique de l'enzyme en stabilisant l'état de transition par des interactions électrostatiques. Il n'y a pas de transfert de protons entre l'His447 et le Glu334. Le rôle du trou oxyanionique a également été confirmé par cette étude. La barrière énergétique obtenue (10.5 kcal/mol, MP2/6-31+G\*\*/HF/6-31G\*) est en accord avec les observations expérimentales.

La première étape a aussi été étudiée par Kim et al. sur un système modèle en Mécanique Quantique (QM).<sup>30</sup> Dans ce modèle, sont pris en compte la triade catalytique et le trou oxyanionique, l'acétylcholine est représentée par l'acétate d'éthyle. Les géométries des intermédiaires réactionnels et les barrières énergétiques ont été déterminées, et sont en accord avec les observations expérimentales (Figure 7). L'acylation se déroule en trois étapes :

- Addition de l'acétylcholine sur la sérine avec assistance de l'histidine (1R-1Int1)
- Rotation de la liaison NH de l'histidine, de la sérine vers l'acétylcholine (1Int1-1Int2)
- Elimination de la choline (1Int2-1P).

La première étape est endothermique avec une barrière d'environ 11 kcal/mol (1TS1). L'adduit formé entre la sérine et l'acétate d'éthyle est stabilisé par des liaisons hydrogènes établies avec le trou oxyanionique. La seconde étape est juste un réarrangement avec une barrière d'environ 1 kcal/mol. L'histidine établit alors une liaison hydrogène avec le groupement éthoxy de l'acétate d'éthyle. Enfin, l'éthanol est éliminé. Cette étape possède une barrière d'environ 4 kcal/mol et est exothermique (1TS2). L'étape cinétiquement déterminante de l'acylation est donc selon cette étude la fixation de l'acétylcholine sur la sérine. Le processus est globalement exothermique.

<sup>29</sup> Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10572.

<sup>30</sup> Manojkumar, T. K.; Cui, C.; Kim, K. *S. J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 606.

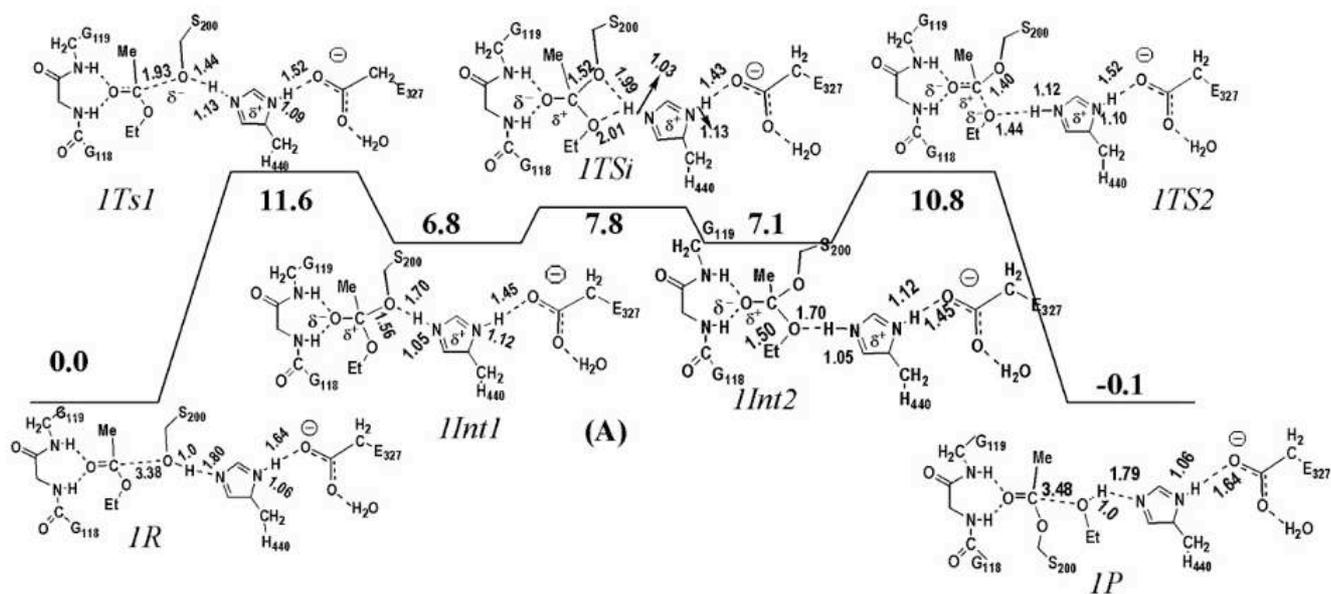


Figure 7 : Profil énergétique de l'acylation de l'AChE (B3LYP/6-31G\*, énergies en kcal/mol, distances en Å)

La déacylation a également été étudiée par la méthode EVB.<sup>31</sup> Les auteurs observent un profil énergétique cohérent avec l'expérience (Figure 8). La réaction de déacylation se déroule en deux étapes :

- Une première étape endothermique qui consiste en la déprotonation d'une molécule d'eau par l'histidine de la triade catalytique pour former le nucléophile
- Puis, le nucléophile réagit avec la fonction carbonyle de la sérine acétylée, ce qui conduit à la formation d'un intermédiaire tétravalent stabilisé par le trou oxyanionique.

Ils ont réalisé cette étude selon trois conditions : dans l'eau, dans l'enzyme sans la choline libérée lors de la première étape, et dans l'enzyme avec la choline. On remarque que la réaction se fait plus facilement dans l'enzyme que dans l'eau, notamment pour la seconde étape de la déacylation ( $E_a = +16.6$  kcal/mol dans l'eau vs  $E_a = +1.3$  kcal/mol dans l'enzyme avec la choline). Ceci correspond bien aux observations expérimentales. Cependant, leur processus global est très endothermique, même lorsque la réaction se fait dans l'enzyme (+10.4 kcal/mol dans l'enzyme avec la choline), ce qui semble montrer que cette méthode reste à améliorer pour décrire quantitativement des réactions enzymatiques.

Il faut noter qu'ils ont également modélisé cette réaction en une seule étape, la déprotonation et l'attaque du nucléophile se faisant simultanément. Dans ce cas, les barrières observées sont beaucoup plus élevées (environ 25 kcal/mol), ce qui souligne qu'il est plus favorable dans le cas de l'AChE de multiplier les étapes, plutôt que d'avoir une seule étape avec de multiples événements concertés.

<sup>31</sup> Vagedes, P.; Rabenstein, B.; Aqvist, J.; Marelis, J.; Knapp, E.-W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12254.

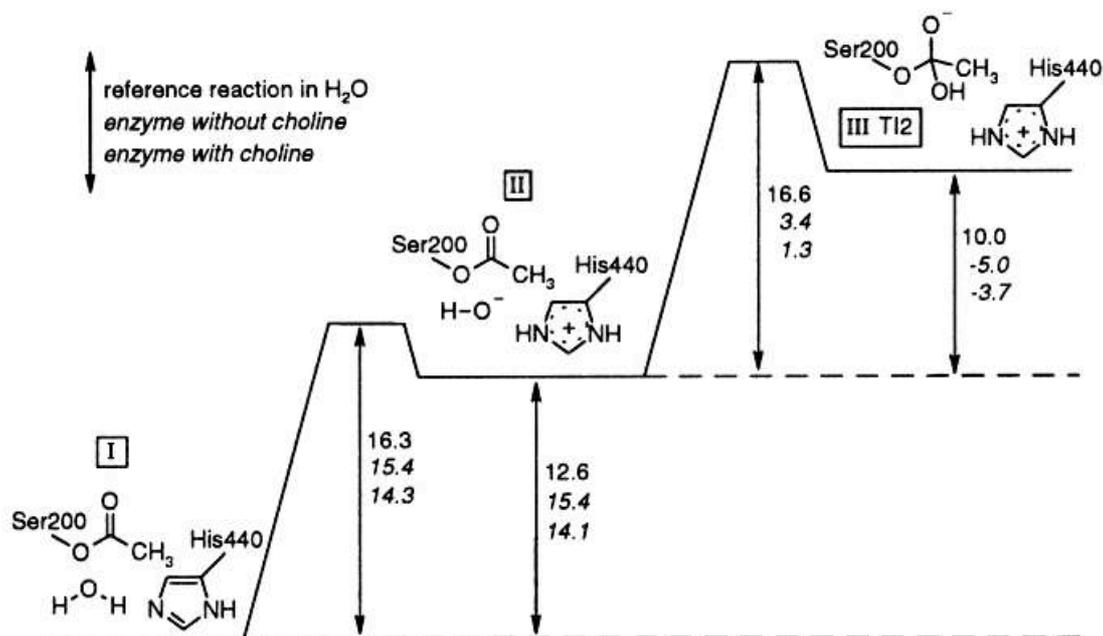


Figure 8 : Profil énergétique de la déacylation de l'AChE acétylée (énergies en kcal/mol)

Enfin, en 2008, Nemukhin et al. ont caractérisé le cycle complet de l'AChE en QM/MM.<sup>32</sup> Leurs résultats sont en accord avec les observations expérimentales, à savoir que l'étape de déacylation est plus lente que l'étape d'acylation. De même, ils ont montré le rôle du Glu202, proche de la triade catalytique, qui permet d'orienter la molécule d'eau pour la seconde étape. Nous reviendrons dans le second chapitre sur cette étude.

Ainsi, l'acétylcholinestérase est une enzyme fondamentale de par son rôle dans la transmission de l'influx nerveux. Elle a été très étudiée tant du point de vue de sa structure que de ses mécanismes d'action. Son site actif est au fond d'une gorge de 20 Å, et la triade catalytique est composée de la Ser203, de l'His447 et du Glu334. Elle hydrolyse l'acétylcholine en choline et en acide acétique en deux principales étapes : l'acylation et la déacylation. Chacune de ces étapes passent par un mécanisme d'addition-élimination. Ce mécanisme a beaucoup été étudié d'un point de vue théorique. De par son rôle dans la neurotransmission, si le fonctionnement de l'AChE est altéré, les dommages occasionnés sur l'organisme peuvent être très importants, comme nous allons le voir.

<sup>32</sup> Nemukhin, A. V.; Lushchekina, S.; Bochenkova, A. V.; Golubeva, A. A.; Varfolomeev, S. D. *J. Mol. Mod.* **2008**, *14*, 409.

## II. Dysfonctionnements de l'AChE

La neurotransmission par l'acétylcholine est un processus essentiel pour la survie, ce qui fait de l'acétylcholinestérase une enzyme majeure pour le fonctionnement de l'organisme. En effet, si celle-ci ne fonctionne plus, les neurones cholinergiques ne retrouvent jamais leur état de repos, et les muscles, épuisés, finissent par cesser de fonctionner. De la même façon, si elle fonctionne trop par rapport à la quantité d'acétylcholine dans la fente synaptique, l'influx nerveux n'est pas correctement transmis, ce qui crée une détérioration des fonctions cognitives et neuromusculaires, comme c'est le cas pour la maladie d'Alzheimer. Nous nous concentrerons dans notre exposé sur le dysfonctionnement de l'AChE dû à son inhibition, et donc à une accumulation d'acétylcholine dans la fente synaptique.

### II.1. Les organophosphorés

Les pesticides et les agents de guerre sont les deux principaux inhibiteurs de l'AChE. Les pesticides ayant cette action, tels que le malathion ou le méthylparathion, peuvent être des composés organosphosphorés ou des carbamates. Les agents de guerre, tels que le sarin ou le tabun, sont uniquement des composés organophosphorés.<sup>33</sup>

Les principaux symptômes dus à ces neurotoxiques sont des nausées, vomissements et vertiges. S'ensuit généralement une perte de conscience et des convulsions avant la paralysie du système respiratoire et ainsi la mort par asphyxie. Ils peuvent tuer en une quinzaine de minutes suivant la dose reçue.

Les organophosphorés sont des composés possédant un phosphoryl (P=O) ou un thiophosphoryl (P=S). Bien qu'aucune classification universelle de ces composés n'existe, Gupta a réparti les organophosphorés en 15 catégories, auxquelles on peut rajouter les cyanidates (Figure 9).<sup>34</sup> Les organophosphorés ont généralement au moins un substituant alkyl, et un groupe partant susceptible de subir une hydrolyse ou une substitution nucléophile.

---

<sup>33</sup> Moretto, A. *Toxicol. Lett.* **1998**, 102-103, 509.

<sup>34</sup> Gupta, R. C. In *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*; Gupta, R. C., ed., 1st ed., Elsevier Academic Press: London, 2006, pp. 5-24.

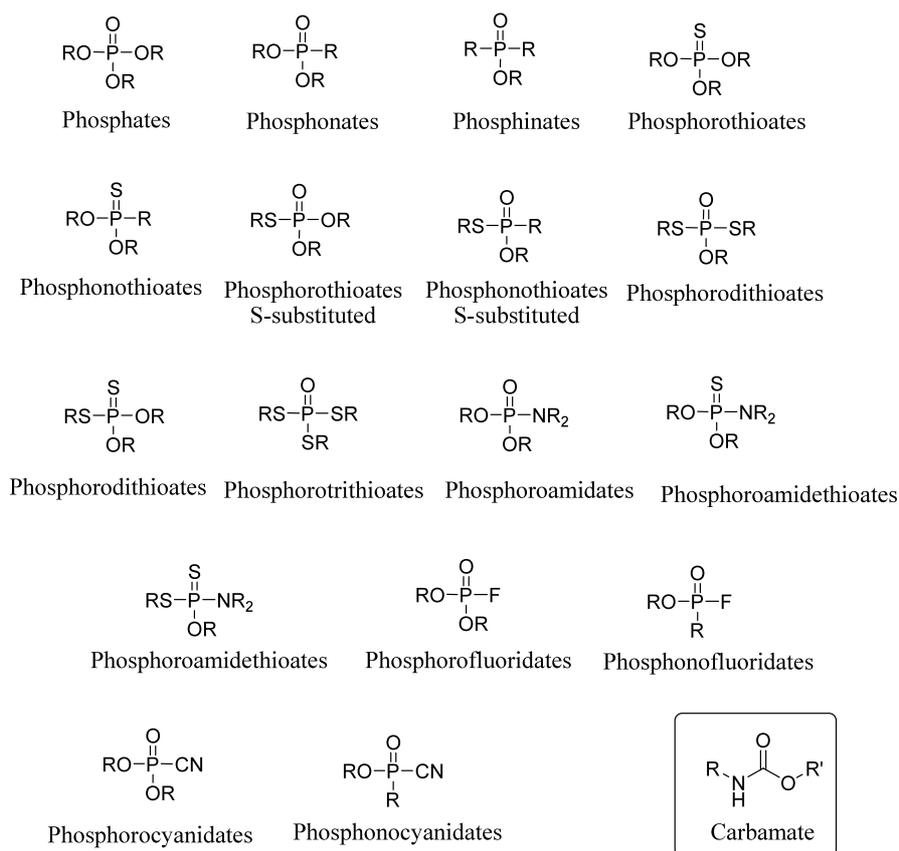


Figure 9 : Classification des organophosphorés selon Gupta et structure d'un carbamate

## II.2. Historique

En ce qui concerne les pesticides, les intoxications accidentelles ou les suicides constituent un problème de santé publique, particulièrement dans les pays du tiers monde. L'organisation mondiale de la santé dénombre chaque année plus de 3 millions d'empoisonnements aux pesticides, parmi lesquels quelques 220000 morts.<sup>35</sup>

Les effets toxiques des organophosphorés ont été découverts en 1932 pour les humains, et en 1937 pour les insectes. En 1940, il a été prouvé que l'inhibition de l'AChE était le mode d'action de ces organophosphorés.<sup>36</sup> Les organophosphorés utilisés comme insecticides sont bien moins puissants pour les hommes que ceux utilisés en tant qu'agents de guerre, car ils présentent une toxicité sélective vis-à-vis des insectes.<sup>37</sup> Ils doivent être efficaces à faible concentration, peu toxiques pour les mammifères, avoir une faible toxicité envers les plantes, et ne pas être trop chers. L'utilisation des organophosphorés comme insecticides a débuté dans les années 40, et ils ont été particulièrement employés entre 1960 et 1980. Du fait de leur toxicité, ils ont été petit à petit

<sup>35</sup> Sogorb, M. A.; Vilanova, E.; Carrera, V. *Toxicol. Lett.* **2004**, *151*, 219.

<sup>36</sup> Casida, J. E.; Quistad, G. B. *Chem.-Biol. Interact.* **2005**, *157-158*, 277.

<sup>37</sup> Casida, J. E.; Quistad, G. B. *J. Pestic. Sci.* **2004**, *29*, 81.

remplacés par des pesticides organochlorés.<sup>38</sup>

Les agents de guerre neurotoxiques, quant à eux, sont apparus en 1936 avec la synthèse du tabun par un chimiste allemand alors qu'IG Farben cherchait à synthétiser de nouveaux insecticides.<sup>39</sup> Le ministère de la défense allemand a compris le potentiel de ces neurotoxiques et a lancé un programme pour leur production industrielle en 1942. De façon assez surprenante, les neurotoxiques organophosphorés n'ont pas été utilisés durant la seconde guerre mondiale par les allemands, alors qu'ils possédaient une avance considérable sur les alliés, qui ne connaissaient pas le tabun, le sarin et le soman.<sup>40</sup> Les raisons de cette non utilisation ne sont toujours pas bien connues : certains pensent qu'A. Hitler n'a pas souhaité les utiliser car il a vu les dégâts causés par les agents de guerre tels que le gaz moutarde lors de la 1<sup>ère</sup> guerre mondiale. De façon plus prosaïque, d'autres estiment qu'il ne savait pas que les alliés ne possédaient pas les mêmes armes, et qu'il a eu peur des représailles si l'armée allemande venait à les utiliser.<sup>41</sup> Malheureusement, les travaux sur les organophosphorés n'ont pas cessé avec la guerre, et les anglais ont par exemple synthétisé le VX dans les années 50. Ces agents neurotoxiques sont facilement synthétisables, peu onéreux, facilement dispersés et difficiles à détecter, et bien sûr potentiellement très meurtriers,<sup>42</sup> ce qui en fait une arme de choix pour les terroristes. Par exemple, l'Irak a utilisé le sarin à l'encontre du village civil kurde de Birjinni en 1988.<sup>43</sup> Le sarin a également été utilisé pour les attaques terroristes de 1994 et 1995 perpétrées par la secte d'Aum Shirinkyô au Japon.<sup>44</sup> De nombreuses tentatives d'assassinat mettent également en cause le VX.<sup>45</sup>

Afin de prohiber l'utilisation des agents de guerre organophosphorés, les Nations Unies ont établi la Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC).<sup>46</sup> Cette convention interdit la mise au point, la fabrication, le stockage et l'usage des armes chimiques. Elle a été signée en 1993 par 143

<sup>38</sup> Santos, V. M. R.; Donnici, C. L.; DaCosta, J. B. N.; Caixeiro, J. M. R. *Quím. Nova*, **2007**, *30*, 159.

<sup>39</sup> Greenfield, R. A.; Brown, B. R.; Hutchins, J. B.; Iandolo, J. J.; Jackson, R.; Slater, L. N.; Bronze, M. S. *Am. J. Med. Sci.* **2002**, *323*, 326.

<sup>40</sup> Maynard, R. L. In *Chemical Warfare Agents-Toxicology and Treatment*; Marrs, T. C.; Maynard, R. L.; Sidell, F. R., eds., 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, 2007, pp. 1-20.

<sup>41</sup> Toy, R. J. T. In *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare - Textbook of Military Medicine*; Sidell, F. R.; Takafuji, E. T.; Franz, D. R., eds., Office of the Surgeon General, US Army: Washington D.C., 1997, pp. 87-109.

<sup>42</sup> Cannard, K. *J. Neurol. Sci.* **2006**, *249*, 86.

<sup>43</sup> (a) *UN Report S/16433*; United Nations: New York, NY, 1984. (b) *UN Report S/117911*; United Nations: New York, NY, 1986. (c) MacIlwain, C. *Nature* **1993**, *363*, 3.

<sup>44</sup> (a) Nagao, M.; Takatori, T.; Matsuda, Y.; Nakajima, M.; Iwase, H.; Iwadate, K. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1997**, *144*, 198. (b) Yanagisawa, N.; Morita, H. *J. Neurol. Sci.* **2005**, *238*, S8. (c) Yanagisawa, N.; Morita, H.; Nakajima, T. *J. Neurol. Sci.* **2006**, *249*, 76. (d) Yokoyama, K. *Neurotoxicology* **2007**, *28*, 364. (e) Suzuki, T.; Morita, H.; Ono, K.; Maekawa, K.; Nagai, R.; Yazaki, Y. *Lancet* **1995**, *345*, 980.

<sup>45</sup> Nozaki, H.; Aikawa, N.; Fujishima, S.; Suzuki, M.; Shinozawa, Y.; Hori, S.; Nogawa, S. *Lancet* **1995**, *346*, 698.

<sup>46</sup> OPCW: <http://www.opcw.nl/factsandfigures/index.html#participation>, accessed in September 2008.

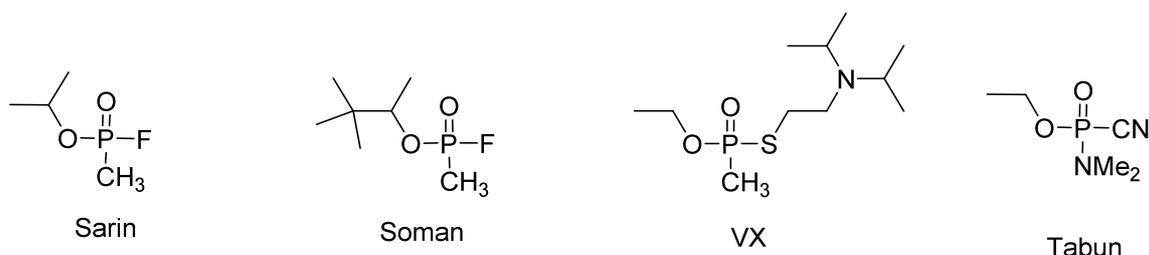
états et est entrée en vigueur en 1997. Aujourd'hui elle est ratifiée par 181 pays. Seuls l'Angola, l'Égypte, l'Iraq, le Liban, la Syrie, la Corée du Nord et la Somalie n'ont pas adhéré à cette convention. C'est l'un des plus grands succès en matière de désarmement mais la menace terroriste persiste.

<b>Date</b>	<b>Fait historique</b>
<b>1936</b>	Le chimiste allemand G. Schrader synthétise le tabun
<b>1937</b>	Schrader et ses collaborateurs synthétisent le sarin
<b>1942</b>	L'Allemagne lance la production industrielle des gaz de combat à Dyhenfurth
<b>1944</b>	Le chimiste allemand R. Kuhn synthétise le soman
<b>1950's</b>	Le VX est synthétisé par les anglais et utilisé à des fins militaires par les USA
<b>1984-6</b>	L'utilisation d'agents de guerre chimiques par l'Irak dans la guerre contre l'Iran est confirmée
<b>1988</b>	L'utilisation d'armes chimiques par l'Irak dans la répression des populations kurdes est confirmée
<b>1993</b>	La Convention sur l'Interdiction des Armes Chimiques (CIAC) est signée par les états membres des Nations Unies
<b>1994</b>	La secte Aum Shinrikyo utilise le sarin à Matsumoto, Japon, tuant 7 personnes et en blessant plus de 300
<b>1994/5</b>	Des tentatives d'assassinat au VX sont perpétrées à Osaka, Japon, par la secte Aum Shirinkyo – Une personne décède
<b>1995</b>	La secte Aum Shirinkyo utilise le sarin dans le métro japonais à Tokyo, causant la mort de 12 personnes et des milliers de blessés
<b>1997</b>	La CIAC entre en vigueur

**Tableau 1 : Historique des agents de guerre organophosphorés**

### **II.3. Structure et activité des principaux organophosphorés**

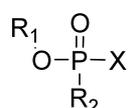
D'un point de vue structural, les principaux agents neurotoxiques sont des phosphonofluoridates ou thiolates (Sarin, Soman, VX). Le tabun est quant à lui un phosphonocyanidate dont le phosphore est substitué par une amine tertiaire (Schéma 3). Il est d'ores et déjà remarquable que d'un point de vue structural, le tabun est tout à fait à part des autres agents neurotoxiques.



**Schéma 3 : Structures des principaux agents de guerre neurotoxiques**

Tous ces composés sont très actifs, comme on peut le voir dans le tableau 2 qui présente leurs constantes d'inhibition.

Les différents neurotoxiques y sont représentés de la façon suivante :



La constante d'inhibition, notée  $k_i$ , est déterminée au pseudo premier ordre telle que :

$$k_i = \frac{1}{[OP] \times t} \ln\left(\frac{v_0}{v_t}\right)$$

Avec [OP] la concentration initiale en organophosphoré,  $v_0$  et  $v_t$  les vitesses de réaction au temps 0 et au temps t respectivement. Plus  $k_i$  est grande, plus l'inhibition est forte.

On peut ainsi remarquer que le tabun n'est pas l'inhibiteur de l'AChE le plus efficace.

OP	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X	k <sub>i</sub> (M <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
Sarin	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	F	2.7 ± 0.1 x 10 <sup>7</sup>
Soman	CH(CH <sub>3</sub> )C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	F	9.2 ± 0.4 x 10 <sup>7</sup>
VX	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	SC <sub>2</sub> H <sub>4</sub> N(CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	1.2 ± 0.002 x 10 <sup>8</sup>
Tabun	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CN	7.4 ± 0.2 x 10 <sup>6</sup>

**Tableau 2 : Constantes d'inhibition des principaux organophosphorés**

Le mécanisme d'inhibition, quant à lui, est une addition-élimination, avec formation d'un intermédiaire pentavalent (Schéma 4). Une liaison covalente est formée entre le phosphore de l'agent toxique et l'oxygène de la Ser203. L'enzyme phosphorylée est stable, et ne peut donc plus fonctionner.<sup>47</sup>

Ce mécanisme a été prouvé grâce à des études théoriques sur la fixation du sarin dans l'AChE effectuées par Leszczynski et al. Selon cette étude, la première étape (fixation du sarin) est l'étape

<sup>47</sup> (a) MacPhee-Quigley, K.; Taylor, P; Taylor, S. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 12185. (b) Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2237.

cinétiquement déterminante.<sup>48</sup> La structure de l'AChE inhibée par des organophosphorés a été déterminée par diffraction des RX, et notamment celle de l'AChE inhibée par le tabun.<sup>49</sup>

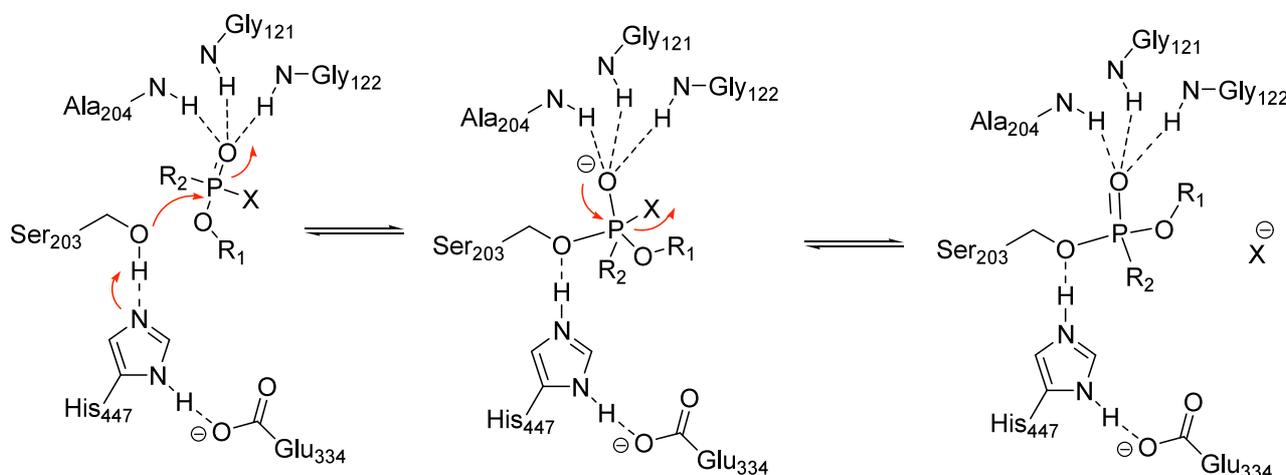


Schéma 4 : Mécanisme d'inhibition de l'AChE par un organophosphoré

Plusieurs études cinétiques ont été menées sur ce mécanisme, et notamment sur les différences d'activité entre les isomères de chacun des organophosphorés précédents.

Dans le cas du sarin, les deux énantiomères n'inhibent pas l'AChE de la même façon : il a été montré que le (*S*)-sarin est beaucoup plus actif que le (*R*)-sarin (Schéma 5).<sup>50</sup>

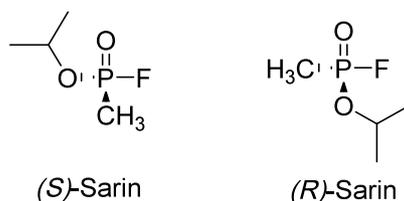


Schéma 5 : Isomères du sarin

Pour le soman le problème est plus complexe puisqu'il possède quatre diastéréoisomères (Schéma 6). De la même façon que pour le sarin, il a été montré que l'isomère le plus actif est le (*S,S*)-soman.

<sup>48</sup> (a) Wang, J.; Gu, J.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 7567. (b) Wang, J.; Gu, J.; Leszczynski, J. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 3485.

<sup>49</sup> Ekström, F.; Akfur, C.; Tunemalm, A.-K.; Lundberg, S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 74.

<sup>50</sup> Spruit, H.E.T.; Langenberg, J. P.; Trap, H. C.; van der Wiel, H. J.; Helmich, R. B.; Van Helden, H. P. M.; Benschop, H. P. *Toxicol. and appl. pharmacol.* **2000**, *169*, 249.

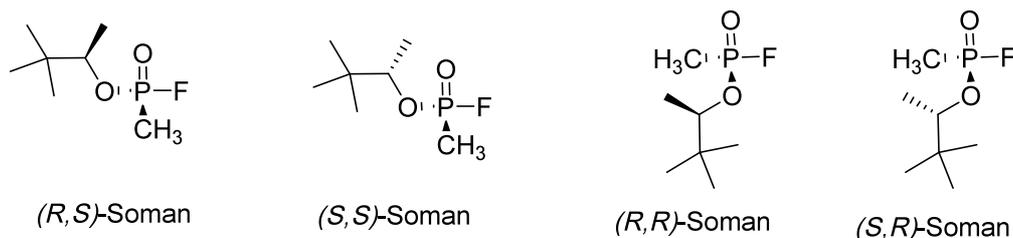


Schéma 6 : Isomères du soman

Les deux énantiomères du tabun ont également été testés par Benschop en 1986.<sup>51</sup> L'un de ses énantiomères est 6.3 fois plus actif. Il s'agit du (-)-tabun. Cependant, la configuration absolue associée au composé lévogyre n'a jamais été déterminée. Récemment, Worek et al. ont rapporté qu'en fait la différence d'activité entre les énantiomères du tabun serait plus importante que celle mesurée par Benschop puisque l'isomère lévogyre serait environ 300 fois plus actif que le dextrogyre (Schéma 7).<sup>52</sup>

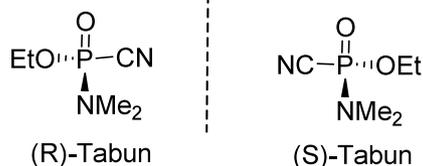


Schéma 7 : Isomères du tabun

Les constantes d'inhibition de ces différents organophosphorés sont résumées dans le tableau 3.<sup>53</sup> La dose létale 50, notée LD50, représente la masse nécessaire d'organophosphoré pour tuer 50% de la population testée. C'est donc un indicateur quantitatif de la toxicité de ces organophosphorés.

<sup>51</sup> Degenhardt, C. E. A. M.; Van Den Berg, G. R.; De Jong, L. P. A.; Benschop, H. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 8291.

<sup>52</sup> Tenberken, O.; Thiermann, H.; Worek, F.; Reiter, G. *Toxicol. Lett.* **2010**, *195*, 142.

<sup>53</sup> Benschop, H. P.; De Jong, L. P. A. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 368.

Stéréoisomères des agents de guerre	Constante d'inhibition de l'AChE (mol.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	LD <sub>50</sub> (chez la souris) en µg/kg
C(+)-P(-)-Soman	2.8 x 10 <sup>8</sup>	99 (sc)
C(-)-P(-)-Soman	1.8 x 10 <sup>8</sup>	38 (sc)
C(+)-P(+)-Soman	< 5 x 10 <sup>3</sup>	> 5000 (sc)
C(-)-P(+)-Soman	< 5 x 10 <sup>3</sup>	>2000 (sc)
C(±)-P(±)-Soman	Non disponible	156 (sc)
(-)-Sarin	1.4 x 10 <sup>7</sup>	41 (iv)
(+)-Sarin	< 3 x 10 <sup>3</sup>	Non disponible
(±)-Sarin	Non disponible	83 (iv)
(-)-Tabun	2.3 x 10 <sup>6</sup>	119 (iv)
(+)-Tabun	3.7 x 10 <sup>5</sup>	837 (iv)
(±)-Tabun	Non disponible	208 (iv)
(-)-VX	4 x 10 <sup>8</sup>	12.6 (iv)
(+)-VX	2 x 10 <sup>6</sup>	165 (iv)
(±)-VX	Non disponible	20.1 (iv)

**Tableau 3 : Constantes d'inhibition des isomères de différents organophosphorés (sc : sous-cutané, iv : intraveineuse)**

Une fois le phosphore fixé à l'oxygène de la sérine, deux phénomènes peuvent avoir lieu :

- Une hydrolyse spontanée de l'enzyme phosphorylée restaurant l'enzyme native. Cependant, cette réaction est généralement trop lente pour être vraiment considérée. Cette réactivation peut être accélérée par l'emploi de nucléophiles adéquats comme nous le verrons par la suite.
- Une hydrolyse appelée vieillissement. Il s'agit en général de l'hydrolyse du groupement oxygéné de l'organophosphoré, qui conduit à un complexe neurotoxique-AChE encore plus stable (Schéma 8). L'hydrolyse spontanée ne peut plus avoir lieu une fois que le complexe organophosphoré-enzyme est vieilli.

Le vieillissement est plus ou moins rapide selon les organophosphorés : il suffit de deux minutes pour le soman, alors que plusieurs heures sont nécessaires dans le cas du sarin (3 h) et du tabun (19 h).<sup>54</sup> L'AChE phosphorylée vieillie a été caractérisée avec plusieurs organophosphorés par diffraction des RX<sup>55</sup>, y compris avec le tabun.

<sup>54</sup> Worek, F.; Koller, M.; Thiermann, H.; Szinicz, L. *Toxicology* **2005**, *214*, 182.

<sup>55</sup> Millard, C. B.; Kryger, G.; Ordentlich, A.; Greenblatt, H. M.; Harel, M.; Raves, M. L.; Segall, Y.; Barak, D.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7032.

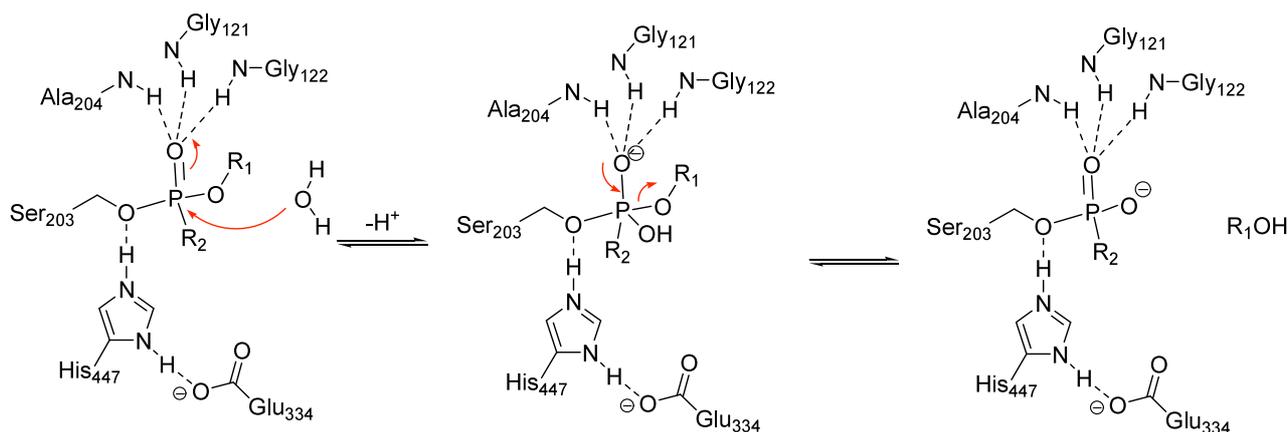


Schéma 8 : Mécanisme du vieillissement du complexe AChE-organophosphoré

L'AChE phosphorylée vieillie ne peut plus être réactivée, notamment du fait de la charge négative de l'oxygène qui gêne l'attaque d'un nucléophile susceptible de régénérer l'enzyme libre.<sup>56</sup>

On peut également noter la présence de nombreuses interactions non covalentes qui stabilisent encore plus le complexe vieilli telles que les interactions avec le trou oxyanionique, la poche acyle et l'histidine de la triade catalytique. Ces interactions limitent aussi la déphosphorylation en bloquant l'accès des nucléophiles au phosphore.<sup>57</sup> Il faut noter que dans le cas du tabun, la question du groupement hydrolysé lors du vieillissement s'est longtemps posée : y-a-t-il hydrolyse du groupement *N*-diméthyle ou éthoxy? Nachon et al. ont clôt le débat en prouvant grâce à la structure cristalline du complexe vieilli que le groupement éthoxy était hydrolysé.<sup>58</sup>

Ainsi, les agents de guerre neurotoxiques inhibent de façon irréversible l'AChE, ce qui provoque de graves dommages sur les organismes, voire la mort. L'inhibition de l'AChE passe par un mécanisme d'addition-élimination, et l'enzyme phosphorylée ainsi formée est très stable. Elle peut également subir une hydrolyse spontanée du groupement oxygéné de l'organophosphoré appelée vieillissement qui stabilise encore plus le complexe formé et ainsi rend encore plus difficile la restauration de l'activité de l'AChE.

Malgré la convention signée par la plupart des pays, la menace terroriste persiste. C'est pourquoi il est important de chercher des moyens de contrer les effets de ces organophosphorés et de réactiver

<sup>56</sup> (a) Bencsura, A.; Enyedy, I.; Kovach, I. M. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8989.

<sup>57</sup> (a) Ordentlich, A.; Kronman, C.; Barak, D.; Stein, D.; Ariel, N.; Marcus, D.; Velan, B.; Shafferman, A. *FEBS Lett.* **1993**, *334*, 215. (b) Qian, N.; Kovach, I. M. *FEBS Lett.* **1993**, *336*, 263. (c) Segall, Y.; Waysbort, D.; Barak, D.; Ariel, N.; Doctor, B. P.; Grunwald, J.; Ashani, Y. *Biochemistry* **1993**, *32*, 13441. (d) Shafferman, A.; Ordentlich, A.; Barak, D.; Stein, D.; Ariel, N.; Velan, B. *Biochem. J.* **1996**, *318*, 833. (e) Millard, C. B.; Kryger, G.; Ordentlich, A.; Greenblat, H. M.; Harel, M.; Raves, M. L.; Segall, Y.; Barak, D.; Shafferman, A.; Silman, I.; Sussman, J. L. *Biochemistry* **1999**, *38*, 7032.

<sup>58</sup> Carletti, E.; Li, H.; Li, B.; Ekström, F.; Nicolet, Y.; Loiodice, M.; Gillon, E.; Froment, M. T.; Lockridge, O.; Schopfer, L. W.; Masson, P.; Nachon, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16011.

l'AChE. Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, de tels moyens existent déjà, mais ils ne sont pas suffisamment performants, notamment en ce qui concerne le tabun.

### III. Réactivation de l'AChE inhibée

Comme dit précédemment, il arrive parfois qu'une hydrolyse spontanée de l'AChE phosphorylée se produise, mais celle-ci est extrêmement lente, et, par là même, inefficace. Il convient donc de trouver un moyen de restaurer l'activité de l'AChE rapidement en cas d'utilisation terroriste des organophosphorés.

#### III.1. Traitements utilisés

Pour régénérer l'enzyme libre, il faut rompre la liaison phosphore-oxygène de la sérine grâce à un nucléophile dont les propriétés physico-chimiques sont optimales pour pénétrer dans la gorge. Les oximes possédant un pyridinium conjugué remplissent ces conditions (Schéma 9).

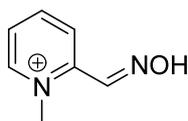


Schéma 9 : Structure de la pralidoxime ou 2-PAM, la plus simple des oximes susceptible de réactiver l'AChE phosphorylée

Les oximes sont de puissants nucléophiles grâce à l'effet  $\alpha$ . En effet, on observe que les atomes qui sont directement liés à un atome porteur d'une ou plusieurs paires d'électrons libres tendent à être des nucléophiles plus forts que ce que l'on pourrait attendre si ce n'était pas le cas. L'interaction des deux doublets libres des atomes d'azote et d'oxygène voisins augmente l'énergie de l'orbitale Haute Occupée de l'anion, et augmente ainsi la nucléophilie de la molécule.<sup>59</sup>

Le pyridinium permet aux oximes de pénétrer dans la gorge grâce aux interactions  $\pi$ -cation avec les résidus aromatiques, et leur pKa est aux alentours de 8, ce qui est le pKa idéal pour passer les barrières cellulaires et atteindre le site actif.<sup>60</sup> Cependant, les oximes seules ne suffisent pas. Elles sont en général couplées avec un antagoniste cholinergique tel que l'atropine qui, en s'opposant à l'effet de l'acétylcholine au niveau des muscles par exemple, les détend, et un anti convulsant tel que des benzodiazepines (Schéma 10).<sup>61</sup>

<sup>59</sup> Terrier, F.; Rodriguez-Dafont, P.; Le Guével, E.; Moutiers, G. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4352.

<sup>60</sup> Kenley, R.A.; Howd, R.A.; Mosher, C.W.; Winterle, J.S. *Journal of Medicinal Chemistry* **1981**, *10*, 1125.

<sup>61</sup> Antonijevic, B.; Stojiljkovic, M.P. *Clinical Medicine & Research* **2007**, *5*, 71.

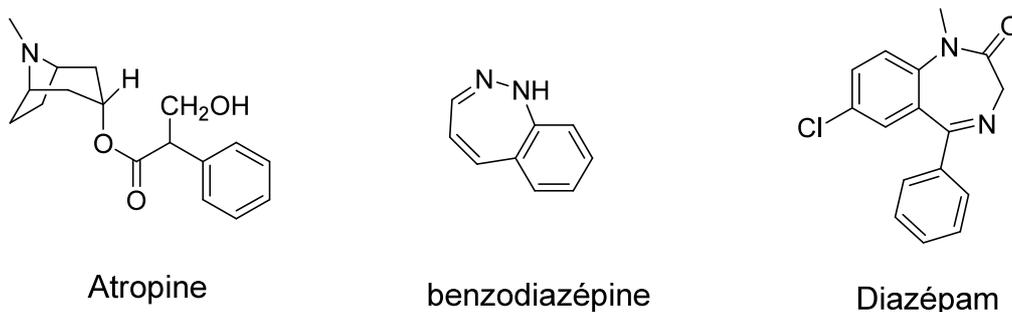


Schéma 10 : Structures de l'atropine, d'une benzodiazépine et du Diazépam

Le premier traitement développé contre les effets des organophosphorés a été l'atropine, isolée par Main en 1835, et utilisée pour la première fois contre des agents inhibiteurs de l'AChE en 1863. L'atropine reste la base du traitement contre les intoxications aux organophosphorés.<sup>55</sup> Cependant, des études ont montré après la seconde guerre mondiale que l'atropine seule était insuffisante dans le cas d'empoisonnement sévère aux organophosphorés.

L'anticonvulsant le plus utilisé est le diazépam.<sup>62</sup> La combinaison de l'atropine et du diazépam est plus efficace que l'atropine ou une oxime seule pour réduire la mortalité.<sup>63</sup> Sur les patients intoxiqués par des organophosphorés, le diazépam agit sur l'anxiété, l'agitation, la fasciculation musculaire, stoppe les convulsions, et réduit la morbidité et la mortalité lorsqu'il est associé à l'atropine et une oxime. Il peut être administré même une fois les convulsions apparues, mais il vaut mieux l'injecter avant ces symptômes.<sup>64</sup>

La première réactivation *in vitro* de l'AChE phosphorylée a été réalisée en 1951 avec l'hydroxylamine. A partir de là, pour développer des réactivateurs plus efficaces dans le cas d'empoisonnement aux organophosphorés, les recherches se sont orientées vers des structures proches de celle de l'acétylcholine, notamment des structures avec un ammonium quaternaire. De fait, la première oxime possédant un pyridinium, la pralidoxime ou 2-PAM, est environ un million de fois plus rapide que l'hydroxylamine pour réactiver l'AChE phosphorylée (Schéma 9). A partir de 1956, la 2-PAM a été utilisée en tant qu'antidote aux empoisonnements aux organophosphorés.<sup>65</sup> La synthèse de bispyridinium a ensuite été envisagée, notamment la trimédoxime (TMB-4), l'obidoxime (LüH-6), HI-6 et HLö-7 (Schéma 11). Elles ont été employées comme antidote à partir de 1957, 1964, 1967 et 1968 respectivement.

<sup>62</sup> Lipp, J.A. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* **1972**, 32, 557.

<sup>63</sup> McDonough, J.H. Jr; Jaax, N.K.; Crowley, R.A.; Mays, M.Z.; Modrow, H.E. *Fundam Appl Toxicol* **1989**, 13, 256.

<sup>64</sup> Marrs, T.C. *Toxicol. Rev.* **2003**, 22, 75.

<sup>65</sup> Namba, T.; Hiraki, K. *J Am Med Assoc* **1958**, 166, 1834.

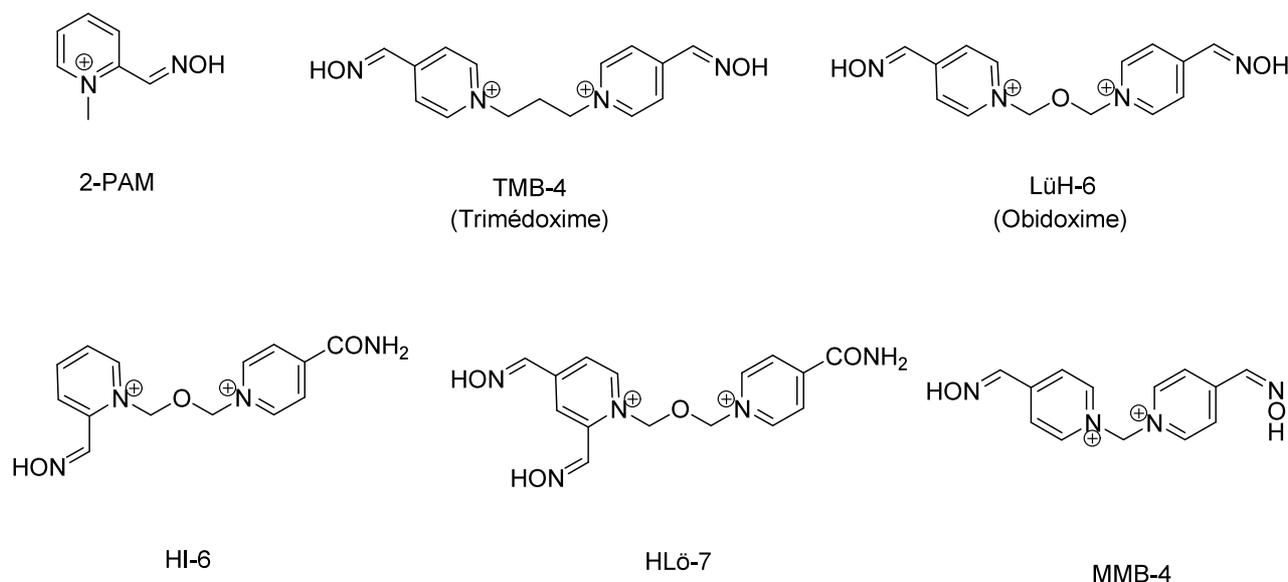


Schéma 11 : Structures des oximes les plus utilisées

La 2-PAM et la trimédoxime ont été synthétisées aux Etats-Unis,<sup>66</sup> LüH-6 en Allemagne. Celle-ci a été nommée ainsi en l'honneur des personnes qui l'ont synthétisée et introduite dans le monde médical, Lüttringhaus et Hagedorn. HI-6 a également été synthétisée par le groupe d'Hagedorn en Allemagne. La plus récente oxime ayant une activité intéressante synthétisée par le groupe d'Hagedorn est HLö-7, nommée ainsi en l'honneur de Hagedorn et Löffler.

### III.2. Etude de différentes oximes

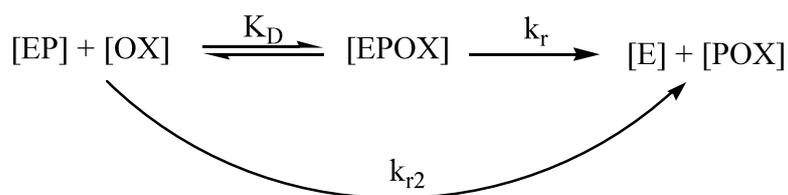
De nombreux efforts sont toujours menés afin d'améliorer les propriétés des mono et bis-pyridinium en modifiant leur structure ou en introduisant d'autres systèmes hétérocycliques comme des imidazoliums, pyridinium-imidazolium, etc.<sup>67</sup> De plus, des études expérimentales ont montré que par rapport à HLö-7 et HI-6, MMB-4 était un moins bon réactivateur de l'AChE inhibée par le sarin, le soman ou le VX.<sup>68</sup> De fait, en dépit de recherches intensives, les meilleures oximes du marché restent pour l'instant la 2-PAM, la trimédoxime, LüH-6, HI-6 et HLö-7.

Cependant, aucune oxime n'est universelle et efficace contre tous les organophosphorés. La réactivation par ces oximes de l'AChE inhibée par différents organophosphorés peut être mesurée en déterminant des constantes cinétiques selon le modèle présenté en figure 10.

<sup>66</sup> (a) Wilson, I.B.; Ginsburg, B. *Biochim. Biophys. Acta.* **1955**, *18*, 168. (b) Poziomek, E.J.; Hackley, B.E. Jr; Streinberg, G.M. *J Org Chem* **1958**, *23*, 714.

<sup>67</sup> (a) de Jong, L.P.; Wolring, G.Z. *Biochem. Pharmacol.* **1980**, *29*, 2379. (b) Kassa, J.; Cabal, J. *Toxicology* **1999**, *132*, 111.

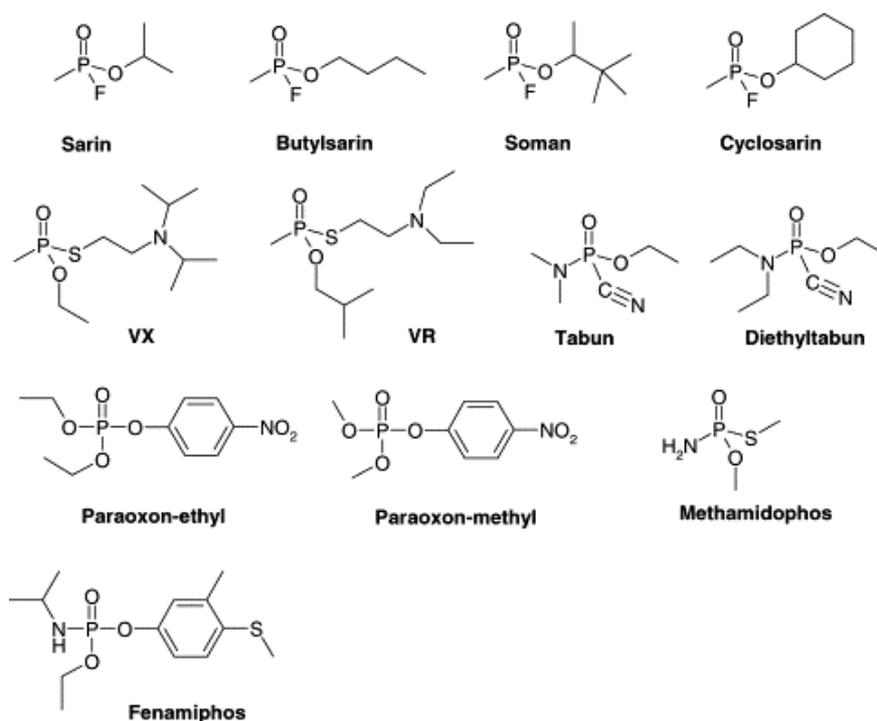
<sup>68</sup> (a) Aurbek, N.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P.; Worek, F. *Toxicology* **2006**, *224*, 91. (b) Bartling, A.; Worek, F.; Szinicz, L.; Thiermann, H. *Toxicology* **2007**, *233*, 166.



**Figure 10 : Modèle cinétique de la réactivation de l'AChE phosphorylée**

[EP] représente l'AChE phosphorylée, [OX] l'oxime, [EPOX] le complexe de Michaelis-Menten AChE phosphorylée – Oxime, [E] l'enzyme libre et [POX] l'oxime phosphorylée.  $K_D$  représente la constante de dissociation et  $k_r$  la constante cinétique du déplacement de la partie phosphorylée du complexe [EPOX] par l'oxime.

Les inhibiteurs étudiés par Worek et al. sont présentés sur le schéma 12, et les résultats obtenus sur la figure 11.



**Schéma 12 : Structures des organophosphorés testés dans l'étude de Worek et al.<sup>64</sup>**

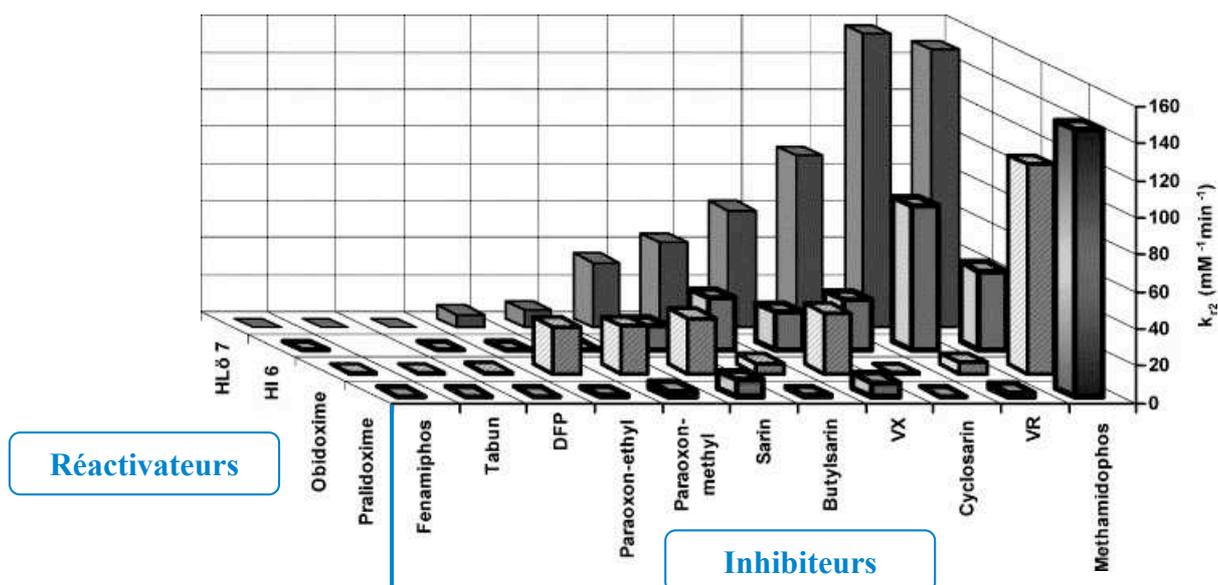


Figure 11 : Constante cinétique du second ordre  $k_{r2}$  ( $\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ ) pour la réactivation par des oximes de l'AChE inhibée par des OP<sup>69</sup>

D'un point de vue général, on peut noter que l'AChE phosphonylée, ou diméthyl-diéthylphosphorylée est réactive par rapport aux oximes, alors que l'AChE diisopropylée, inhibée par le tabun et le fénamiphos est plutôt résistante à la réactivation. Egalement, HLö-7 et l'obidoxime sont les plus efficaces vis-à-vis du plus grand nombre d'inhibiteurs.

Les différentes réactivités des oximes peuvent être expliquées de plusieurs façons, la première étant leur pKa. En effet, comme la forme active est la forme oximate, plus le pKa de l'oxime est bas, plus celle-ci est censée être réactive. Cette règle est vérifiée dans le cas de la pralidoxime (pKa=7.68), HI-6 (pKa=7.28) et HLö-7 (pKa=7.04). Cependant, l'obidoxime et TMB-4 ont des pKa plus élevés de 7.9 et 8.2 respectivement, alors qu'ils sont plus efficaces que la pralidoxime par exemple. Ceci semble contredire l'hypothèse précédente, et surtout montre qu'il faut également prendre en compte l'acidité du proton en  $\alpha$  de l'azote de l'oxime.

Les données de la figure 11 nous montrent également bien que le tabun est l'un des organosphorés les plus difficiles à réactiver, ce qui en fait l'un des neurotoxiques les plus puissants. Comme nous l'avons déjà souligné, le tabun a une structure un peu particulière puisque son groupe partant est un cyanure, et surtout le phosphore porte une amine tertiaire. La difficulté à réactiver l'AChE inhibée par le tabun est de ce fait en général expliquée par la présence du doublet libre de l'azote qui peut se délocaliser sur le phosphore, le rendant plus électro-négatif et donc moins sensible à une substitution nucléophile.

De nouvelles oximes sont actuellement en cours de développement, par exemple des bis-pyridinium

<sup>69</sup> Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; Eyer, P. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2237.

qui diffèrent notamment par le lien entre les deux cycles aromatiques.<sup>70</sup> Ces composés présentent des activités intéressantes pour certains organophosphorés. Quelques exemples sont donnés sur le schéma 13.

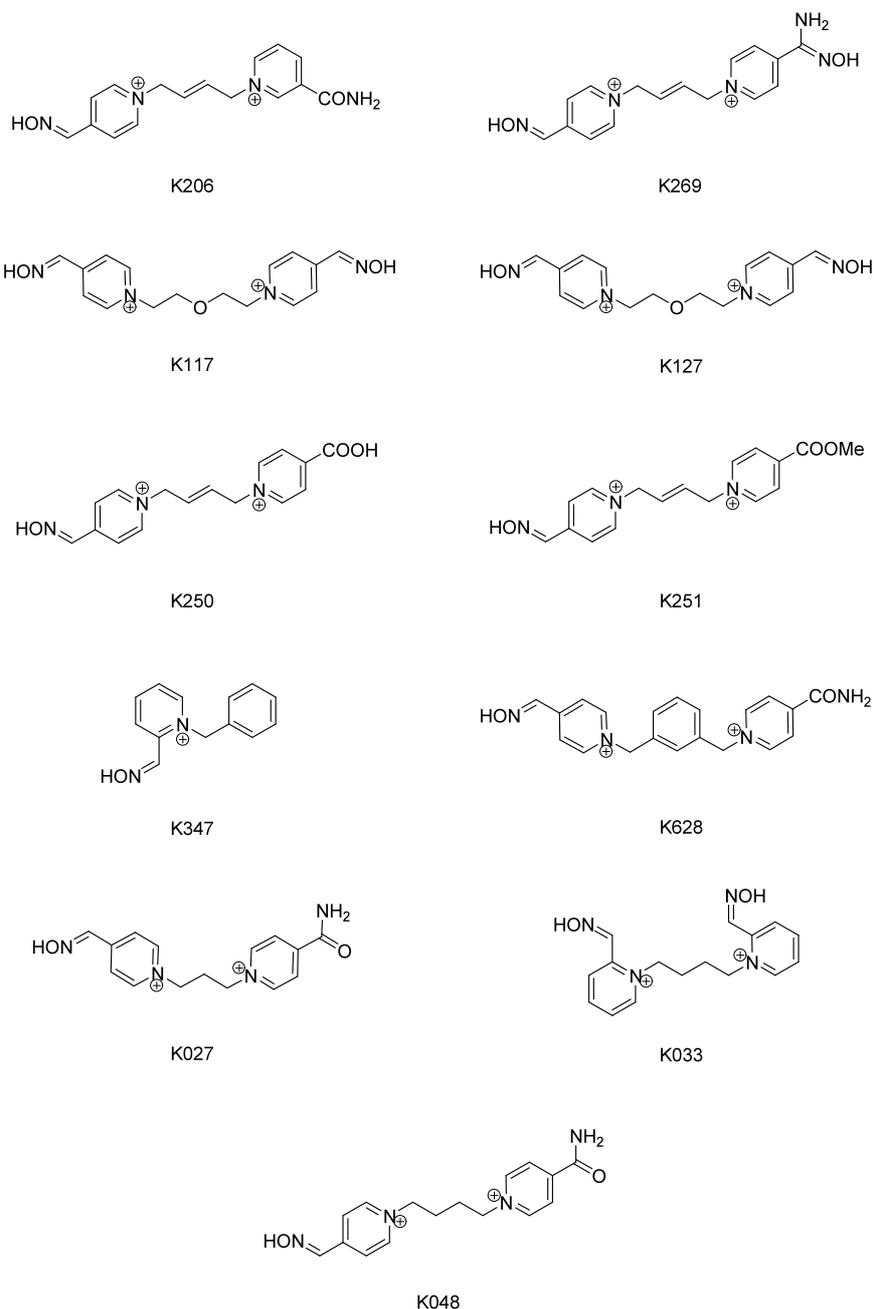


Schéma 13 : Structures de nouveaux réactivateurs

<sup>70</sup> Maxwell, D. M.; Koplovitz, I.; Worek, F.; Sweeney, R. E. *Toxicol. And Applied Pharmacol.* **2008**, *231*, 157. (b) Acharya, J.; Gupta, A. K.; Mazumder, A.; Dubey, D. K. *Toxicology in vitro* **2008**, *22*, 525. (c) Musilek, K.; Holas, O.; Kuca, K.; Jun, D.; Dohnal, V.; Opletalova, V.; Dolezal, M. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2008**, *23*, 70. (d) Kassa, J.; Jun, D.; Karasova, J.; Bajgar, J.; Kuca, K. *Chemico-Biological interactions* **2008**, *175*, 425. (e) Kovarik, Z.; Calic, M.; Sinko, G.; Bosak, A.; Berend, S.; Vrdoljak, A. L.; raic, B. *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *175*, 173. (f) Kassa, J.; Karasova, J.; Musilek, K.; Kuca, K. *Toxicology* **2008**, *243*, 311. (g) Kassa, J.; Karasova, J.; Musilek, K.; Kuca, K.; Jung, Y-S. *Drug and Chemical Toxicology* **2008**, *31*, 371. (h) Calic, M.; Vrdoljak, A. L.; Radic, B.; Jelic, D.; Jun, D.; Kuca, K.; Kovarik, Z. *Toxicology* **2006**, *219*, 85.

Les activités de ces différents réactivateurs sur l'AChE inhibée par le tabun sont présentées sur la figure 12.

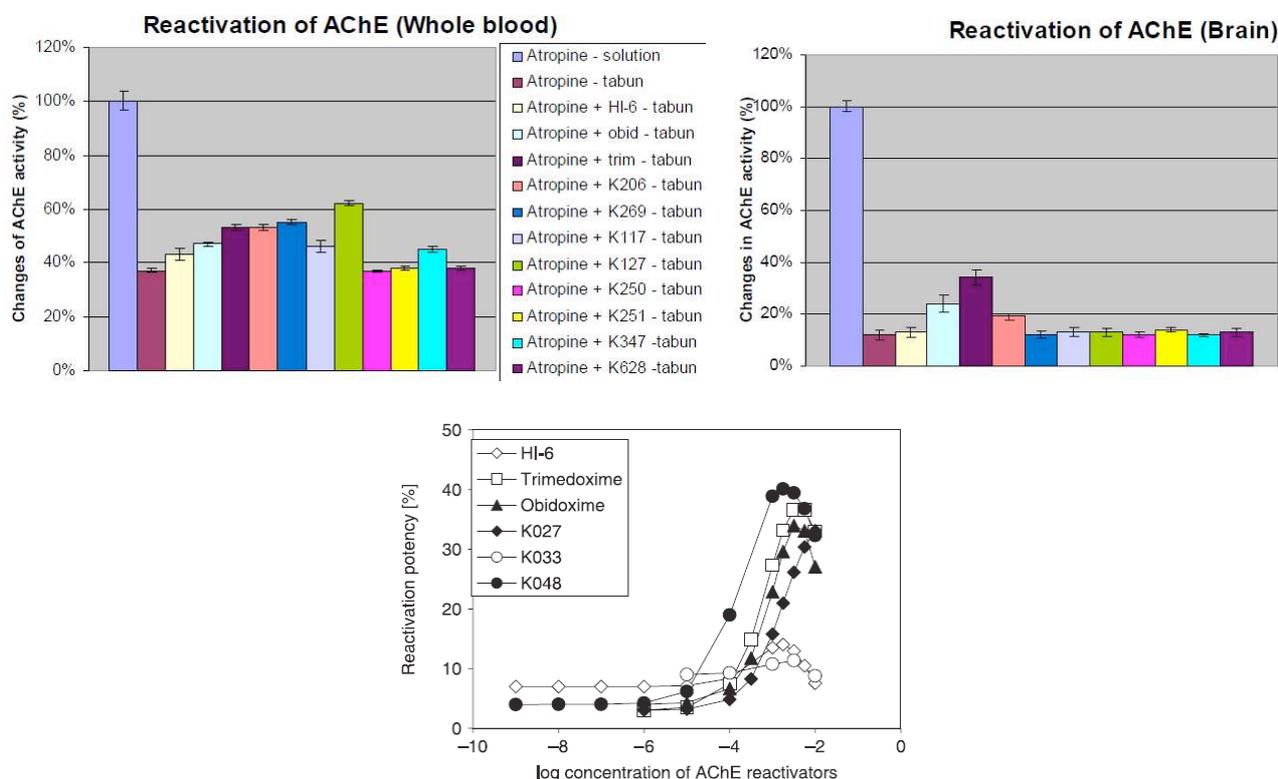


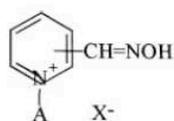
Figure 12 : Pourcentage de réactivation de différents oximes sur l'AChE inhibée par le tabun<sup>71</sup>

Les deux premiers histogrammes représentent le changement d'activité de l'AChE en présence de différents réactivateurs dans le sang et dans le cerveau. Le premier échantillon correspond à l'AChE en présence d'atropine. Il s'agit de l'échantillon témoin pour lequel l'activité de l'AChE est bien de 100%. Le deuxième échantillon correspond à l'AChE en présence d'atropine et de tabun (1 x LD50, administration intramusculaire). Dans ce cas, l'activité de l'AChE chute à moins de 40% dans le sang et à environ 10% dans le cerveau. Lorsque les réactivateurs sont injectés à raison de 5% de leur LD50, il faut qu'ils améliorent au maximum l'activité résiduelle de l'AChE en présence de tabun. Cependant les diagrammes nous montrent que quel que soit le réactivateur, l'activité de l'AChE n'est jamais complètement restaurée et même elle est très peu augmentée par rapport à l'AChE inhibée sans réactivateur, puisque l'activité de l'AChE ne dépasse pas 60% dans le sang et 40% dans le cerveau. La plupart des oximes nouvellement synthétisées ne sont pas plus efficaces que celle actuellement utilisée, à savoir l'obidoxime. Seules la trimedoxime (sang et cerveau) et K127 (sang) sont partiellement efficaces. Les autres sont soit pas du tout, soit trop peu efficaces dans le cas d'une intoxication au tabun.

<sup>71</sup> (a) Karasova, J.; Kassa, J.; Jung, Y-S.; Musilek, K.; Pohanka, M.; Kuca, K. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 2243. (b) Kuca, K.; Cabal, J.; Musilova, L. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2007**, *101*, 25.

Le troisième graphique représente la réactivation de l'AChE du cerveau inhibée en fonction de la concentration en réactivateur pour HI-6, l'obidoxime, la trimédoxime, K027, K033 et K048. Elle a été inhibée pendant 30 min par du tabun pour atteindre 95% d'inhibition et ensuite été incubée pendant 10 min avec l'oxime. La meilleure réactivation à la plus basse concentration est atteinte pour K048. L'obidoxime, la trimédoxime et K027 montrent une activité intéressante mais à des concentrations trop élevées pour être utilisables. K048 est donc prometteur en tant que réactivateur. Ces résultats mettent en évidence que les meilleurs réactivateurs bispyridinium sont ceux avec l'oxime en position 4 du pyridinium (HI-6, K033 vs K027, K048, trimédoxime, obidoxime). La deuxième fonction oxime n'est pas forcément nécessaire (K048).

Des études systématiques sur la nature du lien entre les cycles pyridinium et sur la position et le nombre de fonctions oximes ont également été menées. Leur activité par rapport au complexe AChE-tabun est présentée sur les figures 13 et 14.



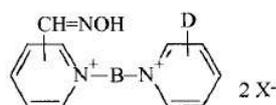
No.	Code	Position of the oxime group	Substituent located on nitrogen of the pyridinium ring (A)	Percentage of reactivation (%)
1	Pralidoxime	2	-CH <sub>3</sub>	1
2	TO 020	2	-CH <sub>2</sub> -Ph	6
3	TO 026	4	-CH <sub>3</sub>	6
4	K006	4	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Br	0
5	TO 063	4	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH <sub>3</sub>	2
6	TO 061	4	-CH <sub>2</sub> -Ph	0

**Figure 13 : Pourcentage de réactivation *in vitro* de l'AChE inhibée par le tabun dans le cerveau après 10 min d'incubation avec une oxime monopyridinium à 1 mmol/L<sup>72</sup>**

Ainsi, il est clair qu'aucune oxime monopyridinium n'est capable de réactiver le complexe AChE-tabun. Le pourcentage de réactivation ne dépasse pas 10% quelle que soit l'oxime, même dans le cas de la pralidoxime qui est le réactivateur le plus utilisé. La modification de la longueur de la chaîne alkyle sur l'azote du pyridinium (n°4 et 5), celle du caractère lipophile de l'oxime (n°2) et de la position du groupement oxime (n°3 et 6) n'améliorent en rien la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun.

Il est donc intéressant de se pencher sur les oximes bis-pyridiniums pour restaurer l'activité de l'AChE (Figure 14).

<sup>72</sup> Cabal, J.; Kuca, K.; Kassa, J. *Basic & clinical Pharmacology & Toxicology* **2004**, *95*, 81.



No.	Code	Position of the oxime group	Substituent located on the second pyridinium ring (D)	Chemical structure of the bridge (B)	Percentage of reactivation (%)
7	TO 091	4	4-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub>	0
8	TO 090	4	4-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	0
9	TO 033	4	4-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	2
10	TO 047	4	4-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	8
11	TO 046	4	4-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	46
12	Trimedoxime	4	4-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	41
13	TO 029	4	4-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	0
14	Methoxime	4	4-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>1</sub>	0
15	TO 040	4	4-CH=NOH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	8
16	TO 057	4	4-CH=NOH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -SO <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	8
17	TO 058	4	4-CH=NOH	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -S <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub>	9
18	TO 205	4	4-CH=NOH	-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub>	34
19	Obidoxime	4	4-CH=NOH	-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub>	0
20	TO 052	4	4-CH=NOH	-CH <sub>2</sub> -CO-CH <sub>2</sub>	8
21	K 34	2	2-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	0
22	BI-6	2	4-CONH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub>	3
23	HI-6	2	4-CONH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub>	2
24	K033	2	2-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	0
25	K005	2	2-CH=NOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	1
26	HS-6	4	4-CONH <sub>2</sub>	-CH <sub>2</sub> -O-CH <sub>2</sub>	0
27	TO 092	4	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	8
28	K027	4	4-CONH <sub>2</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	15
29	K012	4	4-COOH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	0
30	K029	4	4-CH <sub>2</sub> OH	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	0

**Figure 14 : Pourcentage de réactivation *in vitro* de l'AChE inhibée par le tabun dans le cerveau après 10 min d'incubation avec une oxime bispyridinium à 1 mmol/L<sup>67</sup>**

En ce qui concerne les oximes connues que sont l'obidoxime, la méthoxime et HI-6 (n°14, 19, 23), la réactivation est inférieure à 10%, ce qui confirme que ces réactivateurs sont inefficaces face au complexe AChE-Tabun. La trimédoxime (n°12), quant à elle, est la plus efficace avec 41% de réactivation. Des analogues de la trimédoxime ont ainsi été testés. La modification de la longueur de pont entre les deux cycles pyridiniums (n°7-11, 13), de la structure chimique de ce pont (n°15-18, 20), de la position du groupe oxime (n°21, 24-25) ou de la structure chimique de la seconde fonction oxime (n°22, 26-30) n'améliorent pas de façon significative l'activité de la trimédoxime. Les analogues souvent ne réactivent même pas du tout l'AChE inhibée par le tabun. On peut toutefois noter que certaines caractéristiques se dégagent de l'étude de ces analogues : la longueur de pont optimale entre les deux cycles pyridiniums semble être de 3 ou 4 carbones (n°11, 12). Lorsqu'on remplace un des carbones par un oxygène (n°26), le pourcentage de réactivation chute dramatiquement. Enfin, la position la plus favorable à la réactivation du groupement oxime est la position 4 (n°12 vs 25). Ces quelques exemples montrent bien la difficulté à réactiver l'AChE inhibée par le tabun et la nécessité d'étudier précisément la structure et la réactivité du complexe AChE-tabun.

### III.3. Mécanisme de réactivation par les oximes

Le mécanisme communément admis pour la réactivation de l'AChE phosphorylée est très proche de celui de l'inhibition. Une première étape de fixation de l'oxime sur le phosphore conduit à la formation d'un intermédiaire pentavalent. Puis l'élimination du complexe oxime-phosphore a lieu, libérant l'enzyme libre (Schéma 14).

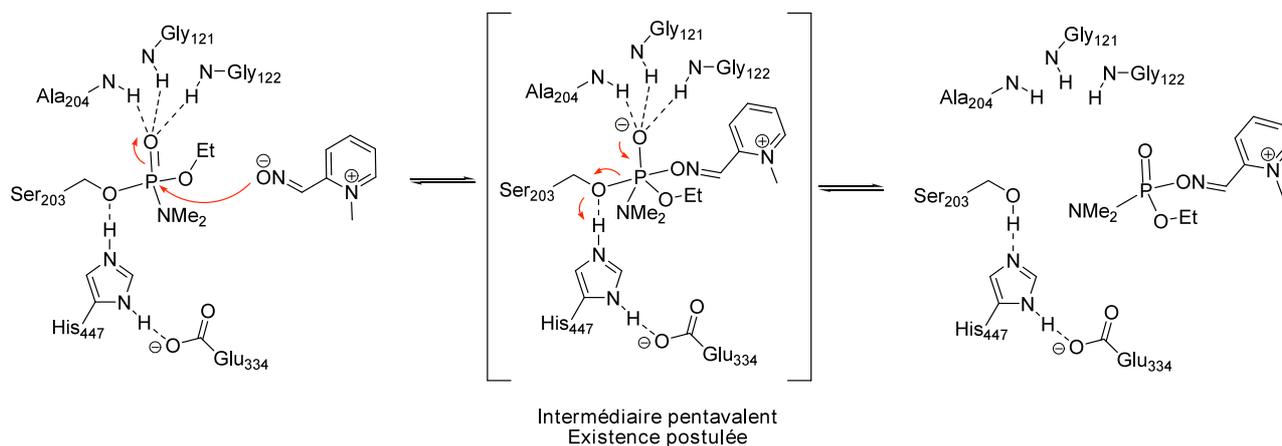


Schéma 14 : Mécanisme de réactivation de l'AChE phosphorylée par le tabun

Les oximes employées sont toujours des aldoximes, car ainsi le produit éliminé peut se décomposer pour former des composés moins toxiques (Schéma 15).

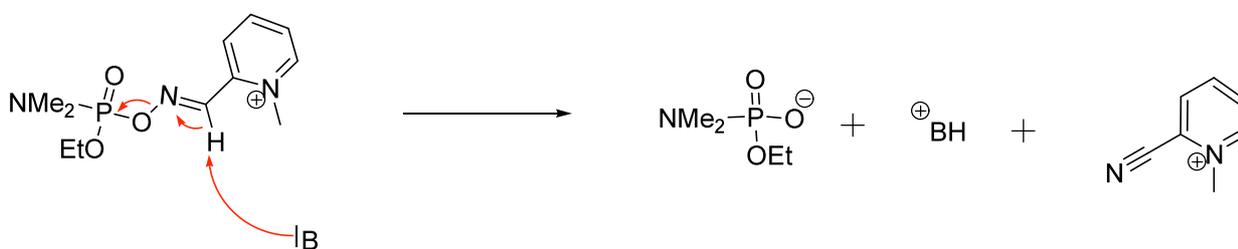


Schéma 15 : Décomposition du complexe oxime-organophosphoré<sup>73</sup>

De la même façon que pour l'inhibition, des études théoriques ont été menées sur la réactivation de l'AChE phosphorylée par J. Leszczynski et al.<sup>74</sup> A partir d'un système modèle, les auteurs ont étudié la réactivation par l'anion formoximate de l'AChE inhibée par le sarin (Schéma 14). Au départ, deux mécanismes sont possibles : soit une substitution nucléophile (mécanisme A), soit une addition-élimination (mécanisme B).

J. Leszczynski et al. ont ainsi montré que le mécanisme effectif était le B, soit une addition-élimination (Schéma 16).

<sup>73</sup> Vyas, S.; Hadad, C. M. *Chemico-Biological Interactions* **2008**, *175*, 187.

<sup>74</sup> Wang, J.; Gu, J.; Leszczynski, J.; Feliks, M.; Sokalski, W. A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 2404.

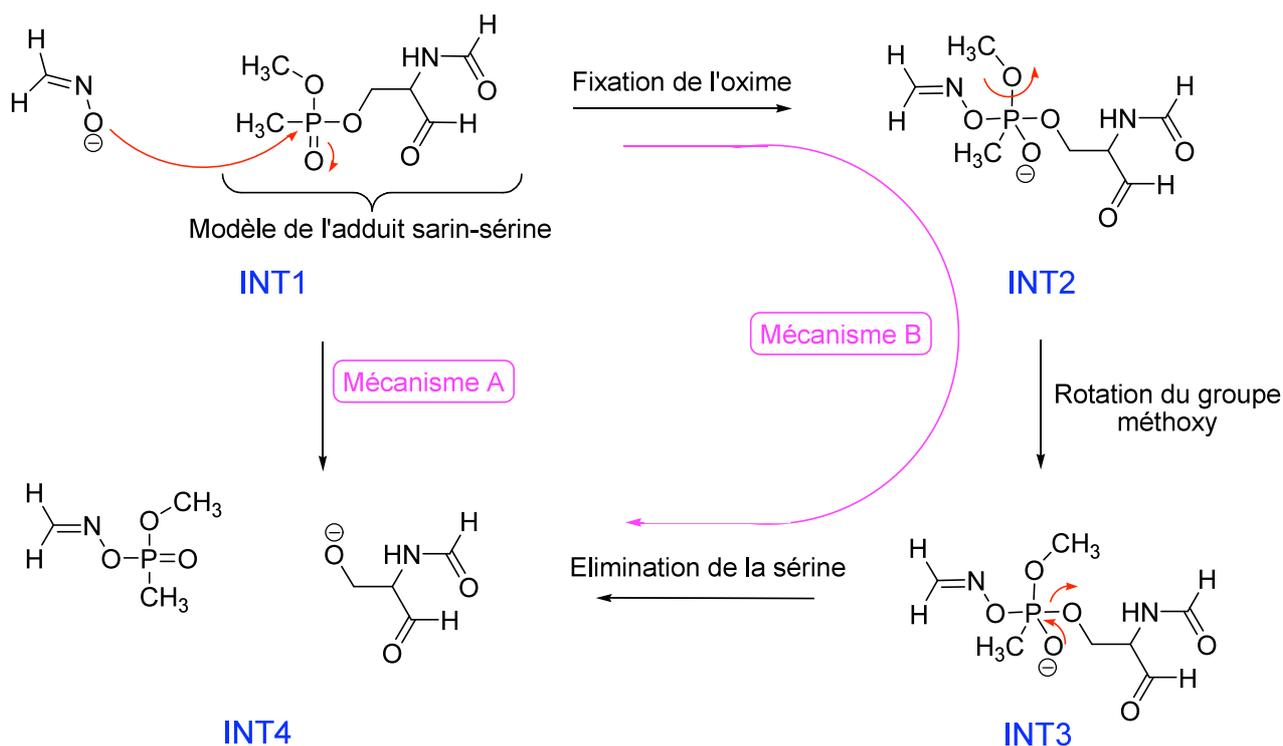


Schéma 16 : Mécanisme de la réactivation de l'AChE inhibée par le sarin selon l'étude de J. Leszczynski et al.

Ainsi, trois étapes ont été mises en évidence : une première étape d'addition de l'oxime sur le phosphore (INT1-INT2), puis une rotation du groupement méthoxy (INT2-INT3), et enfin l'élimination de la sérine libre (INT3-INT4). Cependant, la barrière énergétique de la deuxième étape est tellement faible qu'on peut ne pas la considérer (Figure 15).

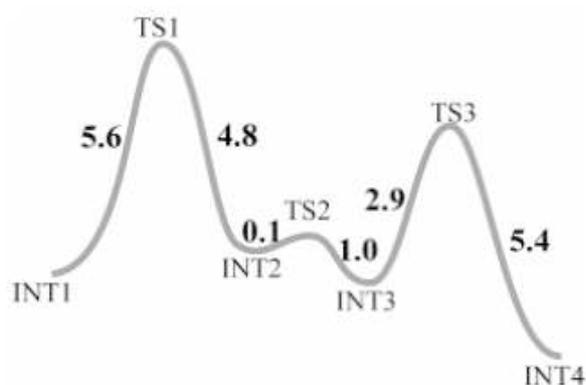


Figure 15 : Profil énergétique de la réactivation de l'AChE inhibée par le sarin par l'anion formoximate (B3LYP/6-311G(d,p), E en kcal/mol)

Il faut noter que sans solvation, l'étape d'addition de l'oxime est cinétiquement déterminante, ce qui n'est pas le cas si l'on solvate le système dans l'eau par la méthode du « Polarizable Continuum Model » (PCM). Cette méthode consiste à modéliser le solvant en un continuum polarisable, pour

ne pas avoir à considérer chaque molécule de solvant indépendamment les unes des autres ce qui serait très long en temps de calcul, et ce qui risquerait d'entraîner une explosion conformationnelle. Les barrières obtenues sont faibles, et tout à fait compatibles avec des phénomènes biologiques. Cependant, les auteurs n'ont étudié la réactivation que sur un système modèle, et n'ont donc pas pris en compte l'environnement du site actif qui peut avoir une grande influence sur la réactivité.

Figuroa et al. ont quant à eux testé d'autres types de réactivateurs, afin de déterminer si l'effet  $\alpha$  est nécessaire pour la réactivation de l'AChE phosphorylée.<sup>75</sup> A partir du même modèle que J. Leszczynski, ils ont modélisé l'attaque de différents nucléophiles : l'anion formoximate comme référence, l'acétaldéhyde énolate qui ne présente pas d'effet  $\alpha$ , le méthylperoxy et le méthylsulphénate qui présentent un effet  $\alpha$  et le formaldéhyde hydrazone dont l'atome réalisant l'attaque nucléophile est un azote et non un oxygène (Schéma 17).

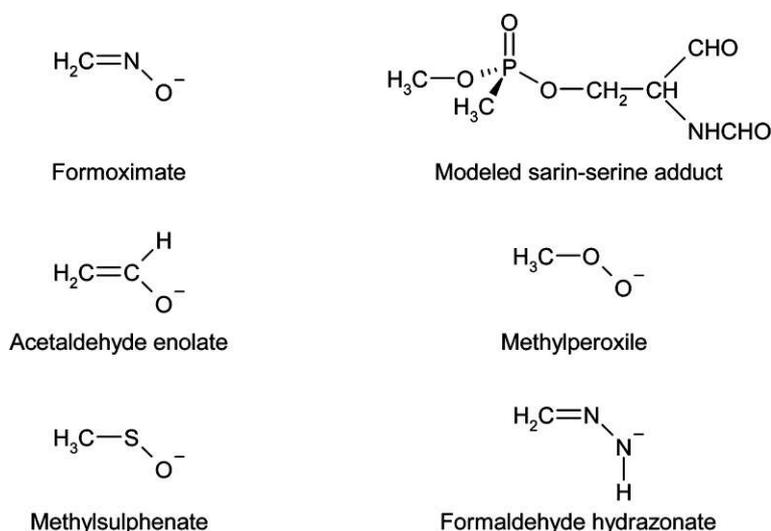


Schéma 17 : Structures du complexe sarin-sérine et des nucléophiles modélisés par J. Figuroa-Villar et al.

Contrairement à J. Leszczynski qui avait montré que l'anion formoximate réagissait via un mécanisme en trois étapes, ils ont déterminé que, pour les nucléophiles autres que l'anion formoximate, le mécanisme se déroulait en quatre étapes : il y a tout d'abord l'attaque nucléophile sur le phosphore, puis une rotation de la sérine. Ces deux étapes ont lieu simultanément dans le cas de l'anion formoximate. Les deux dernières étapes sont les mêmes que dans le cas de l'anion formoximate, à savoir rotation du groupement méthoxy du sarin puis élimination de la sérine. Les quatre étapes sont présentées pour l'énolate dans le schéma 18. Les résultats obtenus pour chaque nucléophile sont présentés figure 16.

<sup>75</sup> Delfino, R. T.; Figuroa-Villar, J. D. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 8402.

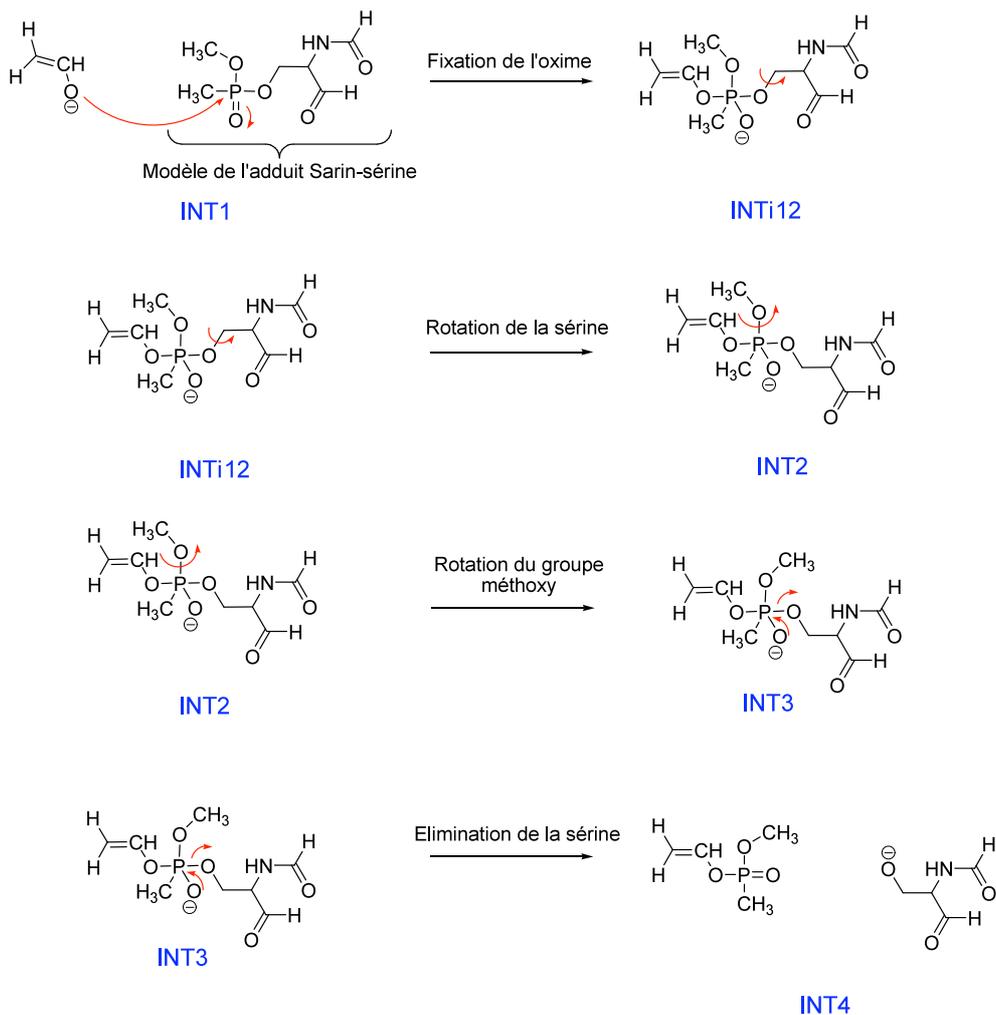


Schéma 18 : Mécanisme proposé par J. Figueroa-Villar et al. de la réactivation de l'AChE inhibée par le sarin dans la cas de l'énolate, du peroxyde, de l'hydrazonate et du sulphénate

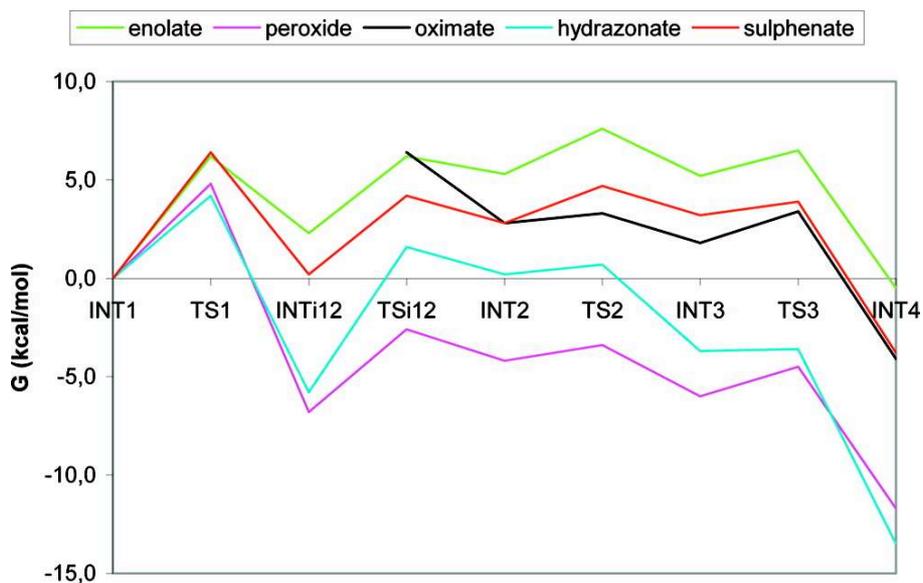


Figure 16 : Profils d'énergie libre à 298.15 K et 1.0 atm de la réactivation en phase gaz du complexe sarin-sérine (B3LYP/6-311G(d,p), E en kcal/mol)

Les profils énergétiques obtenus pour la réactivation avec différents nucléophiles sont tous assez proches, avec des barrières inférieures à 10 kcal/mol, et des processus globalement exothermiques (Figure 16). Les résultats sont similaires lorsque le système est solvatoé par PCM. Cette étude montre donc bien que d'autres nucléophiles que les oximes peuvent être employés comme réactivateurs, et que l'effet  $\alpha$  n'est pas nécessaire à une bonne réactivation. D'après les profils obtenus, les peroxydes seraient de très bons candidats pour la réactivation de l'AChE inhibée puisqu'ils présentent les barrières les plus basses. Mais ce type de molécules entraîne la mort cellulaire, il est donc important de souligner que les nucléophiles testés ne peuvent être utilisés en conditions physiologiques, et que cette étude cherche juste à comprendre l'influence du nucléophile sur la réactivation de l'AChE inhibée par le sarin.

## IV. Conclusion

Ainsi, l'AChE est une enzyme complexe et vitale qui intervient dans la neurotransmission. Très bien connue d'un point de vue structural, elle est inhibée par des neurotoxiques organophosphorés utilisés notamment comme armes chimiques. L'arrêt de l'activité de l'AChE peut mener rapidement à la mort. Bien que la possession et l'utilisation des organophosphorés comme arme de guerre soient prohibées par la CIAC, la menace terroriste persiste comme l'ont montré les attaques au sarin du métro japonais en 1995.

Il existe des solutions pour restaurer l'activité de l'AChE inhibée par des organophosphorés : pour cela, il faut utiliser notamment des oximes qui sont de puissants nucléophiles et qui permettent donc de rompre la liaison entre le phosphore du neurotoxique et l'oxygène de la sérine catalytique. Cependant il n'existe pas d'oxime universelle qui réactive tous les complexes AChE-organophosphoré. Notamment, aucune oxime connue ne réactive efficacement l'AChE inhibée par le tabun, ce qui fait du tabun l'un des organophosphorés les plus puissants.

C'est pourquoi nous nous sommes particulièrement intéressés au complexe AChE-tabun. Après avoir étudié le mécanisme naturel d'hydrolyse de l'AChE d'un point de vue théorique pour confronter notre méthode aux données expérimentales, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes régissant les interactions entre l'enzyme et le tabun pour concevoir de nouvelles structures de réactivateurs. Nous nous sommes tout d'abord penchés sur l'inhibition de l'AChE par le tabun, puis sur la réactivation. La description de la méthode utilisée est faite dans le chapitre 2.

## **CHAPITRE 2**

# **PRESENTATION DE LA CHIMIE THEORIQUE**

## I. Introduction

Avec l'essor de l'informatique et des capacités des ordinateurs, la modélisation moléculaire s'est développée de façon exponentielle. Deux méthodologies peuvent être utilisées. La plus simple est la mécanique moléculaire. Cependant cette méthode ne traite pas les interactions électroniques. D'où l'introduction de la Mécanique quantique (QM) qui prend en compte tous les électrons.

## II. Mécanique Moléculaire

La mécanique moléculaire utilise la mécanique classique pour modéliser les systèmes moléculaires. Elle est notamment appliquée à la minimisation énergétique de molécules, au docking ou à la dynamique moléculaire.

Dans cette approche, seules les interactions classiques sont modélisées, ce qui implique qu'on ne traite pas les électrons. Les liaisons entre atomes sont représentées par des ressorts élastiques. Cette méthode est basée sur l'utilisation de champs de force empiriques.

L'énergie potentielle est ainsi calculée sur la base d'un champ de force empirique, dans lequel les interactions entre les atomes sont décomposées en composantes intramoléculaire et intermoléculaire.

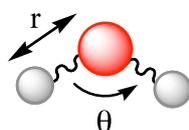
$$\begin{array}{l}
 E_{\text{tot}} = E_{\text{stretching}} \text{ (déformation des liaisons)} \\
 \quad + E_{\text{bending}} \text{ (déformation des angles)} \\
 \quad + E_{\text{torsion}} \text{ (déformation des angles dièdres)} \\
 \quad + E_{\text{non-bonded}} \text{ (interaction non liées)}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} E_{\text{tot}} \\ E_{\text{stretching}} \\ E_{\text{bending}} \\ E_{\text{torsion}} \\ E_{\text{non-bonded}} \end{array}} \right\} \begin{array}{l} \text{Composantes intramoléculaires} \\ \text{Composante intermoléculaire} \end{array}$$

L'énergie totale dépend de  $3N$  variables où  $N$  est le nombre d'atomes de la molécule.

Attardons nous maintenant sur la façon dont les champs de force considèrent ces différentes composantes de l'énergie.

### II.1. Energie des déformations liées

Les énergies de déformation des liaisons et des angles sont représentées par un oscillateur harmonique avec une sommation sur toutes les liaisons covalentes et tous les angles entre atomes liés. Les longueurs de liaison et les angles sont définis de la façon suivante :



## **CHAPITRE 3**

# **ETUDE THEORIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'ACETYLCHOLINE PAR L'ACETYLCHOLINESTERASE**

## II.2. Déformation des liaisons

L'énergie de déformation des liaisons s'exprime de la façon suivante :

$$E_{\text{stretching}} = \sum_{\text{liaisons}} k_b (r - r_0)^2$$

Où  $r$  est la longueur de liaison en Å,  $r_0$  la longueur de liaisons à l'équilibre en Å et  $k_b$  la constante de force associée en  $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ .

Généralement, la valeur de la constante de force provient de données infrarouges ou de calculs *ab-initio* et la longueur à l'équilibre est déterminée à partir de structures RX.

### II.2.1. Déformation des angles

L'énergie de déformation des angles s'exprime de la façon suivante :

$$E_{\text{bending}} = \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2$$

Où  $\theta$  est l'angle en °,  $\theta_0$  l'angle à l'équilibre en ° et  $k_\theta$  la constante de force associée en  $\text{kcal.mol}^{-1}$ .

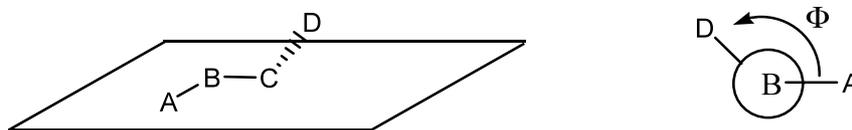
Dans certains champs de force tels que CHARMM que nous utiliserons par la suite,<sup>76</sup> l'énergie d'Urey-Bradley qui représente les interactions 1,3 est aussi prise en compte pour la déformation des angles.

$$E_{\text{Urey-Bradley}} = \sum_{\text{distance}} k_{ub} (S - S_0)^2$$

Où  $S$  est la distance entre les deux atomes considérés en Å,  $S_0$  la distance à l'équilibre en Å et  $k_{ub}$  la constante de force associée en  $\text{kcal.mol}^{-1}.\text{Å}^{-2}$ .

### II.2.2. Déformation des angles dièdres

Les angles dièdres peuvent être définis de la façon suivante :



$$E_{\text{torsion}} = \sum_{\text{dièdres}} \sum_n k_\phi (1 + \cos(n\phi - \delta))$$

Où  $k_\phi$  est la barrière de rotation en  $\text{kcal.mol}^{-1}$ ,  $\phi$  la valeur du dièdre en ° et  $\delta$  la valeur de la

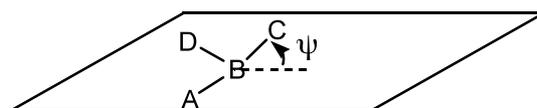
<sup>76</sup> MacKerell, A. D., Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L., Jr.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E., III; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. J. Phys. Chem. B 1998, 102, 3586.

phase en °.

Il peut également exister une déformation pour trois atomes liés à un quatrième atome. Dans le champ de force CHARMM, ces angles appelés dièdres impropres sont pris en compte tels que :

$$E_{improper} = \sum_{dièdres} k_{\psi} (\psi - \psi_0)^2$$

Où  $\psi$  représente l'angle formé entre la liaison d'un atome et l'atome central et le plan formé par les deux autres atomes et l'atome central :



Les dièdres impropres sont utilisés pour décrire correctement la chiralité et la planarité.

### II.3. Energie des interactions non liées

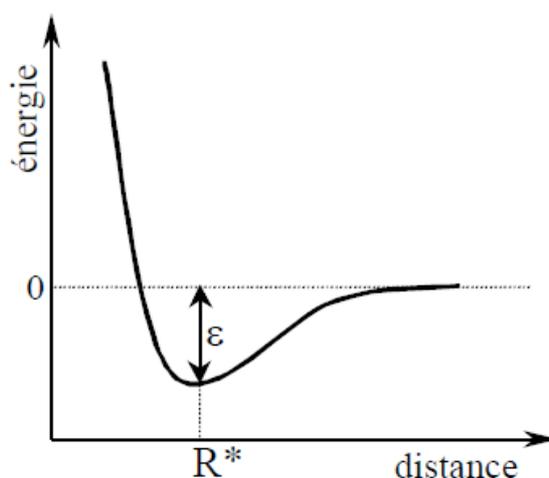
Les interactions non liées sont représentées par deux termes : un terme de Lennard-Jones et un terme électrostatique.

#### II.3.1. Energie de Lennard-Jones

Les interactions de Lennard-Jones s'expriment de la façon suivante :

$$E_{Lennard-Jones} = \sum_{i,j} \epsilon_{i,j} \left( \left( \frac{R_{i,j}^*}{R_{i,j}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{i,j}^*}{R_{i,j}} \right)^6 \right)$$

Avec  $\epsilon_{i,j}$  la profondeur du puits de Van Der Waals à la distance  $R_{i,j}^*$ .



Le terme en  $-(1/R)^6$  représente l'énergie de dispersion attractive de London lié aux forces de dispersion de London entre dipôles instantanés. Celui en  $(1/R)^{12}$  représente la répulsion due

au principe d'exclusion de Pauli, selon lequel deux électrons diffèrent au moins par leur nombre de spin.

### II.3.2. Interactions électrostatiques

Les interactions coulombiennes sont représentées par un potentiel en  $1/R_{i,j}$ :

$$E_{coulomb} = \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{R_{i,j}}$$

$q_i$  et  $q_j$  sont les charges partielles des atomes  $i$  et  $j$ .

La mécanique moléculaire est une méthode rapide pour modéliser un système, ce qui permet l'étude de systèmes de grande taille. Cependant elle ne prend pas en compte les interactions électroniques autres que électrostatiques, alors que celles-ci régissent souvent la géométrie et toujours les mécanismes. Afin de traiter convenablement ces interactions tout comme les ruptures et les formations de liaisons, il faut faire appel à la mécanique quantique.

## III. Mécanique quantique

### III.1. L'équation de Schrödinger

La mécanique quantique permet de simuler les phénomènes chimiques quantitativement. Ainsi il est possible de prévoir la géométrie des molécules, les propriétés moléculaires, les états de transition, les états excités, les propriétés spectroscopiques et les mécanismes...

L'équation fondamentale pour décrire la structure électronique d'un système est celle établie par Schrödinger en 1925 :<sup>77</sup>

$$H\Psi = E\Psi$$

Où  $H$  est l'hamiltonien moléculaire,  $\psi$  la fonction d'onde et  $E$  l'énergie du système.

L'hamiltonien  $H$  peut se définir de la façon suivante, sans champ magnétique :

$$H = -\sum_{i=1}^N \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i=1}^N \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{i,A}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{i,j}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$$

Avec  $M_A$  : Masse du noyau  $A$

$Z_A$  : Numéro atomique du noyau  $A$

$r_{i,A}$  : Distance entre l'électron  $i$  et le noyau  $A$

$r_{i,j}$  : Distance entre les deux électrons  $i$  et  $j$

$R_{AB}$  : Distance entre les deux noyaux  $A$  et  $B$

<sup>77</sup> Schrödinger, E. *Phys. Rev.* **1926**, 28, 1049.

Soit :  $H = T_e + T_n + V_{ne} + V_{ee} + V_{nn}$

Avec  $T_e$  : énergie cinétique des électrons

$T_n$  : énergie cinétique des noyaux

$V_{ne}$  : attraction électron – noyau

$V_{ee}$  : répulsion électron – électron

$V_{nn}$  : répulsion internucléaire

Afin de simplifier cette équation, on se place dans l'approximation de Born-Oppenheimer qui considère les noyaux comme fixes.

De ce fait,  $T_n = 0$  et  $V_{nn} = \text{constante}$

L'hamiltonien devient donc :

$$H = T_e + V_{ne} + V_{ee} + V_{nn} = H_{el} + V_{nn}$$

Il suffit ainsi de résoudre l'hamiltonien électronique pour résoudre l'équation de Schrödinger, à savoir :

$$H_{el}|\Psi\rangle = E_{el}|\Psi\rangle$$

$$\text{Avec : } H|\Psi\rangle = (E_{el} + V_{nn})|\Psi\rangle$$

Afin de calculer l'énergie électronique, on applique le principe variationnel qui définit l'énergie comme une valeur moyenne de l'hamiltonien ( $E > E_0$ ) :

$$E_{el} = \frac{\langle \Psi | H_{el} | \Psi \rangle}{\langle \Psi | \Psi \rangle}$$

Si les fonctions d'ondes sont orthonormales, on a :

$$\langle \Psi_i | \Psi_j \rangle = \delta_{i,j} \quad \text{avec} \quad \begin{matrix} \delta_{i,i} = 1 \\ \delta_{i,j} = 0 \end{matrix}$$

Il reste maintenant à exprimer la fonction d'onde électronique.

Pour cela, il faut d'abord introduire la notion de spin qui découle du principe d'exclusion de Pauli : deux électrons ne peuvent pas être caractérisés par les mêmes nombres quantiques, ils diffèrent au moins par leur nombre de spin.

Du fait du principe d'exclusion de Pauli, la fonction d'onde est antisymétrique :

$$\Psi^2(\dots i \dots j \dots) = -\Psi^2(\dots j \dots i \dots)$$

La fonction d'onde sera représentée sous la forme de spin-orbitale. Pour une fonction d'espace  $\Phi_{esp}$  il existe deux spin-orbitales associées :

$$u_1 = \phi_{esp} \alpha$$

$$u_2 = \phi_{esp} \beta$$

On se place généralement également dans l'approximation orbitale : la fonction d'onde d'un

système multiélectronique s'écrit comme le produit de fonctions monoélectroniques.

$$\Psi = \phi_1 \phi_2 \dots \phi_i \dots \phi_n$$

Ainsi, la fonction d'onde peut s'écrire comme un déterminant de Slater :

$$\Psi = N \begin{vmatrix} u_1(1) & u_2(1) & \dots & u_n(1) \\ u_1(2) & u_2(2) & \dots & u_n(2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ u_1(n) & u_2(n) & \dots & u_n(n) \end{vmatrix} \quad N = \frac{1}{\sqrt{n!}}$$

La partie d'espace des spin-orbitales peut être prise sous la forme d'une Combinaison Linéaire d'Orbitales Atomiques (CLOA) dont l'ensemble constitue une base. On considère qu'au voisinage d'un noyau, la fonction d'onde ressemble à celle de l'atome isolé correspondant. Une fonction moléculaire globale  $\phi$  est donc un « mélange » de toutes les orbitales atomiques  $\chi_q$  :

$$\phi_p = \sum_q c_{q,p} \chi_q$$

### III.2. Méthode Hartree-Fock

La première méthode de résolution approchée de l'équation de Schrödinger est celle d'Hartree-Fock.<sup>78</sup> Il s'agit de l'approximation de base en ab-initio pour la résolution de l'équation de Schrödinger, sur laquelle s'appuient toutes les autres méthodes.

On cherche à avoir le jeu d'orbitales optimal et ainsi une énergie minimale.

Donc toute modification de :  $u$  en  $u + \delta u$ , soit de  $\psi$  en  $\psi + \delta \psi$ , doit transformer  $E$  en  $E + \delta E$  ( $\delta E \rightarrow 0$ )

Dans la méthode Hartree-Fock, la fonction d'onde est exprimée sous forme de déterminant de Slater, et on se place dans l'approximation orbitale.

On se place également dans l'approximation de champ moyen : chaque électron ressent un champ moyen créé par les autres électrons (Figure 1). En effet, il s'agit de résoudre un problème à  $N$  particules, dont il n'existe pas de solution exacte. L'approche la plus simple est donc de moyenniser les interactions des électrons. La méthode Hartree-Fock est ainsi une méthode non corrélée.

<sup>78</sup> Hartree, D. R. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* **1928**, 24, 89, 111, 426.



Figure 1 : Approximation de champ moyen dans la méthode Hartree-Fock

L'hamiltonien peut s'écrire :

$$H_{el} = \sum_i -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i,K} \frac{1}{r_{i,K}} + \sum_{i<j} \frac{1}{r_{i,j}} = \sum H(i) + \sum H(i, j)$$

Les deux premiers termes font intervenir un seul électron. Leur somme est notée  $\sum H(i)$ , opérateur monoélectronique. Le troisième terme fait intervenir deux électrons  $i$  et  $j$ . C'est un opérateur biélectronique noté  $\sum H(i, j)$ .

L'énergie peut alors s'écrire sous la forme :

$$E = \sum_{i=1}^n \int \Psi_i^*(i) \left\{ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \frac{1}{r_i} \right\} \Psi_i(i) d\tau_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n \iint \left( \Psi_i^*(1) \Psi_j^*(2) \frac{1}{r_{ij}} \Psi_i(1) \Psi_j(2) - \Psi_i^*(1) \Psi_i^*(2) \frac{1}{r_{ij}} \Psi_j(1) \Psi_j(2) \right) d\tau_i d\tau_j$$

$$\text{Soit : } E = \sum_i H_i + \sum_i \sum_j (J_{ij} - K_{ij})$$

On peut ainsi définir un opérateur monoélectronique appelé opérateur de Fock tel que :

$$F(1) = H(1) + \sum_j [J_j(1) - K_j(1)]$$

Avec  $H(1)$  : opérateur monoélectronique défini ci-dessus

$J_i(1)$  : intégrale coulombienne (Energie à fournir pour arracher un électron à une orbitale et l'envoyer à l'infini)

$K_i(1)$  : intégrale d'échange (Energie pour échanger un électron entre A et B)

Trouver la fonction d'onde monoélectronique de Hartree-Fock revient maintenant à résoudre l'équation aux valeurs propres :

$$F(1) |u_k(1)\rangle = \varepsilon_k |u_k(1)\rangle$$

L'opérateur F dont on cherche les fonctions propres  $u_k$  est défini à partir des fonctions  $u$  elles-mêmes : il s'agit donc d'une méthode itérative, dans laquelle on cherche à obtenir un champ cohérent autour de chaque électron considéré. On peut ainsi utiliser un cycle Self Consistent Field (SCF) (Figure 2).

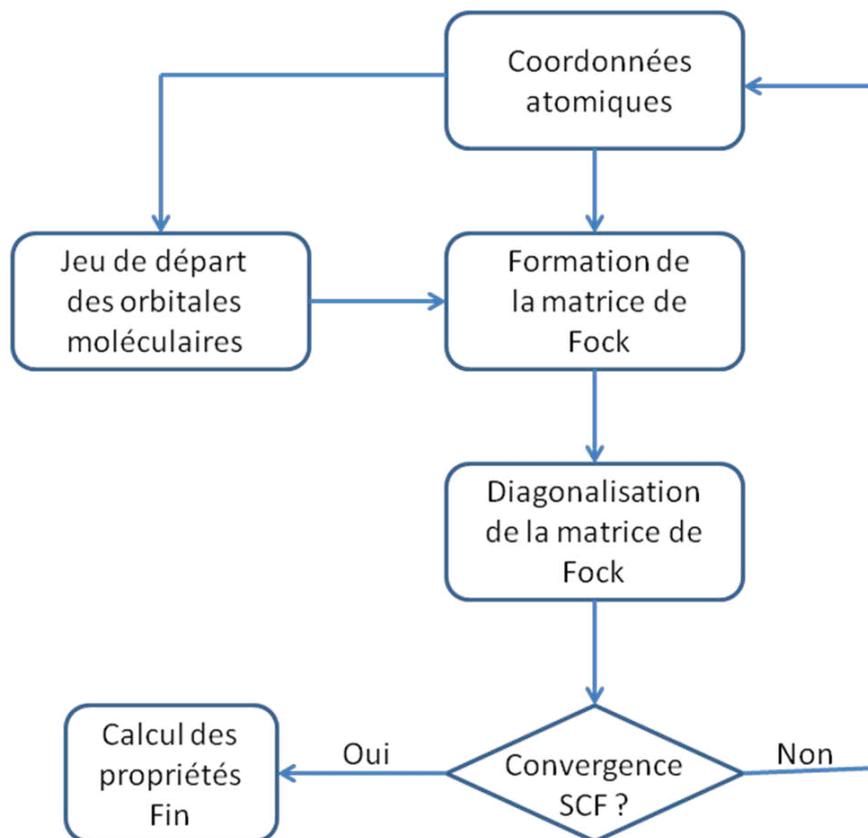


Figure 2 : Cycle SCF pour la méthode Hartree-Fock

La méthode Hartree-Fock nécessite l'utilisation d'une base d'orbitales atomiques. Pour cela, la méthode CLOA exprime les OM sous forme de combinaisons linéaires d'orbitales centrées sur chaque noyau (OA).

Il existe différents types de bases :

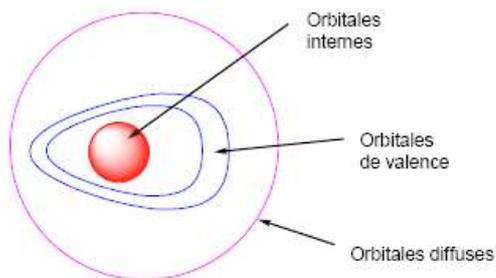
- Les bases minimales : utilisation d'une seule fonction par OA occupées et OA vides de la couche de valence
- Les bases étendues : utilisation de plusieurs fonctions par OA.

Concrètement, la partie radiale de chaque OA est représentée par une combinaison linéaire de  $n$  gaussiennes :

$$\sum_{i=1}^n d_i e^{-\alpha_i r^2}$$

Ceci est adapté pour les atomes qui ont une symétrie sphérique, mais à améliorer lorsqu'on s'éloigne de cette symétrie sphérique.

Les bases utilisées sont construites de la façon suivante (Figure 3).



- **Les orbitales internes** : nombre élevé de gaussiennes
- **La zone de valence** : *Multiple zêta de valence* (ex : une double zêta utilisera pour le carbone 2 orbitales s de valence 2s et 2s' et 6 orbitales p, 2p et 2p' )  
*Orbitales de polarisation* (ajout des fonctions de l supérieur))
- **La zone diffuse** : ajout d'orbitales diffuses (exposant  $\alpha$  faible), permet d'augmenter la taille du nuage électronique (interactions à longue distance, anion ...)

Figure 3 : Conception d'une base d'orbitales

L'inconvénient majeur de la méthode Hartree-Fock est que c'est une méthode non corrélée. Comme on peut le voir sur le tableau 1, la corrélation est parfois extrêmement importante pour décrire convenablement les systèmes chimiques comme dans le cas de F<sub>2</sub> où on note une inversion du signe de l'énergie de dissociation, d'où la nécessité d'autres méthodes.

		Energie de dissociation (kcal/mol)	
		Hartree-Fock	Expérimental
<b>Liaisons chimiques</b>	HF	100.3	141.6
	N <sub>2</sub>	122.3	228.4
	F <sub>2</sub>	-27.0	39.0
<b>Liaisons hydrogènes</b>	(HF) <sub>2</sub>	3.7	4.6
« Liaisons » électrostatiques	N <sub>2</sub> -HF	1.27	2.22
« Liaisons » de Van der Waals	He <sub>2</sub>	-	0.0218

Tableau 1 : Importance de la corrélation électronique pour la description de systèmes chimiques

De nombreuses méthodes ont été élaborées en vue de compenser les erreurs du schéma Hartree-Fock. Un certain nombre de ces méthodes se base sur la fonction d'onde Hartree-Fock pour obtenir leur sienne propre. C'est pourquoi ces méthodes sont souvent désignées comme des méthodes post Hartree-Fock. Elles se partagent essentiellement en deux catégories : les méthodes perturbatives et les méthodes multi-configurationnelles. Les

premières s'appuient sur la théorie de la perturbation de Rayleigh-Schrödinger qui consiste à partir d'un système simple à appliquer graduellement un hamiltonien perturbant qui représente un écart léger par rapport à l'équilibre du système :

$$H = H_0 + \lambda V$$

V étant la perturbation appliquée et  $\lambda$  un paramètre arbitraire réel.

La théorie de la perturbation de Møller-Plesset<sup>79</sup> améliore ainsi la méthode Hartree-Fock en y apportant les effets de corrélation électronique au moyen de la théorie de la perturbation au deuxième (MP2), troisième (MP3) ou quatrième (MP4) ordre habituellement. Dans la théorie Møller-Plesset, la fonction d'onde d'ordre 0 est une fonction propre exacte de l'opérateur de Fock, qui sert alors d'opérateur non perturbé. La perturbation est le potentiel de corrélation. Les méthodes multi-configurationnelles utilisent une fonction d'onde contenant plusieurs déterminants de Slater. Ces méthodes utilisent la fonction d'onde Hartree-Fock comme point de départ. La forme générale de cette fonction d'onde est :

$$\Psi = a_0 \Psi_{HF} + \sum_{I \neq 0} a_I \Psi_I$$

avec  $a_0$  généralement proche de 1. Les méthodes multiconfigurationnelles diffèrent dans la manière de calculer les coefficients en face des autres déterminants. Une méthode classique est la méthode d'Interaction de Configuration. La fonction d'onde dans ce cas est décrite comme une combinaison linéaire de déterminants dont les coefficients sont obtenus en minimisant l'énergie :

$$\Psi = a_0 \Psi_{HF} + \sum_{i,a} a_i^a \Psi_i^a + \sum_{i,j,a,b} a_{i,j}^{a,b} \Psi_{i,j}^{a,b} + \dots$$

où  $\Psi_{HF}$  est le déterminant HF,  $\Psi_i^a$  et  $\Psi_{i,j}^{a,b}$  sont respectivement les déterminants excités simples et doubles. Les électrons des orbitales occupées i et j sont excités dans les orbitales non occupées a et b.

Une autre méthodologie est la méthode de la fonctionnelle de la densité qui se base quant à elle sur une conception tout à fait différente par rapport aux méthodes Hartree-Fock et post Hartree-Fock, puisqu'elle se fonde sur une quantité physique observable : la densité de probabilité de présence d'un électron dans un volume élémentaire.

### III.3. Théorie de la Fonctionnelle de la densité (DFT)

La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT) a été développée dans les années 60.

<sup>79</sup> Møller C. ; Plesset, M.S. *Phys. Rev.* **1934**, *46*, 618.

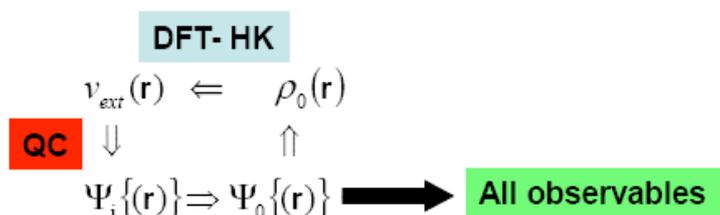
La DFT s'appuie sur l'utilisation de la densité électronique en tant que quantité de base pour les calculs. La densité électronique est définie comme la probabilité de présence de l'électron en un endroit donné :

$$\rho(r) = \Psi^*(r)\Psi(r) = |\Psi(r)|^2$$

Connaître la densité électronique est suffisant pour une détermination complète de toutes les propriétés d'une molécule.

La DFT utilise les théorèmes de Hohenberg et Kohn :<sup>80</sup>

- Pour tout système de particules en interaction dans un potentiel externe  $v_{\text{ext}}(r)$ , le potentiel  $v_{\text{ext}}(r)$  est uniquement déterminé, à une constante additive près, par la densité  $\rho_0(r)$  de la particule dans son état fondamental.
- Il existe une fonctionnelle universelle  $E[\rho]$  exprimant l'énergie en fonction de la densité électronique  $\rho(r)$ , valide pour tout potentiel externe  $v_{\text{ext}}(r)$ . Pour chaque  $v_{\text{ext}}(r)$  particulier, l'énergie de l'état fondamental du système est la valeur qui minimise cette fonctionnelle, la densité  $\rho(r)$  qui lui est associée correspond à la densité exacte  $\rho_0(r)$  de l'état fondamental.



Cependant, nous sommes toujours dans un problème à N corps. C'est pourquoi Kohn et Sham ont fait la proposition suivante : un hamiltonien, décrivant un système de N particules n'interagissant pas, a la même densité que le système réel dans lequel les particules interagissent. Ceci revient à l'utilisation d'un système de référence qui a la même densité que le système réel.<sup>81</sup>

$$D'où : H_{KS} \Psi_i = \left[ -\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{\text{eff}}(r) \right] \Psi_i = \varepsilon_i \Psi_i$$

$$\Psi = (N!)^{-\frac{1}{2}} \det(\Psi_1 \Psi_2 \Psi_3 \dots \Psi_N)$$

Ainsi, l'énergie peut maintenant s'exprimer :

<sup>80</sup> Hohenberg, P. ; Kohn, W. *Phys. Rev.* **1964**, 136, B864.

<sup>81</sup> Kohn, W.; Sham, L.J. *Phys. Rev.* **1965**, 140, A1133.

$$E_{KS}[\rho] = T[\rho] + V_{\text{int}}[\rho] + \int v_{\text{ext}}(r)\rho(r)dr$$

$$E_{KS}[\rho] = T_S[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] + \int v_{\text{ext}}(r)\rho(r)dr$$

Avec :  $T_S[\rho]$  : énergie cinétique de référence (gaz homogène d'électrons)

$J[\rho]$  : interaction électron/électron coulombienne

$E_{xc}[\rho]$  : échange – corrélation

$v_{\text{ext}}(r)$  : potentiel créé par les noyaux

Les corrections par rapport au système réel sont comprises dans le terme d'échange corrélation. L'énergie d'échange – corrélation s'exprime alors :

$$E_{xc}[\rho] = E_{HK}[\rho] - T_S[\rho] - J[\rho]$$

$$E_{xc}[\rho] = \boxed{T[\rho] - T_S[\rho]} + \boxed{V_{ee}[\rho] - J[\rho]}$$

Energie  
Cinétique

Contributions non classiques des  
interactions électron - électron

L'hamiltonien s'exprime alors :

$$H_{KS}\Psi_i = \left[ -\frac{1}{2}\nabla^2 \cdot \right.$$

$$\rho(r) = \sum_{i=1, N\sigma=\alpha,\beta} |\Psi_i|^2$$

$$v_{xc}[\rho] = \frac{\partial E_{xc}[\rho]}{\partial \rho(r)}$$

Avec  $v_{\text{hartree}}$  : potentiel d'interaction électron/électron coulombienne

$v_{xc}$  : potentiel d'échange – corrélation

$v_{\text{ext}}$  : potentiel créé par les noyaux

On obtient ainsi des équations de type Hartree-Fock, et la méthode SCF est utilisée de la même façon (Figure 4).

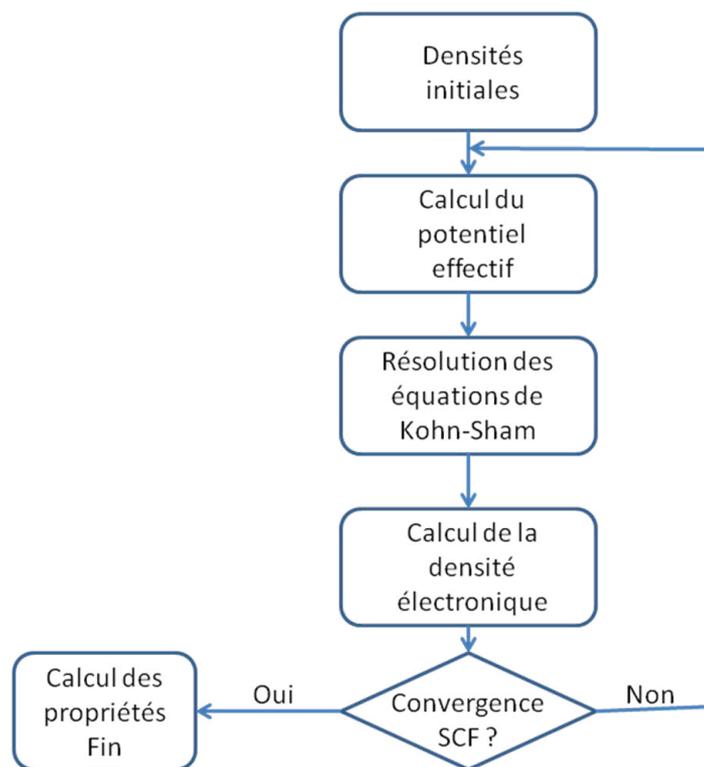


Figure 4 : Cycle SCF pour la DFT

Le dernier problème de cette approche est que la forme exacte du potentiel d'échange – corrélation n'est pas connue. Une approximation de la fonctionnelle d'échange – corrélation est donc utilisée.

L'approximation la plus simple est appelée « Local Density Approximation » (LDA).<sup>82</sup> Cette approche est fondée sur le modèle du gaz uniforme d'électrons. Dans ce cas, les contributions d'échange et de corrélation sont séparées :  $E_{xc} = E_x + E_c$ . L'énergie d'échange – corrélation peut être calculée comme une fonction de la densité uniquement.

Une seconde approche est la « Generalized Gradient Approximation » (GGA).<sup>83</sup> L'énergie d'échange – corrélation dépend dans ce cas non seulement de la densité en chaque point mais aussi de son gradient.

Si l'on prend en compte également la densité de l'énergie cinétique, alors on a des fonctionnelles méta-GGA.

On peut aussi trouver des fonctionnelles hybrides qui sont une combinaison de l'échange exact d'Hartree-Fock (20 à 30%) et d'une fonctionnelle d'échange – corrélation GGA ou métaGGA.

<sup>82</sup> Parr, Robert G; Yang, Weitao (1994). *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford: Oxford University Press.

<sup>83</sup> John P. Perdew, Kieron Burke, and Matthias Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 77, 3865.

L'approximation la plus proche de l'exactitude est celle obtenue lorsqu'on rajoute une dépendance aux orbitales non occupées, et dans ce cas, on a des fonctionnelles non locales. Ces différentes approximations peuvent être représentées sur une échelle de Jacob établie par John Perdew en fonction de leur précision (Figure 5).<sup>84</sup>

Paradis : Exactitude



Echelon 5	+ Dépendance orbitales non occupées	Non locales	B2PLYP
Echelon 4	+ Dépendance orbitales occupées	Fonctionnelles hybrides	B3LYP, PBE0, M06
Echelon 3	+ Dépendance densité de l'énergie cinétique	méta-GGAs	PBE, MO6L
Echelon 2	+ Dépendance gradient de la densité	GGAs	BP86, BLYP
Echelon 1	Densité locale	LDAs	SVWN

Terre : Théorie de Hartree

Figure 5 : Echelle de Jacob établie par John perdew

La DFT est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle en ce qui concerne les optimisations de géométrie et les études mécanistiques.

Cependant, malgré son efficacité, elle ne peut servir à modéliser de très gros systèmes tels que les enzymes. En effet, les temps de calcul seraient beaucoup trop longs du fait de la taille du système. D'autres méthodes sont donc nécessaires, et notamment dans ce cas la méthodologie hybride Mécanique Quantique/Mécanique Moléculaire (QM/MM) qui permet d'allier la vitesse de la mécanique moléculaire et la capacité de casser ou créer des liaisons de la mécanique quantique.

### III.4. Mécanique Quantique/Mécanique Moléculaire (QM/MM)

Le principe de la QM/MM est de décomposer l'enzyme en différentes zones :<sup>85</sup>

- la zone du site actif, là où se fait la réaction chimique, est traitée en QM. En effet, la précision de la QM est nécessaire pour correctement décrire les ruptures et les formations de liaisons, ce qui n'est pas possible en MM. Dans cette partie sont inclus tous les résidus qui interviennent dans la réaction étudiée. Cette zone compte une centaine d'atomes.

<sup>84</sup> Perdew, J.P.; Ruzsinszky, A.; Tao, J.; Staroverov, V.N.; Scuseria, G.; Csonka, G.I. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 062201.

<sup>85</sup> Lin, H.; Truhlar, D.G. *Theor Chem Acc* **2007**, *117*, 185.

- la zone en interaction avec le site actif uniquement de façon perturbative est traitée en MM. Les interactions faibles et l'encombrement stérique sont ainsi correctement pris en compte, sans pour autant avoir un temps de calcul trop long. Cette zone compte environ 400 atomes.
- La zone qui n'interagit pas du tout avec le site actif est quant à elle figée. Tous les atomes sont pris en compte pour le calcul de l'énergie, mais les géométries des résidus de cette partie ne sont pas optimisées.

On a ainsi :<sup>86</sup>

$$H_{tot} = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM/MM}$$

$H_{QM}$  est l'hamiltonien décrivant les particules de la zone traitée en mécanique quantique et leurs interactions entre eux.  $H_{MM}$  est l'hamiltonien de la zone mécanique moléculaire qui dépend uniquement de la position des atomes traités classiquement.  $H_{QM/MM}$  est l'hamiltonien qui décrit les interactions entre les atomes de la zone QM et ceux de la zone MM.

$$H_{QM/MM} = - \sum_{i,M} \frac{q_M}{r_{i,M}} + \sum_{\alpha,M} \frac{Z_\alpha q_M}{R_{\alpha,M}} + \sum_{\alpha,M} \left( \frac{A_{\alpha,M}}{R_{\alpha,M}^{12}} - \frac{B_{\alpha,M}}{R_{\alpha,M}^6} \right) + H_{QM/MM}^{int.coord.}$$

$i$  et  $\alpha$  représentent les électrons et les noyaux de la zone QM respectivement, et  $M$  correspond à la zone MM. Le premier terme correspond à l'interaction électrostatique entre un atome de la zone MM de charge  $q_M$  et l'électron  $i$ . Il est inclus dans les calculs SCF, contrairement aux autres. Le deuxième terme décrit les interactions coulombiennes entre les charges MM classiques et les noyaux quantiques. Le troisième représente les interactions de Van Der Waals entre les atomes QM et MM. Le quatrième terme correspond à l'interaction introduite pour connecter les systèmes QM et MM. Ce terme n'existe que si la connexion entre les zones QM et MM est dans une même molécule.

<sup>86</sup> Reuter, N.; Dejaegere, A.; Maignet, B.; Karplus, M. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 1720.

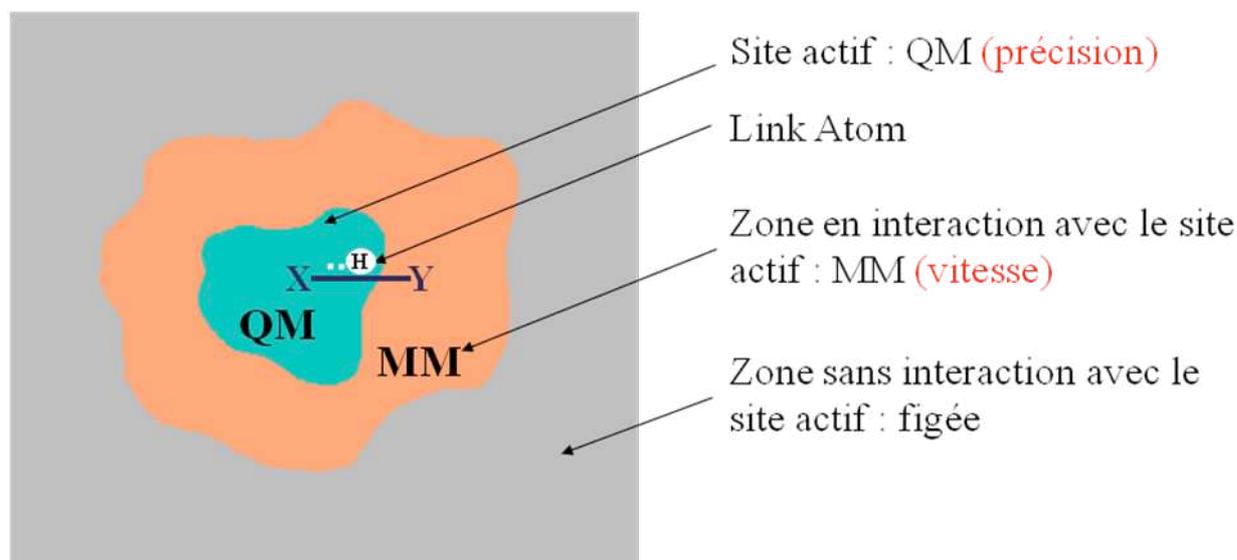


Figure 6 : Méthode de division du système utilisée en QM/MM

La difficulté de cette méthode est la façon de traiter la jonction entre les zones QM et MM. En effet, il faut compléter la valence des atomes frontières de la zone QM. Plusieurs approches existent :

- l'utilisation d'atomes de saturation ou « link atom »:<sup>87</sup> la valence des atomes frontières est complétée par des atomes d'hydrogène, ou parfois des halogènes. Ils interagissent avec la zone MM uniquement de façon électrostatique, et l'atome à la jonction de la zone MM (Y sur la figure 6) a une charge nulle pour éviter de compter deux fois les interactions électrostatiques.
- L'utilisation d'orbitales frontières.<sup>88</sup> Cette méthode, appelée « Local Self –Consistent Field » (LSCF), est basée sur le fait qu'une orbitale hybridée  $sp^2$  avec un électron est incluse pour chaque atome frontière de la zone QM. La jonction QM/MM est décrite par des orbitales de liaisons strictement localisées. Ces orbitales localisées, appelées orbitales gelées, ne sont pas incluses dans le cycle SCF, et sont définies par leur coefficient d'hybridation et leur population électronique.

Ces deux méthodes donnent des résultats similaires en termes de précision. La méthode LSCF permet de ne pas rajouter d'atomes dans le système. Cependant, elle est parfois moins robuste

<sup>87</sup> (a) Field, M.J.; Bash, P.A.; Karplus, M. *J Comput Chem* **1990**, *11*, 700. (b) Maseras F, Morokuma K *J Comput Chem* **1995**, *16*, 1170. (c) Svensson M, Humbel S, Froese RDJ, Matsubara T, Sieber S, Morokuma K *J Phys Chem* **1996**, *100*, 19357. (d) Dapprich S, Komiro I, Byun KS, Morokuma K, Frisch MJ *Theochem* **1999**, *1*, 461. (e) Kerdcharoen T, Morokuma K *Chem Phys Lett* **2002**, *355*, 257.

<sup>88</sup> (a) Ferenczy GG, Rivail J-L, Surjan PR, Naray-Szabo G *J Comput Chem* **1992**, *13*, 830 (b) Thery V, Rinaldi D, Rivail J-L, Maigret B, Ferenczy GG *J Comput Chem* **1994**, *15*, 269. (c) Assfeld X, Rivail J-L *Chem Phys Lett* **1996**, *263*, 100. (d) Ferré N, Assfeld X, Rivail J-L *J Comput Chem* **2002**, *23*, 610.

que la méthode du « Link Atom » : les énergies calculées sont plus sensibles à la taille de la zone QM, à la valeur des charges MM pour les atomes frontières de la zone MM, et au choix de la population électronique pour les orbitales gelées. Ainsi, pour un système avec une petite zone QM ou si les atomes frontières traités classiquement ont une charge importante, la méthode « Link Atom » est préférable. Si la frontière est suffisamment loin du lieu des transformations chimiques, et les atomes frontières en MM ont une petite charge, alors les deux méthodes sont équivalentes, mais la méthode LSCF est plus simple car il n'est pas nécessaire d'introduire des contraintes à la frontière pour maintenir les propriétés géométriques. Cependant, elle est très longue à correctement paramétrer, et il faut recommencer la paramétrisation pour chaque système.

D'un point de vue énergétique, il existe principalement deux méthodes en QM/MM. La première est une méthode additive telle que :

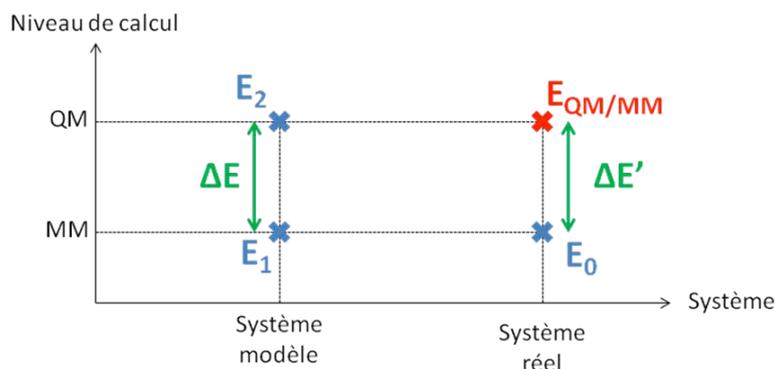
$$E_{QM/MM} = E_{QM} + E_{MM}$$

Tous les atomes sont pris en compte dans le calcul de l'énergie, y compris ceux qui sont figés dans l'optimisation. Il s'agit de la méthode la plus simple.

Une autre méthode a été envisagée, appelée ONIOM (Our Own N-layered Integrated MO and MM).<sup>89</sup> Cette méthode soustractive n'est pas spécifique à la QM/MM, elle peut également être utilisée en QM/QM'. Nous présenterons ici la méthode ONIOM appliquée à la QM/MM. L'idée de cette méthode est de déterminer ce que l'on ne sait pas calculer grâce à ce que l'on sait calculer simplement. Pour cela, on travaille sur deux systèmes : le système réel et un système modèle, plus simple, et deux niveaux de calcul : un bas niveau de calcul (ici, la MM) et un haut niveau de calcul (ici, la QM).

---

<sup>89</sup> (a) Dapprich, S.; Koma'romi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1999**, 461-462,1. (b) Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D. J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 19357. (c) Vreven, T.; Mennucci, B.; da Silva, C. O.; Morokuma, K.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **2001**, 115, 62. (d) Karadakov, P. B.; Morokuma, K. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, 317, 589. (e) Rega, N.; Iyengar, S. S.; Voth, G. A.; Schlegel, H. B.; Vreven, T.; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 4210. (f) Humbel, S.; Sieber, S.; Morokuma, K. *J. Chem. Phys.* **1996**, 105, 1959. (g) Vreven, T.; Morokuma, K. *Theor. Chem. Acc.* **2003**, 109, 125. (h) Vreven, T.; Morokuma, K. *J. Comput. Chem.* **2000**, 21, 1419. (i) Hopkins, B. W.; Tschumper, G. S. *J. Comput. Chem.* **2003**, 24, 1563. (j) Vreven, T.; Byun, K. S.; Koma'romi, I.; Dapprich, S.; Montgomery, J. A. Jr.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, 2, 815.



**Figure 7 : Principe de la méthode ONIOM**

L'énergie du système modèle au bas et haut niveau de calcul sont connues, et celle du système réel au bas niveau de calcul également. En considérant le rapport d'énergie entre haut et bas niveau de calcul constant quelque soit le système, on obtient :

$$E_{QM,réel} = E_0 + \Delta E' = E_0 + \Delta E$$

$$E_{QM,réel} = E_{MM,réel} + (E_{QM,modèle} - E_{MM,modèle})$$

Ces deux méthodes (additives et soustractives) n'ont jamais été comparées, mais il est acquis qu'elles sont toutes les deux tout à fait valables. La méthode additive est évidemment la plus simple. La méthode ONIOM est cependant plus générale, puisqu'elle peut être utilisée en QM/QM', voire sur des systèmes à trois couches (QM/QM'/QM''). Mais elle est plus instable, et les optimisations sont plus longues car la jonction « Link Atom » est plus difficile à gérer.<sup>90</sup>

## IV. Conclusion

La chimie théorique est un outil de choix pour étudier les mécanismes réactionnels. La méthode la plus employée à l'heure actuelle en mécanique quantique est la DFT, qui s'appuie sur la densité électronique. Cependant, pour étudier les systèmes enzymatiques, il est nécessaire de prendre en compte l'environnement, et donc un très grand nombre d'atomes. Pour ce faire, il existe une méthode hybride qui allie les performances de la mécanique moléculaire (vitesse) à celles de la mécanique quantique (précision).

Pour l'étude des réactions ayant lieu au sein de l'ACHÉ, nous avons choisi d'utiliser cette méthodologie QM/MM afin d'avoir un modèle le plus proche de la réalité possible.

<sup>90</sup>Derat, E.; Bouquant, J. ; Humbel, S. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2003**, 632, 61.

## I. Introduction

Comme souligné dans l'introduction (chap1, §I-3), l'hydrolyse de l'acétylcholine a déjà été étudiée de nombreuses fois d'un point de vue théorique. En général, les deux principales étapes (acylation/déacylation) ont été étudiées séparément. Cependant, en 2008, Nemukhin et al. ont caractérisé le cycle complet de l'hydrolyse de l'acétylcholine (Schéma 1) en QM/MM, dont la méthode a été présentée précédemment (Chap. 2).

## II. Etude du cycle complet de l'hydrolyse de l'acétylcholine en QM/MM par Nemukhin et al.<sup>91</sup>

### II.1. Méthodologie

Pour étudier l'hydrolyse de l'acétylcholine, ils sont partis du PDB 1F8U<sup>92</sup> qui est un mutant de l'acétylcholinestérase. Dans cette structure RX, le Glu202 est remplacé par une glutamine, et l'AChE est complexée avec un peptide de fasciculine II de venin de mamba vert. Dans leur méthodologie, ils ont ôté l'inhibiteur, restauré la chaîne du Glu202 et solvaté l'enzyme. Il faut noter qu'ils ont rajouté une grande quantité de molécules d'eau par rapport à la place disponible, puisque 137 molécules d'eau ont été ajoutées aux alentours du site actif.

Ils ont utilisé la méthode QM/MM présentée précédemment. Ils ont défini la zone QM contenant l'ACh, trois molécules d'eau proches, les chaînes latérales de la triade catalytique (Ser203, His447, Glu334), les chaînes latérales du trou oxyanionique (Gly121, Gly122, Ala204), un fragment de la Ser229 qui établit une liaison hydrogène avec le Glu334 et la chaîne latérale du Glu202. Il faut déjà souligner que le découpage de leur zone QM n'est pas très heureux, puisqu'ils n'ont conservé dans cette zone que la fonction carboxylate du Glu202 (COO<sup>-</sup>) et la fonction alcool de la Ser229 (OH) alors qu'on évite en générale de couper juste derrière une fonction de ce type (Figure 1). Leurs calculs ont été réalisés en PBE0/6-31+G\*.<sup>93</sup>

---

<sup>91</sup> Nemukhin, A. V.; Lushchekina, S.; Bochenkova, A. V.; Golubeva, A. A.; Varfolomeev, S. D. *J. Mol. Mod.* **2008**, *14*, 409.

<sup>92</sup> Kryger, G., Harel, M., Giles, K., Toker, L., Velan, B., Lazar, A., Kronman, C., Barak, D., Ariel, N., Shafferman, A., Silman, I., Sussman, J.L. *Acta Crystallogr., Sect. D* **2000**, *56*, 1385.

<sup>93</sup> (a) Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724. (b) Dill, J. D.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 4233. (c) Binkley, J. S.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1977**, *66*, 879. (d) Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257. (e) Francel, M. M.; Pietro, W. J.; Hehre, W. J.; Binkley, J. S.; Gordon, M. S.; DeFres, D. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1982**, *77*, 3654.

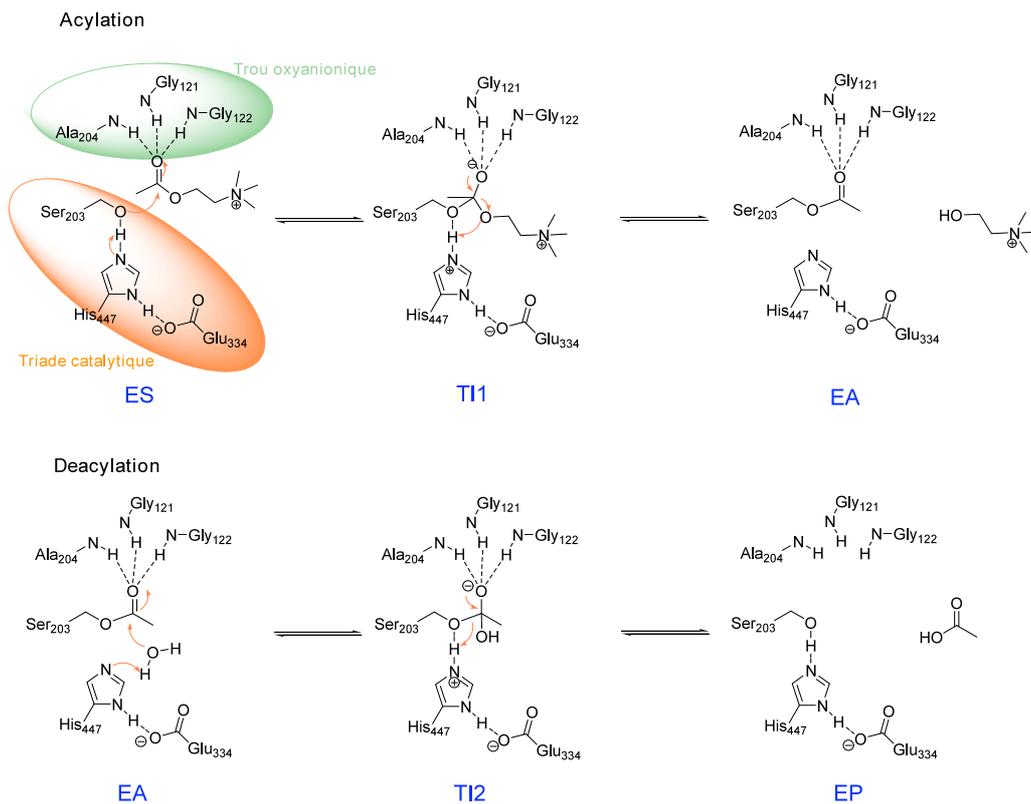


Schéma 1 : cycle complet de l'hydrolyse de l'acétylcholine

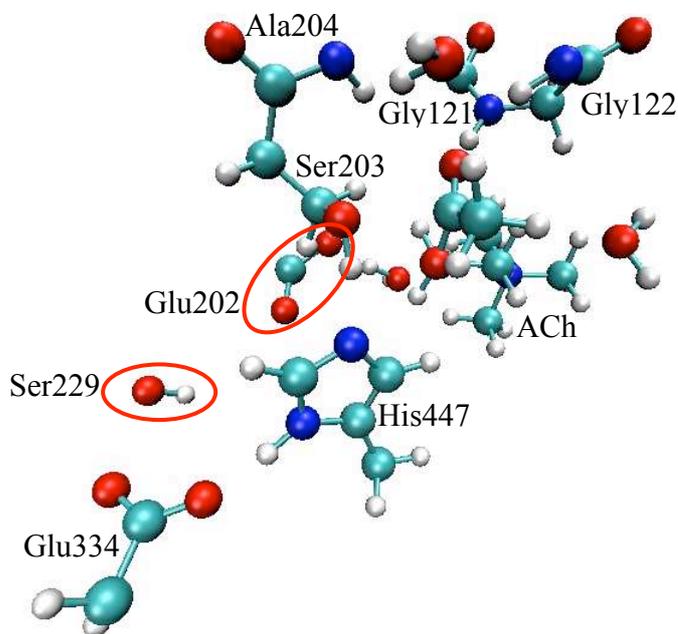


Figure 1 : Zone QM de Nemukhin et al.

## II.2. Résultats obtenus par Nemukhin et al.

Le profil qu'ils obtiennent est présenté en figure 2. Les noms des différents intermédiaires correspondent aux structures présentées sur le schéma 1.

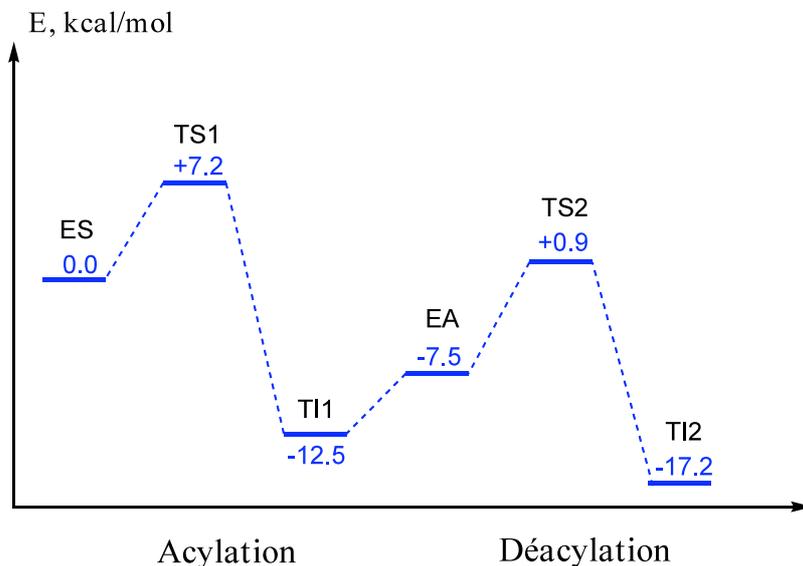


Figure 2 : profil énergétique obtenu par Nemukhin et al. en PBE0/6-31+G\*

Seuls deux états de transition ont été déterminés, ceux entre T11 et EA et entre TI2 et EP ayant été jugés trop bas pour pouvoir les localiser. La première étape de l'acylation a une barrière de 7.2 kcal/mol, ce qui correspond aux résultats obtenus par Mc Cammon et al. (+10.5 kcal/mol en MP2/6-31G(d,p)//HF/6-31G\*).<sup>94</sup> La réaction est exothermique de 12.5 kcal/mol. Durant cette étape, la sérine catalytique attaque la fonction carbonyle de l'ACh et son proton est transféré sur l'histidine simultanément. La différence énergétique entre T11 et EA est de 5 kcal/mol. La choline est libérée dans cette étape après avoir récupéré le proton de l'histidine. Les auteurs n'ont pas retiré la choline du site actif pour réaliser la déacylation, cependant, ils l'ont retournée de façon à ce que la fonction alcool établisse une liaison hydrogène avec le carboxylate du Glu202. Pour l'étape de déacylation (EA-TI2), une molécule d'eau est parfaitement positionnée entre le Glu202 et la Ser203 pour attaquer la sérine acétylée. Cette étape a une barrière de 8.4 kcal/mol, plus élevée que celle de l'acylation, ce qui correspond aux observations expérimentales. Elle est exothermique de 9.7 kcal/mol. Le produit final EP est 6.7 kcal/mol plus stable que TI2. La dernière étape correspond au départ de l'acide acétique, et à la régénération de la sérine libre.

<sup>94</sup> Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10572.

### III. Travaux effectués

L'étude de Nemukhin et al. étant la première à modéliser le cycle catalytique complet de l'ACHÉ, nous avons décidé de la reproduire pour en confirmer les résultats, ou au contraire pour en souligner les faiblesses. En effet, avant même de s'être penché précisément sur ces calculs, certaines choses semblent surprenantes dans leur méthodologie, comme la définition de leur zone QM, leur façon de solvater l'enzyme avec beaucoup trop de molécules d'eau par rapport à la place disponible, le fait qu'ils aient retourné eux-mêmes la choline pour l'étape de déacylation, prenant ainsi le risque de multiplier les conformations et donc d'invalider leur profil, etc.

#### III.1. Méthodologie

Le but de notre étude a été de reproduire les travaux de Nemukhin et al. sur le cycle catalytique de l'ACHÉ. Pour cela nous avons utilisé la méthode QM/MM présentée précédemment avec le logiciel Chemshell<sup>95</sup> qui interface Turbomole<sup>96</sup> pour la zone QM et DL\_POLY utilisant le champ de force CHARMM<sup>97</sup> pour la zone MM. La partie QM est traitée avec la fonctionnelle PBE0<sup>98</sup> et la base SVP<sup>99</sup> pour les optimisations de géométrie.

Nous avons défini notre propre zone QM comportant l'acétylcholine, des atomes de la triade catalytique (Ser203, His447, Glu334), du trou oxyanionique (Gly121, Gly122, Ala204) et des Val330 et Val331 qui stabilisent le Glu334 (Figure 3). On peut noter sur la figure 3 que peu de différences géométriques existent entre notre zone QM et celle de Nemukhin et al. Nous avons modélisé les différents produits de la réaction à différents niveaux de calculs et à partir de différentes structures cristallographiques. En effet, nous avons utilisé la même structure que les auteurs russes (PDB 1F8U), mais également les structures dont nous sommes partis pour l'étude sur le tabun, à savoir les PDB 2C0P<sup>100</sup> et 3DL7<sup>101</sup>. Ces structures correspondent à l'ACHÉ inhibée par le tabun, 3DL7 étant la version corrigée de 2C0P. Nous n'avons pas solvater l'enzyme afin de rester

<sup>95</sup> Sherwood, P.; de Vries, A. H.; Guest, M. F.; Schreckenbach, G.; Catlow, C. R. A.; French, S. A.; Sokol, A. A.; Bromley, S. T.; Thiel, W.; Turner, A. J.; Billeter, S.; Terstege, F.; Thiel, S.; Kendrick, J.; Rogers, S. C.; Casci, J.; Watson, M.; King, F.; Karlsen, E.; Sjøvoll, M.; Fahmi, A.; Schäfer, A.; Lennartz, C. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2003**, *632*,

<sup>96</sup> Ahlrichs, R.; Br, M.; Hser, M.; Horn, H.; Klmel, C. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *162*, 165

<sup>97</sup> MacKerell, A. D., Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L., Jr.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E., III; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiorkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586

<sup>98</sup> Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158.

<sup>99</sup> Schäfer, A.; Horn, H.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2571.

<sup>100</sup> Ekström, F.; Akfur, C.; Tunemalm, A.-K.; Lundberg, S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 74.

<sup>101</sup> Carletti, E.; Li, H.; Li, B.; Ekström, F.; Nicolet, Y.; Loiodice, M.; Gillon, E.; Froment, M. T.; Lockridge, O.; Schopfer, L. M.; Masson, P.; Nachon, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16011.

dans les conditions de notre étude sur le tabun, présentée par la suite.

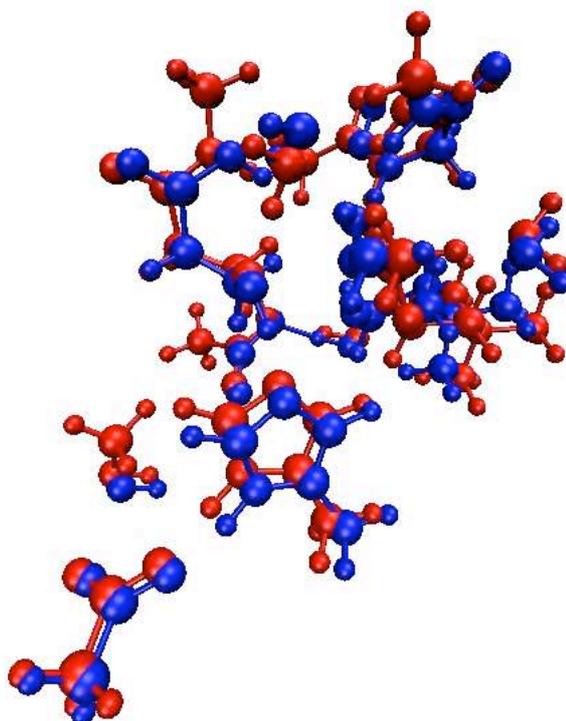


Figure 3 : Superposition de la zone QM de Nemukhin et al. (bleu) et de la nôtre (rouge)

### III.2. Etude de l'acylation

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'acylation, et notamment à l'aspect thermodynamique de la première étape de l'acylation (Schéma 2).

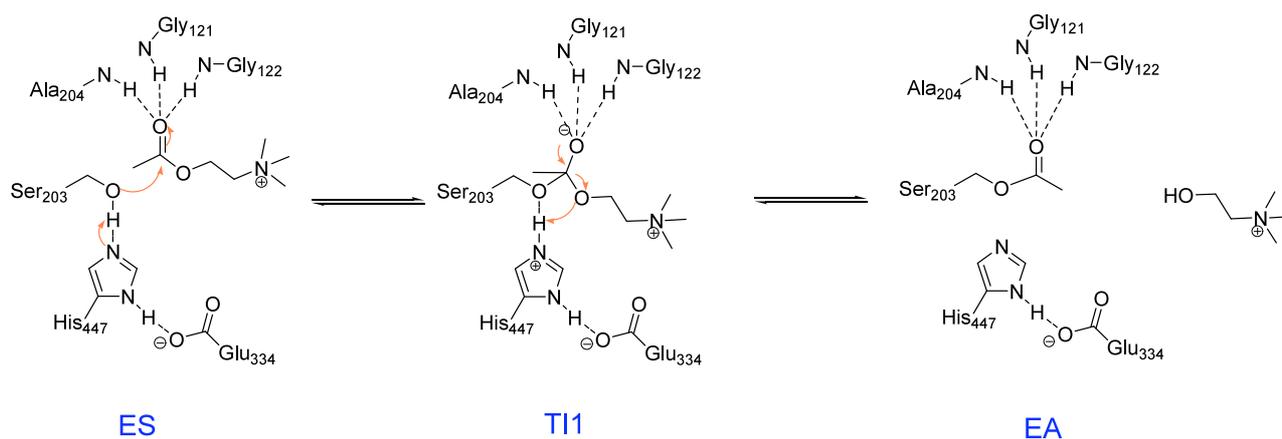


Schéma 2 : Mécanisme de l'acylation de l'ACHE

Les énergies relatives de TI1 par rapport à ES, caractérisant l'exothermicité de la première étape de l'acylation, sont présentées sur le tableau 1. On peut d'ores et déjà remarquer que le caractère

exothermique dépend fortement de la structure cristallographique de départ puisque la réaction est globalement endothermique avec 2C0P (+1.73 kcal/mol en PBE0/TZVP//BP86/TZVP), alors qu'elle est exothermique avec 1F8U quel que soit le niveau de calcul (-12.24 kcal/mol en PBE0/TZVP//BP86/TZVP). Avec 3DL7, la réaction est exothermique mais moins fortement qu'avec 1F8U (-1.70 kcal/mol en PBE0/TZVP//BP86/TZVP). Ainsi, même de faibles différences structurales au niveau de l'enzyme peuvent entraîner de grandes variations au niveau des énergies obtenues. Ceci est vraiment flagrant si l'on regarde l'exothermicité avec les PDB 2C0P et 3DL7, pour lesquels les différences géométriques sont très faibles puisqu'il s'agit de la même structure cristalline corrigée. En effet, l'un présente un profil endothermique alors que l'autre exothermique. Il convient donc de rester prudent face aux profils obtenus, et de travailler en comparatif par rapport à un étalon interne et non en absolu.

Il y a également une influence de la fonctionnelle : le caractère exothermique de la réaction est plus important en PBE0/SVP qu'en BP86/TZVP (-14.11 kcal/mol vs -9.98 kcal/mol pour le PDB 1F8U). Les simples points PBE0/TZVP//BP86/TZVP ont des valeurs énergétiques intermédiaires. Il est donc nécessaire de vérifier chaque calcul par des simples points PBE0/TZVP pour tester la robustesse de nos résultats.

	Niveau de calcul	QM	QM/MM
<b>1F8U + H<sub>2</sub>O (Nemukhin et al.)</b>	PBE0/6-31+G*	/	-12.50
	BP86/TZVP	-9.33	-9.98
<b>1F8U<sup>(a)</sup></b>	PBE0/SVP	-12.97	-14.11
	PBE0/TZVP//BP86/TZVP	-11.33	-12.24
<b>2C0P<sup>(a)</sup></b>	BP86/TZVP	-0.92	2.95
	PBE0/SVP	-8.05	-2.23
	PBE0/TZVP//BP86/TZVP	-3.97	1.73
<b>3DL7<sup>(a)</sup></b>	BP86/TZVP	2.21	-0.81
	BP86/SVP	-3.39	-4.53
	PBE0/SVP	-5.17	-6.31
	PBE0/TZVP//BP86/TZVP	-0.34	-1.70

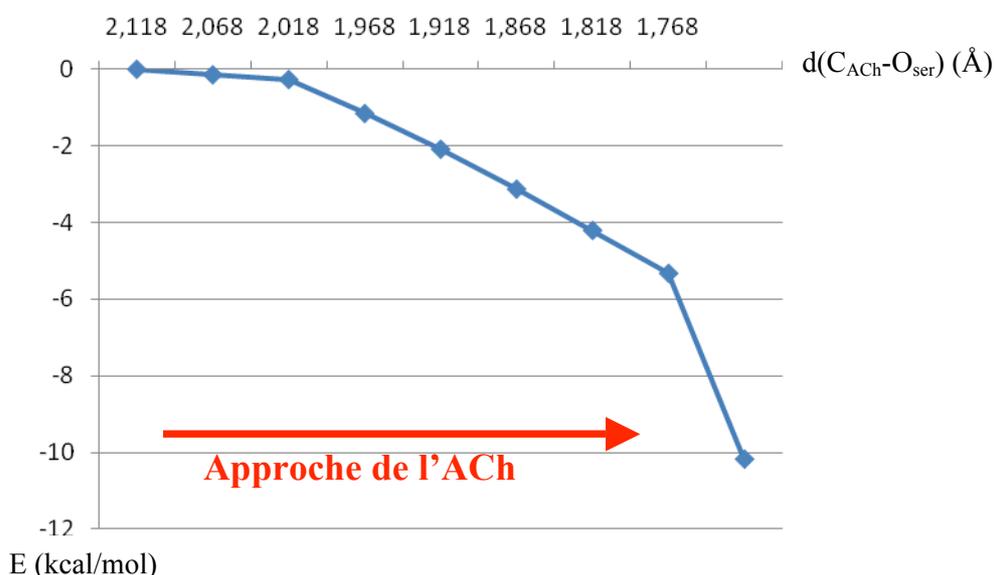
**Tableau 1 : Energie relative de T11 par rapport à ES (Schéma1) en kcal/mol. <sup>(a)</sup> Notre travail**

Si l'on se penche maintenant sur le profil énergétique de la première étape de l'acylation (ES-T11), nos résultats sont encore une fois différents de ceux de Nemukhin et al. (Tableau 2).

	Niveau de calcul	TS1
<b>1F8U + H<sub>2</sub>O</b> (Nemukhin et al.)	PBE0/6-31+G*	7.20
<b>1F8U<sup>(a)</sup></b>	PBE0/SVP	Sans barrière
<b>3DL7<sup>(a)</sup></b>	PBE0/SVP	3.73

**Tableau 2 : barrières énergétiques de la première étape de déacylation (ES-TI1) en kcal/mol. <sup>(a)</sup> Notre travail**

En effet, ils observent une barrière de 7.2 kcal/mol alors qu'avec le même PDB nous avons un profil sans barrière énergétique, comme on peut le voir sur la figure 4. La barrière est également plus faible que celle publiée avec le PDB 3DL7 (+3.73 kcal/mol).



**Figure 4 : Scan de l'approche de l'oxygène de l'ACh sur l'oxygène de la sérine (E en kcal/mol, BP86/TZVP)**

Nous nous sommes par la suite focalisés sur le PDB 1F8U afin de nous mettre dans les conditions les plus proches de celle de la publication. Nous avons continué notre étude comparative avec la déacylation, afin de noter les éventuelles différences et essayer de les expliquer.

### III.3. Etude de la déacylation

Le profil que nous avons obtenu pour l'acylation est très différent de ce que les auteurs ont observé (Schéma 3). Notamment, dans le produit de l'acylation (EA), nous n'avons aucune molécule d'eau suffisamment proche de la triade catalytique pour faire la réaction de déacylation.

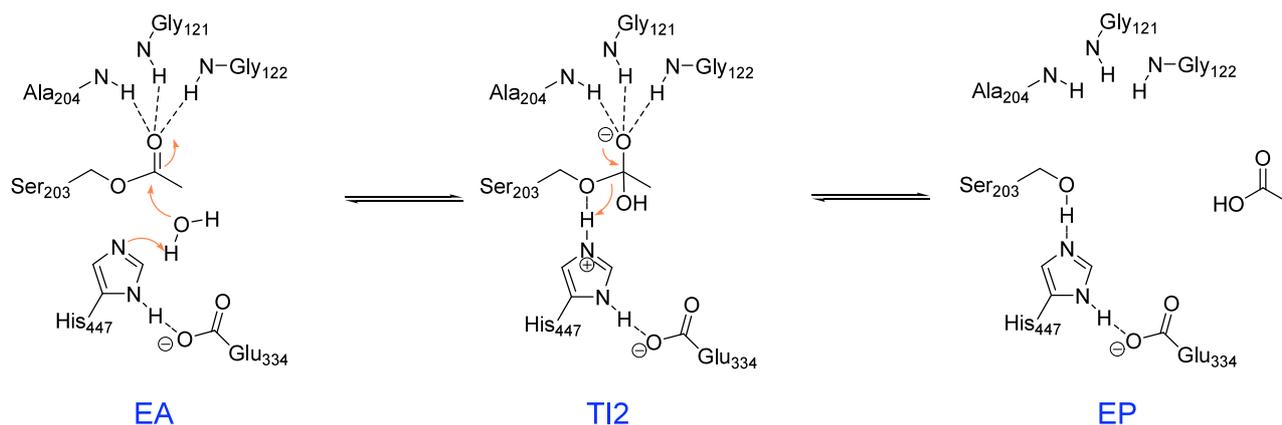


Schéma 3 : Mécanisme de la déacylation de l'AChE

Afin d'étudier quand même cette réaction de déacylation, nous avons nous-mêmes déplacé une molécule d'eau pour la positionner de la même façon que Nemukhin et al. dans le site actif, entre le Glu202 et la Ser203 (Tableau 3).

	EA	TS2	TI2	EP
<b>1F8U + H<sub>2</sub>O</b> (Nemukhin et al.)	0.00	8.40	-9.70	-16.40
<b>1F8U<sup>(a)</sup></b>	0.00	8.27	0.92	-6.71

 Tableau 3 : Energie des intermédiaires de la déacylation en kcal/mol (PBE0/SVP). <sup>(a)</sup> Notre travail

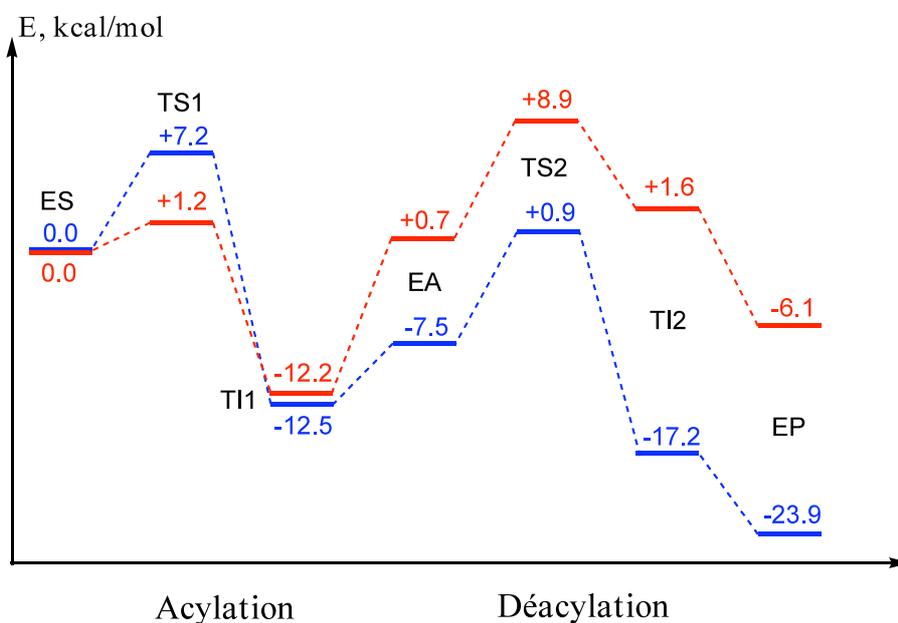
Pour l'étape EA-TI2, nous observons une barrière de 8.27 kcal/mol, ce qui est assez proche de ce que Nemukhin et al. ont obtenu. Par contre, la réaction dans notre cas est légèrement endothermique. Le produit EP, lorsque l'acide acétique a été éliminé, est moins stable dans notre cas que dans celui des auteurs (-6.71 kcal/mol vs -16.40 kcal/mol). Il semble donc que lorsqu'une molécule d'eau est bien positionnée, le profil de la réaction soit assez stable quel que soit l'état de solvation de l'enzyme et la position exacte de cette molécule d'eau, puisque nous n'avons pas à ce stade les coordonnées cartésiennes des structures optimisées des auteurs russes.

### III.4. Comparaison acylation et déacylation (PDB 1F8U)

Si l'on compare le profil complet de l'hydrolyse de l'AChE que nous avons obtenu, avec la molécule d'eau correctement placée entre le Glu202 et la Ser203 dès le départ, les différences entre les résultats de Nemukhin et les nôtres sont bien mises en évidence (Figure 4).

En effet, nous n'avons pas du tout le même profil pour la première étape (barrière plus basse dans notre cas, différence énergétique entre TI1 et EA plus importante), et si la barrière de la première

étape de la déacylation (EA-TI2) est similaire dans les deux cas, la réaction n'en reste pas moins endothermique dans notre cas et pas chez les auteurs russes (+0.92 kcal/mol vs -9.7 kcal/mol). Ainsi, malgré des différences géométriques faibles, comme on peut le voir sur la Figure 5 montrant les zones QM superposées, les énergies obtenues sont très différentes.

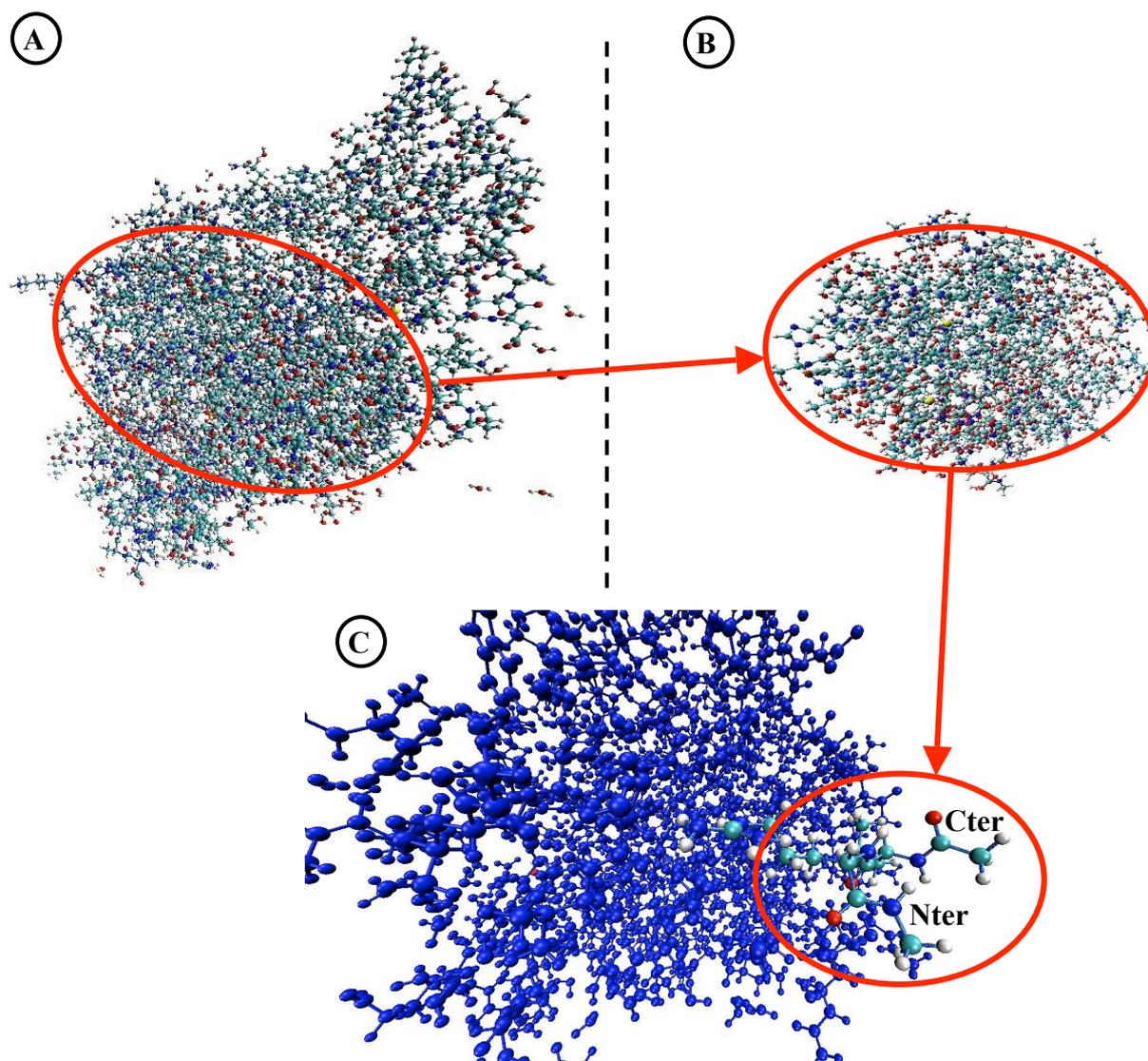


**Figure 5 : profils énergétiques de l'hydrolyse de l'acétylcholine. Bleu : Profil obtenu par les auteurs russes, Rouge : Profil obtenu par nos soins**

Ainsi, il est clair que nous ne sommes pas capables de reproduire les résultats observés par les auteurs russes sans avoir leur structure au départ. Nous les avons donc contactés pour qu'ils nous envoient leurs structures, ce qu'ils ont accepté. Nous avons repris notre étude à partir de leurs structures afin de déterminer si les différences observées proviennent de ces structures (positionnement de l'acétylcholine, des molécules d'eau), ou s'il y a également un problème de méthodologie.

### III.5. Etude à partir des structures de Nemukhin et al.

La première observation sur leurs structures est qu'ils ont coupé des résidus de l'enzyme pour limiter la taille du système. Ils ont ainsi défini une sphère d'environ 25 Å autour du site actif, et ont enlevé tous les résidus en dehors de cette sphère (Figure 6). Pour compenser les résidus coupés à l'extérieur, ils ont rajouté des C et des N terminaux non chargés. Ne voyant pas la nécessité de faire cette coupure, nous avons décidé de conserver l'enzyme entière pour mener notre étude.



**Figure 6 : Représentation de l'AcHe. A : enzyme non tronquée que nous avons utilisée pour nos, B : calculs enzyme utilisée par Nemukhin et al. coupée selon une sphère, C : C et N terminaux ajoutés par Nemukhin et al.**

La seconde observation est que la choline a complètement été retournée entre T11 et EA pour former une liaison hydrogène entre la choline et le Glu202, ce qui risque d'entraîner des différences conformationnelles au niveau du site actif, et ainsi de perturber les profils obtenus (Figure 7). Néanmoins afin de retrouver leurs résultats, nous avons suivi leur démarche.

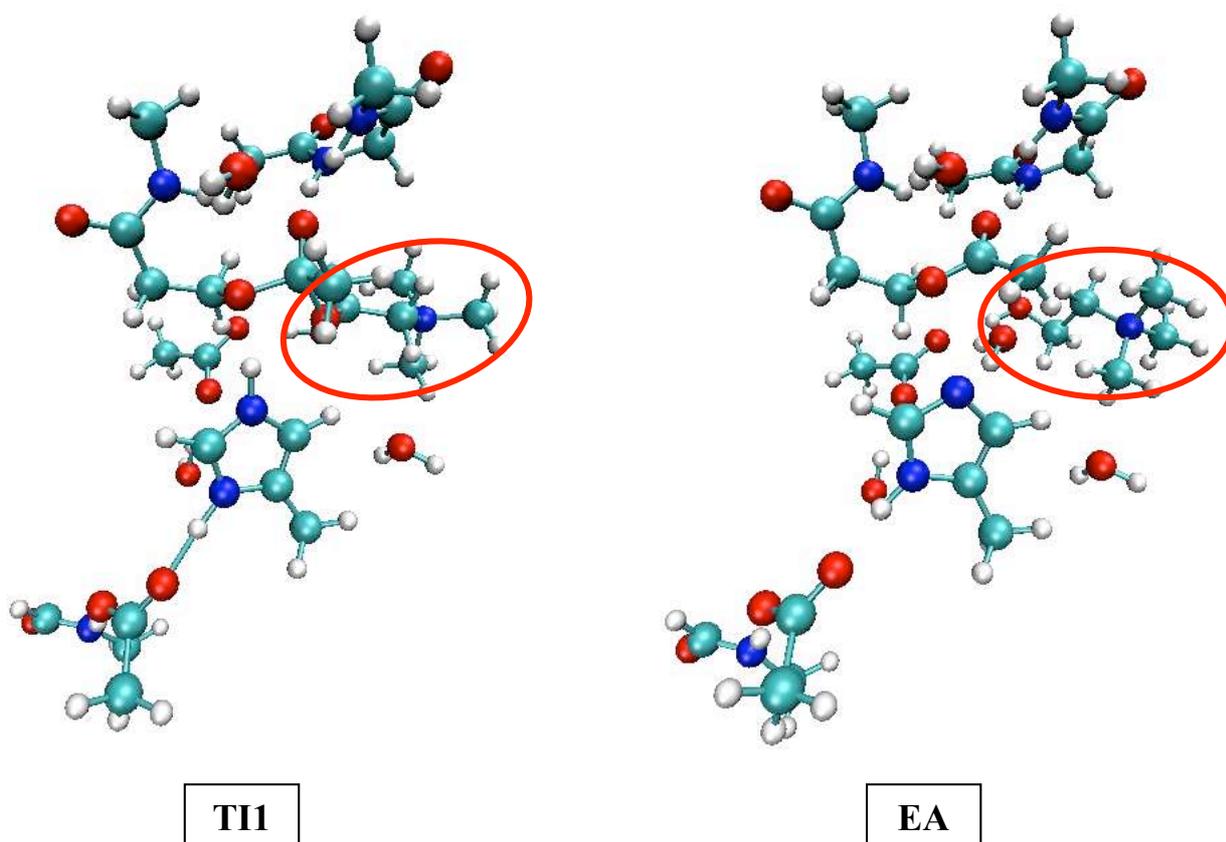


Figure 7 : Position de la choline dans les intermédiaires TI1 et EA de Nemukhin et al.

La première chose que nous avons testée est l'optimisation des intermédiaires obtenus par Nemukhin et al. sans modification à partir de leurs fichiers PDB (Tableau 4). Nous avons repris leurs fichiers PDB, et nous avons cherché à optimiser leurs structures. Cependant, avec CHARMM nous ne pouvons pas compenser la coupure de l'enzyme par des résidus non chargés, nous avons donc compensé par des C et des N terminaux chargés.

	QM	QM/MM
ES	0.00	0.00
TI1	15.95	40.97
EA	-7.82	15.22
TI2	0.06	20.37

Tableau 4 : Energies des intermédiaires réactionnels obtenus à partir des fichiers PDB de Nemukhin et al. (PBE0/SVP)

Nous n'avons alors pas obtenu les résultats que nous attendions. S'agissant de structures déjà optimisées, l'optimisation aurait du être rapide, et nous aurions du retrouver les valeurs données dans la publication pour ces intermédiaires, ce qui n'est pas le cas. En effet, TI1 est très haut en énergie (+40.97 kcal/mol), et bien que plus stables, EA et TI2 sont également hauts en énergie

(+15.22 kcal/mol et +20.37 kcal/mol). Il faut noter aussi la grande différence entre les énergies QM et QM/MM qui indique un problème de simulation. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons rajouté des résidus chargés, ce qui crée une concentration de charges beaucoup trop importante. De plus s'agissant de l'optimisation du réactif de déacylation (EA), la molécule d'eau placée entre le Glu202 et la Ser203 pour faire la réaction ne tient pas dans notre optimisation. Elle s'éloigne de la triade catalytique, et n'est plus correctement placée pour faire la déacylation. Cependant, si l'on regarde les pas d'optimisation, on observe un long palier pour la structure avec la molécule d'eau positionnée pour la déacylation, puis celle-ci s'éloigne, et l'énergie chute (Figure 8). A partir de ce moment là, la déacylation ne peut plus avoir lieu.

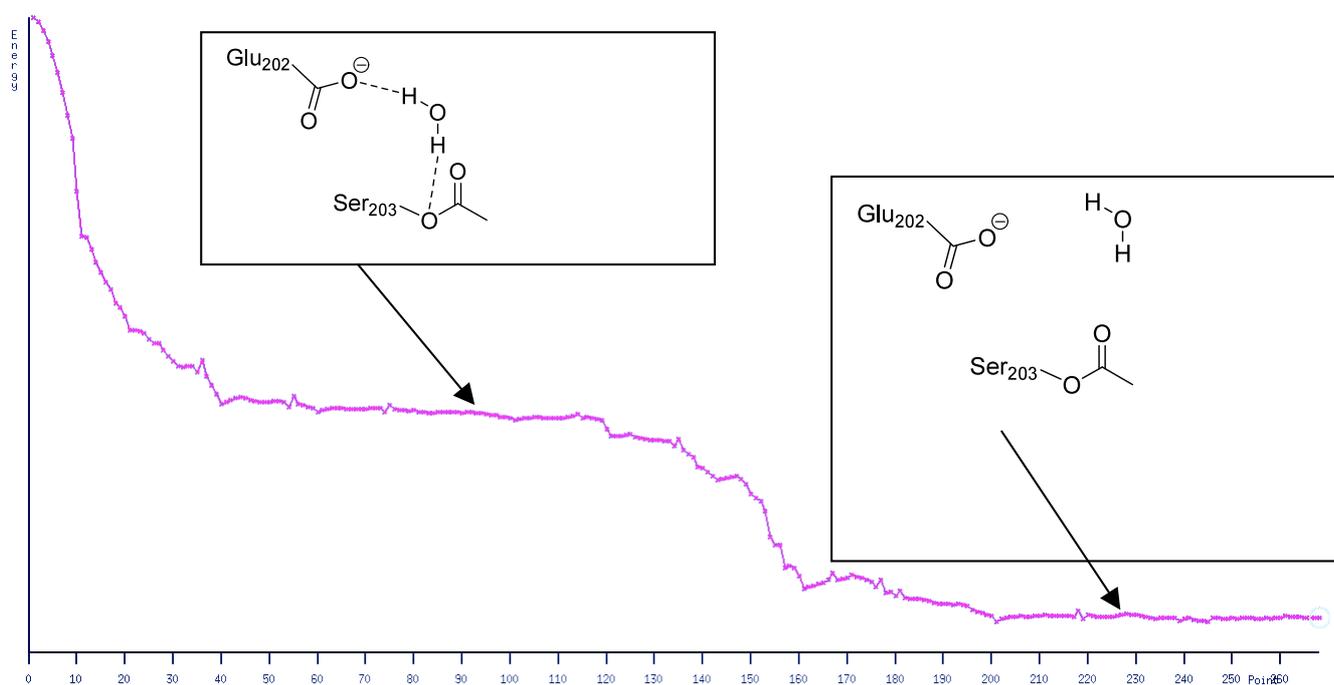
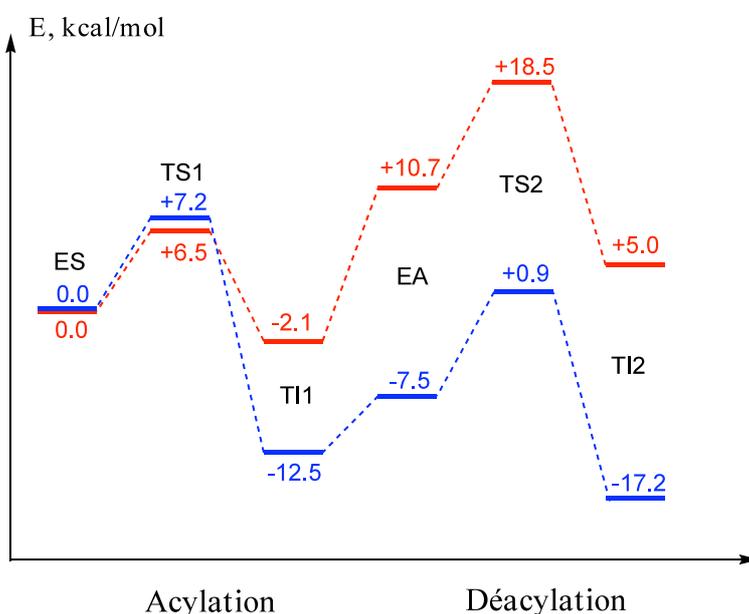


Figure 8 : Pas d'optimisation du réactif de la déacylation (EA)

Il est probable que du point de vue de l'optimisation, Nemukhin et al. aient réussi à stabiliser la structure correspondant au premier palier sur la figure 8. Comme nous n'avons pas solvato l'enzyme, il est possible que nous n'ayons pas le réseau de liaison hydrogène suffisant pour maintenir en place la molécule d'eau. Cependant, il faut aussi se rappeler qu'ils ont très fortement solvato l'enzyme puisqu'ils ont rajouté 137 molécules d'eau dans l'environnement du site actif. Pour pouvoir rajouter cette quantité de molécules d'eau, il faut avoir une densité supérieure à 1kg/L, ce qui n'est pas très réaliste. Quoiqu'il en soit, ne retrouvant pas leurs résultats par de simples optimisations, nous avons réalisé les scans à partir de leurs structures.

Nous avons du imposer des contraintes sur les molécules d'eau afin de les garder dans la même position que les auteurs russes. Nous avons donc fixé pour l'étape d'acylation la molécule d'eau

formant une liaison hydrogène avec le Glu202 proche de la Ser203, et une molécule d'eau établissant une liaison hydrogène avec l'Ala204 qui semblait avoir son importance. Grâce à ces contraintes, nous avons pu obtenir un profil proche de ce qu'ils avaient observé (Figure 9). En effet, la première étape de la déacylation (ES-TI1) a maintenant une barrière énergétique de 6.51 kcal/mol (vs 7.2 kcal/mol dans la publication). La réaction est cependant moins exothermique (-2.1 kcal/mol vs -12.2 kcal/mol), et la différence énergétique entre TI1 et EA est toujours plus importante (12 kcal/mol vs 5 kcal/mol). Ceci est peut-être dû à l'état de solvation de l'enzyme qui stabilise plus ou moins la choline libérée dans le site actif. Avec les contraintes imposées sur les molécules d'eau, la barrière énergétique pour la déacylation est tout à fait comparable à celle obtenue par Nemukhin et al. (7.8 kcal/mol vs 8.4 kcal/mol).



**Figure 9 : profils énergétiques de l'hydrolyse de l'acétylcholine à partir des structures de Nemukhin et al.**

**Bleu : Profil obtenu par les auteurs russes, Rouge : Profil obtenu par nos soins**

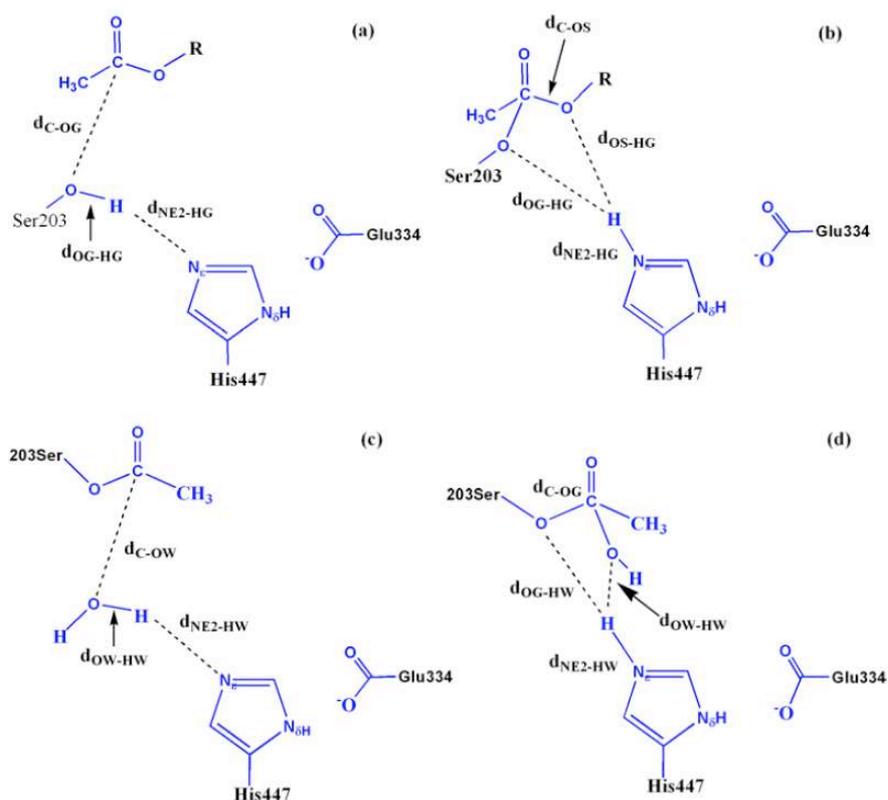
Ainsi, la méthodologie de Nemukhin et al. montre un certain nombre de faiblesses. Tout d'abord, la définition de leur zone QM n'est pas adaptée pour une méthodologie QM/MM car ils coupent leurs résidus au niveau de fonctions importantes, ce qui a une influence sur les effets électroniques. De plus, le positionnement de la choline dans l'étape de déacylation est artificielle puisqu'ils l'ont retournée de façon à faire une liaison hydrogène avec le carboxylate du Glu202. Ceci fait qu'il y a un risque d'avoir un profil incorrect car on fait intervenir différentes conformations et non les structures obtenues par optimisations lors de l'étude théorique. Enfin, leur solvation excessive fait que nous sommes obligés de mettre des contraintes si nous voulons retrouver leur profil.

Une étude récente souligne également les faiblesses de la méthodologie de Nemukhin et al. Les

auteurs se proposent ainsi de refaire l'étude du cycle catalytique complet en QM/MM couplée à la dynamique moléculaire.

#### IV. Etude de Zhang et al.<sup>102</sup>

Pour réaliser leur étude, Zhang et al. ont utilisé une méthodologie basée sur la dynamique moléculaire Born-Oppenheimer avec un potentiel ab initio QM/MM<sup>103</sup> et la méthode de l'« umbrella sampling ». <sup>104</sup> Cette méthode consiste à imposer des contraintes sur des coordonnées réactionnelles choisies par rapport à la réaction étudiée (Schéma 4), et à faire des dynamiques moléculaires sur ces structures avec une répartition QM/MM du système.



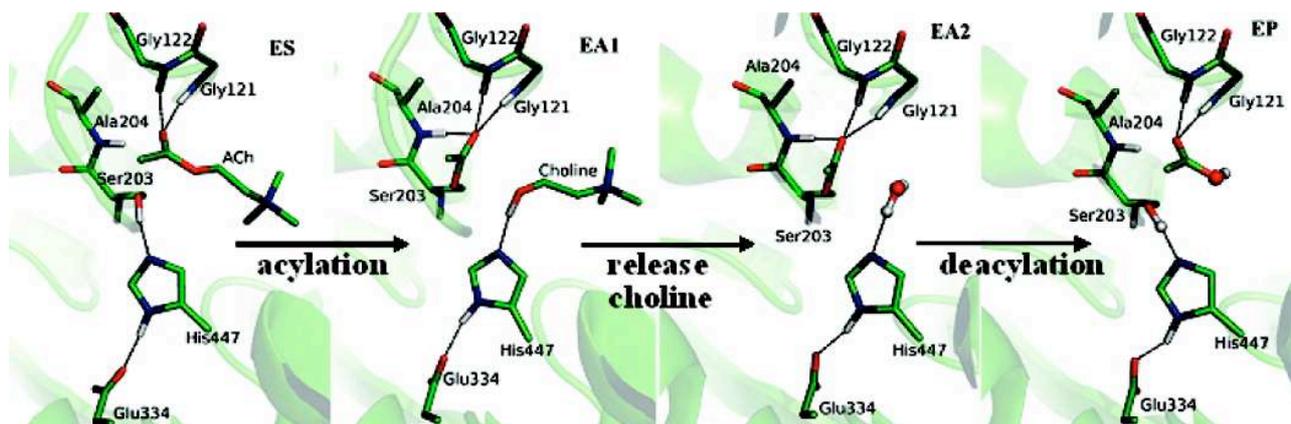
**Schéma 4 : Coordonnées réactionnelles choisies pour l'acylation et la déacylation : a) première étape de l'acylation, b) deuxième étape de l'acylation, c) première étape de la déacylation, d) deuxième étape de la déacylation**

<sup>102</sup> Yanzi Zhou, Shenglong Wang and Yingkai Zhang *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 8817.

<sup>103</sup> (a) Warshel, A.; Levitt, M. *J. Mol. Biol.* **1976**, *103*, 227. (b) Singh, U. C.; Kollman, P. A. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 718. (c) Field, M. J.; Bash, P. A.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* **1990**, *11*, 700. (d) Mulholland, A. *J. Drug Discovery Today* **2005**, *10*, 1393. (e) Zhang, Y. K. *Theor. Chem. Acc.* **2006**, *116*, 43. (f) Hu, H.; Yang, W. T. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2008**, *59*, 573. (g) Friesner, R. A.; Guallar, V. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2005**, *56*, 389. (h) Gao, J. L.; Truhlar, D. G. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2002**, *53*, 467. (i) Senn, H. M.; Thiel, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 1198.

<sup>104</sup> (a) Patey, G. N.; Valleau, J. P. *J. Chem. Phys.* **1975**, *63*, 2334. (b) Roux, B. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 275. (c) Boczeko, E. M.; Brooks, C. L. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 4509.

Leur modèle QM/MM a été préparé, après une équilibration en dynamique moléculaire, en coupant l'enzyme dans un rayon de 25 Å autour de la Ser203. Leur zone QM comporte pour l'acylation la triade catalytique et l'ACh, et pour la déacylation, la triade catalytique avec la sérine acétylée et la molécule d'eau responsable de la réaction. La choline a été retirée du site actif pour cette dernière étape. Seuls les atomes dans un rayon de 20 Å autour du centre de la réaction sont autorisés à bouger en MM. Les optimisations QM/MM ont été réalisées en B3LYP/6-31G\*.



Les zones QM étant différentes pour les deux étapes considérées, celles-ci ne peuvent être directement comparées. Elles sont donc étudiées séparément.

#### IV.1. Etude de l'acylation

Selon leurs résultats, l'acylation se déroule en deux étapes comme on peut le voir en figure 10.

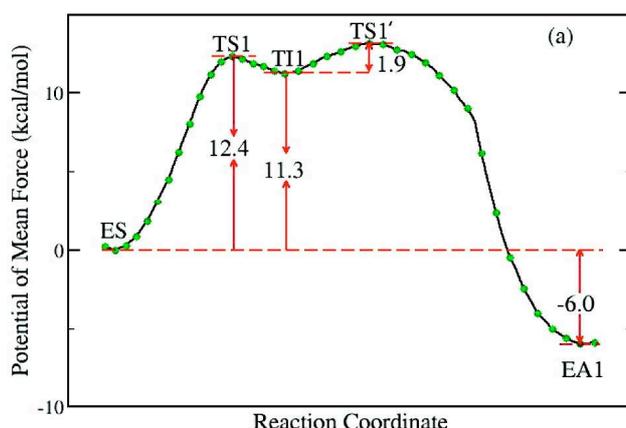


Figure 10 : Profil énergétique de l'acylation (énergie libre)

Les intermédiaires sont nommés de la même façon que précédemment. Les structures qu'ils ont obtenues sont représentées sur la figure 11. Les auteurs observent une barrière de 12.4 kcal/mol

pour la formation de T11, ce qui est cohérent avec les résultats de Mc Cammon. Il faut noter que seules deux liaisons hydrogènes avec le trou oxyanionique existent dans la structure du réactif ES. T11 par contre est stabilisé par trois liaisons hydrogènes avec les Gly121, Gly122 et l'Ala204. Durant cette étape, l'attaque de la sérine catalytique sur la fonction carbonyle de l'acétylcholine est concertée avec le transfert du proton entre la sérine et l'histidine. Cette réaction est très endothermique (+11.3 kcal/mol). T11 est dans un puits peu profond. C'est une espèce métastable. La seconde étape de l'acylation, à savoir le départ de la choline, se fait très rapidement (1.9 kcal/mol) et la réaction est fortement exothermique. Durant cette étape, le proton de l'histidine est transféré à la choline. Globalement, la réaction d'acylation est exothermique de 6 kcal/mol. Toutes ces observations sont cohérentes avec l'expérience.

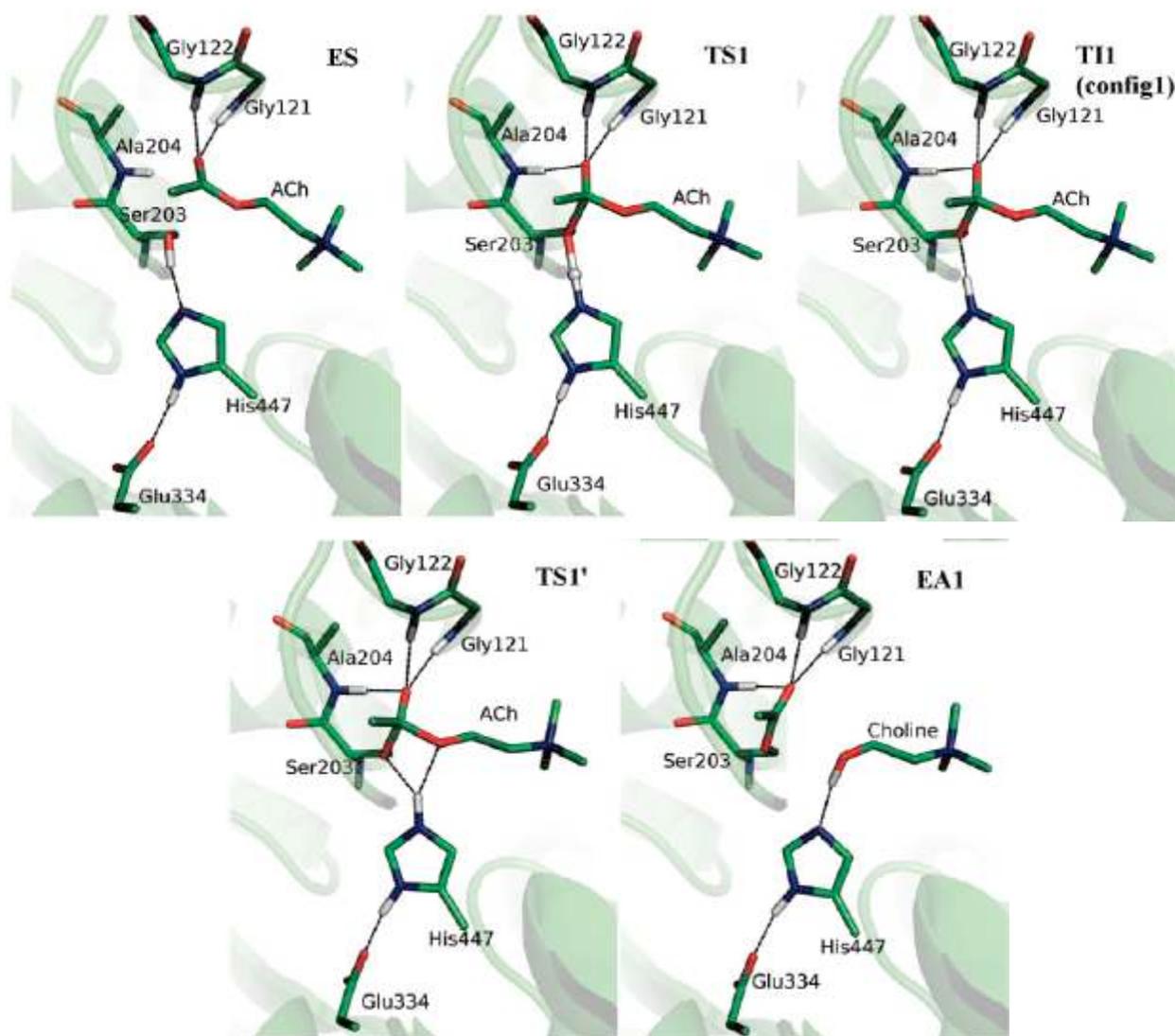


Figure 11 : Structures des différents intermédiaires et états de transition intervenant dans l'acylation

## IV.2. Etude de la déacylation

Le profil de la déacylation est très proche de celui de l'acylation (Figure 10). De la même façon, elle se déroule en deux étapes avec un intermédiaire haut en énergie dans un puits de potentiel peu profond. Il ne faut pas oublier que la choline a été retirée du site actif pour cette étape puisque l'élimination de la choline est plus rapide que la déacylation.<sup>105</sup>

Il faut noter que Zhang et al. ont étudié la déacylation avec le Glu202 déprotoné (Glu202) et protoné (Glu202H). En accord avec les observations expérimentales basées sur le pKa et sur des simulations EVB,<sup>106</sup> les barrières obtenues avec le Glu202 protoné sont 5 kcal/mol plus faibles que celles obtenues avec le Glu202 déprotoné, ce qui semble montrer que le Glu202 est protoné dans l'étape d'acylation (Figure 12). Ils ont donc réalisé cette étape avec le résidu 202 protoné.

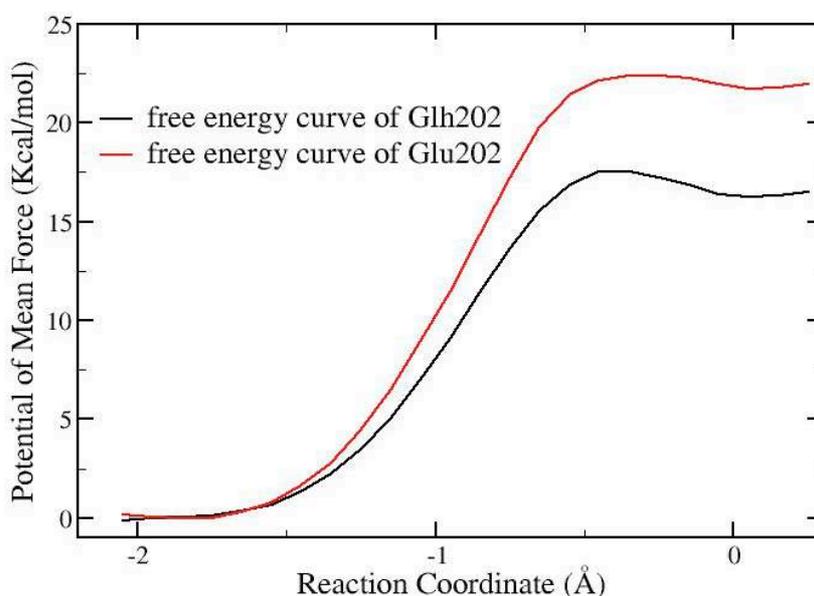


Figure 12 : Profils comparés Glu202 protoné et déprotoné

La première étape de la déacylation consiste en l'attaque de la molécule d'eau sur la fonction carbonyle de la sérine acétylée avec transfert du proton sur l'histidine. Elle a une barrière de 17.5 kcal/mol. Cette barrière est plus élevée que celle de l'acylation, ce qui va dans le sens des observations expérimentales.<sup>107</sup> Cette réaction est très endothermique (+16.3 kcal/mol), et elle est suivie de l'élimination de l'acide acétique. Cette dernière étape a une barrière de 1.7 kcal/mol, elle se fait donc très facilement une fois la fixation de la molécule d'eau réalisée. Elle est exothermique,

<sup>105</sup> (a) Froede, H. C.; Wilson, I. B.; Kaufman, H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *247*, 420. (b) Szegletes, T.; Mallender, W. D.; Thomas, P. J.; Rosenberry, T. L. *Biochemistry* **1999**, *38*, 122.

<sup>106</sup> Vagedes, P.; Rabenstein, B.; Aqvist, J.; Marelius, J.; Knapp, E. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12254.

<sup>107</sup> Froede, H. C.; Wilson, I. B. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 11010.

mais globalement la déacylation est endothermique (+2.3 kcal/mol) (Figure 13).

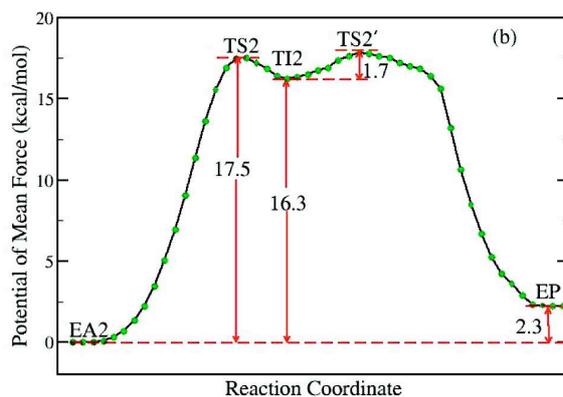


Figure 13 : Profil énergétique de la déacylation (énergie libre)

Les structures des intermédiaires et des états de transition de la déacylation sont présentés en figure 14. Le réactif de la déacylation (EA2) est stabilisé par trois liaisons hydrogène avec le trou oxyanionique. L'état de transition de la deuxième étape de la déacylation (TS2') consiste en fait simplement à un changement d'orientation de l'histidine catalytique pour favoriser le transfert du proton de l'histidine vers la sérine.

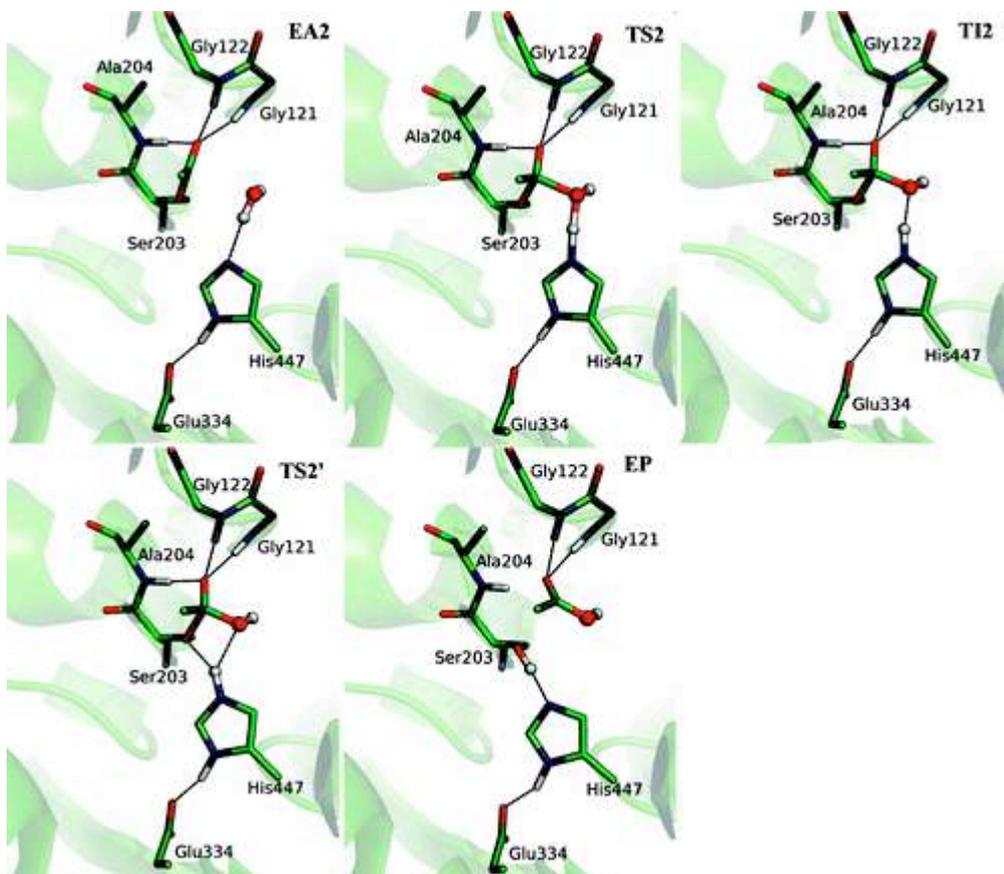


Figure 14 : Structures des différents intermédiaires et états de transition intervenant dans la déacylation

Ainsi, nous sommes d'accord avec Zhang et al. pour souligner les faiblesses de la méthodologie de Nemukhin et al. qui discréditent quelque peu leurs résultats. Cependant, nous n'obtenons pas non plus les mêmes résultats que Zhang et al. Notamment, ils ont des barrières plus élevées que les nôtres pour les deux étapes et les premières étapes de l'acylation et de la déacylation respectivement sont fortement endothermiques. Il faut cependant noter qu'ils ont réalisé la déacylation avec le Glu202 protoné, ce que nous n'avions pas fait dans un premier temps, nous empêchant ainsi de comparer directement nos résultats pour cette étape. Afin de vérifier l'influence de la protonation du Glu202 sur l'étape de déacylation, nous avons modélisé cette étape avec le Glu202 protoné et sans la choline dans le site actif. Le profil obtenu est présenté en tableau 5.

Barrière énergétique de la déacylation (kcal/mol)	
Glu202 non protoné	8.2
Glu202 protoné	7.2

**Tableau 5 : Comparaison des barrières énergétiques de la déacylation suivant l'état de protonation de Glu202 (PDB 1F8U, PBE0/SVP)**

De la même façon que Zhang et al., nous observons une barrière plus faible lorsque le Glu202 est protoné (7.2 kcal/mol vs 8.5 kcal/mol), ce qui est cohérent avec les données expérimentales. Nos barrières sont encore une fois plus faibles que celles obtenues par Zhang et al.

Egalement, dans l'étude de Zhang et al., la définition de la zone QM change entre les deux étapes empêchant toute comparaison entre celles-ci, et donc toute comparaison complète du mécanisme d'hydrolyse de l'ACh par l'AChE. Les barrières plus élevées de Zhang et al. peuvent s'expliquer notamment par le fait qu'ils travaillent en énergie libre ( $\Delta G$ ) de par leur méthodologie basée sur la dynamique moléculaire, contrairement à nous qui ne travaillons qu'avec les enthalpies ( $\Delta H$ ). En effet,  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ , la différence d'énergie provient donc de l'entropie. Or, dans notre système, nous réduisons le nombre de degrés de liberté en formant des liaisons. Le système final est plus ordonné que le système initial, il y a donc diminution de l'entropie. Ainsi,  $\Delta S < 0$  et  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S > \Delta H$ .

## V. Conclusion

Tout le monde s'accorde sur le profil général de l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase : celle-ci se déroule en deux principales réactions (acylation et déacylation) se décomposant chacune en deux étapes. La première étape de la déacylation est cinétiquement déterminante (Schéma 5).

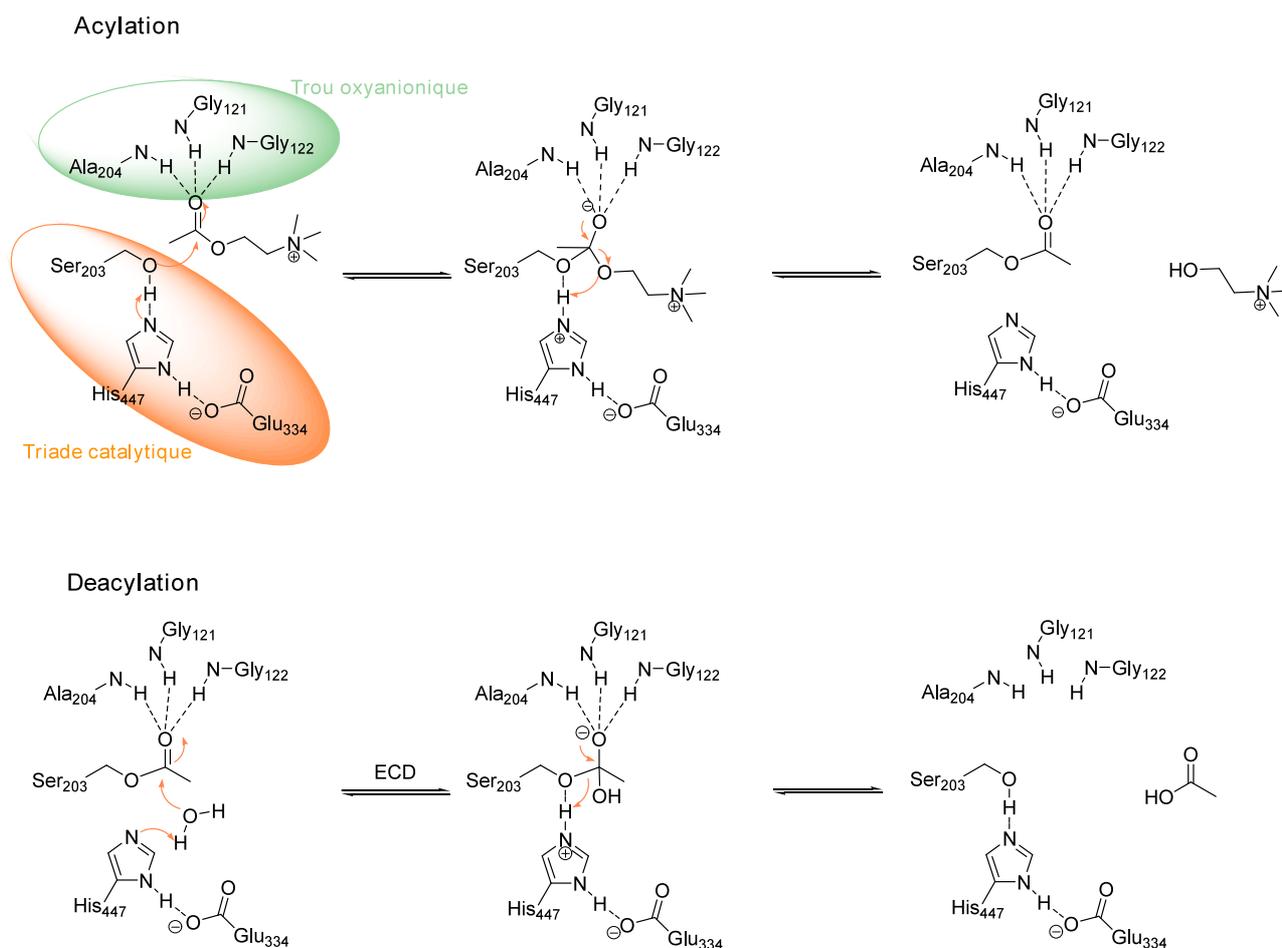


Schéma 5 : Mécanisme d'hydrolyse de l'ACh par l'AcHE

Par contre, les différents profils divergent beaucoup d'un point de vue quantitatif (barrières énergétiques, caractère exothermique). Ceci peut venir des différentes méthodologies employées (Tableau 6), mais aussi du fait que l'AcHE soit une enzyme très flexible.

	Nemukhin	Zhang	Nous
<b>Avantages</b>	Surface en un seul bloc	Dynamique moléculaire Energie libre	Surface en un seul bloc Pas de coupure de l'enzyme Pas de solvatisation
<b>Inconvénients</b>	Coupure de l'enzyme Solvatisation excessive Retournement de la choline	Surface en deux blocs	Enthalpie Retournement de la choline

Tableau 6 : Avantages et inconvénients des différentes méthodologies employées

Ainsi, selon la structure de départ, le degré de solvatisation et la définition du système, les résultats obtenus peuvent être très différents. Le système semble extrêmement dynamique et de nombreuses zones d'ombres persistent telles que l'état de protonation de certains résidus, le nombre de molécules d'eau et leur rôle... En effet, les molécules d'eau que nous utilisons pour nos

optimisations proviennent de la structure cristallographique, et donc sont des molécules d'eau cristallines, mais il est possible, voire probable que dans l'organisme elles ne soient pas au même endroit, et qu'elles bougent rapidement. On voit nettement dans cette étude comparative que selon la méthode de calcul employée, les résultats sont différents, les barrières énergétiques bougent beaucoup ce qui semble être une caractéristique de l'AChE. La rigidité de son site actif n'est pas très importante ce qui est un défi pour la traiter en chimie théorique. Ceci implique que nous ne pouvons pas faire de modélisation quantitative avec cette enzyme. Mais il est bien sûr possible de travailler comparativement, et donc qualitativement, sur un système défini, comme nous l'avons fait par la suite avec le tabun.

## **CHAPITRE 4**

# **ETUDE THEORIQUE DE L'INHIBITION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE PAR LE TABUN**

## I. Introduction

### I.1. Réactivité du tabun au sein de l'AChE

Comme souligné dans l'introduction générale (Chap.1, §II-3), le tabun inhibe de façon irréversible l'AChE par substitution nucléophile sur la sérine de la triade catalytique. Ainsi, l'AChE ne peut plus fonctionner, ce qui entraîne des troubles importants pouvant aller jusqu'à la mort. Des traitements à base des nucléophiles puissants tels que les oximes existent mais restent quasiment inefficaces face à une intoxication au tabun. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier précisément le complexe AChE-tabun. En étudiant la fixation du tabun au sein de l'AChE, nous cherchons ainsi à mettre en évidence les paramètres qui régissent la réactivité du tabun dans le site catalytique de l'AChE, et notamment l'influence de l'amine tertiaire fixée sur le phosphore (en orange sur le schéma 1) et du groupe partant (en bleu sur le schéma 1) qui sont les deux particularités structurales du tabun.

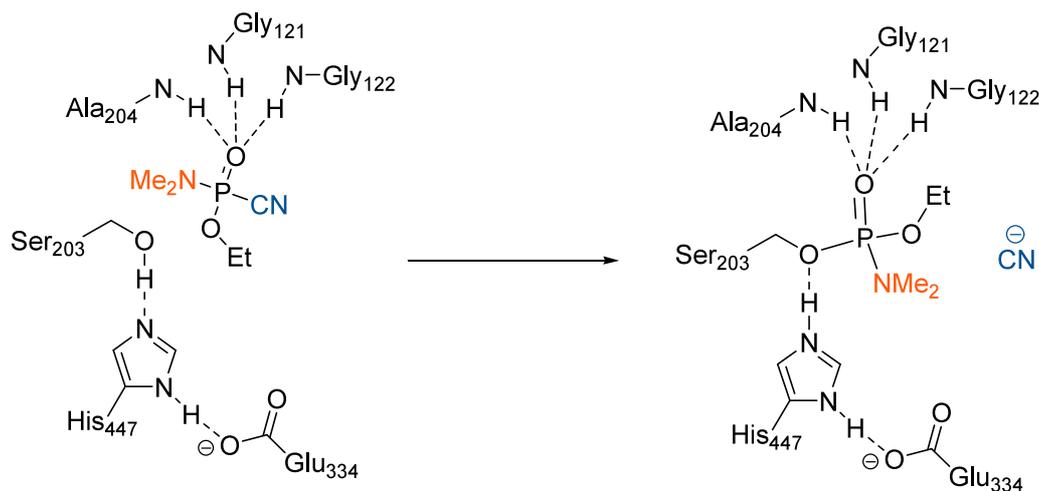


Schéma 1 : Inhibition de l'AChE par le tabun

Nous nous sommes donc intéressés à la fixation du tabun sur l'AChE, et plus précisément à la détermination de l'isomère le plus actif du tabun, afin de comprendre les causes de la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis de ces isomères. Les isomères les plus actifs ont été identifiés pour plusieurs organophosphorés tels que le sarin ou le soman.<sup>108</sup>

C'est également le cas pour le tabun. Dès 1986, Benschop et al. se sont penchés sur l'isolation et

<sup>108</sup> Spruit, H.E.T.; Langenberg, J. P.; Trap, H. C.; van der Wiel, H. J.; Helmich, R. B.; van Helden, H. P. M.; Benschop, H. P. *Toxicol. and appl. pharmacol.* **2000**, 169, 249.

l'étude des propriétés des deux énantiomères du tabun.<sup>109</sup> Pour cela, ils ont utilisé une méthode de complexation énantiospécifique utilisant la chromatographie en phase gaz. Ils ont ainsi séparé et identifié les deux énantiomères, lévogyre et dextrogyre. Il avait auparavant été montré que les phosphorylphosphatases hydrolysaient l'isomère le plus actif du tabun, qui se trouve être le lévogyre selon l'étude de Benschop. Ainsi, ils soulignent que le (-)-tabun est 6.3 fois plus actif que le (+)-tabun, à savoir que les constantes d'inhibition respectives sont de  $3.9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$  et  $0.62 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ . Cependant, la configuration absolue des isomères lévogyre et dextrogyre n'a jamais été attribuée. Récemment, il est apparu qu'en fait la différence d'activité entre les deux isomères serait beaucoup plus importante.<sup>110</sup> En effet, les énantiomères obtenus par Benschop en 1986 contiendraient des impuretés, ce qui aurait faussé les résultats. Worek et al. les ont donc de nouveau séparés, et testés. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1. Il semble donc que le (-)-tabun est environ 300 fois plus actif que le (+)-tabun.

Enzyme	(-)-tabun	(+)-tabun	$k_{i(-)\text{-tabun}}/k_{i(+)\text{-tabun}}$
AChE humaine	$(2.77 \pm 0.107) \times 10^7$	$(7.02 \pm 1.15) \times 10^4$	395
AChE de porc	$(6.52 \pm 0.183) \times 10^6$	$(2.92 \pm 0.303) \times 10^4$	224

Tableau 1 : Constantes d'inhibition des deux énantiomères du tabun (en  $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ )

## 1.2. Règles de Cahn-Ingold-Prelog pour le phosphore

Afin de pouvoir étudier la fixation des différents isomères du tabun dans le site actif, il faut déterminer la configuration absolue sur le phosphore.

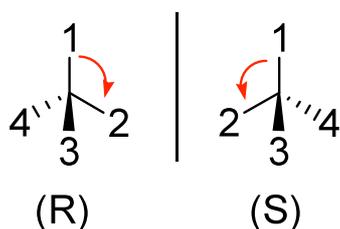
Les règles de Cahn-Ingold-Prelog sont la base pour déterminer la configuration d'un carbone. Elles permettent de classer les différents substituants tels que :

- Le substituant prioritaire est celui dont l'atome directement lié (une liaison) au centre stéréogène possède le numéro atomique Z le plus grand.
- Quand deux substituants sont liés au centre stéréogène par des atomes identiques, on compare entre eux les atomes situés à la proximité suivante (deux liaisons) et on applique la règle précédente à cette proximité. S'ils sont identiques, on poursuit la comparaison dans les proximités suivantes de la ramification prioritaire.
- Les liaisons multiples sont comptées comme autant de liaisons simples, et chaque atome engagé dans une liaison multiple est répété autant de fois qu'il est lié dans cette liaison.

<sup>109</sup> Degenhardt, C. E. A. M.; Van Den Berg, G. R.; De Jong, L. P. A.; Benschop, H. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 8291.

<sup>110</sup> Tenberken, O.; Thiermann, H.; Worek, F.; Reiter, G. *Toxicol. Lett.* **2010**, *195*, 142.

Ainsi, pour un atome de carbone, une fonction carbonylée est prioritaire sur un éther ou un alcool. Une fois les substituants classés, la configuration peut être déterminée telle que :



Le même type de règles s'applique dans le cas du phosphore de géométrie tétraédrique, à l'exception du fait que la double liaison avec l'oxygène perd sa priorité sur les éthers ou les alcools. Ainsi, par convention, une fonction éther est prioritaire dans le cas du phosphore, soit : P-OR > P=O.<sup>111</sup> On peut donc définir les deux énantiomères du tabun (Schéma 2). A partir de là, nous avons pu définir notre modèle théorique.

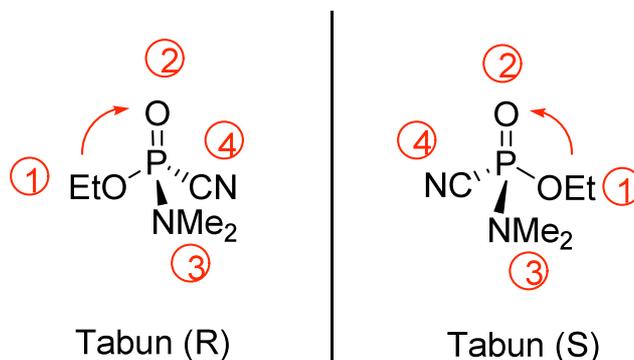


Schéma 2 : Représentation des deux énantiomères du tabun

## II. Description du modèle utilisé

Le but de notre étude a été de modéliser en QM/MM les approches de différents isomères du tabun afin de déterminer la plus favorable, et ainsi l'isomère le plus actif. Pour cela nous avons utilisé la méthode QM/MM présentée précédemment avec le logiciel Chemshell<sup>112</sup> qui interface Turbomole<sup>113</sup> pour la zone QM et DL\_POLY utilisant le champ de force CHARMM<sup>114</sup> pour la zone

<sup>111</sup> Frank R. Hartley, *The chemistry of organophosphorus compounds*, Wiley, **1990**.

<sup>112</sup> Sherwood, P.; de Vries, A. H.; Guest, M. F.; Schreckenbach, G.; Catlow, C. R. A.; French, S. A.; Sokol, A. A.; Bromley, S. T.; Thiel, W.; Turner, A. J.; Billeter, S.; Terstege, F.; Thiel, S.; Kendrick, J.; Rogers, S. C.; Casci, J.; Watson, M.; King, F.; Karlsen, E.; Sjøvoll, M.; Fahmi, A.; Schäfer, A.; Lennartz, C. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2003**, 632,

<sup>113</sup> Ahlrichs, R.; Bär, M.; Häser, M.; Horn, H.; Kölmel, C. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 162, 165

<sup>114</sup> MacKerell, A. D., Jr.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L., Jr.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E., III; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.;

MM. La partie QM est traitée avec la fonctionnelle BP86<sup>115</sup> avec l'approximation RI et une base triple- $\zeta$  (TZVP)<sup>116</sup> pour les optimisations de géométrie. En prenant en considération la taille du système, BP86 est un bon compromis entre le temps de calcul et la précision. Des simples points en énergie ont également été réalisés avec B3LYP<sup>117</sup>, ou, pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux de Nemukhin<sup>118</sup>, avec PBE0<sup>119</sup> pour vérifier la validité des résultats obtenus avec BP86.

Au niveau de l'étude de la fixation du tabun sur le phosphore, on peut définir quatre attaques différentes sur la sérine. En effet, chaque énantiomère peut approcher la sérine avec le groupe partant en *syn* ou en *anti* par rapport à l'oxygène de celle-ci. Les quatre approches sont représentées sur le schéma 3. Elles seront par la suite notées :

- R-Anti : tabun (*R*) avec le groupe cyano en *anti* par rapport à la Ser203 (noté RA sur les schémas)
- R-Syn : tabun (*R*) avec le groupe cyano en *syn* par rapport à la Ser203 (noté RS sur les schémas)
- S-Anti : tabun (*S*) avec le groupe cyano en *anti* par rapport à la Ser203 (noté SA sur les schémas)
- S-Syn : tabun (*S*) avec le groupe cyano en *syn* par rapport à la Ser203 (noté SS sur les schémas)

---

Watanabe, M.; Wiorcikiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586

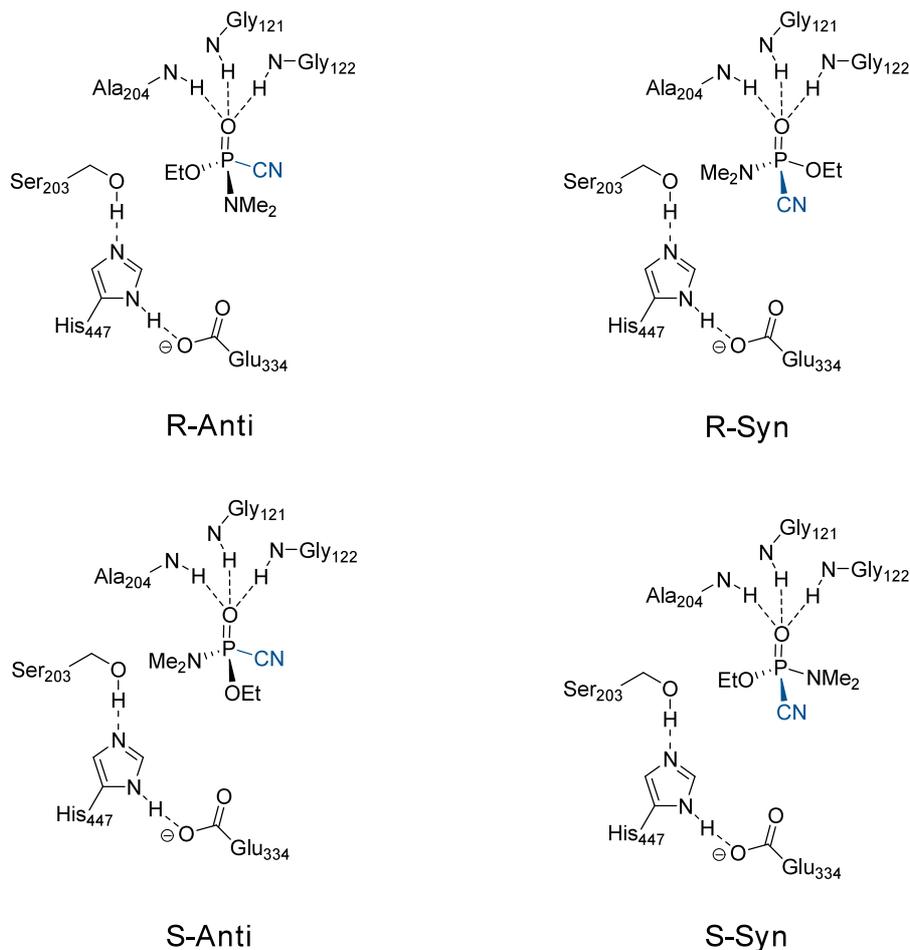
<sup>115</sup> (a) Vosko, S.; Wilk, L.; Nusair, M. *Can. J. Phys.* **1980**, *58*, 1200 (b) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098 (c) Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8822

<sup>116</sup> Schäfer, A.; Huber, C.; Ahlrichs, R. *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829.

<sup>117</sup> (a) Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098 (b) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1372 (c) Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648 (d) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.

<sup>118</sup> Nemukhin, A. V.; Lushchekina, S. V.; Bochenkova, A. V.; Golubeva, A. A.; Varfolomeev, S. D. *J. Mol. Model.* **2008**, *14*, 409.

<sup>119</sup> Adamo, C.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 6158.



**Schéma 3 : Présentation des quatre approches du tabun dans le site actif de l'AChE**

La première étape de ce processus est le choix de la structure cristalline de départ. Notre choix s'est naturellement orienté vers les structures existantes de l'AChE inhibée par le tabun. Nous sommes donc partis du PDB de F. Ekström (PDB 2C0P)<sup>120</sup> pour lequel la structure de l'AChE est non mutée. Nous avons utilisé la structure de l'AChE inhibée par le tabun vieilli à cause de la position de l'His447. En effet, dans le cas du tabun non vieilli, l'His447 a subi une rotation de 90° par rapport à la sérine. Ceci est assez surprenant puisque dans d'autres structures cristallographiques de l'AChE inhibée par le tabun non vieilli telle que 2JEZ,<sup>121</sup> cette rotation n'a pas lieu. Cette position de l'histidine n'étant pas celle de l'AChE native, nous avons décidé de prendre la structure vieillie dans laquelle elle est correctement positionnée. De ce fait, nous avons dû restaurer le *N*-diméthyle pour commencer nos calculs, sachant que dans le PDB 2C0P, F. Ekström avait défini le vieillissement du complexe AChE-tabun comme étant l'hydrolyse de l'amine.

<sup>120</sup> Ekström, F.; Akfür, C.; Tunemalm, A.-K.; Lundberg, S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 74.

<sup>121</sup> Ekstrom, F.J.; Astot, C.; Pang, Y. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *82*, 282.

Il a ensuite fallu définir notre système de calcul, à savoir quels atomes mettre en zone QM et quels atomes mettre en zone MM. La première zone QM est constituée de 85 atomes comprenant des atomes de la triade catalytique, du tabun, du trou oxyanionique, des Val330 et Val331 qui stabilisent le Glu334, de la Ser229 et de la Gly230 (Zone QM 1 – Figure 1). La zone MM est composée des résidus Gly120, Gly121, Gly122, Phe123, Tyr124, Ser125, Glu202, Ser203, Ala204, Ser229, Gly230, Trp236, Phe295, Phe297, Val330, Val331, Glu334, Phe338, Val407, His447, Wat21, Wat99, Wat141, et Wat258. Le reste de l'enzyme est fixée.

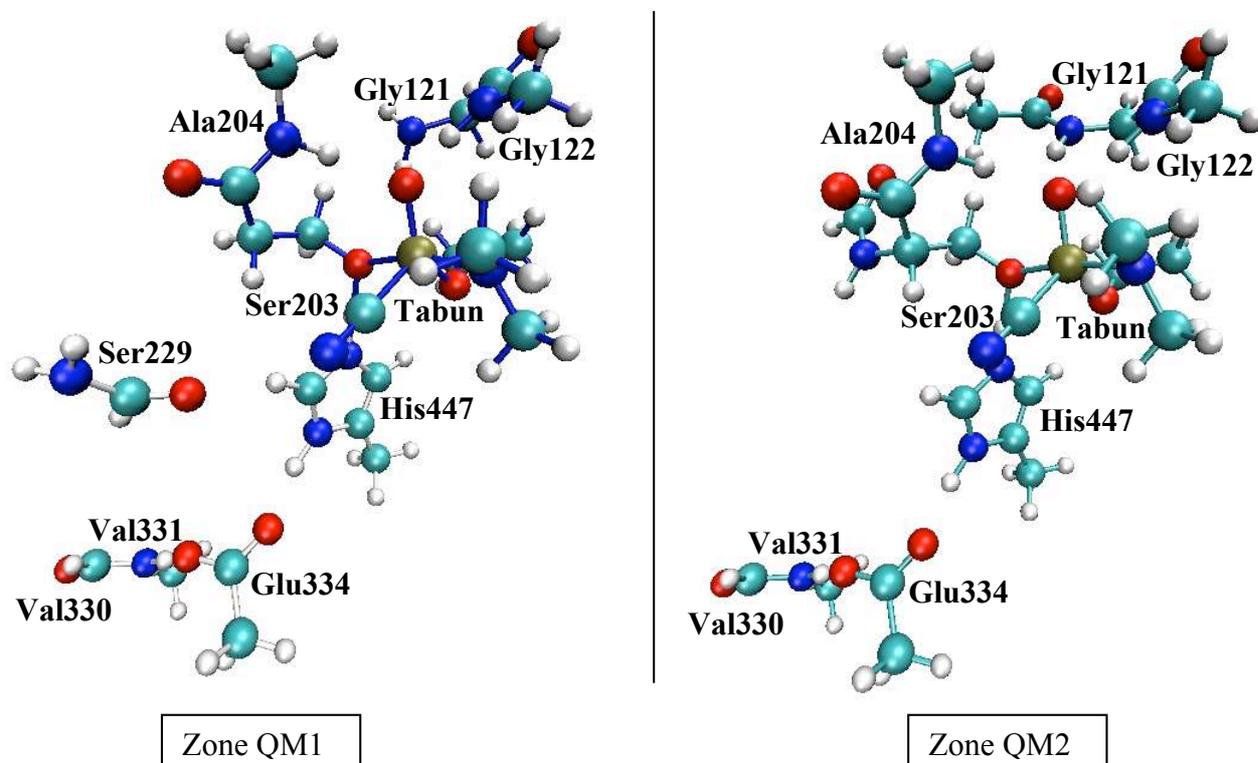


Figure 1 : Représentation des deux zones QM employées

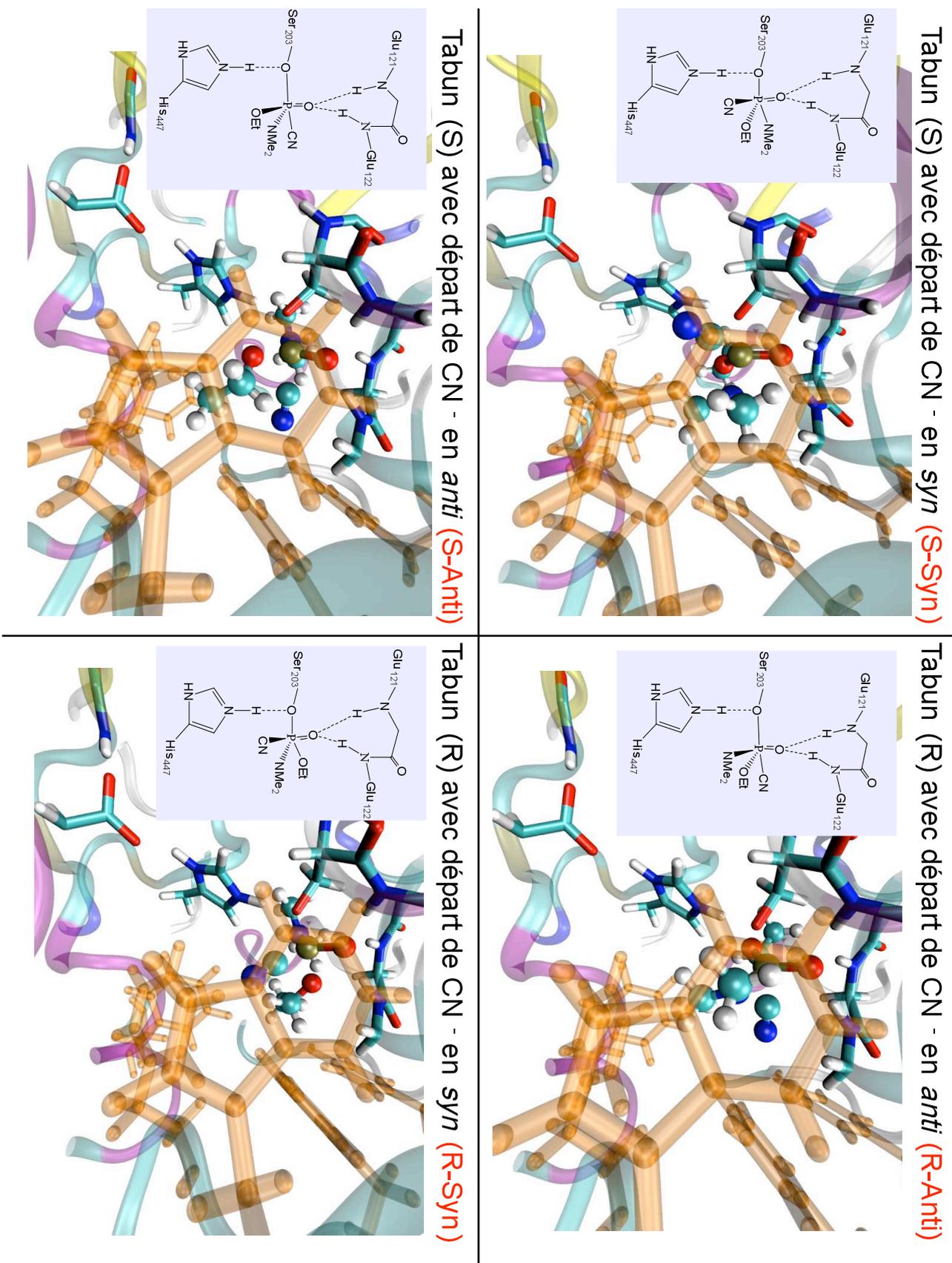
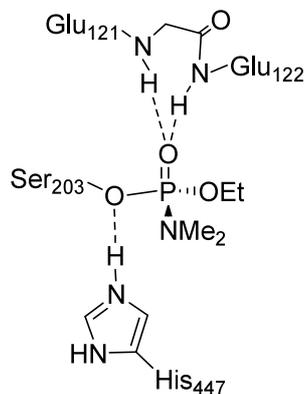


Figure 2 : Site actif de l'ACHé pour les quatre isomères du tabun

Sur la figure 2 ci-dessus, la zone QM est représentée. Le tabun est en boules et bâtons dans le site actif. Les résidus en bâtons sont la triade catalytique et le trou oxyanionique. Les résidus en orange appartiennent à la zone MM. Ce sont les résidus aromatiques formant la poche acyle. Il faut noter que dans la structure cristallographique 2C0P, le phosphore est de configuration (*R*) lorsqu'il est fixé sur la sérine (Schéma 4).



**Schéma 4 : Structure du complexe AChE-tabun observé en cristallographie**

Les approches R-Anti et S-Syn donnent au final l'adduit observé en cristallographie, alors que les S-Anti et R-Syn ne le donnent pas. Pour le PDB 2C0P, nous avons uniquement modélisé les attaques conduisant à l'adduit cristallographique, à savoir R-Anti et S-Syn. Cette structure cristallographique a été corrigée en 2008 par F. Nachon et al. qui ont montré qu'en fait la structure vieillie provenait de l'hydrolyse du groupement éthoxy et non *N*-diméthyle.<sup>122</sup> Cette nouvelle structure est encodée dans la Protein Data Bank 3DL7. Nous avons donc repris nos calculs avec le PDB 3DL7, en modifiant la zone QM : notamment nous avons mieux décrit les fonctions amide entre Gly120 et Gly121. Nous avons également enlevé les résidus 229 et 230 qui n'avaient aucune influence dans nos modélisations avec le PDB 2C0P (Figure 3). Cette nouvelle zone QM comporte 88 atomes (Zone QM 2 – Figure 2). Nous avons utilisé le même niveau de calcul que précédemment. Avec le PDB 3DL7, nous avons modélisé les quatre approches possibles, à savoir R-Anti, R-Syn, S-Anti, S-Syn. Nous avons ainsi obtenu un schéma complet de la réactivité du tabun dans le site actif de l'AChE.

<sup>122</sup> Carletti, E.; Li, H.; Li, B.; Ekström, F.; Nicolet, Y.; Loiodice, M.; Gillon, E.; Froment, M. T.; Lockridge, O.; Schopfer, L. M.; Masson, P.; Nachon, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16011.

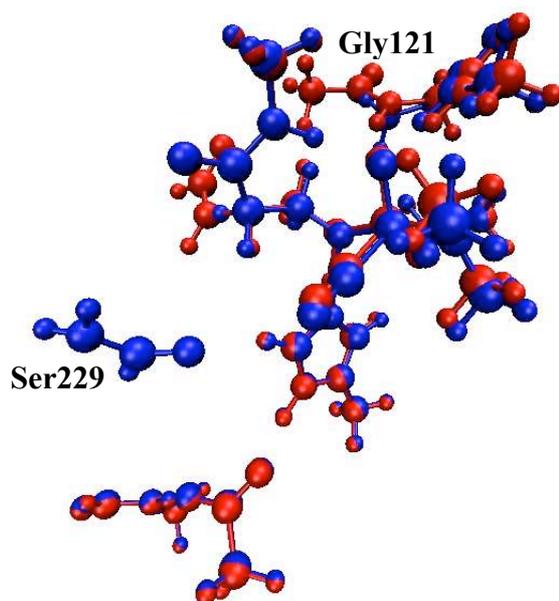


Figure 3 : Superposition des zones QM1 (bleu) et QM2 (rouge)

Avant de modéliser la fixation du tabun dans le site actif de l'enzyme, nous avons commencé par étudier le profil de la fixation du sarin. En effet, l'isomère le plus actif du sarin est connu. Cette information permettra de valider notre système de calcul : si on trouve comme isomère favorisé l'un de ceux qui ne donne pas l'adduit cristallographique, alors il faudra reprendre la définition du système.

### III. Fixation du sarin

De la même façon que pour le tabun, les quatre approches du sarin ont été modélisées (Schéma 5). Il faut noter que du fait des priorités différentes pour le sarin par rapport au tabun, l'isomère R-Anti du sarin correspond au S-Anti du tabun du point de vue du positionnement des groupements dans le site actif.

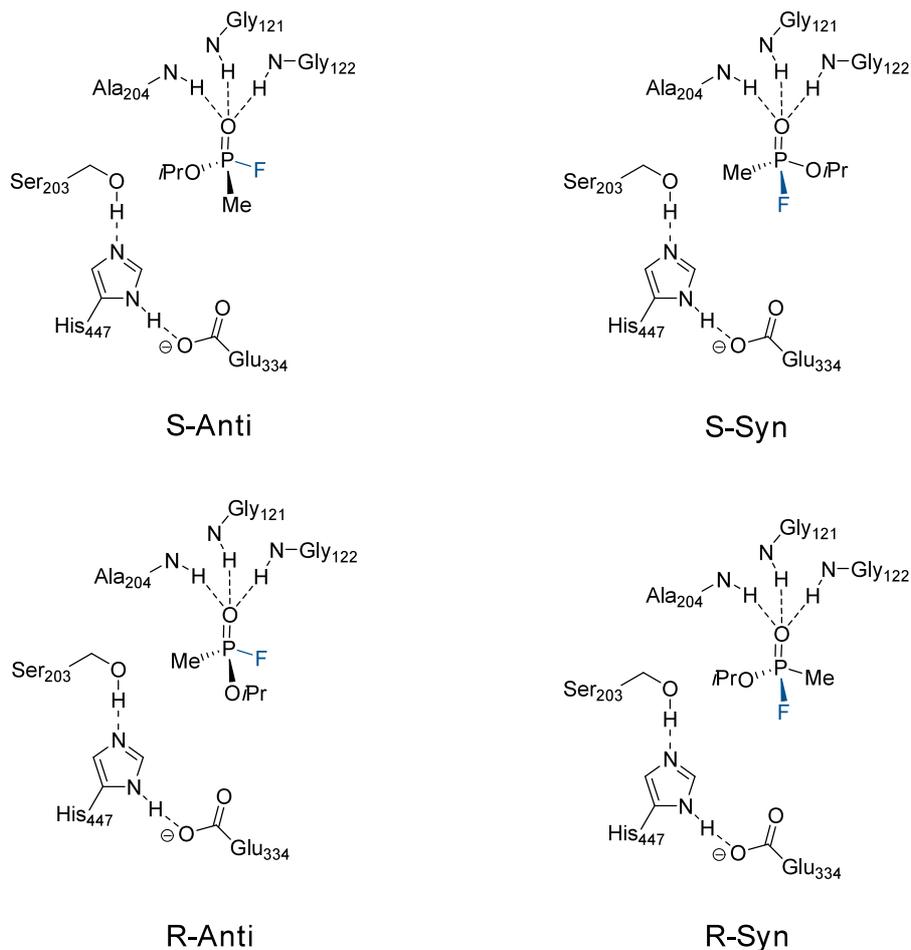


Schéma 5 : Présentation des quatre approches du sarin dans le site actif de l'AChE

Le complexe AChE-sarin est de configuration (*R*) sur le phosphore, comme on peut l'observer sur la structure cristallographique PDB 2JGG.<sup>123</sup> Il a été montré que l'isomère le plus actif du sarin est le (*S*),<sup>124</sup> ce qui signifie probablement que le fluorure part en anti par rapport à l'oxygène de la sérine (Schéma 6). Les deux isomères conduisant à l'adduit observé en cristallographie sont donc le S-Anti et le R-Syn, sachant que le S-Anti est l'inhibiteur le plus réactif expérimentalement.

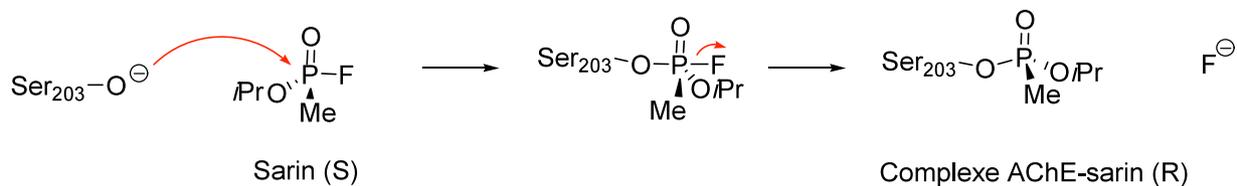


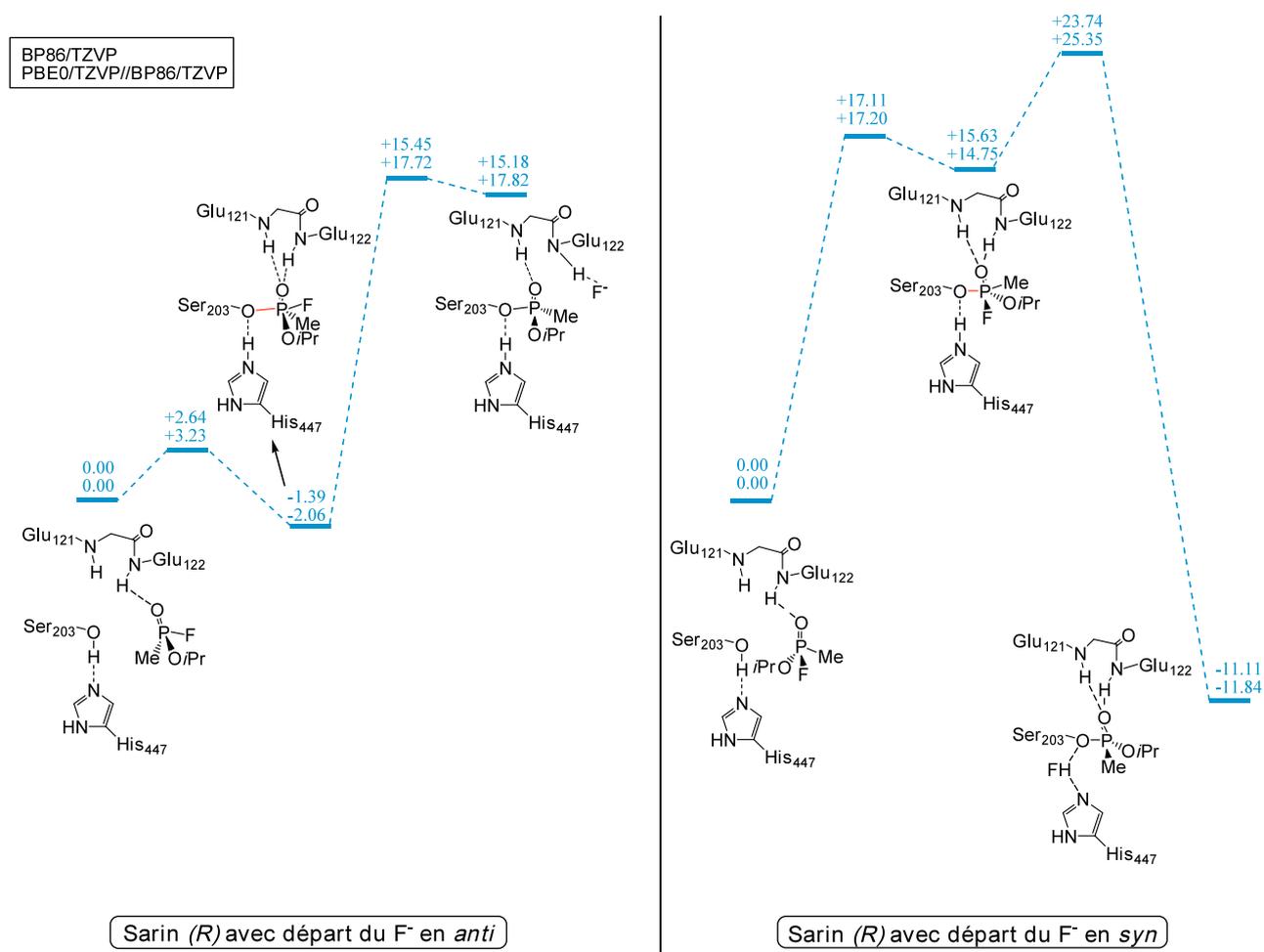
Schéma 6 : Mécanisme proposé d'inhibition de l'AChE par le sarin (*S*)

<sup>123</sup> Hornberg, A.; Tunemalm, A.-K.; Ekstrom, F. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4815.

<sup>124</sup> Spruit, H.E.T.; Langenberg, J. P.; Trap, H. C.; Van der Wiel, H. J.; Helmich, R. B.; Van Helden, H. P. M.; Benschop, H. P. *Toxicol. and appl. pharmacol.* **2000**, *169*, 249.

Pour l'étude de la fixation du sarin dans l'ACHé, le PDB 3DL7 a été utilisé, afin de garder la même référence que pour le tabun. La partie QM correspond à la zone QM 2. La zone MM tout comme le niveau de calcul sont les mêmes que ceux décrits précédemment. Il faut noter que nous avons rajouté une molécule d'eau derrière le fluor afin de stabiliser l'ion fluorure libéré par liaison hydrogène. Pour simplifier les schémas, cette molécule d'eau n'est pas représentée sur les profils énergétiques.

Les résultats pour l'énantiomère (*R*) sont présentés sur la figure 4.



**Figure 4 : Profils énergétiques de la fixation des isomères R-Anti et R-Syn du sarin dans l'ACHé (PDB 3DL7, E en kcal/mol)**

La première étape consiste en la fixation du phosphore du sarin sur l'oxygène de la sérine. Pour l'isomère R-Anti, la barrière énergétique est très faible (+2.64 kcal/mol en BP86/TZVP), alors que pour le R-Syn, elle est au contraire très élevée (+17.11 kcal/mol en BP86/TZVP). Durant cette étape le proton de la sérine de la triade catalytique est transféré à l'histidine. La réaction est exothermique

pour le R-Anti (-1.39 kcal/mol en BP86/TZVP) alors qu'elle est fortement endothermique dans le cas du R-Syn (+15.63 kcal/mol en BP86/TZVP). La fixation du sarin est donc favorisée pour le R-Anti par rapport au R-Syn.

La deuxième étape est le départ du fluorure. Pour l'isomère R-Anti, la barrière énergétique est d'environ 17 kcal/mol (BP86/TZVP), soit une barrière élevée, et la réaction est endothermique. Ceci peut s'expliquer par le fait que le fluorure part dans la direction de résidus aromatiques (Phe295, Phe297, Phe338). Il y a donc des interactions électrostatiques défavorables entre l'anion formé et les résidus hydrophobes de la poche acyle. Dans le cas du R-Syn, la barrière est d'environ 8 kcal/mol (BP86/TZVP) pour l'élimination du fluorure, et la réaction est fortement exothermique du fait de la formation de HF dans le milieu.

Ainsi, quel que soit l'isomère de l'énantiomère (*R*), la réaction d'inhibition de l'AChE par le sarin se fait difficilement. Pour le R-Anti, l'élimination du fluorure est l'étape cinétiquement déterminante et sa barrière est élevée pour un processus biologique, pour le R-Syn il s'agit de l'étape de fixation du phosphore sur la sérine.

Passons maintenant à l'étude des isomères (*S*), dont les résultats sont présentés sur la figure 5.

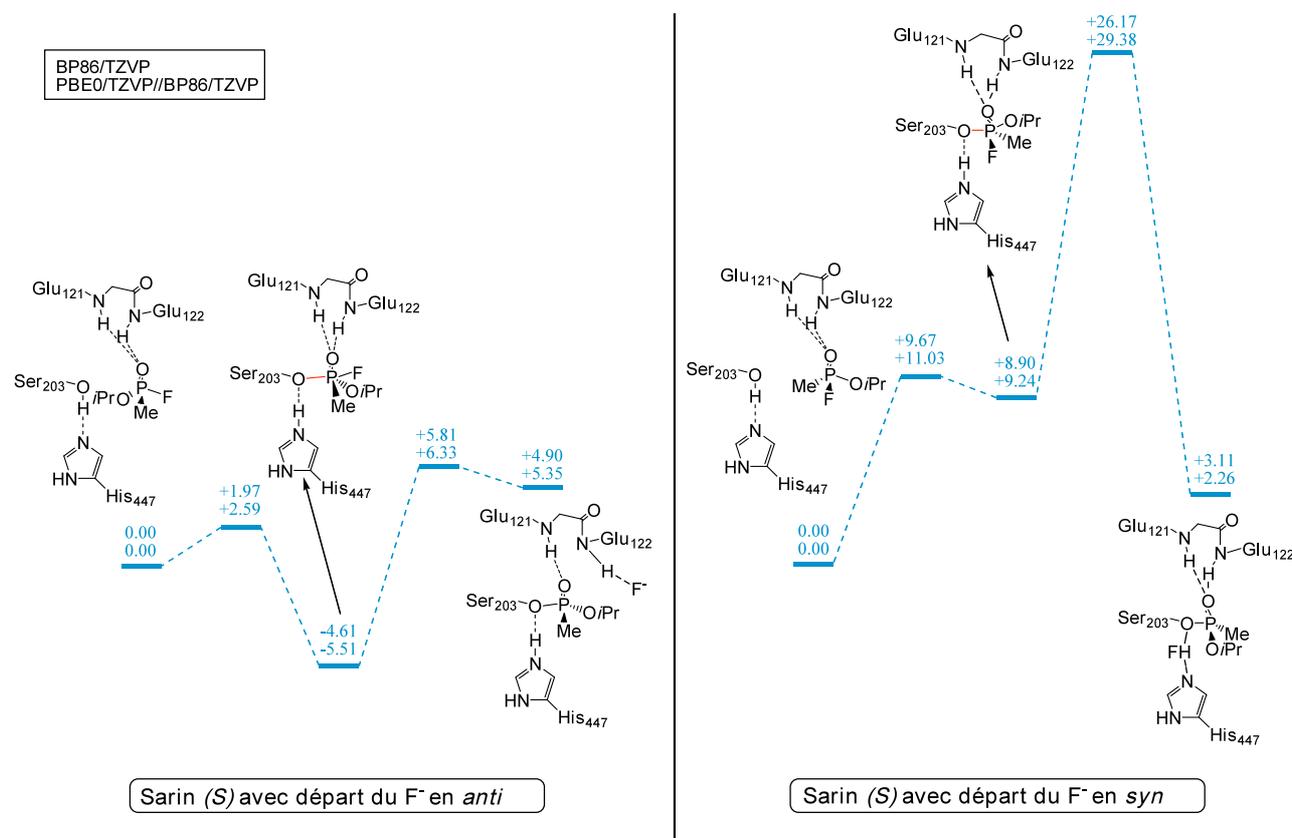


Figure 5 : Profils énergétiques de la fixation des isomères S-Anti et S-Syn du sarin dans l'AChE (PDB 3DL7, E en kcal/mol)

La première étape de fixation du phosphore sur la sérine est encore une fois plus facile pour l'isomère *anti* que pour le *syn* dans le cas du sarin (*S*). En effet, pour le S-Anti, la barrière est de 1.97 kcal/mol (BP86/TZVP) alors qu'elle est de 9.67 kcal/mol (BP86/TZVP) pour le S-Syn. La réaction est exothermique dans le cas du S-Anti (-4.61 kcal/mol en BP86/TZVP) alors qu'elle est endothermique pour le S-Syn (+8.90 kcal/mol en BP86/TZVP). L'intermédiaire pentavalent est donc stabilisé avec le fluor en anti par rapport à l'oxygène de la sérine.

En ce qui concerne le départ du fluorure, la barrière énergétique est d'environ 10 kcal/mol (BP86/TZVP) pour le S-Anti, et la réaction est endothermique pour les mêmes raisons que le R-Anti (+4.92 kcal/mol en BP86/TZVP). Pour le S-Syn, la réaction est fortement exothermique du fait de la formation de HF dans le milieu et la barrière énergétique est d'environ 17 kcal/mol (BP86/TZVP). La barrière énergétique est donc très élevée pour le départ du fluorure dans le cas de l'isomère S-Syn.

Ainsi, en ce qui concerne l'énantiomère (*S*) du sarin, l'isomère favorisé est le S-Anti, puisque les barrières énergétiques des deux étapes sont les plus faibles. Il faut noter que pour le S-Anti, la réaction d'inhibition est globalement endothermique puisque l'AChE inhibée par le sarin est moins stable que lorsque le phosphore n'est pas encore fixé sur la sérine de la triade catalytique. Cependant, nous ne prenons en compte ici que l'enthalpie et pas l'énergie libre. Or, la différence entre ses deux énergies est l'entropie que l'on peut définir telle que :

$$S = k_B \ln(\Omega)$$

Avec :  $\Omega$  : nombre d'états microscopiques définissant l'état d'équilibre d'un système au niveau macroscopique

$$k_B = 1.381 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1} : \text{constante de Boltzman}$$

Ainsi, lorsqu'on ajoute un degré de liberté à un système, on crée de l'entropie et  $\Delta S$  augmente.

Sachant que  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ , si  $\Delta S$  augmente alors  $\Delta G$  diminue.

Lorsque le fluorure est libéré, on augmente le désordre du système en créant un degré de liberté supplémentaire, puisqu'il peut y avoir des réarrangements dans le site actif pour permettre la sortie de l'anion. Donc l'entropie augmente et l'enthalpie libre diminue.

En considérant donc l'entropie du système, la réaction peut être estimée comme étant exothermique.

Ainsi, l'isomère le plus actif du sarin est le S-Anti d'après nos calculs puisqu'il est le seul à avoir deux étapes avec de faibles barrières énergétiques, donc facilement réalisables. Nos résultats sont tout à fait en accord avec les résultats expérimentaux, et valident notre modélisation.

## IV. Fixation du tabun

Nous nous sommes ensuite intéressés à la fixation du tabun, qui est le but de notre étude. En effet, une fois notre système validé par l'étude de la fixation du sarin, nous avons réalisé la même étude pour le tabun, afin d'en déterminer l'isomère le plus actif, et surtout les paramètres influençant la réactivité du tabun dans le site actif de l'AChE. Ces paramètres sont en effet importants à comprendre si l'on veut améliorer la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun. Pour cette étude, deux PDB ont été utilisés : le PDB 2C0P et sa version corrigée le PDB 3DL7, ces deux structures ayant également été comparées entre elles.

### IV.1. Résultats avec le PDB 2C0P

En premier lieu, penchons nous sur les résultats obtenus pour les deux isomères menant à l'adduit cristallographique avec le PDB 2C0P dont les profils énergétiques sont représentés sur la figure 4.

Comme on peut le voir sur la figure 6, la première étape correspond à la fixation du phosphore du tabun sur l'oxygène de la sérine de la triade catalytique. Dans le cas de l'isomère R-Anti, cette étape se décompose en deux sous étapes : il y a tout d'abord le positionnement du tabun dans le trou oxyanionique grâce à un réseau de liaisons hydrogènes. Cette étape a un état de transition **TS12RA** très bas en énergie (+0.35 kcal/mol en BP86/TZVP). Le coût de cette réorganisation est très faible. Ensuite, le phosphore se fixe sur l'oxygène de la sérine avec une barrière énergétique encore une fois très faible (**TS23RA** : +0.12 kcal/mol en BP86/TZVP). Durant cette étape le proton de la Ser203 est transféré sur l'His447. La première étape est globalement exothermique d'environ 8 kcal/mol, ce qui indique qu'elle est favorisée sur le plan thermodynamique. En ce qui concerne l'isomère S-Syn, les deux sous étapes précédentes ont lieu simultanément. Le positionnement du tabun dans le trou oxyanionique, la fixation du phosphore sur l'oxygène de la sérine et le transfert du proton de la Ser203 sur l'His447 ont lieu en une seule étape avec une barrière énergétique très faible (**TS12SS** : +0.24 kcal/mol en BP86/TZVP). Cette réaction est exothermique d'environ 3.5 kcal/mol en BP86/TZVP. Globalement cette première étape de fixation du phosphore sur le tabun sur la sérine possède de très faibles barrières énergétiques, et est favorisée thermodynamiquement pour les deux isomères.

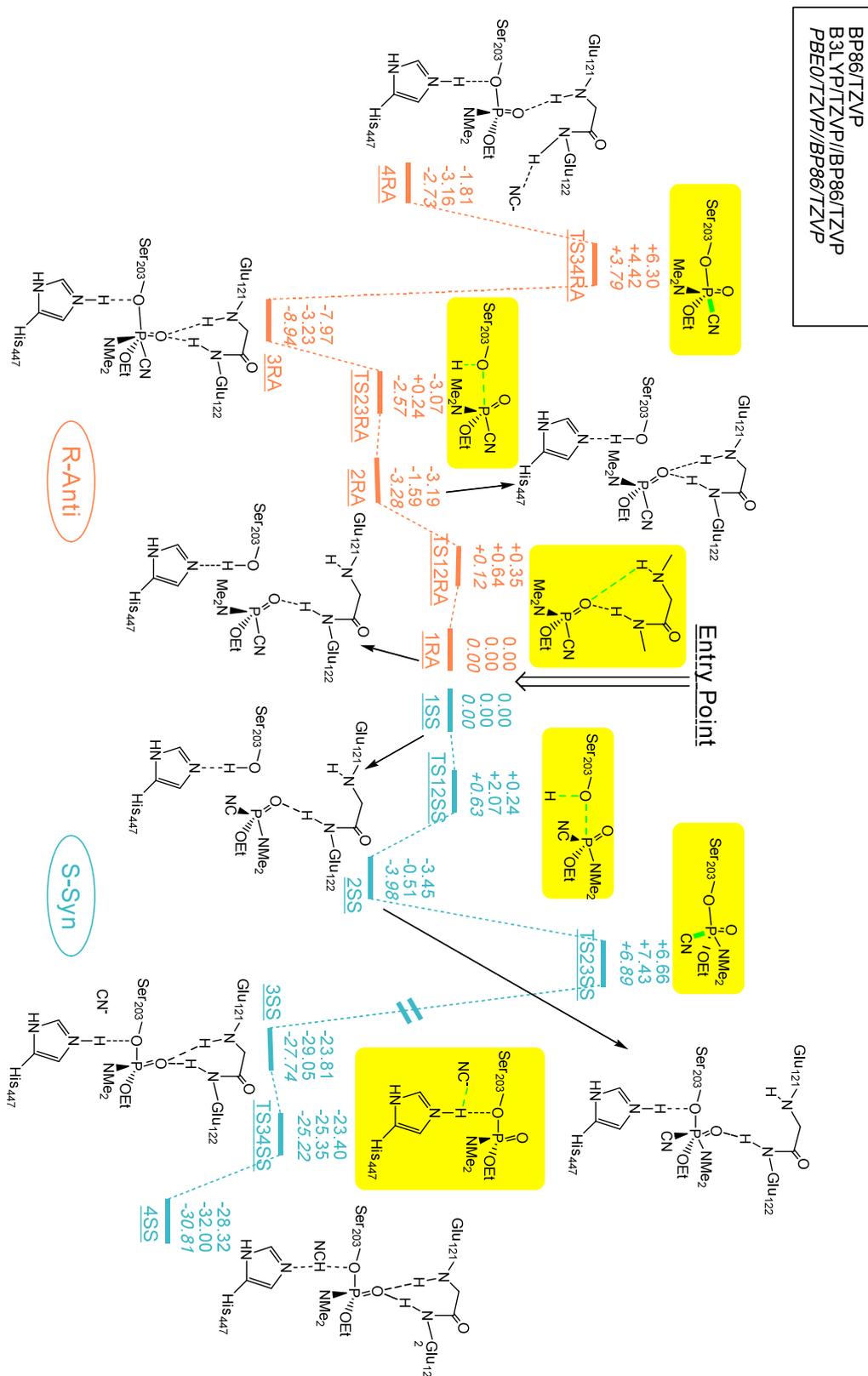


Figure 6 : Profils énergétiques de la fixation des isomères R-Anti et S-Syn du tabun dans l'AChE (PDB 2C0P, E en kcal/mol)

La seconde étape est le départ du groupement cyano. Dans le cas du R-Anti, il s'agit de l'étape cinétiquement déterminante puisque la barrière énergétique est d'environ 14 kcal/mol. Cependant, elle est endothermique d'environ 6 kcal/mol (**4RA**). Ceci peut s'expliquer par le fait que le cyanure libéré part dans la direction des résidus aromatiques formant la poche acyle (Phe295, Phe297, Phe338). Il y a donc des interactions répulsives entre ces résidus hydrophobes du site actif de l'enzyme et le groupe partant qui justifient le caractère endothermique de cette étape. Cependant, il faut noter que le processus complet de formation du complexe AChE-tabun (deux étapes) est globalement exothermique de 2 kcal/mol en BP86/TZVP. Si l'on regarde l'isomère S-Syn, le départ du cyanure est également l'étape cinétiquement déterminante avec une barrière d'environ 10 kcal/mol. Cette barrière énergétique est plus faible que celle du R-Anti, et contrairement au R-Anti la réaction est exothermique d'environ 20 kcal/mol (**3SS**). Il semble donc que la fixation du S-Syn soit favorisée par rapport à celle du R-Anti. Il faut noter que dans le cas du S-Syn, une dernière étape a lieu : il s'agit de la formation de l'acide cyanhydrique HCN par transfert du proton de l'His447 sur le cyanure formé. Cette étape a une barrière énergétique très faible (+0.41 kcal/mol en BP86/TZVP) et est exothermique.

Quelques différences géométriques existent entre les intermédiaires des isomères R-Anti et S-Syn. La structure de départ **1RA** a une distance P-O<sub>ser203</sub> plus longue que celle de **1SS** (3.02 Å vs 2.48 Å). La longueur de la liaison P-CN est de 1.80 Å pour les deux isomères. Après l'addition du tabun sur la sérine, la liaison P-CN dans **3RA** est plus longue que dans **1RA** (1.93 Å vs 1.80 Å), et la longueur de la liaison P-O<sub>ser203</sub> est de 1.80 Å dans **3RA**. La liaison P-O<sub>ser203</sub> se renforce avec le départ du cyanure, sa longueur devient 1.68 Å dans **4RA**. Le même phénomène est observé pour l'isomère S-Syn : la liaison P-CN est plus longue dans **2SS** que dans **1SS** (1.88 Å vs 1.81 Å), mais plus courte que la liaison P-CN de **3RA** (1.88 Å vs 1.93 Å). Et la liaison P-O<sub>ser203</sub> se renforce avec le départ du groupe cyano, sa longueur est de 1.61 Å dans **3SS**.

D'après ces calculs, les deux énantiomères conduisent à l'adduit cristallographique via deux mécanismes distincts. Il semble que l'isomère le plus actif soit le S-Syn, contrairement à l'idée communément admise, du fait (i) de l'instabilité du produit résultant de l'approche du R-Anti et (ii) de la plus faible barrière énergétique de S-Syn dans l'étape cinétiquement déterminante (départ du cyanure). Pour confirmer ces résultats, il faut bien sûr modéliser les deux autres approches qui ne conduisent pas à l'adduit cristallographique.

## IV.2. Comparaison des PDB 2C0P et 3DL7

Alors que nous avons commencé nos travaux avec le PDB 2C0P, F. Nachon a corrigé cette structure. Nous avons donc repris nos calculs avec la nouvelle structure (PDB 3DL7). Les deux PDB 2C0P et 3DL7 sont très proches, puisque 3DL7 est juste la version corrigée de 2C0P, la différence principale étant le groupement hydrolysé lors du vieillissement. Nous avons également modifié la zone QM car la zone QM 1 était mal définie au niveau du Gly121. Ces calculs ont ainsi été réalisés avec la zone QM 2. Afin de valider nos précédents résultats, nous avons repris les mêmes calculs qu'avec le PDB 2C0P et la zone QM 1. Sachant que l'étape cinétiquement déterminante est le départ du cyanure, nous nous sommes focalisés sur cette étape pour confirmer la validité de notre nouveau système (Figure 7).

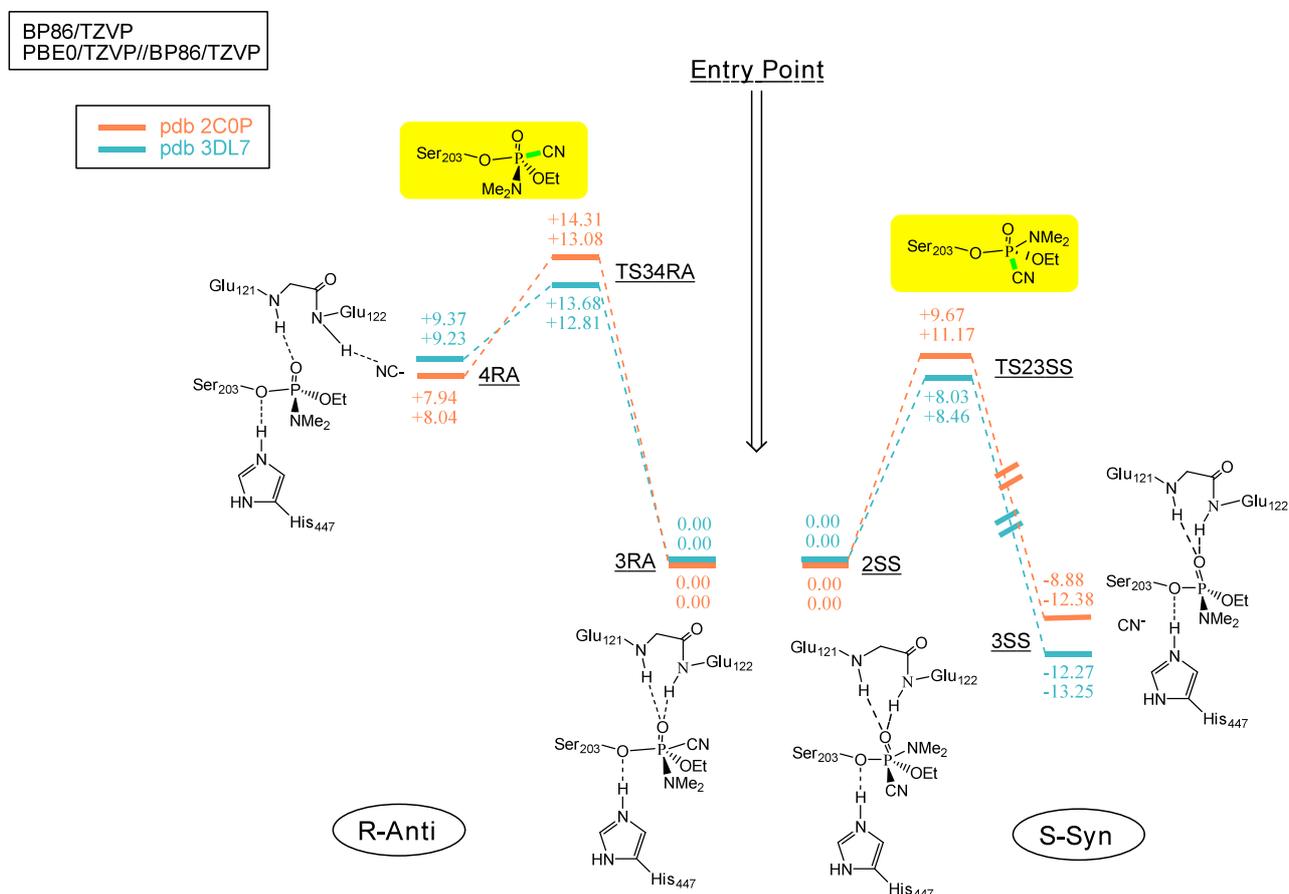


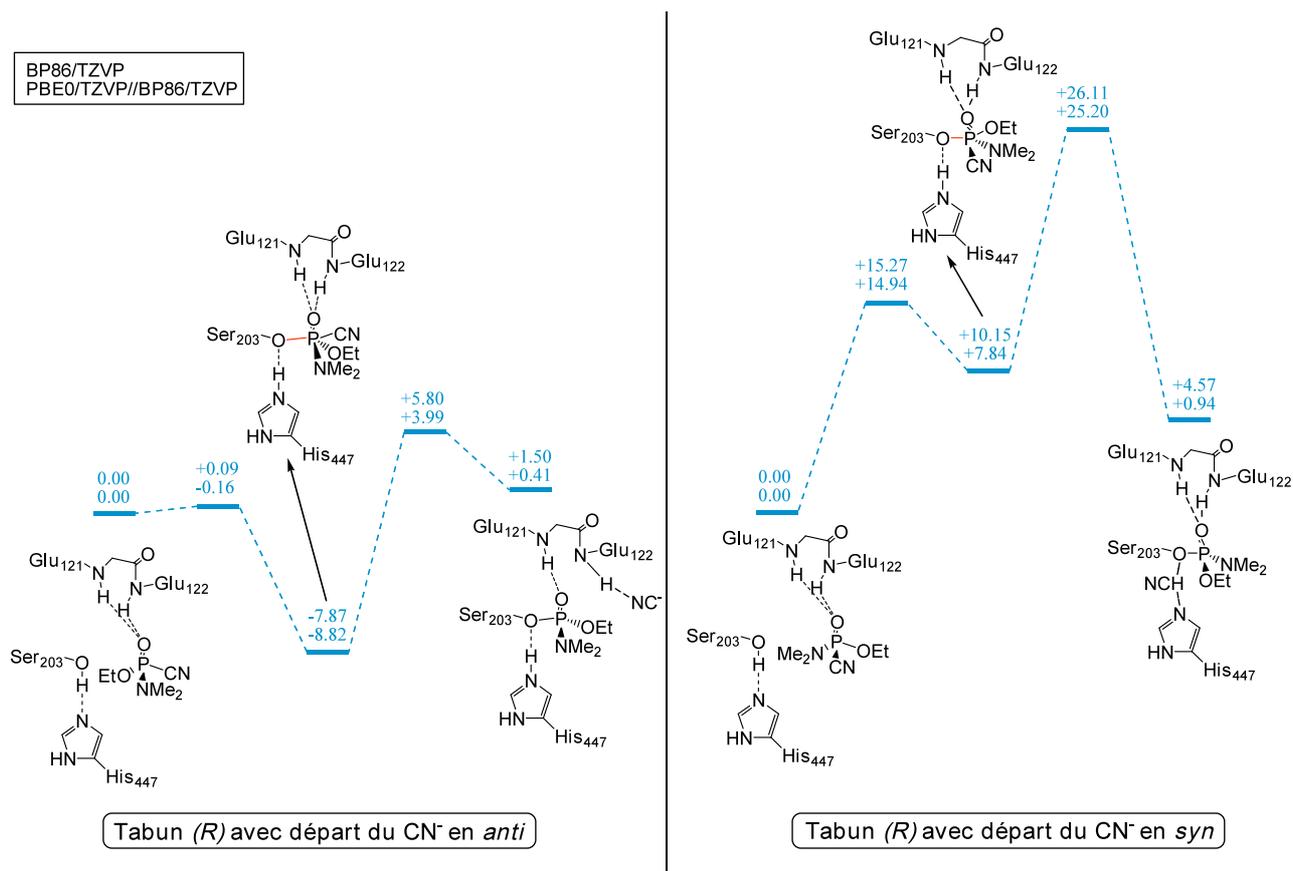
Figure 7 : Comparaison des profils énergétiques de la fixation des isomères R-Anti et S-Syn du tabun dans l'ACHé pour les PDB 2C0P et 3DL7 (E en kcal/mol)

Il est tout de suite visible que les profils obtenus avec les deux PDB sont très proches l'un de l'autre. Pour l'isomère R-Anti, la barrière énergétique est d'environ 14.3 kcal/mol pour le PDB 2C0P, et de 13.7 kcal/mol pour le PDB 3DL7, soit environ 14 kcal/mol dans les deux cas. La réaction est endothermique dans les deux cas également (+7.94 kcal/mol pour 2C0P et +9.37

kcal/mol pour 3DL7). Les géométries sont tout à fait comparables entre les deux PDB, notamment les longueurs de liaisons P-O et P-CN. Par exemple,  $P-O_{3RA}(2C0P) = 1.84 \text{ \AA}$ ,  $P-CN_{3RA}(2C0P) = 1.92 \text{ \AA}$ ,  $P-O_{3RA}(3DL7) = 1.81 \text{ \AA}$ ,  $P-CN_{3RA}(3DL7) = 1.93 \text{ \AA}$ . Pour l'isomère S-Syn, les résultats sont aussi très proches. Une barrière de 9.67 kcal/mol est obtenue avec le PDB 2C0P et de 8.03 kcal/mol avec le PDB 3DL7. Ces barrières sont non seulement voisines l'une de l'autre, mais aussi inférieures à celles obtenues avec le R-Anti quel que soit le PDB. La réaction est exothermique pour les deux PDB (-8.88 kcal/mol pour 2C0P et -12.27 kcal/mol pour 3DL7). Il faut noter qu'avec le PDB 3DL7, les barrières énergétiques sont plus faibles pour les deux isomères, ce qui souligne qu'il est de meilleure qualité. D'un point de vue géométrique, les longueurs de liaisons sont encore une fois comparables. Par exemple,  $P-O_{2SS}(2C0P) = 1.81 \text{ \AA}$ ,  $P-CN_{2SS}(2C0P) = 1.87 \text{ \AA}$ ,  $P-O_{2SS}(3DL7) = 1.80 \text{ \AA}$ ,  $P-CN_{2SS}(3DL7) = 1.88 \text{ \AA}$ . Ainsi, nos résultats obtenus avec le PDB 2C0P sont assez robustes. Comme le PDB 3DL7 est une version corrigée du PDB 2C0P, nous avons néanmoins poursuivi nos calculs avec le PDB 3DL7.

### IV.3. Résultats avec le PDB 3DL7

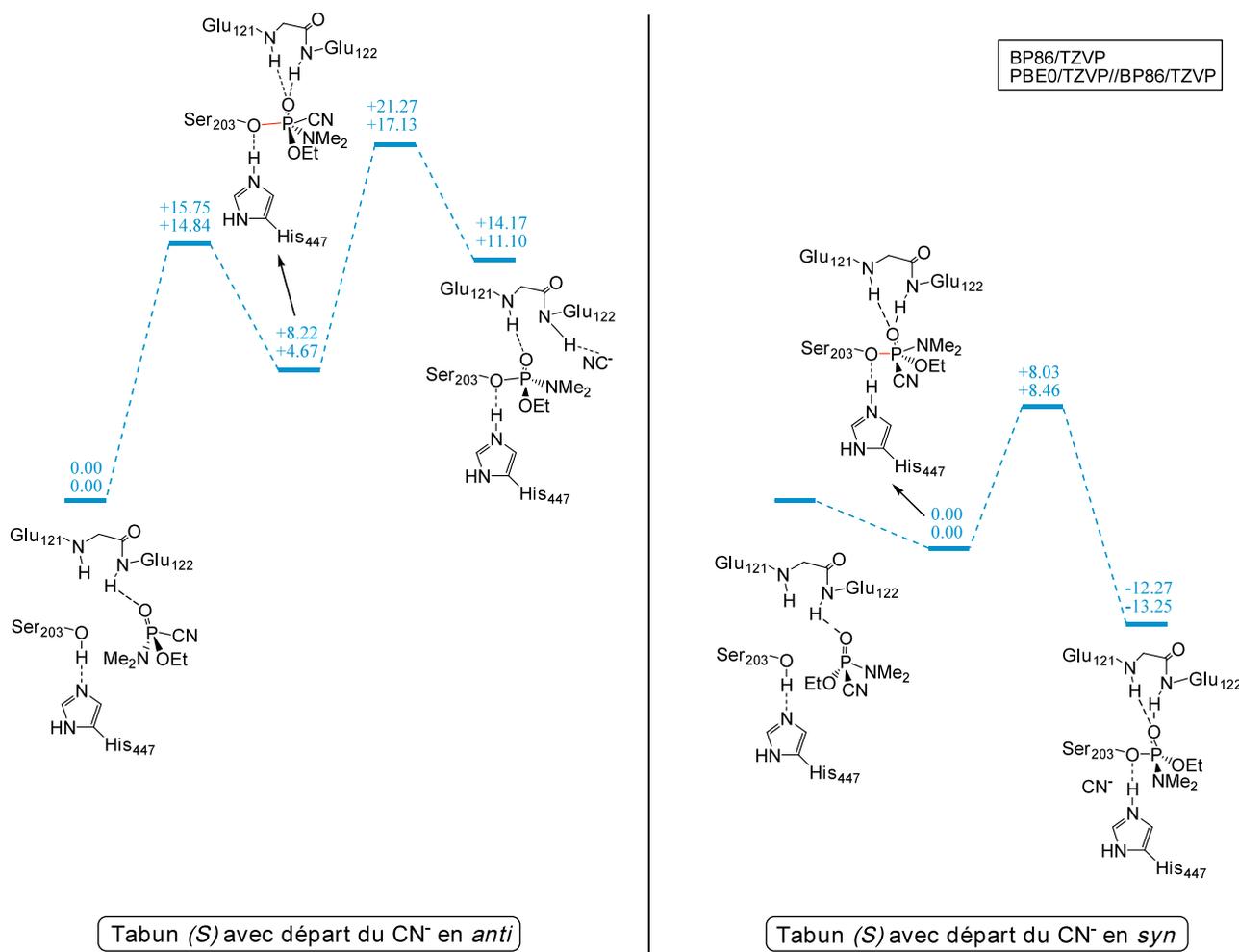
Les quatre approches ont été modélisées avec le PDB 3DL7 et la zone QM 2. Les résultats pour l'énantiomère (*R*) sont présentés figure 8.



**Figure 8 : Profils énergétiques de la fixation des isomères R-Anti et R-Syn du tabun dans l'AcChE (PDB 3DL7, E en kcal/mol)**

Dans le cas de l'énantiomère (*R*), les deux approches sont présentées. La première étape est la fixation du phosphore sur l'oxygène de la sérine de la triade catalytique. Dans le cas du R-anti, la barrière énergétique pour cette étape est très faible (+0.09 kcal/mol en BP86/TZVP), et la réaction est fortement exothermique (-7.87 kcal/mol en BP86/TZVP). L'intermédiaire pentavalent est très stable. En ce qui concerne le R-Syn, la barrière énergétique de la première étape est beaucoup plus importante, puisqu'elle est de +15.27 kcal/mol (BP86/TZVP). De plus, la réaction est fortement endothermique avec un intermédiaire pentavalent à +10.15 kcal/mol (BP86/TZVP). Cette première étape n'est donc pas favorisée pour l'isomère R-syn. La seconde étape est le départ du groupe cyano. Dans le cas du R-Anti, la barrière est d'environ 14 kcal/mol (BP86/TZVP) et la réaction est endothermique comme on l'a vu précédemment. Pour le R-Syn, la barrière est d'environ 16 kcal/mol et la réaction est exothermique d'environ 6 kcal/mol (BP86/TZVP). Encore une fois, on note que pour l'isomère syn, la réaction est favorisée thermodynamiquement contrairement à l'isomère *anti* avec le cyanure qui part dans la direction des résidus hydrophobes de la poche acyle.

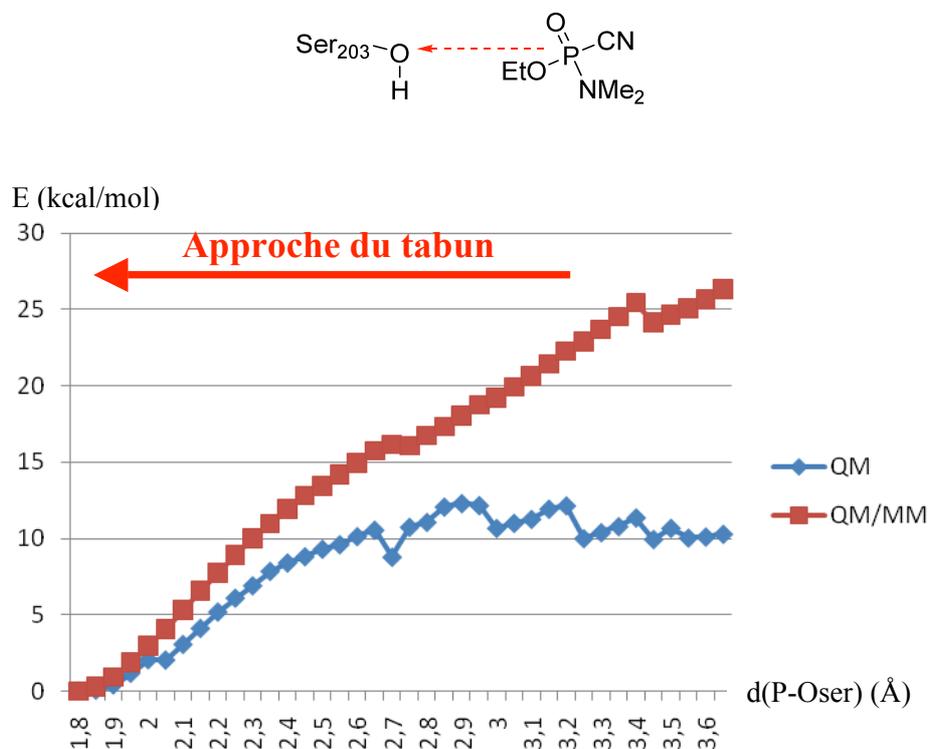
Ainsi, dans le cas du (*R*)-tabun, l'isomère favorisé est celui avec le groupe partant en *anti* par rapport à l'oxygène de la sérine, soit le R-Anti, du fait des barrières plus faibles, notamment sur l'étape de fixation du phosphore. Ceci est tout à fait en accord avec les données expérimentales, puisque le R-Anti donne le complexe AChE-tabun observé en cristallographie contrairement au R-Syn.



**Figure 9 : Profils énergétiques de la fixation des isomères S-Anti et S-Syn du tabun dans l'AChE (PDB 3DL7, E en kcal/mol)**

Si l'on observe maintenant l'énantiomère (*S*) du tabun (Figure 9), on remarque que la première étape, soit la fixation du phosphore sur la sérine, a une barrière importante de +15.75 kcal/mol (BP86/TZVP) dans le cas du S-Anti, et la réaction est endothermique (+8.22 kcal/mol en BP86/TZVP), alors que dans le cas du S-Syn il n'y a pas de barrière énergétique, et la réaction est exothermique comme montré précédemment. Pour la fixation du phosphore sur la sérine dans le cas

du S-Syn, aucun état de transition n'a pu être déterminé : le scan réalisé à partir de l'intermédiaire pentavalent vers le réactif montre un plateau en QM, mais l'énergie diverge en QM/MM (Figure 10). On a donc un problème de définition de la zone MM lorsqu'on éloigne trop le réactif de la sérine. Mais la réaction peut être considérée comme exothermique et sans barrière énergétique d'après le scan.



**Figure 10 : Scan de l'approche du phosphore sur l'oxygène de la sérine pour le tabun S-Syn (E en kcal/mol, BP86/TZVP)**

En ce qui concerne la seconde étape (départ du cyanure), la barrière est d'environ 13 kcal/mol (BP86/TZVP) dans le cas du S-Anti, et la réaction est endothermique (+5.95 kcal/mol en BP86/TZVP) pour les mêmes raisons que le R-Anti. Pour le S-Syn, la barrière pour l'élimination du cyanure est d'environ 8 kcal/mol et la réaction est exothermique comme on l'a vu précédemment.

Ainsi, dans le cas du (*S*)-tabun, l'isomère favorisé est celui avec le groupe partant en *syn* par rapport à l'oxygène de la sérine, soit le S-Syn, du fait des barrières plus faibles, notamment sur l'étape de fixation du phosphore. Ceci est encore une fois tout à fait en accord avec les données expérimentales, puisque le S-Syn donne le complexe AChE-tabun observé en cristallographie contrairement au S-Anti.

D'après nos calculs, les deux isomères favorisés pour l'inhibition de l'AChE par le tabun sont le R-Anti et le S-Syn qui donnent bien l'adduit cristallographique. De ces deux isomères, le plus actif est le S-Syn du fait de la répulsion entre le cyanure et la poche acyle pour le R-Anti, et de la barrière énergétique plus faible pour l'étape cinétiquement déterminante de départ du groupe cyano dans le cas du S-Syn. Le mécanisme pour les deux isomères favorisés est représenté sur le schéma 7, avec encadré celui de l'isomère le plus actif, à savoir le S-Syn.

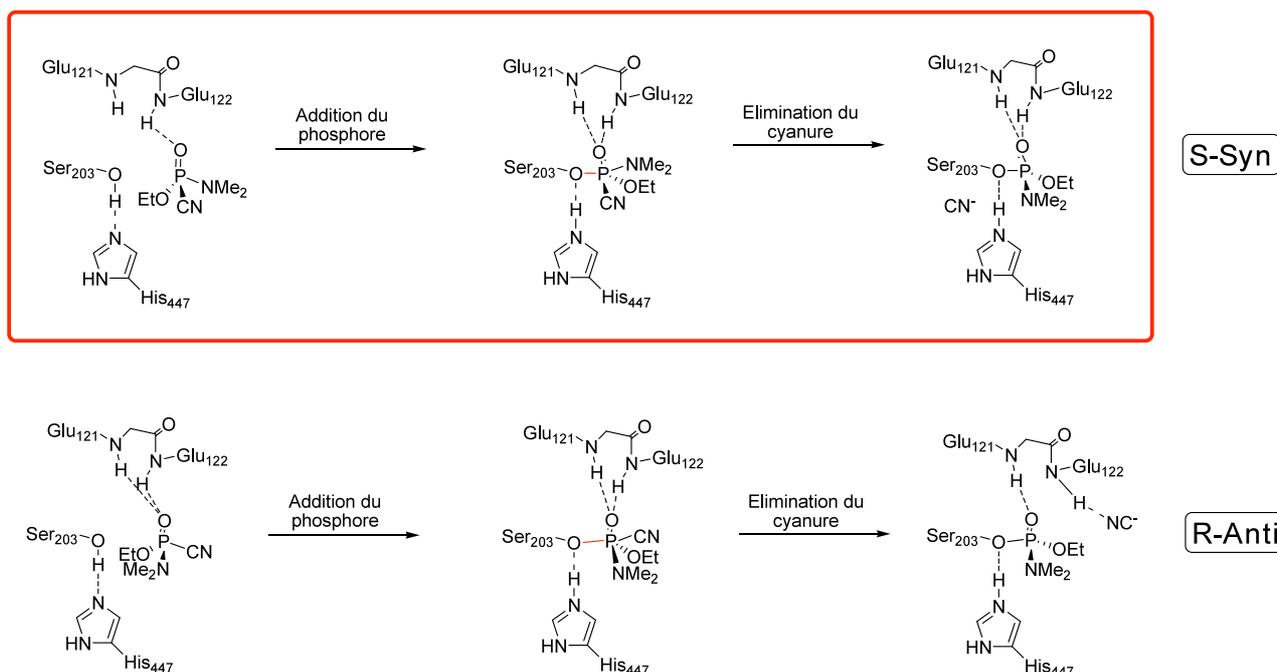


Schéma 7 : Mécanisme d'inhibition de l'AChE par le tabun montré par QM/MM (BP86/TZVP). L'isomère S-Syn est le plus actif

## V. Fixation d'analogues du tabun

Une fois ce travail effectué sur le tabun, nous avons décidé d'étudier la fixation d'analogues afin de déterminer plus précisément les paramètres qui régissent la réactivité du tabun dans le site actif. En effet, le tabun a une structure particulière, notamment le groupe partant qui est un groupement cyano alors que la plupart des organophosphorés possèdent un fluor ou un thiol, et l'amine tertiaire directement fixée sur le phosphore. Ces paramètres ont déjà été étudiés du point de vue de l'activité biologique par Nachon et al.<sup>125</sup> Ils ont notamment étudié la fixation de différents analogues du

<sup>125</sup> Carletti, E.; Aurbek, N.; Gillon, E.; Loiodice, M.; Nicolet, Y.; Fontecilla-Camps, J-C.; Masson, P.; Thiermann, H.; Nachon, F.; Worek, F. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 97.

tabun sur la BChE, une cholinestérase non spécifique très proche de l'AChE, présentés sur le schéma 8.

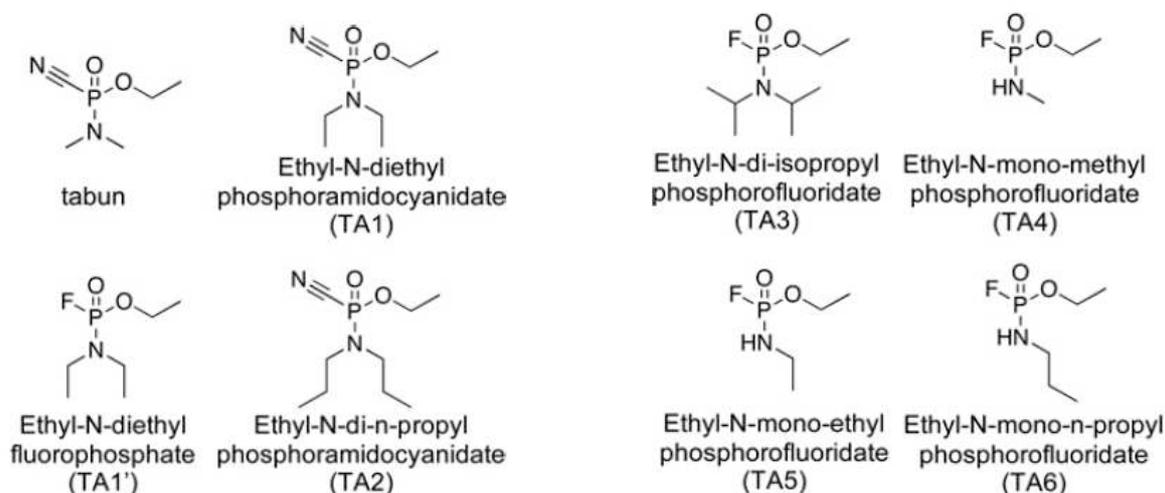


Schéma 8 : Structures des analogues du tabun étudiés par F. Nachon et al.

Le but de cette étude était de déterminer une relation structure-activité afin de comprendre la difficile réactivation du complexe AChE-tabun. Ils se sont donc intéressés à l'influence du groupe partant (TA1 vs TA1') en comparant un groupe cyano et un fluor, et à l'encombrement de la chaîne latérale sur l'azote. Pour cela, ils ont synthétisé des diamines avec différentes longueurs de chaîne : méthyle (tabun), éthyle (TA1), propyle (TA2). Ils ont également synthétisé des monoamines avec des longueurs de chaîne différentes : méthyle (TA4), éthyle (TA5), propyle (TA6). Les résultats obtenus pour l'inhibition de la BChE sont présentés dans le tableau 2.

	N-group	$k_i$ ( $10^6$ ) ( $M^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )
tabun		$30 \pm 8$
TA1		$1 \pm 0.0$
TA1'		$0.06 \pm 0.003$
TA2		$0.3 \pm 0.03$
TA3		$0.012 \pm 0.001$
TA4		$4 \pm 0.5$
TA5		$8 \pm 0.6$
TA6		$17 \pm 0.3$

Tableau 2 : Constantes d'inhibition de la BChE par le tabun et ses analogues

Nachon et al. ont ainsi mis en évidence que les cyanidates inhibaient plus rapidement la BChE que les fluoridates (TA1 vs TA1'). Ceci peut s'expliquer par l'effet électronique attracteur plus important du cyanure par rapport au fluorure. Le cyanure est également un accepteur par effet mésomère contrairement au fluorure. Ainsi l'atome de phosphore des phosphoramidocyanidates est plus électrophile et plus réactif.

En ce qui concerne la longueur de chaîne, on peut observer que  $k_i$  diminue d'autant plus que la longueur de chaîne augmente. Il semble donc qu'il y ait une taille limite pour les substituants sur l'azote. En effet, TA1 et TA2 possèdent sans doute des groupements trop volumineux pour que l'inhibition se fasse rapidement. Pour les monoamines, l'inhibition augmente avec la longueur de chaîne. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il y a des interactions favorables avec les résidus de la poche acyle, comme l'équipe de F. Nachon a pu le voir sur les structures RX obtenues.

Ainsi, ils ont mis en évidence une relation structure-activité intéressante.

Nous nous sommes penchés sur la même problématique en étudiant la fixation de différents analogues du tabun du point de vue théorique (Schéma 9).

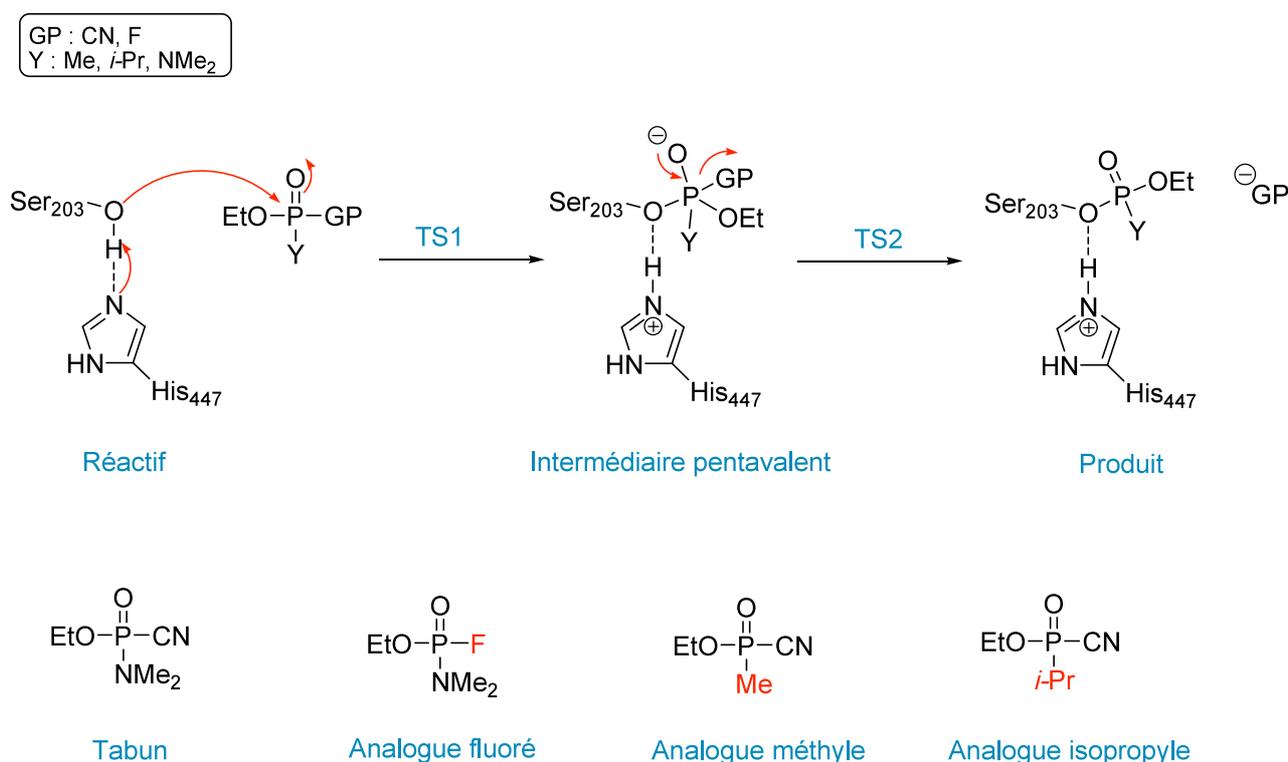


Schéma 9 : Mécanisme d'inhibition et structure des différents analogues étudiés

Afin de voir l'influence du groupe partant, nous avons étudié un analogue pour lequel le groupement cyano est remplacé par un fluor. Pour l'effet du groupement *N*-diméthyle, nous avons étudié deux analogues : l'un avec un méthyle à la place de l'amine, qui nous permet de mettre en évidence les influences stériques et électroniques du *N*-diméthyle, l'autre avec un isopropyle qui permet de discriminer ces deux influences, et ainsi de mettre en évidence uniquement le rôle électronique de l'amine en assumant l'hypothèse qu'il n'y a pas d'échange électronique avec le groupement isopropyle (Schéma 9).

### V.1. Fixation de l'analogue fluoré

Nous avons tout d'abord cherché à comprendre l'influence du groupe partant sur la réactivité. Pour cela, nous avons modélisé un analogue fluoré du tabun, où le groupe cyano est remplacé par un fluor (Schéma 10).

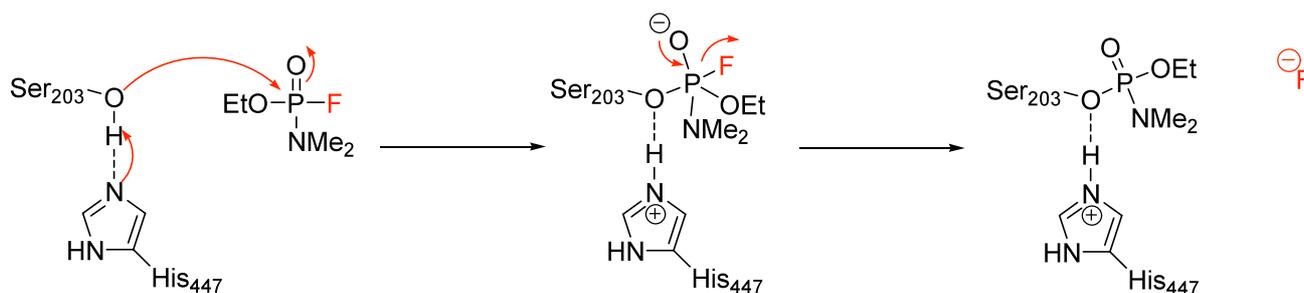


Schéma 10 : Mécanisme d'inhibition de l'AChE par l'analogue fluoré

De la même façon que pour le tabun nous avons étudié l'approche des quatre isomères R-Anti, R-Syn, S-Anti et S-Syn. Il faut noter que comme pour le sarin, le R-Anti de l'analogue fluoré correspond au S-Anti du tabun du point de vue du positionnement spatial des différents groupements dans le site actif. En effet, la dénomination (*R*) et (*S*) est fixée par les règles de Cahn-Ingold-Prelog et pas du tout par l'agencement spatial dans le site actif.

Les résultats pour l'isomère (*R*) de l'analogue fluoré sont présentés figure 11.

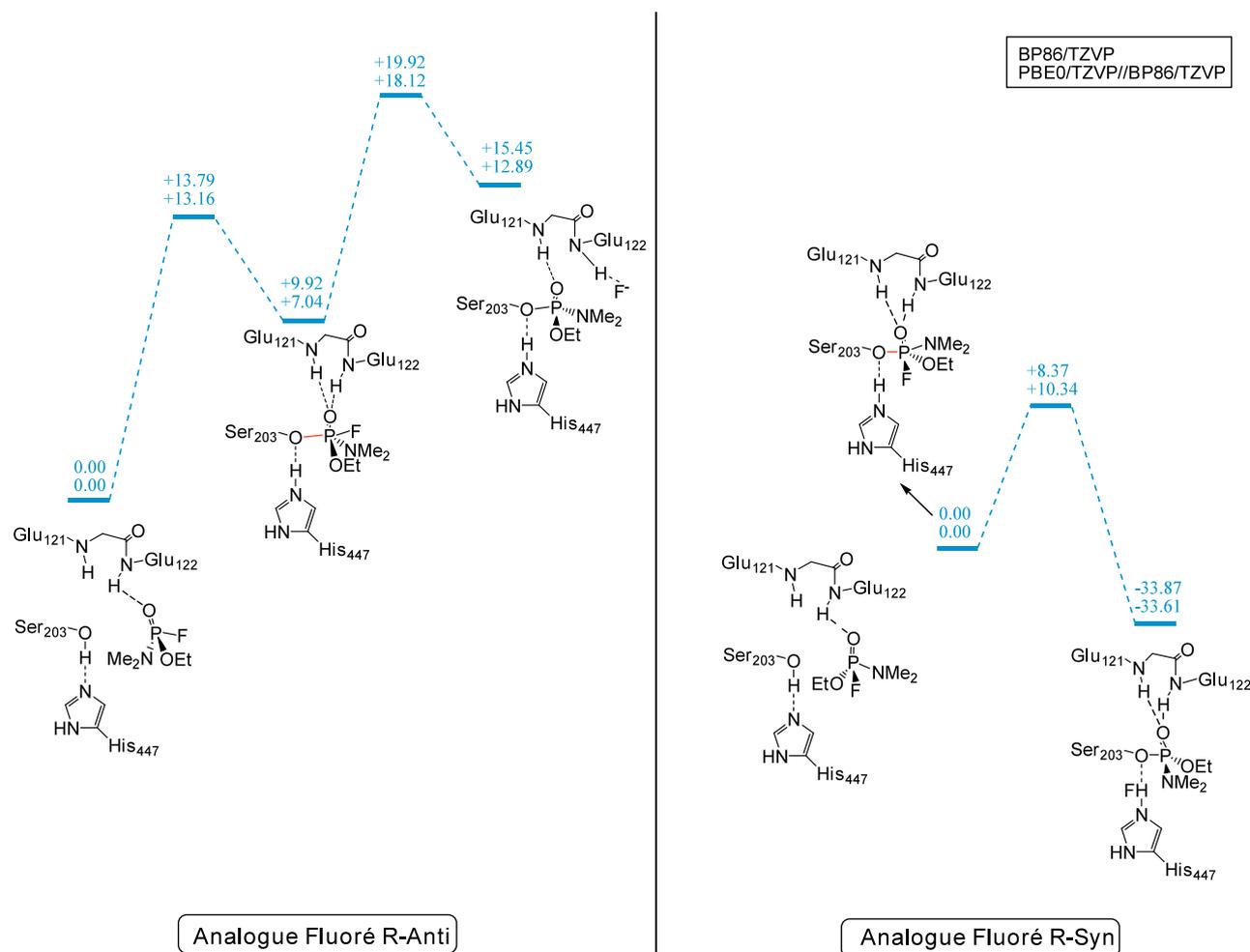


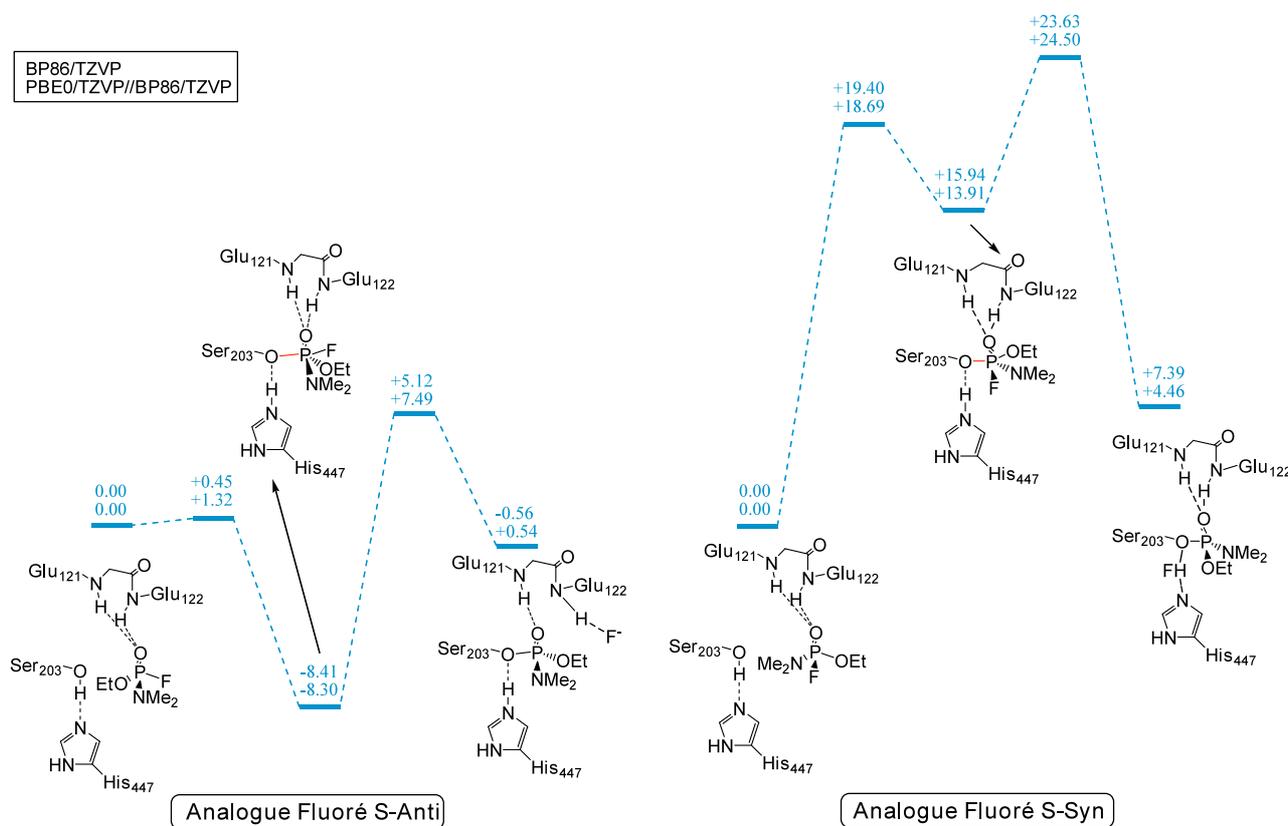
Figure 11 : Profils énergétiques de la fixation des isomères R-Anti et R-Syn de l'analogue fluoré dans l'AChE (PDB 3DL7, E en kcal/mol)

La première étape est toujours l'étape de fixation du phosphore sur l'oxygène de la sérine. Pour l'isomère R-Anti, la barrière est d'environ 14 kcal/mol (BP86/TZVP) et la réaction est fortement endothermique. Cette étape est donc difficile à réaliser, comme c'était le cas pour l'isomère S-Anti du tabun. L'intermédiaire pentavalent est déstabilisé. Nous n'avons pas pu localiser de réactif dans le cas de l'isomère R-Syn. En effet, lorsque nous avons réalisé le scan à partir de l'intermédiaire pentavalent, le fluor ne restait pas dans la bonne position. Nous avons donc cherché à obtenir ce réactif sans passer par le scan, en positionnant de différentes façons la molécule dans le site actif, mais nous avons toujours observé le flip du fluor. Aucun réactif et aucun profil énergétique n'a donc pu être déterminé pour cette étape.

La seconde étape est le départ du fluor. Dans le cas du R-Anti, la barrière est d'environ 5 kcal/mol et la réaction est fortement endothermique, encore une fois parce que le fluorure part dans la direction des résidus aromatiques de la poche acyle (Phe295, Phe297, Phe338). Dans le cas du R-Syn, la barrière est un peu plus élevée (8.37 kcal/mol en BP86/TZVP) et la réaction est fortement

exothermique du fait de la formation de HF dans le milieu (-33.87 kcal/mol en BP86/TZVP). Les profils obtenus pour les isomères (*R*) de l'analogue fluoré sont tout à fait similaires à ceux observés pour l'isomère (*S*) du tabun, à savoir l'étape de fixation du phosphore difficile et endothermique pour le R-Anti et le départ du fluor avec une faible barrière pour les deux isomères, mais endothermique pour le R-Anti et exothermique pour le R-Syn. Ainsi, en ce qui concerne les isomères (*R*) de l'analogue fluoré, l'isomère favorisé est le R-Syn.

Nous avons ensuite modélisé les deux isomères (*S*) de l'analogue fluoré, dont les profils sont présentés figure 12.



**Figure 12 : Profils énergétiques de la fixation des isomères S-Anti et S-Syn de l'analogue fluoré dans l'ACHé (PDB 3DL7, E en kcal/mol)**

En ce qui concerne les isomères (*S*) de l'analogue fluoré, l'étape de fixation du phosphore est très différente selon l'isomère. Pour le S-Anti, cette étape a une barrière très faible (+0.45 kcal/mol en BP86/TZVP), et la réaction est exothermique (-8.41 kcal/mol en BP86/TZVP). Ceci correspond tout à fait à ce qui est observé pour l'isomère R-Anti du tabun. Pour le S-Syn de l'analogue fluoré, la barrière énergétique est au contraire très élevée (+19.40 kcal/mol en BP86/TZVP), et la réaction fortement endothermique (+15.94 kcal/mol en BP86/TZVP), comme pour l'isomère R-Syn du tabun. L'étape de départ du fluor a une barrière d'environ 14 kcal/mol (BP86/TZVP) pour le S-

Anti, et la réaction est endothermique pour la même raison que précédemment à savoir les interactions défavorables entre le fluorure et les résidus hydrophobes de la poche acyle. Il faut noter que la fixation de l'isomère S-Anti de l'analogue fluoré est globalement isoénergétique, voire légèrement exothermique (-0.56 kcal/mol en BP86/TZVP). Dans le cas de l'isomère S-Syn, le départ du fluor a une barrière d'environ 8 kcal/mol (BP86/TZVP) et cette étape est exothermique. Cependant, la fixation de l'isomère S-Syn de l'analogue fluoré est globalement endothermique (+7.39 kcal/mol en BP86/TZVP). Ces profils énergétiques sont une fois de plus totalement comparables à ceux obtenus avec les isomères (*R*) du tabun, et le S-Anti est favorisé.

Ainsi, la fixation de l'analogue fluoré du tabun dans le site actif de l'AChE présente un profil similaire à celui du tabun quel que soit l'isomère. Il semble donc qu'il n'y ait pas d'influence du groupe partant pour la fixation du tabun dans l'AChE. Ceci contredit ce qu'avait exposé F. Nachon et al. Cependant, dans nos calculs nous ne prenons en compte que la réaction chimique proprement dite, et pas l'entrée dans le site actif ou les réarrangements qui peuvent avoir lieu une fois le groupe partant parti par exemple. Ainsi d'autres facteurs interviennent probablement dans la cinétique de la réaction d'inhibition, ce qui peut expliquer les différences de résultats obtenus.

Une fois éclaircie l'influence du groupe partant, nous nous sommes intéressés à l'influence du groupement *N*-diméthyle fixé sur le phosphore. Deux effets peuvent intervenir à ce niveau :

- Un effet stérique, du fait de l'encombrement du à l'amine volumineuse
- Un effet électronique, du fait de la délocalisation des électrons de l'azote sur le phosphore.

L'effet électronique du doublet non liant de l'azote est l'hypothèse généralement avancée pour expliquer la difficile réactivation du complexe AChE-tabun. En effet, en se délocalisant sur le phosphore, le doublet non liant de l'azote diminue l'électrophilie du phosphore, qui est donc moins sensible aux attaques nucléophiles.

Pour séparer ces deux effets, deux analogues ont été modélisés :

- Un analogue avec un méthyle à la place de l'amine qui mettra en évidence les deux effets conjointement sans qu'on puisse les discriminer
- Un analogue avec un isopropyle à la place de l'amine, qui est également un groupement volumineux, et mettra donc en évidence uniquement les effets électroniques de l'amine.

Nous avons commencé notre étude avec l'analogue méthyle.

## V.2. Fixation de l'analogue méthyle

L'analogue méthyle permet donc de déterminer conjointement les effets électroniques et stériques du groupement *N*-diméthyle. Sa structure est représentée sur le schéma 11.

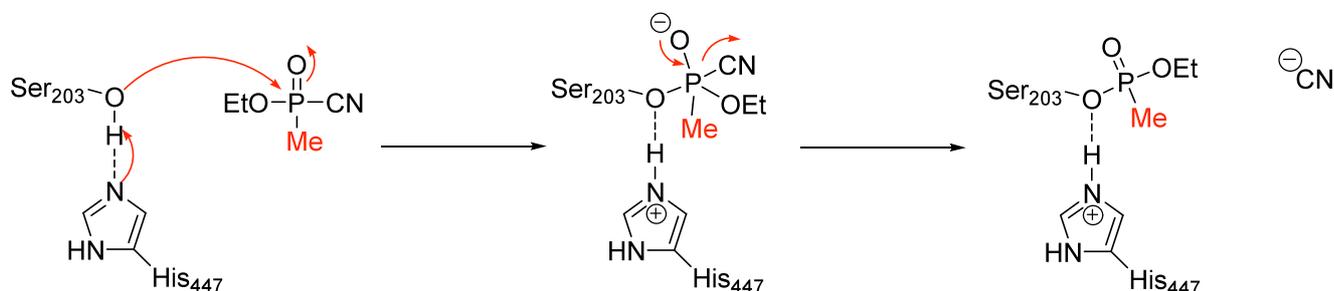
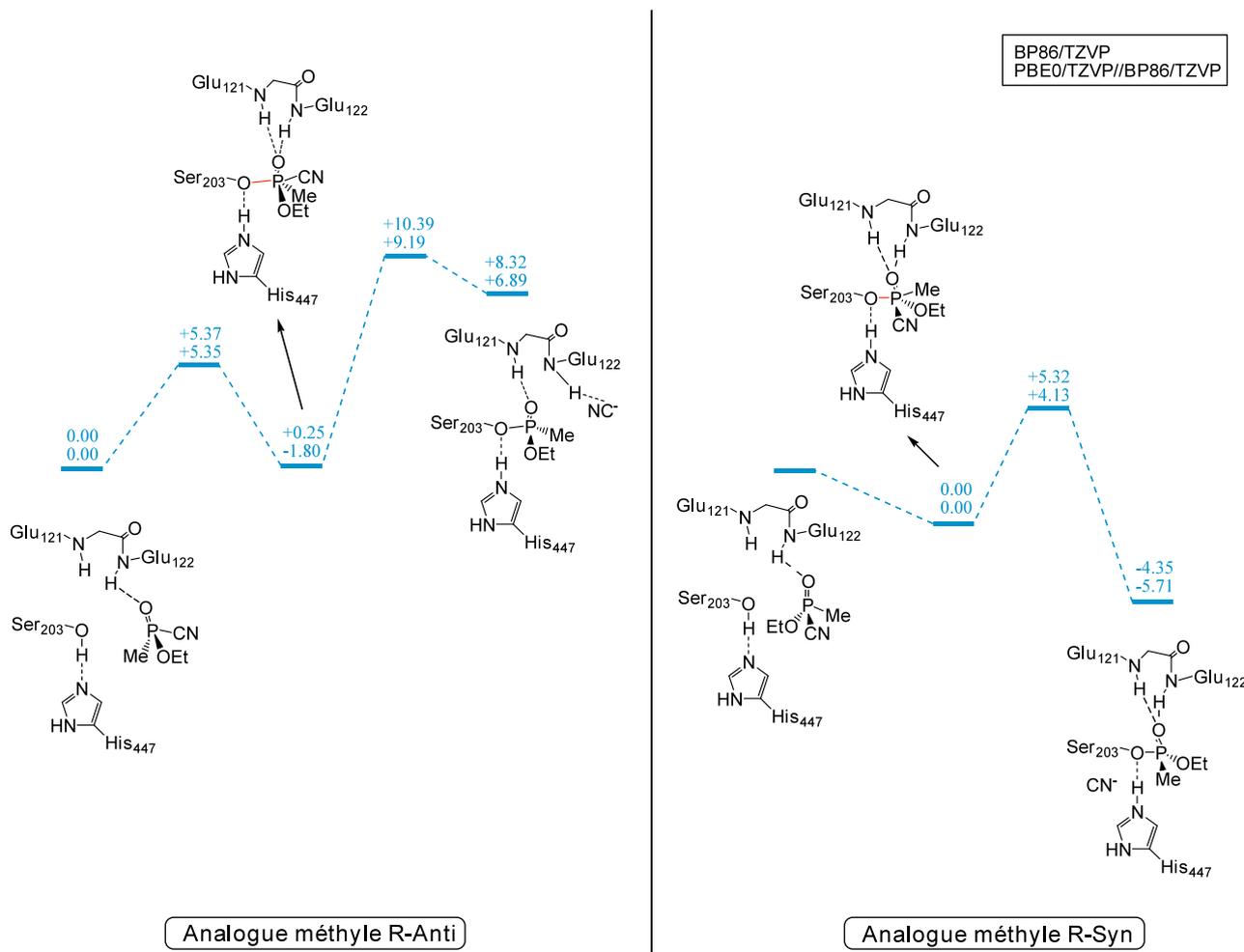


Schéma 11 : Mécanisme d'inhibition de l'AChE par l'analogue méthyle

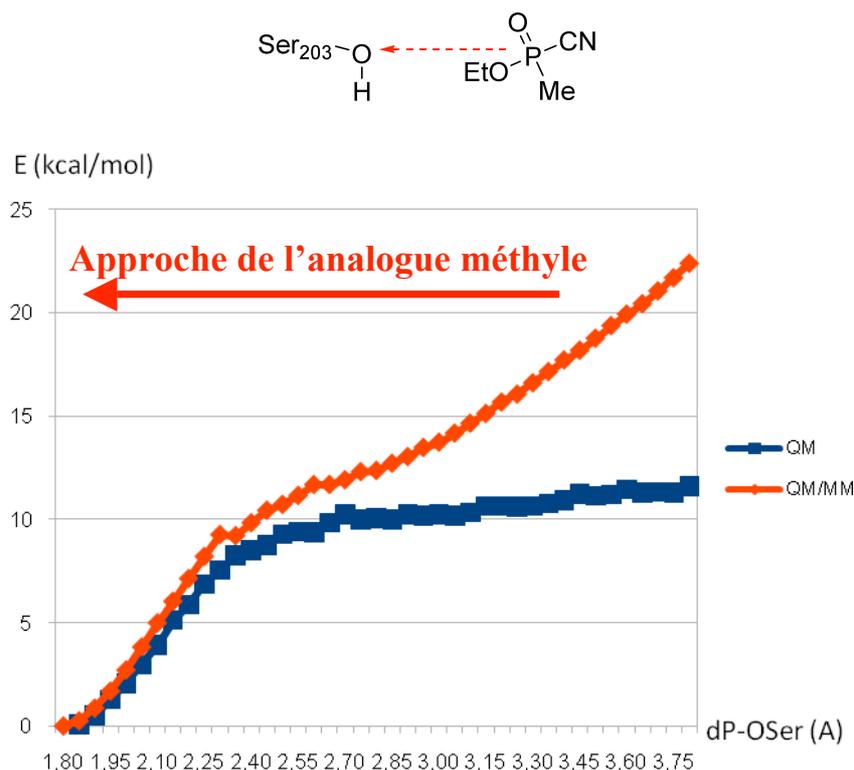
Nous avons étudié comme précédemment les quatre approches possibles dans le site actif de l'AChE, à savoir le R-Anti, le R-syn, le S-Anti et le S-Syn. Il faut noter que le R-Anti de l'analogue méthyle correspond au S-Anti du tabun par rapport au positionnement des groupements dans le site actif.

Les résultats pour les isomères (R) sont présentés figure 13.



**Figure 13 :** Profils énergétiques de la fixation des isomères R-Anti et R-Syn de l'analogue méthyle dans l'AChE (PDB 3DL7, E en kcal/mol)

La première étape est la fixation du phosphore sur la sérine du site actif. Pour le R-Anti, la réaction a une barrière d'environ 5 kcal/mol (BP86/TZVP), et elle est isoénergétique (+0.25 kcal/mol en BP86/TZVP). Dans le cas du R-Syn, aucun réactif n'a pu être isolé, comme c'était le cas pour le S-Syn du tabun. En effet, lorsqu'on réalise le scan à partir de l'intermédiaire pentavalent, l'énergie de la zone QM atteint un palier, mais celle de la zone QM/MM diverge et ne cesse de croître sans doute à cause du fait qu'on s'éloigne trop du site actif.



**Figure 14 : Scan de l'approche du phosphore sur l'oxygène de la sérine pour l'isomère R-Syn de l'analogue méthyle (E en kcal/mol, BP86/TZVP)**

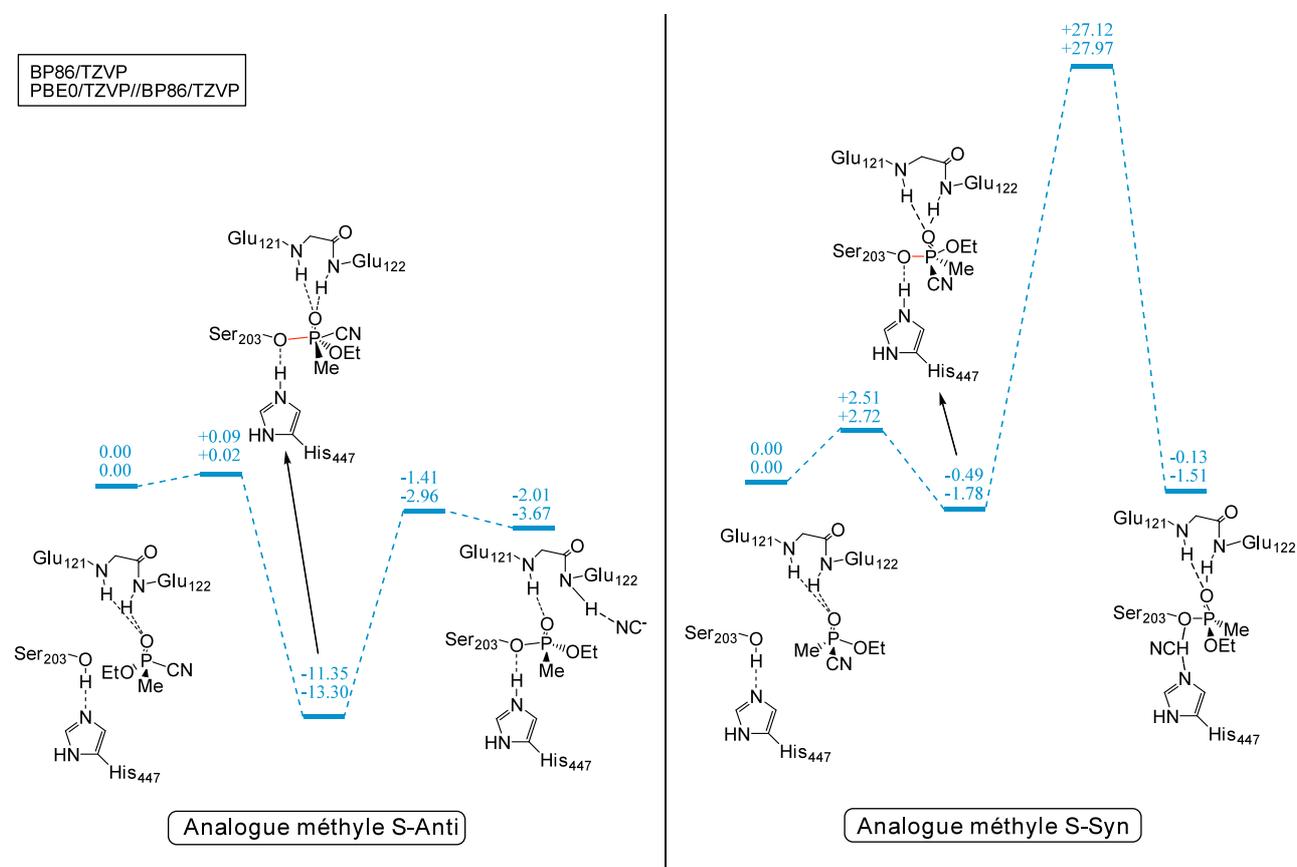
Cependant, d'après le scan précédent, on peut considérer la réaction comme étant sans barrière énergétique (Figure 14). Il semble en effet que le site actif n'arrive pas à accommoder le réactif, ce qui est un effet de simulation.

La seconde étape (départ du cyanure) pour l'isomère R-Anti de l'analogue méthyle se fait assez facilement, puisque la barrière est d'environ 10 kcal/mol (BP86/TZVP). Par contre comme à chaque fois que le groupe partant est en *anti* par rapport à l'oxygène de la sérine, la réaction est endothermique du fait des interactions défavorables avec les résidus de la poche acyle. Globalement l'inhibition de l'AChE par l'analogue méthyle R-Anti est endothermique, mais si nous prenons en compte l'entropie, elle serait probablement exothermique. Pour l'isomère R-Syn, le départ du cyanure a une barrière énergétique d'environ 5 kcal/mol (BP86/TZVP) et la réaction est exothermique (-4.35 kcal/mol en BP86/TZVP).

Ainsi, les résultats obtenus pour les isomères (*R*) de l'analogue méthyle montrent un profil d'allure proche de celle obtenue pour les isomères (*S*) du tabun, mais avec des barrières énergétiques plus faibles, notamment pour l'étape de fixation du phosphore sur la sérine dans le cas du R-Anti (5.37 kcal/mol vs 15.75 kcal/mol). Il semble donc bien qu'il y ait une influence du groupement

*N*-diméthyle.

Afin de confirmer ces premiers résultats, observons ceux obtenus avec les isomères (*S*) de l'analogue méthyle (figure 15).



**Figure 15 : Profils énergétiques de la fixation des isomères S-Anti et S-Syn de l'analogue méthyle dans l'AChE (PDB 3DL7, E en kcal/mol)**

La même tendance que pour les isomères (*R*) est observée. Pour l'étape de fixation du phosphore sur la sérine, la barrière énergétique est très faible pour l'isomère S-Anti (+0.09 kcal/mol en BP86/TZVP) et la réaction est exothermique : l'intermédiaire pentavalent est fortement stabilisé (-11.35 kcal/mol en BP86/TZVP). Pour l'isomère S-Syn, la barrière est également très faible (+2.51 kcal/mol en BP86/TZVP) alors qu'elle était élevée dans le cas du tabun R-Syn (+15.27 kcal/mol en BP86/TZVP). La réaction est exothermique (-0.49 kcal/mol en BP86/TZVP) alors qu'elle était endothermique dans le cas du tabun (+10.15 kcal/mol en BP86/TZVP).

La seconde étape (départ du cyanure) a une barrière d'environ 10 kcal/mol (BP86/TZVP) pour le S-Anti, et elle est endothermique. La réaction totale (fixation du phosphore + départ du cyanure) est globalement exothermique (-2.01 kcal/mol en BP86/TZVP).

Pour l'isomère S-Syn, la barrière est par contre très élevée (+27.61 kcal/mol en BP86/TZVP) et la

réaction est légèrement endothermique. L'inhibition de l'AChE par l'isomère S-Syn de l'analogue méthyle est par contre globalement exothermique (-0.13 kcal/mol en BP86/TZVP).

Ainsi, il semble que lorsqu'on remplace le *N*-diméthyle par un méthyle, la sélectivité de l'enzyme est moins importante. En effet, l'étape de fixation du phosphore a une très faible barrière quel que soit l'isomère, y compris pour les isomères ne donnant pas les groupements positionnés comme dans l'adduit cristallographique dans le site actif. Pour ces deux isomères de l'analogue méthyle (R-Anti et S-Syn), la fixation du phosphore sur la sérine se fait beaucoup plus facilement que dans le cas du tabun pour les isomères correspondant (S-Anti et R-Syn). La seconde étape (départ du cyanure) est par contre très proche de celle du tabun. Les barrières sont un peu plus faibles (environ 10 kcal/mol pour les deux isomères *anti* vs 14 kcal/mol dans le cas du tabun, environ 5 kcal/mol pour le R-Syn vs 8 kcal/mol pour le tabun S-Syn). On peut donc dire que globalement la fixation de l'analogue méthyle se fait plus facilement quel que soit l'isomère considéré. Ainsi, il y a une réelle influence du *N*-diméthyle. Cependant, l'étude de cet analogue ne permet pas de discriminer les effets électroniques et stériques. Nous pouvons juste conclure que l'amine tertiaire fixée sur le phosphore a une influence stérique et/ou électronique sur la réactivité du tabun dans le site actif de l'AChE.

Pour différencier ces deux effets, nous avons modélisé un analogue avec un isopropyle à la place de l'amine, ce qui devrait nous permettre de mettre en évidence les éventuels effets électroniques du *N*-diméthyle.

### **V.3. Analogue isopropyle**

Nous avons étudié les quatre approches possibles de l'analogue isopropyle (R-Anti, R-Syn, S-Anti, S-Syn). Il faut noter que le R-Anti de l'analogue méthyle correspond au S-Anti du tabun par rapport au positionnement des groupements dans le site actif. La structure de l'analogue isopropyle est présentée schéma 12.

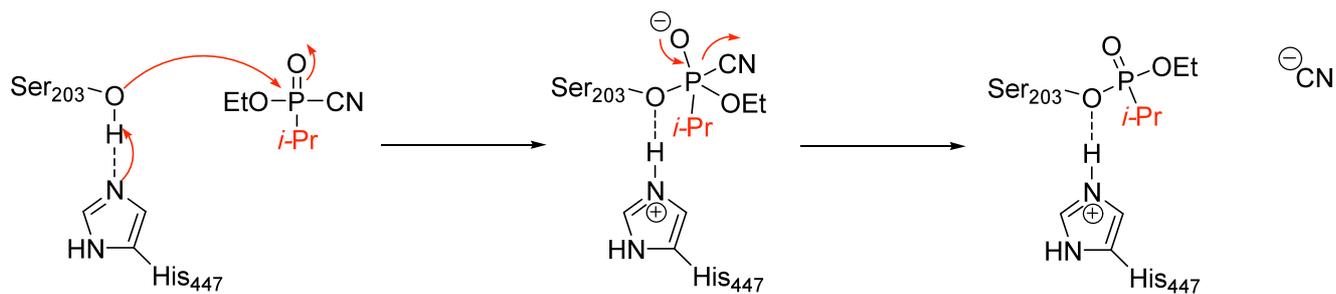


Schéma 12 : Mécanisme d'inhibition de l'AChE par l'analogue isopropyle

L'étude de l'analogue isopropyle nous permet d'éclairer l'importance des effets électroniques du à l'amine tertiaire directement fixée sur le phosphore.

Les résultats pour les isomères (*R*) sont présentés figure 16.

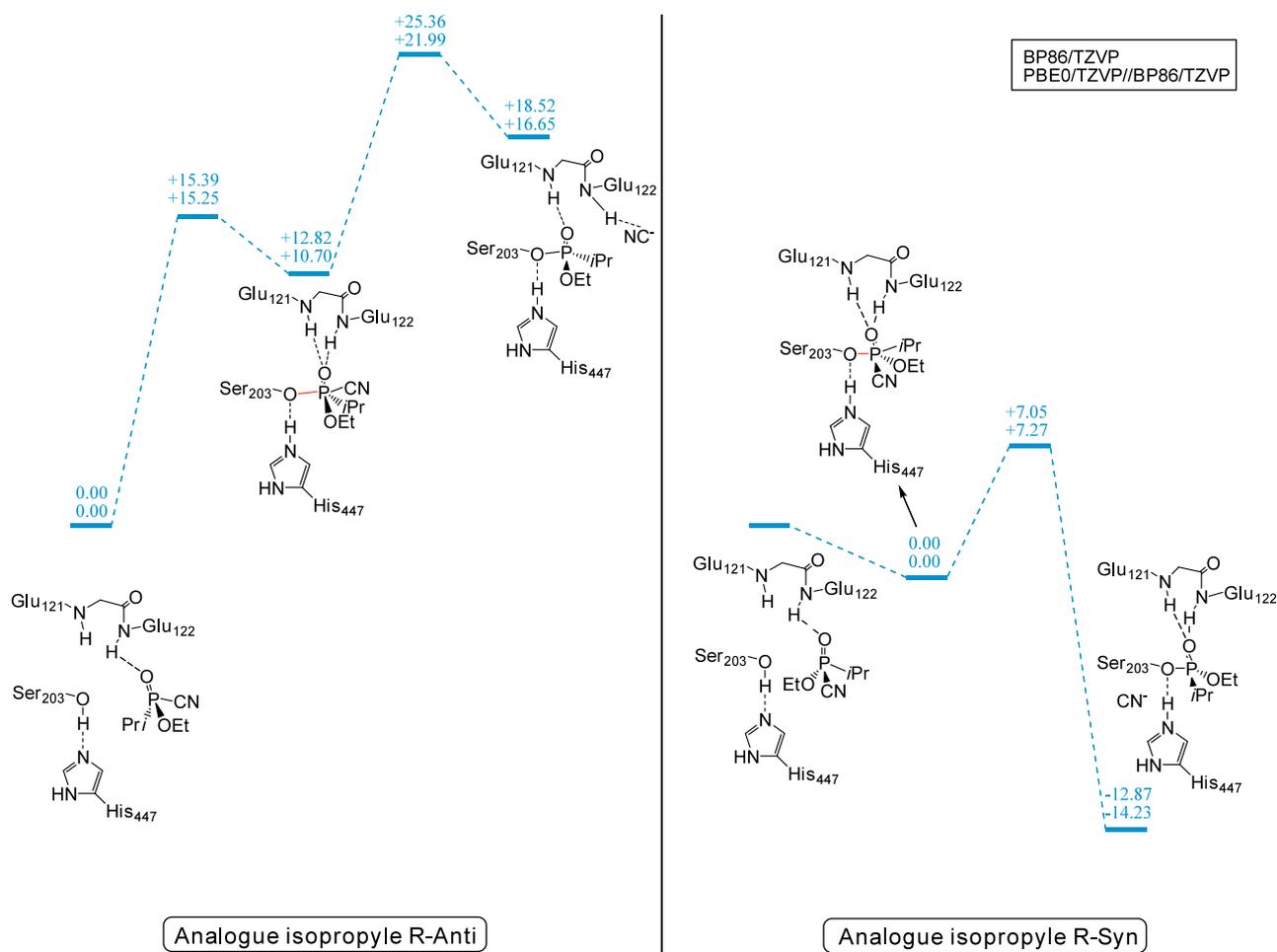
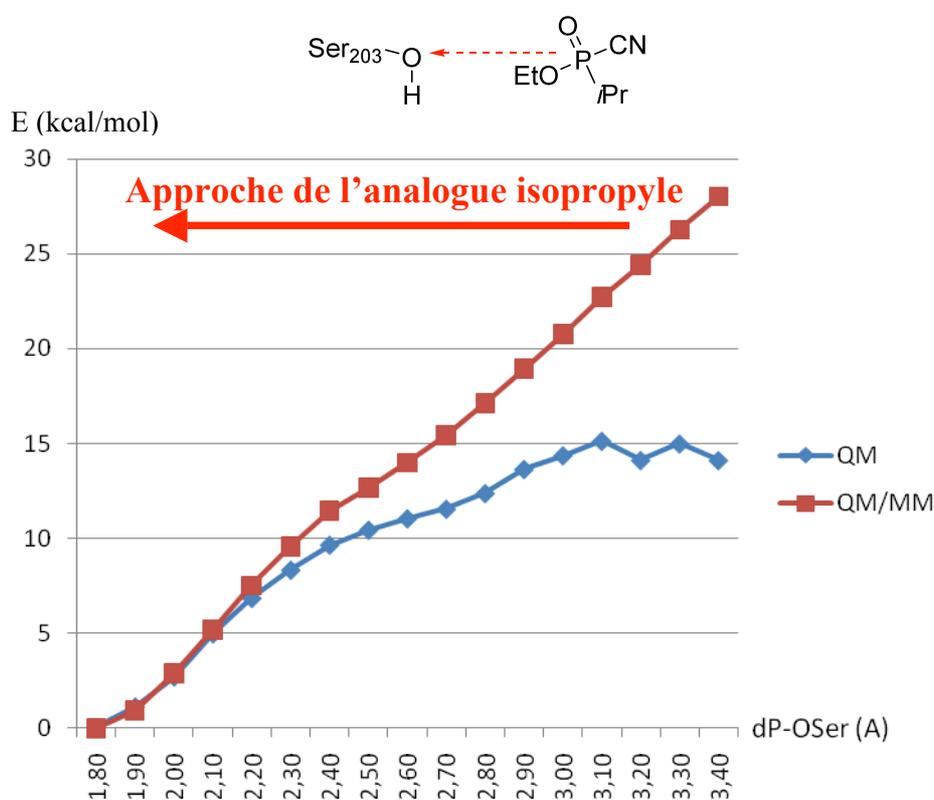


Figure 16 : Profils énergétiques de la fixation des isomères R-Anti et R-Syn de l'analogue isopropyle dans l'AChE (PDB 3DL7, E en kcal/mol)

La première étape correspond à la fixation du phosphore sur l'oxygène de la sérine. De la même façon que pour le tabun, pour l'isomère R-Anti de l'analogue isopropyle, la barrière énergétique est importante pour cette étape (+15.39 kcal/mol vs +15.75 kcal/mol pour le tabun S-Anti en BP86/TZVP). La réaction est fortement endothermique (+12.82 kcal/mol vs +8.22 kcal/mol pour le tabun S-Anti en BP86/TZVP). Pour l'isomère R-Syn, le réactif n'a pu être isolé, comme c'était le cas pour l'isomère S-Syn du tabun et l'isomère R-Syn de l'analogue méthyle. Si le réactif est trop éloigné, la zone MM optimisée n'est plus suffisamment large pour décrire correctement le système. On observe ainsi un palier pour l'énergie QM alors que l'énergie QM/MM diverge. On peut considérer cette réaction comme sans barrière énergétique et exothermique d'après le scan obtenu comme c'était le cas pour le tabun S-Syn (Figure 17).

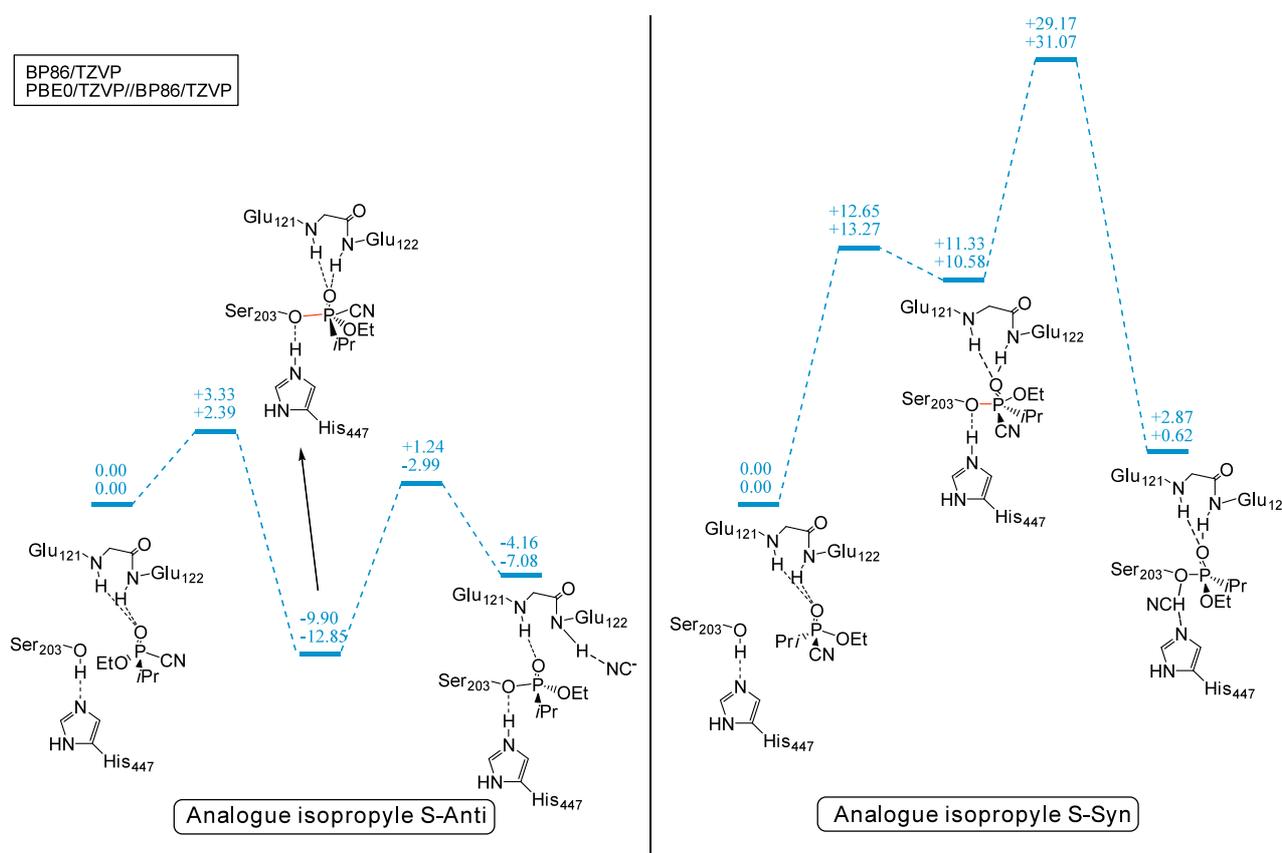


**Figure 17 : Scan de l'approche du phosphore sur l'oxygène de la sérine pour l'isomère R-Syn de l'analogue isopropyle (E en kcal/mol, BP86/TZVP)**

La seconde étape a également un profil comparable à celui obtenu pour le tabun. Pour l'isomère R-Anti, la barrière énergétique du départ du cyanure est d'environ 13 kcal/mol (BP86/TZVP) alors qu'elle était de 14 kcal/mol pour l'isomère S-Anti du tabun. La réaction est endothermique dans les deux cas du fait des interactions défavorables entre le cyanure et les résidus hydrophobes de la

poche acyle. Pour l'isomère R-Syn, le départ du cyanure a une barrière énergétique d'environ 7 kcal/mol (BP86/TZVP), ce qui est très proche de la barrière obtenue pour l'isomère S-Syn du tabun (+8.03 kcal/mol en BP86/TZVP). La réaction est fortement exothermique (-12.87 kcal/mol).

Ainsi, pour les isomères (*R*) de l'analogue isopropyle, les profils obtenus sont tout à fait similaires à ceux obtenus pour les isomères (*S*) du tabun. Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié la fixation des isomères (*S*) de l'analogue isopropyle (Figure 18).



**Figure 18 : Profils énergétiques de la fixation des isomères S-Anti et S-Syn de l'analogue isopropyle dans l'AChE (PDB 3DL7, E en kcal/mol)**

Pour l'isomère S-Anti, l'étape de fixation du phosphore sur l'oxygène de la sérine a une faible barrière énergétique (+3.33 kcal/mol en BP86/TZVP), et la réaction est fortement exothermique (-9.90 kcal/mol en BP86/TZVP). Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus pour l'isomère R-Anti du tabun (barrière de +0.09 kcal/mol, exothermicité de -7.87 kcal/mol en BP86/TZVP). Pour l'isomère S-Syn de l'analogue isopropyle, les résultats sont également similaires à ceux obtenus avec le tabun pour la fixation du phosphore (+12.65 kcal/mol vs +15.27 kcal/mol en BP86/TZVP). La réaction est endothermique (+11.33 kcal/mol en BP86/TZVP). L'étape de départ du cyanure est

également en tout point comparable à celle avec le tabun. Pour l'isomère S-Anti, la barrière énergétique est d'environ 11 kcal/mol (BP86/TZVP), et la réaction est endothermique, du fait de la proximité du cyanure avec les résidus de la poche acyle.

Il faut noter que le processus est cependant globalement exothermique pour l'isomère S-Anti de l'analogie isopropyle (-4.16 kcal/mol en BP86/TZVP). La barrière énergétique est d'environ 18 kcal/mol pour le départ du cyanure de l'isomère S-Syn, et la réaction est exothermique.

Pour l'analogie isopropyle, les profils énergétiques obtenus quel que soit l'isomère considéré sont totalement analogues à ceux obtenus pour le tabun. Il semble donc que le groupement *N*-diméthyle n'ait pas d'influence électronique, puisqu'avec un groupement à l'encombrement équivalent mais sans doublet délocalisable sur le phosphore, les résultats sont identiques.

Ainsi, nous avons modélisé la fixation de trois analogues du tabun dans le site actif de l'enzyme (Tableau 3) :

- un analogue fluoré pour voir l'influence du groupe partant
- un analogue méthyle pour voir l'influence stérique et électronique du groupement *N*-diméthyle
- un analogue isopropyle pour voir l'influence électronique du groupement *N*-diméthyle.

Les profils obtenus pour l'analogie fluoré sont similaires à ceux obtenus avec le tabun, il n'y a donc pas d'effet du groupe partant pour la fixation du tabun dans l'AChE. Cependant, des tests biologiques d'inhibition de la BChE avaient montré que les phosphoramidocyanidates inhibaient plus rapidement la BChE que les phosphoramidofluoridates.<sup>126</sup> La différence observée entre nos résultats peut s'expliquer par le fait que nous ne prenons en compte dans nos calculs que la réaction chimique proprement dite, alors que d'autres facteurs peuvent intervenir (réarrangements, sortie du site actif...).

En ce qui concerne le groupement *N*-diméthyle, les barrières énergétiques sont globalement plus faibles pour l'analogie méthyle que pour le tabun. On peut donc supposer un effet électronique et/ou stérique de l'amine tertiaire fixée sur le phosphore. Pour discriminer ces deux effets, nous avons modélisé l'analogie isopropyle qui donne des résultats identiques à ceux obtenus avec le

---

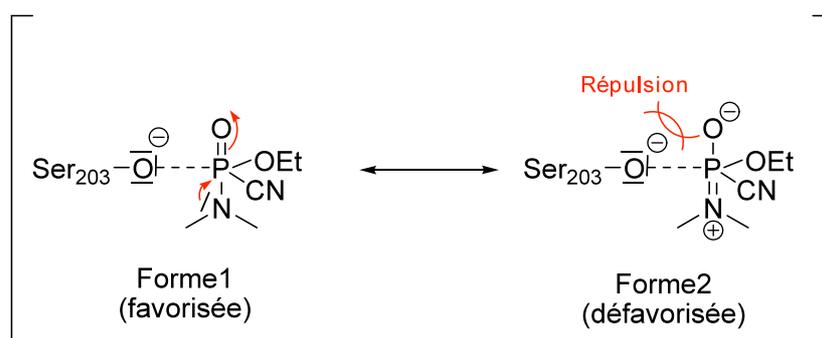
<sup>126</sup> Carletti, E.; Aurbek, N.; Gillon, E.; Loiodice, M.; Nicolet, Y.; Fontecilla-Camps, J-C.; Masson, P.; Thiermann, H.; Nachon, F.; Worek, F. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 97.

tabun. Il n'y a donc pas d'effet électronique important dû au *N*-diméthyle. Par conséquent, de ces deux expériences nous pouvons déduire que l'amine fixée sur le phosphore a une influence stérique sur le mécanisme de fixation du tabun dans l'AChE. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Nachon et al., puisque plus la longueur de chaîne augmentait, plus l'inhibition était difficile.

	Isomère	TS1	TS2		Isomère	TS1	TS2
<b>Tabun</b>	R-Anti	0.09	13.67	<b>Analogue Méthyle</b>	S-Anti	0.09	9.94
	R-Syn	15.67	15.96		S-Syn	2.51	27.61
	S-Anti	15.75	13.05		R-Anti	5.37	10.14
	S-Syn	Sans barrière	8.03		R-Syn	Sans barrière	5.32
<b>Analogue Fluoré</b>	S-Anti	0.45	13.53	<b>Analogue Isopropyle</b>	S-Anti	3.33	11.11
	S-Syn	19.40	7.69		S-Syn	12.65	17.84
	R-Anti	13.79	10.00		R-Anti	15.39	12.54
	R-Syn	/	8.37		R-Syn	Sans barrière	7.05

**Tableau 3 : Barrières énergétiques pour la fixation du tabun et de ses analogues (BP86/TZVP, E en kcal/mol)**

Le fait que le groupement *N*-diméthyle n'ait pas d'influence électronique peut s'expliquer si on regarde les formes mésomères du tabun dues au doublet non liant de l'azote (Schéma 13). En effet, dans la forme « ammonium » (forme 2), il y a une forte répulsion entre l'oxygène porteur de la charge négative fixé au phosphore et l'oxygène de la sérine lors de l'approche du tabun. L'équilibre est ainsi fortement déplacé vers la forme 1. Le doublet de l'azote n'influence donc pas vraiment la nucléophilie du phosphore.



**Schéma 13 : Formes mésomères du tabun à l'approche de la sérine**

Ainsi, l'encombrement induit par le groupement *N*-diméthyle entraîne une sélectivité importante au niveau de l'isomère fixé dans l'AChE, et notamment discrimine les positions des groupements

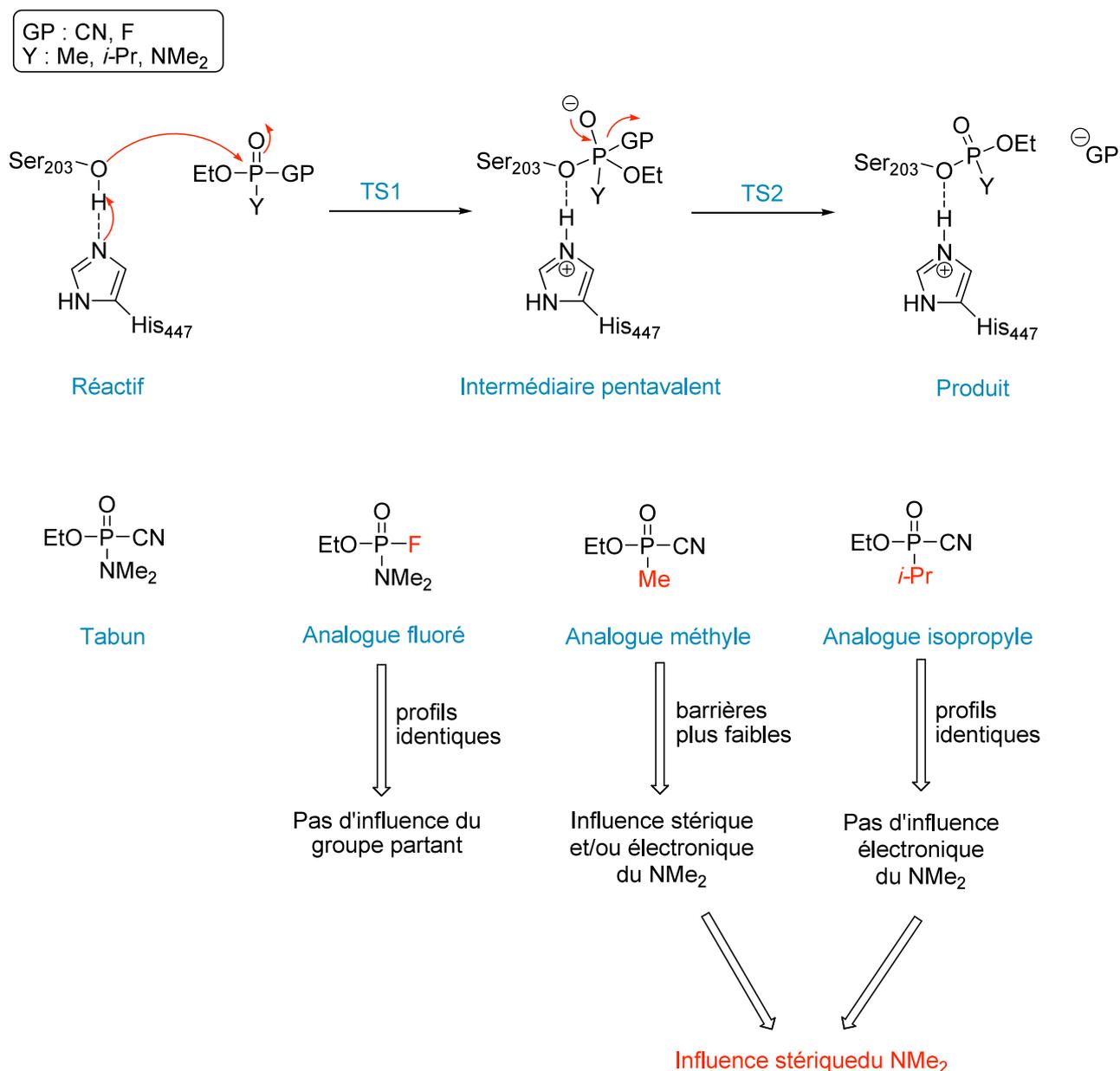
éthoxy et *N*-diméthyle dans le site actif. Ceci est tout à fait en accord avec les données expérimentales, puisque les deux isomères favorisés sont ceux qui aboutissent à l'adduit observé en cristallographie dans le cas du tabun. On peut observer que dans le cas de l'analogue méthyle, la différence entre les barrières énergétiques des isomères menant à l'adduit cristallographique (S-Anti, R-Syn) et celles des isomères qui ne mènent pas à l'adduit cristallographique (R-Anti, S-Syn) est beaucoup plus faible que dans le cas du tabun (R-Anti, S-Syn vs S-Anti R-Syn), ce qui tend à montrer que lorsque l'encombrement stérique est moindre, la sélectivité de l'enzyme l'est également.

## VI. Conclusion

Dans un premier temps, nous avons modélisé la fixation du sarin dans le site actif de l'AChE afin de tester notre modèle QM/MM. De notre étude ressort que l'isomère le plus actif du sarin est le S-Anti, ce qui est en accord avec les données expérimentales et valide donc notre système.

Une fois cette précaution prise, nous avons réalisé l'étude de la fixation du tabun. Une fois encore, les données expérimentales ont été retrouvées, puisque les deux isomères les plus actifs sont le R-Anti et le S-Syn qui conduisent tous les deux à l'adduit observé en cristallographie. Cependant, nous avons déterminé que l'isomère le plus actif des deux est le S-Syn, alors qu'il était admis que le groupe partant partait en *anti* par rapport à l'oxygène de la sérine selon un mécanisme classique type SN2. Afin de lever définitivement le doute sur ce problème, il faudrait séparer les deux énantiomères, et les tester *in vitro* séparément en leur attribuant une configuration absolue. Ceci souligne bien qu'il nous reste beaucoup de choses à apprendre, même sur une enzyme très bien connue telle que l'AChE.

Pour mieux cerner les différents paramètres régissant la réactivité du tabun dans le site actif, nous avons modélisé trois analogues : un analogue fluoré soulignant l'influence du groupe partant, un analogue méthyle et un analogue isopropyle, soulignant l'influence du groupement *N*-diméthyle. D'après nos calculs, le groupe partant a peu d'influence sur la réactivité du tabun. Par contre, le groupement *N*-diméthyle en a une : l'encombrement stérique provoqué par cette amine tertiaire entraîne une inhibition plus difficile de l'AChE. Cependant, le complexe AChE-tabun étant l'un des plus difficile à réactiver, il n'en reste pas moins redoutable. Aucun effet électronique n'a cependant été mis en évidence (Schéma 14).



**Schéma 14 : Résumé des résultats obtenus avec les différents isomères du tabun**

Ces paramètres sont intéressants pour la réactivation, notamment l'influence stérique du *N*-diméthyle. En effet, il est couramment admis que si le complexe AChE-tabun est difficile à réactiver, c'est à cause du doublet non liant de l'azote qui se délocalise sur le phosphore, défavorisant une attaque nucléophile. Mais aux vues de nos résultats qui insistent sur l'effet stérique du *N*-diméthyle, il est possible que ce soient seulement les orbitales de l'azote qui gênent l'approche de l'oxime.

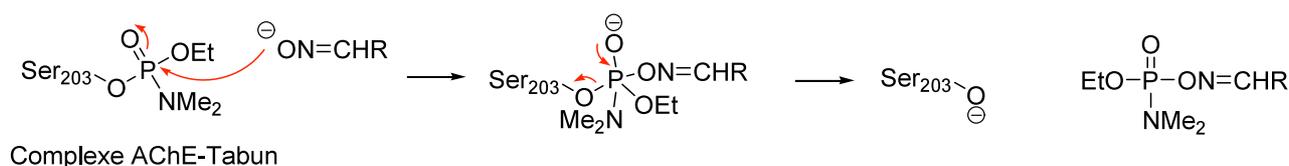
Munis de ces informations, nous nous sommes ensuite intéressés à la réactivation du complexe AChE-tabun.

## **CHAPITRE 5**

# **ETUDE THEORIQUE DE LA REACTIVATION DE L'ACETYLCHOLINESTERASE INHIBEE PAR LE TABUN ET CONCEPTION D'UN NOUVEAU REACTIVATEUR**

## I. Introduction

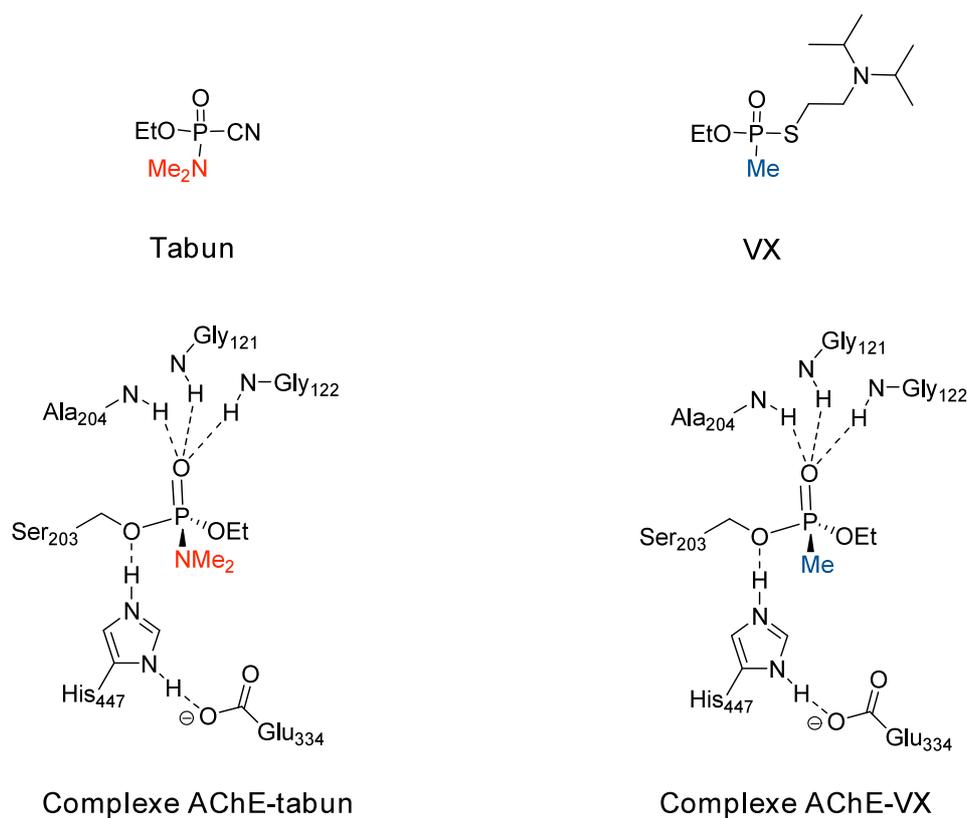
Comme présenté dans l'introduction générale, les oximes sont les réactivateurs de choix pour hydrolyser le complexe AChE-organophosphoré (Schéma 1). Cependant, tous les organophosphorés ne réagissent pas de la même manière, et il n'existe aucun réactivateur universel. En effet, aucune oxime n'est efficace contre les intoxications de tous les organophosphorés.



**Schéma 1 : Mécanisme proposé de réactivation du complexe AChE-tabun par une oxime**

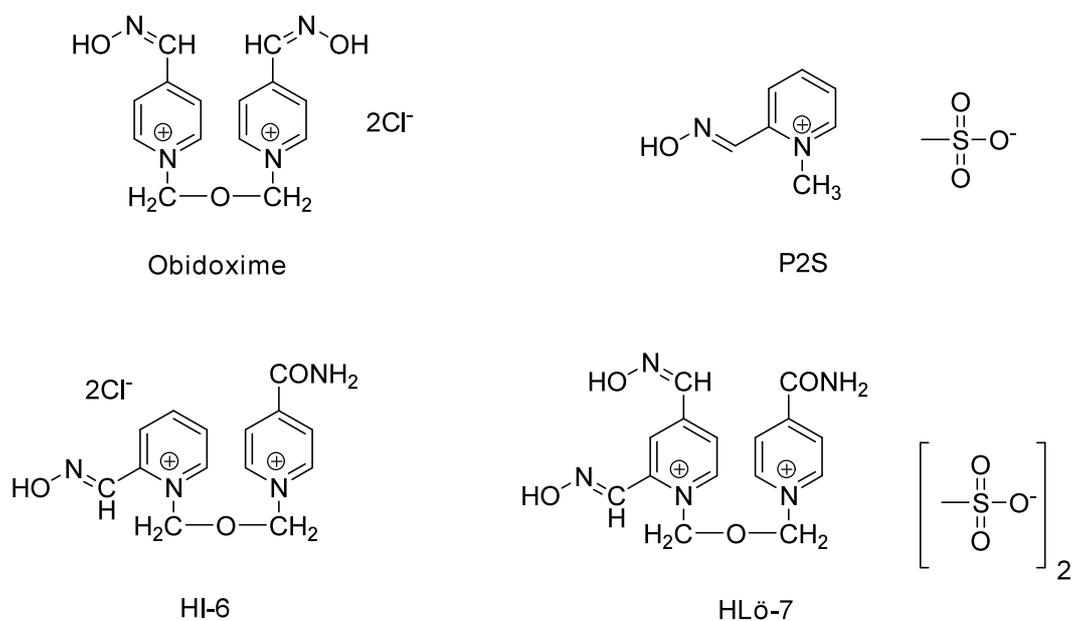
Nous nous intéressons plus particulièrement au tabun car il est très difficilement réactivé par la plupart des oximes couramment utilisées. L'explication généralement donnée pour l'hydrolyse difficile du complexe AChE-tabun est la structure particulière du tabun qui possède une amine tertiaire directement fixée sur le phosphore. Le doublet non liant de l'azote peut en effet se délocaliser sur le phosphore et ainsi exacerber sa nucléophilie, le rendant moins sensible aux attaques nucléophiles des oximes. Cependant, notre précédente étude montre d'un point de vue théorique que le *N*-diméthyle aurait une influence stérique plus qu'électronique. Notre but est donc de déterminer une relation structure-activité pour les oximes susceptibles de réactiver le complexe AChE-tabun et *in fine* de concevoir de nouvelles structures de réactivateurs.

Afin de voir précisément l'influence du groupement *N*-diméthyle sur la réactivation du complexe AChE-tabun, nous avons également étudié le complexe AChE-VX pour lequel l'amine est remplacée par un groupement méthyle (Schéma 2).



**Schéma 2 : Structures des complexes AChE-tabun et AChE-VX**

Expérimentalement, le complexe AChE-VX est plus facilement réactivé par les oximes classiques (Schéma 3) que le complexe AChE-tabun, comme on peut le voir sur la figure 1.



**Schéma 3 : Oximes testées pour la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX**

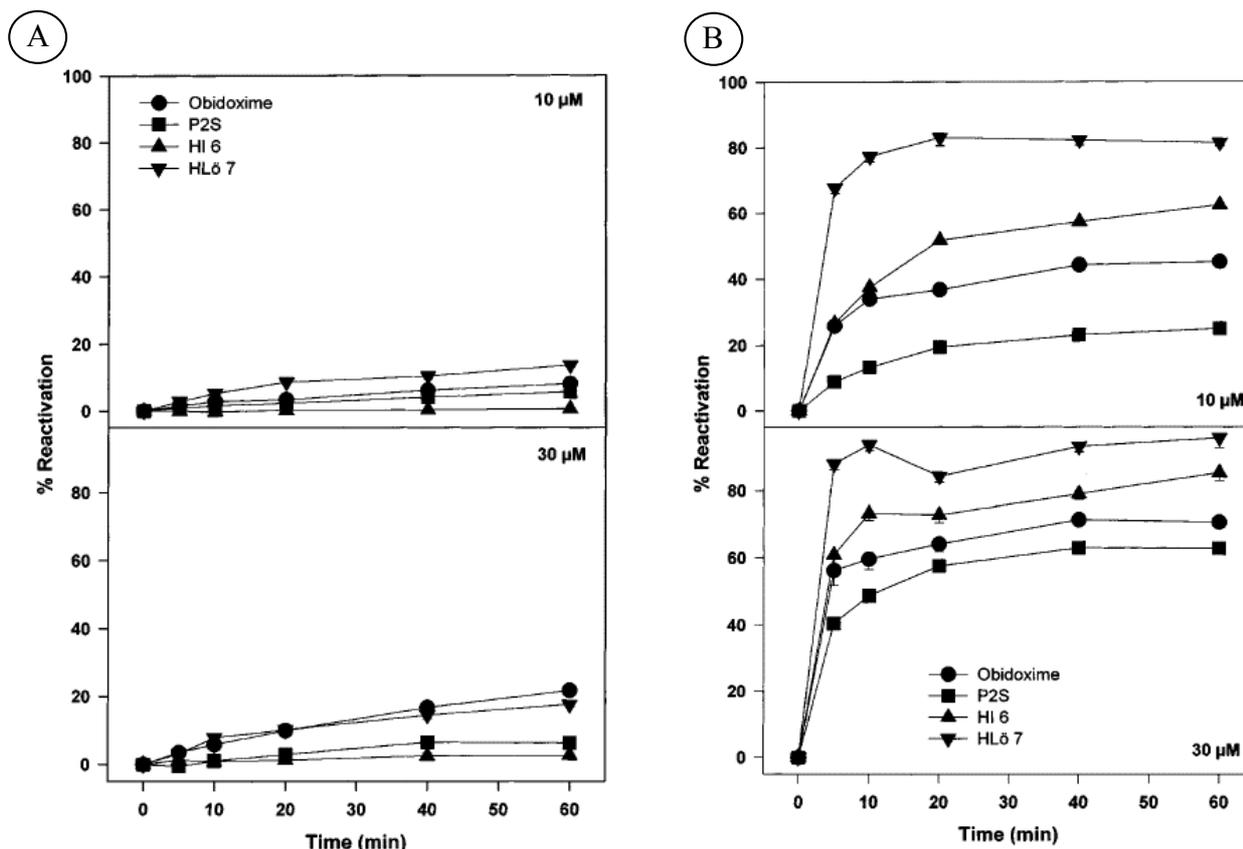


Figure 1 : Réactivation par différents oximes des complexes AChE-tabun (à gauche) et AChE-VX (à droite) à 10 µM et 30 µM<sup>127</sup>

En ce qui concerne la réactivation du complexe AChE-tabun présentée sur la figure 1-A, on peut tout se suite remarquer qu'elle est très difficile quel que soit le réactivateur et quelle que soit la concentration puisqu'on ne dépasse pas 25% de réactivation. Quelle que soit la concentration, P2S et HI-6 sont totalement incapables de réactiver le complexe AChE-tabun. HLö-7 et l'obidoxime le réactivent un peu mais très lentement. Ainsi, quelles que soit les conditions (réactivateur, concentration), le complexe AChE-tabun est particulièrement résistant à la réactivation à des doses acceptables d'un point de vue thérapeutique.

Le complexe AChE-VX quant à lui réagit très différemment. Du point de vue de la réactivation, on peut classer les oximes de la plus active à la moins active tel que : HLö-7 > HI-6 > Obidoxime > P2S. Pour le meilleur réactivateur, soit HLö-7, on atteint 80% de réactivation à 10 µM et 95% à 30 µM.

Ainsi, il est clair que les complexes AChE-tabun et AChE-VX ont des comportements très différents vis-à-vis de la réactivation. Ceci ne peut s'expliquer que par le groupement *N*-diméthyle

<sup>127</sup> Worek, F.; Widmann, R.; Knopff, O.; Szinicz, L. *Arch. Toxicol.* **1998**, *72*, 237.

du tabun qui est la seule différence structurale entre les deux complexes. Nous avons montré dans le chapitre précédent que le groupement *N*-diméthyle avait une influence stérique sur l'inhibition de l'AChE. Nous cherchons à voir si cette influence se retrouve pour la réactivation. Nous avons donc décidé de modéliser la réactivation de ces deux complexes, pour non seulement mettre en évidence l'influence de l'amine, mais aussi pour encore une fois tester la robustesse de notre système modèle. En effet, si nous obtenons des barrières plus élevées pour la réactivation du complexe AChE-VX que pour le complexe AChE-tabun, alors notre système aura montré ses limites.

La réactivation du complexe AChE-sarin a déjà été étudiée d'un point de vue théorique, comme il a été souligné dans l'introduction (Chap. 1, §III). Leczszinski et al. ont montré que la réactivation se déroulait en trois étapes successives :

- addition de l'oxime sur le phosphore
- rotation du groupement méthoxy
- élimination de la sérine libre

L'étape de rotation du groupement méthoxy a une très faible barrière énergétique et peut être négligée. Les barrières obtenues sont assez faibles pour être compatibles avec des réactions en milieu biologique (environ 6 kcal/mol pour l'addition et 3 kcal/mol pour l'élimination, sans solvation en B3LYP/6-311G(d,p)).

L'équipe de Figueroa-Villar a quant à elle testée d'autres types de réactivateurs que les oximes sur le même système modèle que Leszczinski et al. Ils ont montré que des énolates, des sulfénates et des hydrazonates pouvaient être utilisés. Cependant, les oximes étant les réactivateurs les plus utilisés et les plus courants, nous nous sommes focalisés sur elles.

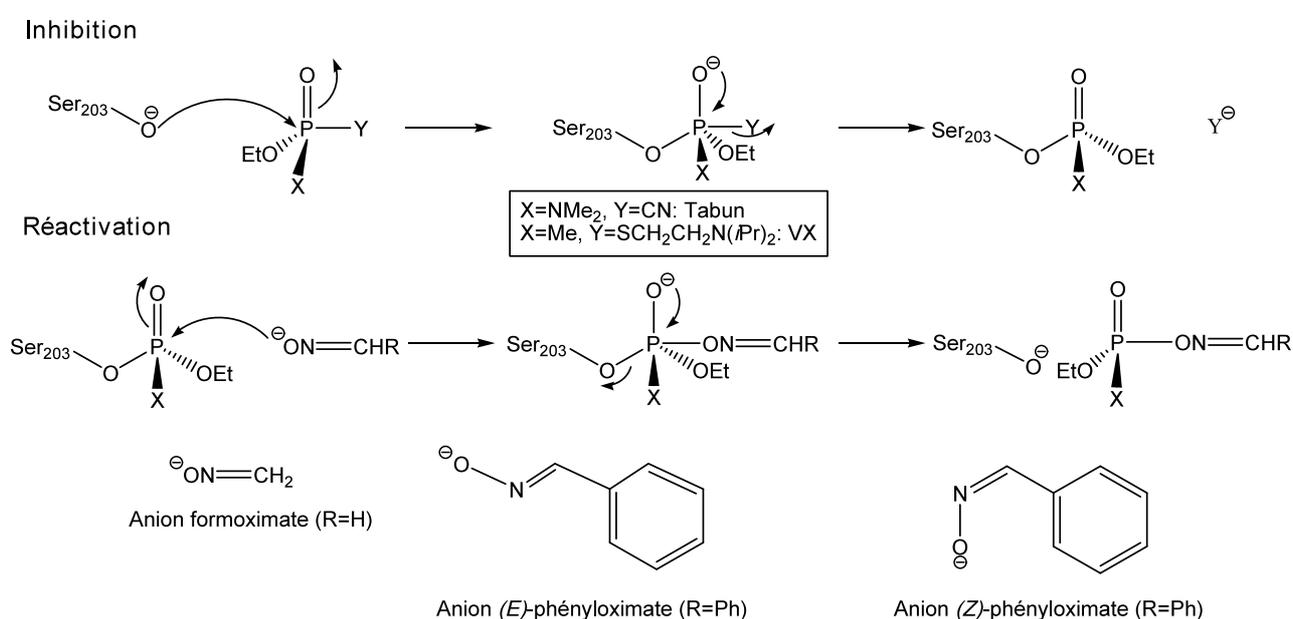
## II. Etude méthodologique

Avant de chercher à modéliser des réactivateurs existants telle que la 2-PAM pour confronter nos résultats à l'expérience, nous avons décidé de réaliser une étude méthodologique. En effet, les seules études faites sur la réactivation de complexes AChE-organophosphorés sont des études QM comme présentées précédemment. Ainsi, ces études ne prennent pas en compte l'environnement du site actif, qui risque pourtant d'avoir une influence importante sur la réaction. Nous avons donc voulu comparer les profils obtenus en QM de ceux obtenus en QM/MM pour déterminer si la méthodologie QM/MM est nécessaire ou non pour décrire ce système enzymatique. Cette étude nous permettra également de valider notre système puisque nous avons modélisé les deux complexes AChE-tabun et AChE-VX.

## II.1. Description du modèle

Nous avons modélisé la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par deux types de nucléophiles : l'anion formoximate et la phényloxime.

Nous avons choisi l'anion formoximate car c'est le nucléophile étudié par Leszczinski et al. dans leur étude théorique de la réactivation du complexe AChE-sarin. La phényloxime, quant à elle, est une oxime aromatique et se rapproche donc plus des oximes effectivement utilisées. Elle possède deux isomères (*Z*) et (*E*), qui seront tous les deux étudiés selon les différentes méthodologies (Schéma 4).



**Schéma 4 : Mécanismes d'inhibition et de réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX, et structures des réactivateurs étudiés pour la comparaison des méthodologies QM et QM/MM**

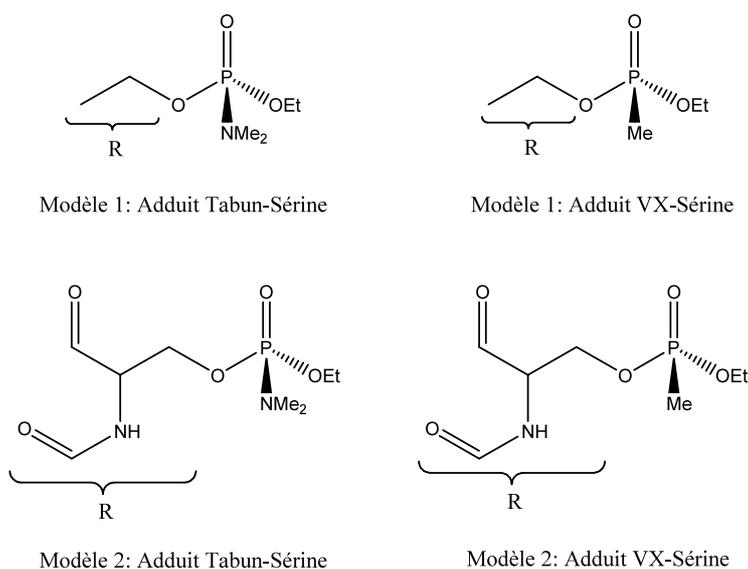
La réactivation des complexes AChE-organophosphorés a été étudiée selon deux méthodes : en premier lieu nous avons déterminé les profils énergétiques en utilisant la QM uniquement, puis dans un second temps nous avons déterminé ces mêmes profils en QM/MM.

Nous avons donc d'abord décidé d'utiliser la DFT avec BP86 comme fonctionnelle et LACVP\*<sup>128</sup> comme base. Des simples points ont été réalisés avec la fonctionnelle PBE0 et la base

<sup>128</sup>Hay, J.P.; Wadt, W.R. *J Chem Phys* **1985**, 82, 299.

LACV3P+\*<sup>129</sup> pour vérifier la robustesse des résultats obtenus en BP86/LACVP\*. Nous avons vérifié que toutes les fréquences des minimums obtenus étaient réelles, et que seule une fréquence était imaginaire pour les états de transition. Toutes les optimisations ont été réalisées avec Jaguar<sup>130</sup>, et les calculs de fréquence par Gaussian03<sup>131</sup>.

Deux systèmes modèles ont été utilisés pour chaque oxime (Schéma 5). D'abord la sérine de la triade catalytique a été modélisée par un groupement éthoxy. Le second modèle est celui défini par Leszczynski et al. dans leur étude sur la réactivation du complexe AChE-sarin. Ce modèle est plus complexe pour mieux décrire les interactions entre l'enzyme phosphorylée et l'oxime.



**Schéma 5 : Systèmes modèles utilisés pour l'étude QM**

De façon à confirmer les résultats obtenus par DFT sur un système modèle beaucoup plus complexe et plus réaliste, nous avons utilisé une méthodologie QM/MM, qui est une méthode de choix pour traiter les réactions enzymatiques. De la même façon que pour l'inhibition, les calculs QM/MM ont

<sup>129</sup>Friesner, R.A.; Murphy, R.B.; Beachy, M.D.; Ringnalda, M.N.; Pollard, W.T.; Dunitz, B.D.; Cao, Y. *J Phys Chem A* **1999**, *103*, 1913.

<sup>130</sup>Jaguar, version 7.5, Schrodinger, LLC, New York, NY, 2008.

<sup>131</sup>Gaussian 03, Revision E.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; and Pople, J. A.; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

été réalisés avec Chemshell. La zone QM a été traitée avec la fonctionnelle BP86 avec l'approximation RI et la base TZVP pour les optimisations de géométrie. Des simples points ont également été réalisés avec la fonctionnelle PBE0 pour vérifier les résultats obtenus avec BP86. Pour ces calculs, nous avons utilisé la structure RX 2C0P. Cette structure a été corrigée par Nachon et al., mais d'après les résultats du chapitre 3, les résultats obtenus avec 2C0P et sa version corrigée 3DL7 sont tout à fait comparables après optimisation. Nous sommes partis de la structure du complexe AChE-tabun que nous avons obtenue lors de notre étude de l'inhibition de l'AChE par le tabun. Pour obtenir le complexe AChE-VX, nous avons transformé le *N*-diméthyle de la structure précédente en méthyle.

La zone QM consiste en 93-108 atomes et est composée de l'oxime, de l'organophosphoré (tabun ou VX) et d'une partie des résidus Gly121, Gly122, Ser203, Ala 204, Val330, Val331, Glu334 et His447. La zone MM active est constituée de 388-403 atomes et est composée des résidus Trp86, Gly120, Gly121, Gly122, Phe123, Tyr124, Ser125, Glu202, Ser203, Ala204, Ser229, Gly230, Trp236, Phe295, Phe297, Val330, Val331, Glu334, Tyr337, Phe338, Tyr341, Val407, His447, Wat21, Wat99, Wat141 et Wat258.

## II.2. Réactivation par l'anion formoximate

Nous avons tout d'abord étudié la réactivation par l'anion formoximate pour deux raisons :

- C'est la plus petite oxime possible, donc ce n'est pas trop coûteux en temps de calcul, et tous les effets stéréoélectroniques sont éliminés.
- C'est l'oxime étudiée par Leszczynski et al. et Figueroa-Villar et al. dans leur étude QM de la réactivation du complexe AChE-sarin.

### II.2.1. Etude QM

Nous avons commencé par l'étude QM de la réactivation par l'anion formoximate selon les deux systèmes modèles présentés schéma 5:

- Le modèle 1 représente la sérine par un groupement éthoxy
- Le modèle 2 décrit mieux l'environnement de la sérine catalytique.

Les résultats sont présentés en figure 2.

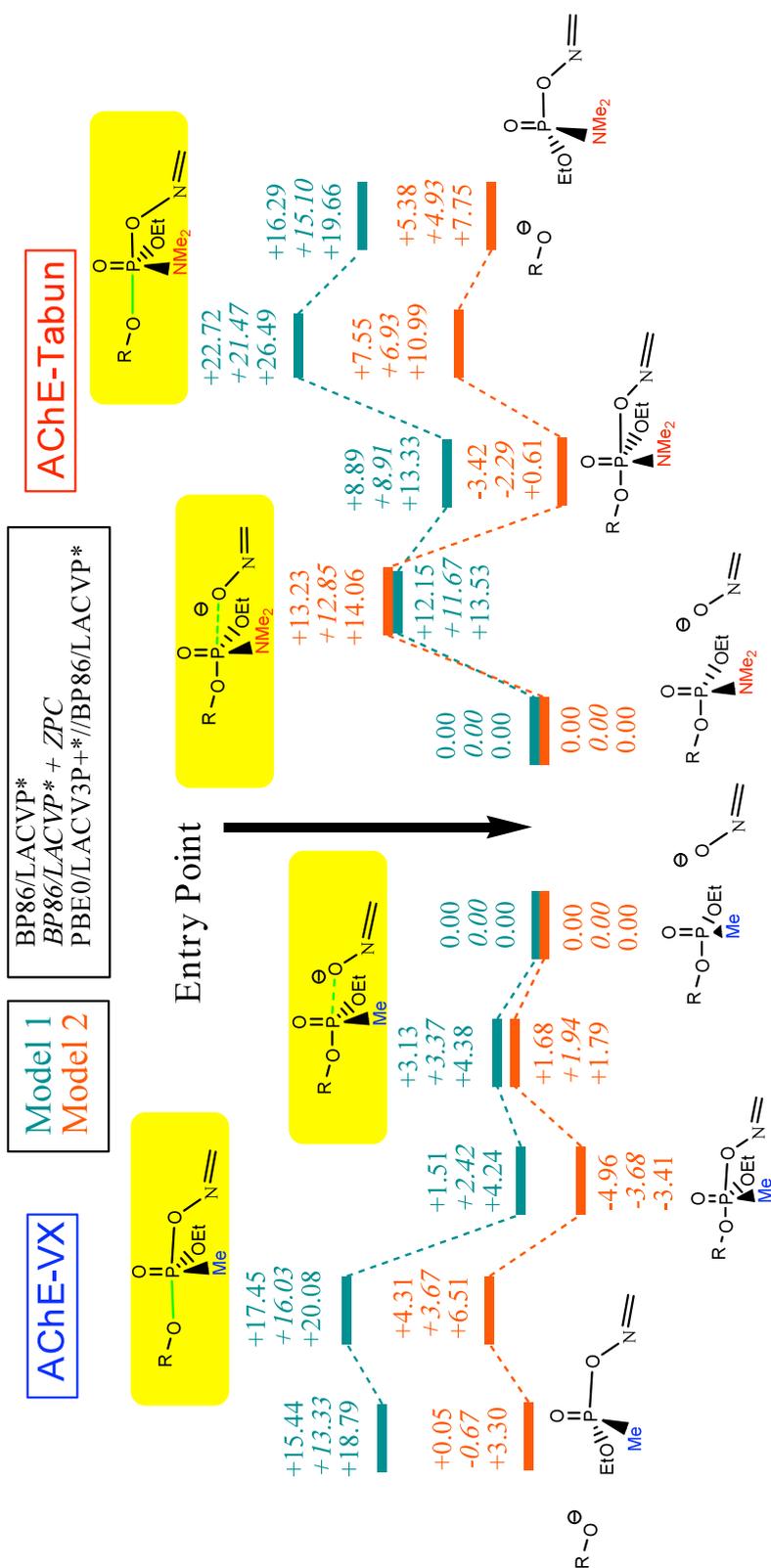


Figure 2 : Profils énergétiques obtenus en QM pour la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par l'anion formoximate (E en kcal/mol).

Selon nos résultats, et quel que soit l'organophosphoré qui inhibe l'AChE, le modèle 1 ne décrit pas correctement le système. En effet, les profils obtenus sont très fortement endothermiques (+19.66 kcal/mol pour le tabun, +18.79 kcal/mol pour le VX en PBE0/LACV3P+\*).

La première étape de la réactivation correspond à la fixation de l'anion formoximate sur l'atome de phosphore. Un intermédiaire pentavalent est alors formé. Pour le modèle 1 dans le cas du VX, la barrière est faible pour cette étape (+4.38 kcal/mol en PBE0/LACV3P+\*), alors que pour le tabun la barrière est bien plus importante (+13.53 kcal/mol en PBE0/LACV3P+\*).

La seconde étape est l'élimination de la sérine par rupture de la liaison phosphore-oxygène de la sérine. C'est l'étape cinétiquement déterminante d'après nos calculs (+20.08 kcal/mol pour la réactivation du complexe AChE-VX, +26.49 kcal/mol pour la réactivation du complexe AChE-tabun en PBE0/LACV3P+\*). Entre les géométries des deux complexes organophosphorés, quelques différences existent. Par exemple, pour l'intermédiaire pentavalent, P-OSer(tabun)=1.78 Å et P-OSer(VX)=1.76 Å, P-Ooxime(tabun)=1.92 Å et P-Ooxime(VX)=2.04 Å.

Dans le cas du modèle 1, on peut noter que le complexe AChE-VX est plus facilement réactivé que le complexe AChE-tabun.

Dans le cas du modèle 2, les réactions sont toujours endothermiques mais beaucoup moins fortement (+7.75 kcal/mol pour le complexe AChE-tabun, +3.30 kcal/mol pour le complexe AChE-VX en PBE0/LACV3P+\*). Les deux mêmes étapes ont lieu : fixation de l'oxime sur le phosphore puis élimination de la sérine. Globalement les barrières énergétiques sont plus faibles que pour le modèle 1. Le complexe AChE-VX est encore une fois mieux réactivé que le complexe AChE-tabun. Ainsi, il apparaît que les effets électrostatiques et de polarisation dus au site actif de l'enzyme sont importants pour correctement modéliser la réaction de réactivation. En effet, plus le modèle en QM est complexe, plus les valeurs sont réalistes.

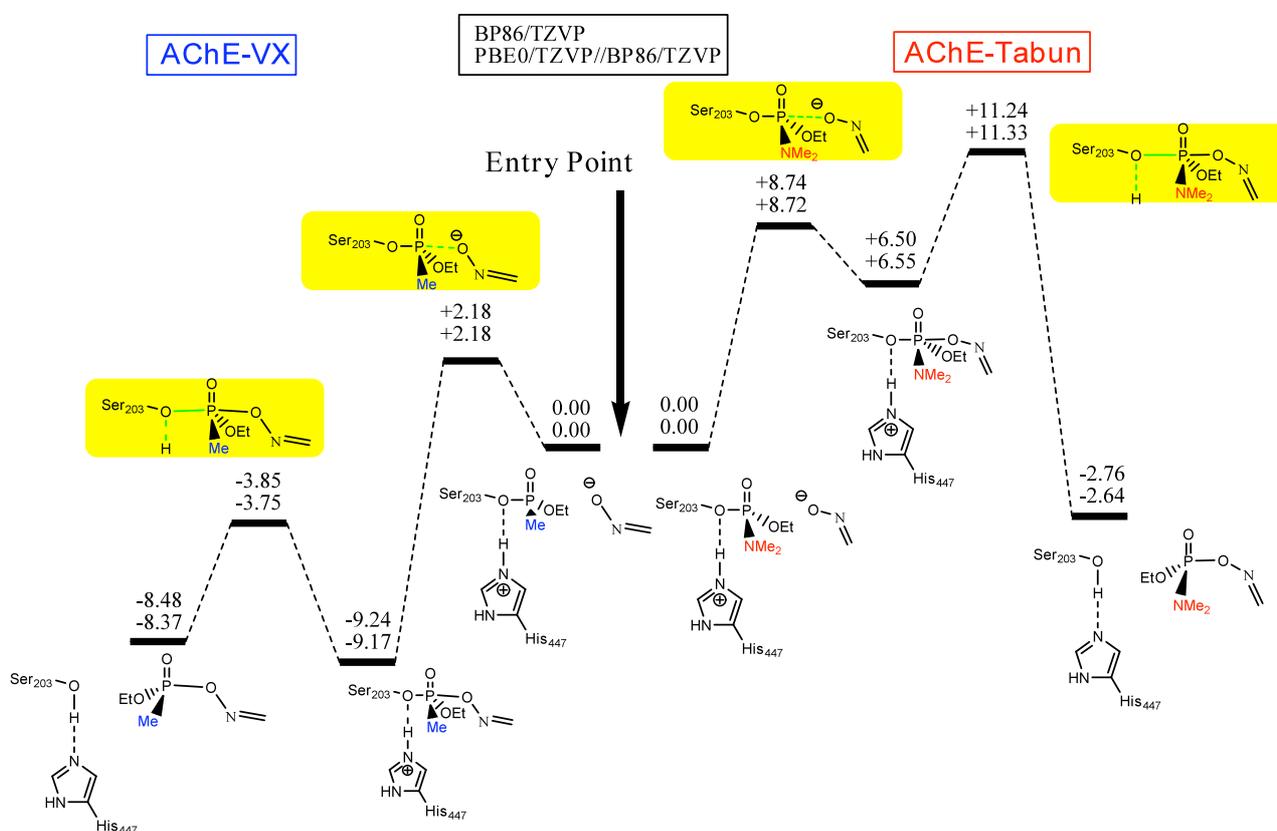
### II.2.2. Etude QM/MM

Afin d'affiner encore le modèle pour se rapprocher des conditions physiologiques, nous avons modélisé la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par l'anion formoximate en QM/MM. Cette méthode permet de prendre en compte de nombreux résidus du site catalytique dans la partie MM optimisée, et ainsi de considérer l'influence de l'environnement enzymatique sur la réaction chimique.

Les résultats obtenus sont présentés en figure 3. Les profils obtenus en QM/MM sont très différents

de ceux obtenus en QM. En effet, la réactivation par l'anion formoximate est exothermique quel que soit le complexe organophosphoré (-2.76 kcal/mol pour le complexe AChE-tabun, -8.48 kcal/mol pour le complexe AChE-VX en BP86/TZVP). Les deux étapes sont les mêmes que celles obtenues en QM, à savoir fixation de l'oxime sur le phosphore puis élimination de la sérine.

Dans le cas du complexe AChE-tabun, la barrière énergétique de la fixation de l'oxime est assez élevée (+8.74 kcal/mol en BP86/TZVP) et la réaction est endothermique (+6.50 kcal/mol en BP86/TZVP). Le départ de la sérine a une barrière plus faible d'environ 5 kcal/mol (BP86/TZVP) et la réaction est fortement exothermique. D'un point de vue géométrique, la distance entre le phosphore et l'oxygène de l'oxime de l'intermédiaire pentavalent est plus longue en QM/MM qu'en QM (P-Ooxime(QM-modèle2)=1.87 Å et P-Ooxime(QM/MM)=1.97 Å).



**Figure 3 : Profils énergétiques obtenus en QM/MM pour la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par l'anion formoximate (E en kcal/mol).**

En ce qui concerne le complexe AChE-VX, la barrière énergétique de l'étape de fixation de l'oxime est beaucoup plus faible que dans le cas du tabun, et également plus faible que celle obtenue en QM (+2.18 kcal/mol en BP86/TZVP). La réaction est fortement exothermique (-9.24 kcal/mol en BP86/TZVP). L'élimination de la sérine a une faible barrière d'environ 5 kcal/mol en BP86/TZVP.

Cette barrière de +5.42 kcal/mol est à comparer à celle de +9.92 kcal/mol obtenue en QM (au niveau PBE0). Il y a donc clairement un effet du site actif pour cette étape. La réaction est légèrement endothermique, mais encore une fois nous ne prenons pas en compte l'entropie de la réaction. Et le processus est globalement exothermique. D'un point de vue géométrique, la distance entre le phosphore et l'oxygène de l'oxime de l'intermédiaire pentavalent est plus courte en QM/MM qu'en QM (P-Ooxime(QM-modèle2)=1.94 Å et P-Ooxime(QM/MM)=1.89 Å).

Ainsi, les barrières énergétiques obtenues sont plus faibles en QM/MM qu'en QM quel que soit l'organophosphoré, et les processus sont exothermiques en QM/MM alors que ce n'était pas le cas en QM. La méthodologie QM/MM décrit donc mieux la réactivation de l'AChE inhibée, du fait sans doute de la prise en compte de l'environnement au niveau du site actif.

Egalement, cette étude nous montre que le complexe AChE-VX est effectivement mieux réactivé que le complexe AChE-tabun, ce qui est conforme aux observations expérimentales.

Nous avons réalisé la même étude comparative avec une oxime plus proche des oximes communément utilisées, à savoir la phényloxime.

### **II.3. Réactivation par l'anion phényloximate**

La phényloxime est plus réaliste par rapport aux réactivateurs utilisés car elle est aromatique. Elle peut donc à priori pénétrer dans l'enzyme grâce au  $\pi$ -stacking avec les résidus aromatiques de la gorge. Cependant, les oximes couramment utilisées possèdent un pyridinium car les interactions  $\pi$ -cations établies sont plus fortes et le pKa de cette oxime est aux alentours de 8, ce qui est la valeur optimale pour que l'oxime parvienne jusqu'au site actif. Ainsi, la phényloxime n'est pas utilisable en milieu biologique, mais elle reste un bon modèle pour se rapprocher des oximes telle que la 2-PAM et permet de faire une série de comparaison.

#### **II.3.1. Etude QM**

Nous avons commencé par l'étude QM de la réactivation par l'anion phényloximate selon les deux systèmes modèles décrits précédemment.

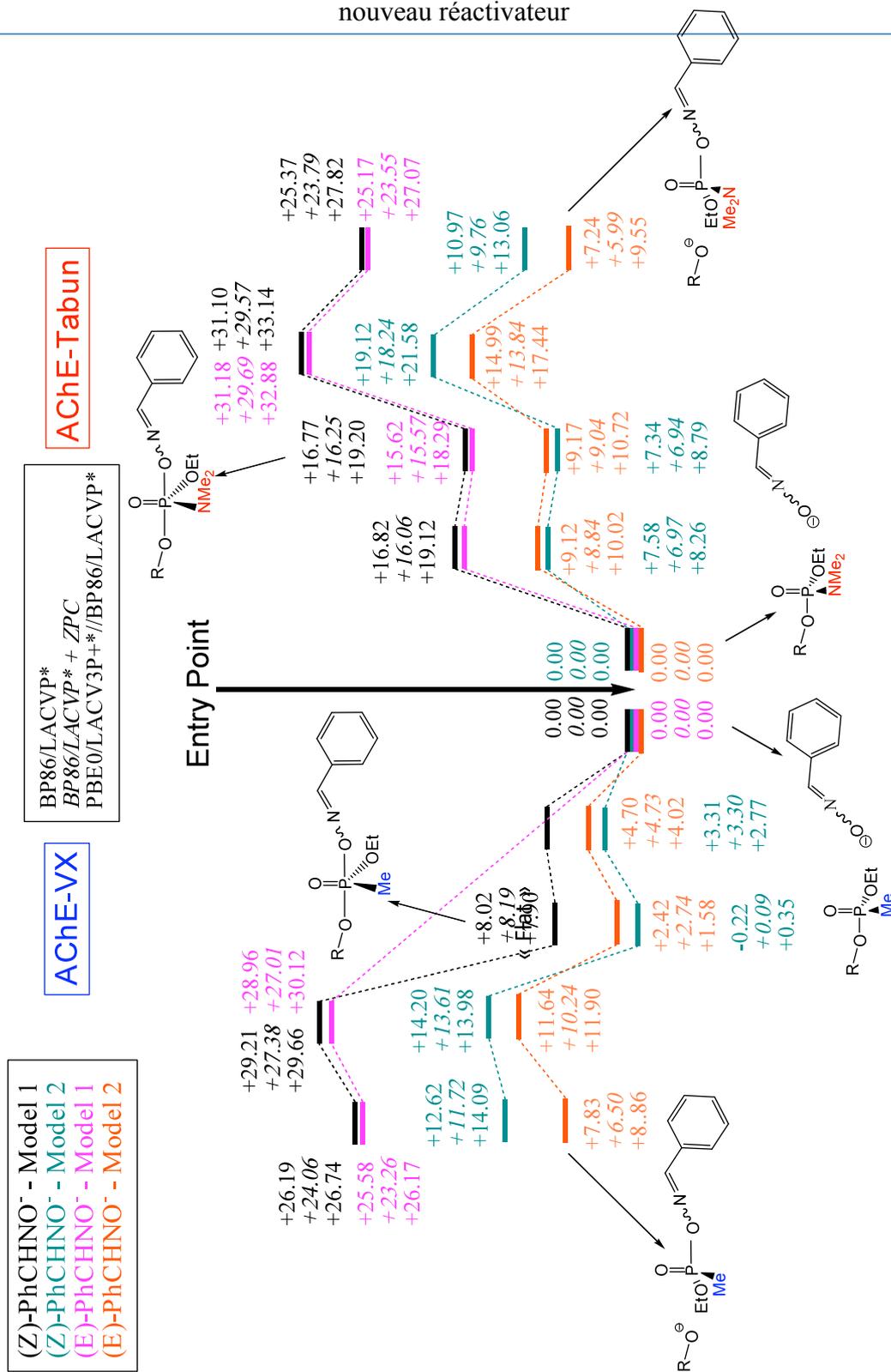


Figure 4 : Profils énergétiques obtenus en QM pour la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par l'anion phényloximate (E en kcal/mol).

Nous avons modélisé les deux configurations de la phényloxime, à savoir la (*Z*)-phényloxime et la (*E*)-phényloxime. A priori la (*E*)-phényloxime devrait donner des profils plus favorables que la (*Z*)-phényloxime car il y a moins d'interactions défavorables entre le site aromatique et l'anion (Schéma 6). Les résultats pour les deux isomères sont présentés en figure 4.



**Schéma 6 : Isomères de l'anion phényloximate**

De la même façon que pour l'anion formoximate, lorsque le modèle 1 est utilisé, la réaction est très endothermique quel que soit l'inhibiteur et l'isomère de la phényloxime (+26.74 kcal/mol ((*Z*)-phényloxime), +26.17 kcal/mol ((*E*)-phényloxime) pour le VX et +27.82 kcal/mol ((*Z*)-phényloxime), +27.07 kcal/mol ((*E*)-phényloxime) pour le tabun). Les deux étapes classiques (fixation de l'oxime sur le phosphore + élimination de la sérine) sont retrouvées.

Si l'on s'intéresse d'abord au VX, nous n'avons pu localiser pour l'isomère (*E*) d'intermédiaire pentavalent (modèle 1). Ainsi, on observe dans ce cas une seule étape avec une barrière élevée (+30.12 kcal/mol en PBE0/LACV3P+\*).

Pour l'isomère (*Z*), nous avons bien localisé un intermédiaire pentavalent, mais avec une surface de potentiel plate autour de celui-ci (Figure 5). Nous n'avons donc pu localiser l'état de transition correspondant à la fixation de l'oxime sur le phosphore (modèle 1). L'intermédiaire pentavalent est déstabilisé par rapport au réactif (+7.90 kcal/mol en PBE0/LACV3P+\*).

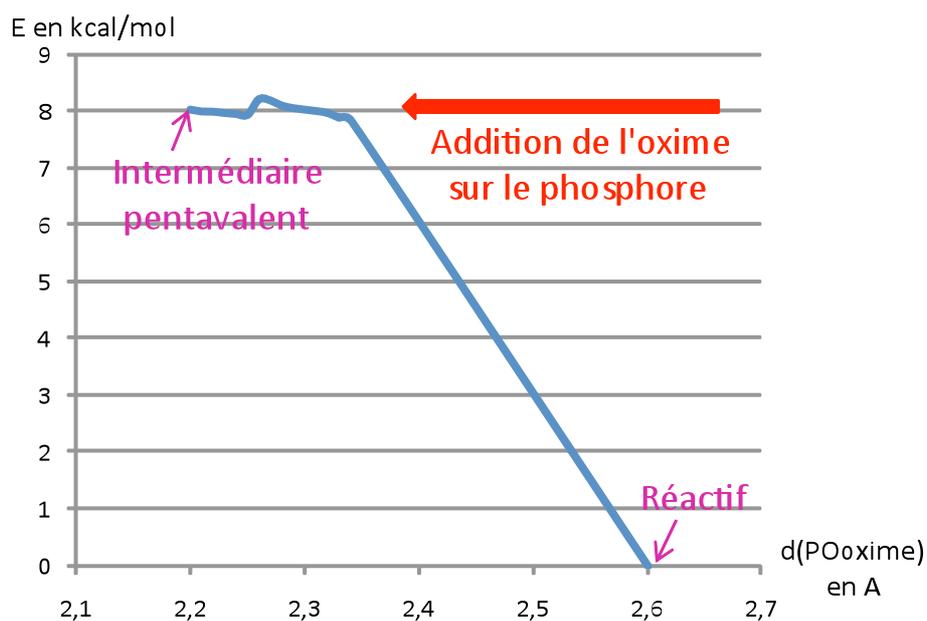


Figure 5 : Scan d'addition de l'anion (*Z*)-phényloximate sur le phosphore du complexe AChE-VX (Modèle 1)

L'étape d'élimination pour l'isomère (*Z*) dans le cas du VX (modèle 1) possède également une barrière importante d'environ 21 kcal/mol (PBE0/LACV3P+\*) et la réaction est fortement endothermique comme souligné précédemment. Ainsi, le modèle 1 ne décrit pas correctement le système puisqu'il est difficile de localiser les intermédiaires, que les barrières obtenues sont très élevées et que la réaction est très fortement endothermique.

Si l'on se penche maintenant sur le modèle 2 dans le cas du VX, la première observation est que le caractère endothermique de la réaction décroît de façon importante (+14.09 kcal/mol (modèle 2) vs +26.74 kcal/mol (modèle 1) pour l'isomère (*Z*) et +8.86 kcal/mol (modèle 1) vs +26.17 kcal/mol (modèle 2) pour l'isomère (*E*) en PBE0/LACV3P+\*). Ceci tend à prouver que le modèle 2 décrit mieux le système. Également, l'intermédiaire pentavalent est beaucoup plus stable dans le cas du modèle 2 quel que soit l'isomère. D'une part, nous avons pu localiser cet intermédiaire pour les deux isomères, ce qui n'était pas le cas avec le modèle 1. D'autre part, pour les deux isomères, cet intermédiaire est quasiment à la même énergie que le réactif contrairement au modèle 1 (+1.58 kcal/mol pour la (*E*)-phényloxime et +0.35 kcal/mol pour la (*Z*)-phényloxime en PBE0/LACV3P+\*).

Les barrières énergétiques de l'étape de fixation de l'oxime sur le phosphore sont plus faibles avec le modèle 2, puisqu'elles sont inférieures à 5 kcal/mol quel que soit l'isomère (+4.02 kcal pour la (*E*)-phényloxime et +2.77 kcal/mol pour la (*Z*)-phényloxime en PBE0/LACV3P+\*). Il en va de

même pour l'étape d'élimination de la sérine : bien que la réaction reste endothermique avec le modèle 2, les barrières énergétiques sont beaucoup plus faibles qu'avec le modèle 1 puisqu'elles sont d'environ 14 kcal/mol pour la (*Z*)-phényloxime et 10 kcal/mol pour la (*E*)-phényloxime en PBE0/LACV3P+\*. On peut également noter que les profils énergétiques des deux isomères sont très proches. L'isomère (*Z*) est favorisé pour la première étape, mais le (*E*) l'est pour la seconde.

D'un point de vue géométrique, les structures des deux isomères dans le cas du VX sont aussi très proches. Par exemple, pour l'intermédiaire pentavalent, P-OSer(*Z*)-modèle2)=1.77 Å, P-OSer(*E*)-modèle2)=1.78 Å et P-Ooxime(*Z*)-modèle2)=1.99 Å, P-Ooxime(*E*)-modèle2)=2.02 Å. Cependant, la distance entre le phosphore et l'oxygène de l'oxime dans l'intermédiaire pentavalent est plus longue pour les deux isomères de l'anion phényloximate que pour l'anion formoximate (P-Ooxime(formoximate-modèle2)=1.94 Å, P-Ooxime(*Z*)-modèle2)=1.99 Å, P-Ooxime(*E*)-modèle2)=2.02 Å). Cet intermédiaire semble donc être plus stable dans le cas de l'anion formoximate.

Avec le tabun comme inhibiteur, les résultats obtenus sont similaires. La description QM de la réaction avec le modèle 1 donne des valeurs fortement endothermiques quel que soit l'isomère considéré. Les mêmes observations que pour le VX, tant énergétiques que géométriques, peuvent être faites : le modèle 2 diminue le caractère endothermique des réactions, et les barrières énergétiques obtenues sont plus faibles que pour le modèle 1.

Pour le VX et le tabun, la première étape de la réactivation (fixation de l'oxygène de l'oxime sur le phosphore) semble assez facile à réaliser avec des barrières d'environ 4 kcal/mol pour le VX et 10 kcal/mol pour le tabun (PBE0/LACV3P+\*). La seconde étape (rupture de la liaison entre les phosphore et l'oxygène de la sérine) est plus difficile puisqu'on observe des barrières d'environ 10-14 kcal/mol pour le VX et le tabun (PBE0/LACV3P+\*). Il faut noter que la réactivation du complexe AChE-VX est plus facile à réaliser que le complexe AChE-tabun, ce qui correspond aux observations expérimentales.

Ainsi, de la même façon que pour l'anion formoximate, il est nécessaire d'avoir un système QM complexe pour correctement décrire notre système.

### II.3.2. Etude QM/MM

Le fait de ne pas être capable d'obtenir des réactions exothermiques en QM nous a poussés à utiliser une méthodologie hybride QM/MM. Les grandes différences observées entre les profils obtenus en QM selon le système modèle nous amènent à conclure que si l'on veut décrire correctement le

système, alors il faut prendre en compte une partie plus importante du site actif.

Ainsi, nous avons réalisé la même étude que précédemment avec l'anion phényloximate en QM/MM. Les résultats sont présentés en figure 6.

Dans le cas du VX et de l'isomère (*E*), la barrière énergétique est d'environ 4 kcal/mol pour l'étape de fixation de l'oxygène de l'oxime sur le phosphore. Cette étape conduit à un intermédiaire pentavalent stable (-5.20 kcal/mol en PBE0/TZVP). L'élimination de la sérine se fait également très facilement puisque la barrière est de +0.47 kcal/mol en PBE0/TZVP. La réaction est globalement exothermique d'environ 10 kcal/mol. L'isomère (*Z*) présente le même type de profil avec des barrières énergétiques plus élevées : +7.48 kcal/mol pour la première étape et +1.37 kcal/mol pour la seconde étape. La réaction est également exothermique (-8.23 kcal/mol en PBE0/TZVP).

En ce qui concerne le tabun, la barrière pour l'étape de fixation du phosphore est beaucoup plus importante pour l'isomère (*Z*) (+10.51 kcal/mol en PBE0/TZVP) que pour le (*E*) (+2.21 kcal/mol en PBE0/TZVP). Dans les deux cas, l'intermédiaire pentavalent est stable, contrairement à celui de la réactivation par l'anion formoximate. L'étape de rupture de la liaison phosphore-oxygène de la sérine se fait très facilement avec des barrières inférieures à 2 kcal/mol.

Il faut noter que dans le cas de la phényloxime (*E*), la barrière énergétique de la première étape est plus élevée dans le cas du VX que dans le cas du tabun, ce qui ne correspond pas aux observations expérimentales. Cependant, il faut tenir compte du fait qu'expérimentalement, on a un mélange des deux isomères (*Z*) et (*E*), et les barrières considérées sont faibles, il y a donc une marge d'erreur importante sur ces valeurs.

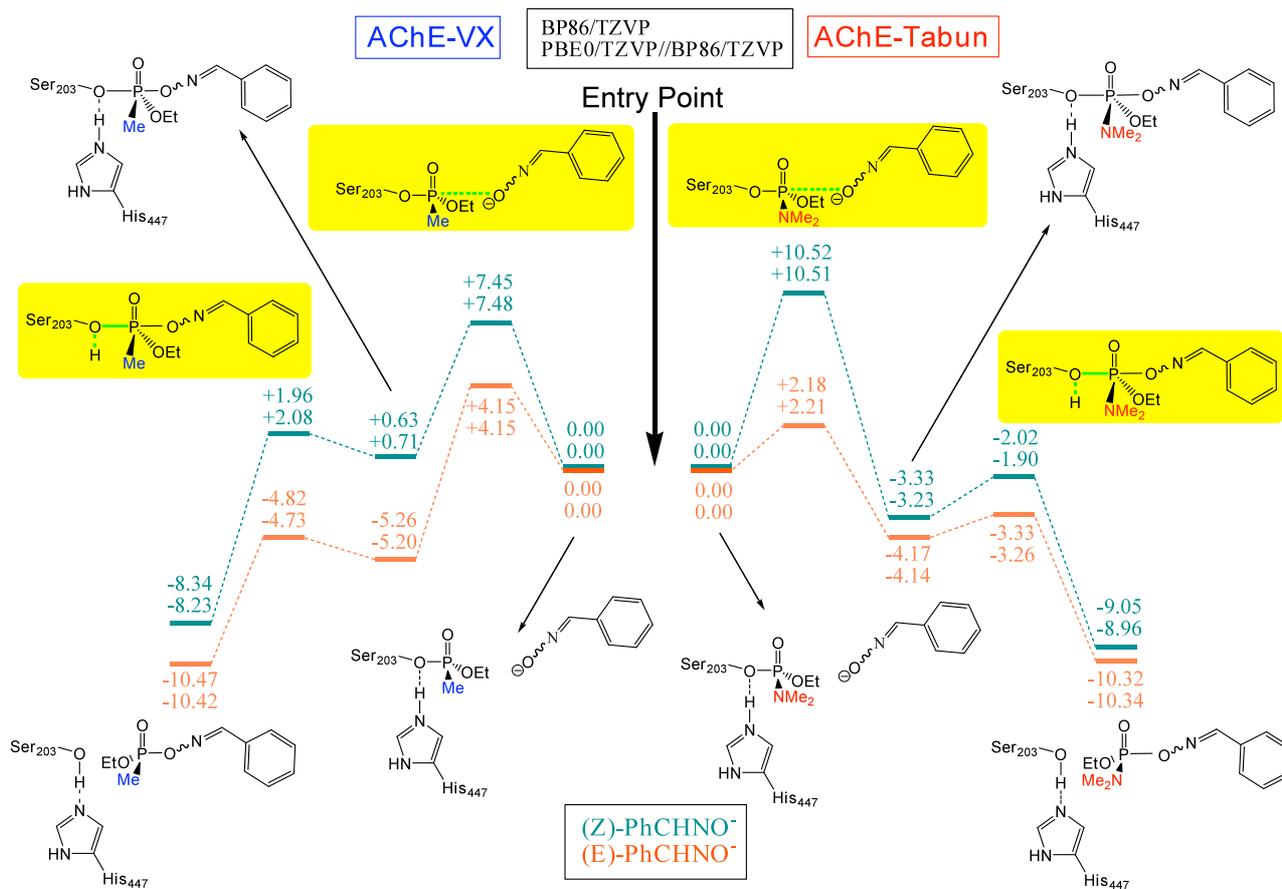


Figure 6 : Profils énergétiques obtenus en QM/MM pour la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par l'anion phényloximate (E en kcal/mol).

Ainsi, il apparaît encore une fois que la QM/MM décrit mieux notre système que la QM, puisqu'on a des réactions exothermiques avec des barrières plus faibles.

Cependant, il faut noter que selon notre modèle, la phényloxime réactiverait facilement le complexe AChE-tabun. Ce qui est assez surprenant puisque ce complexe est l'un des plus difficiles à réactiver par les oximes classiques. Néanmoins, il est important de souligner que nous n'étudions que la réaction chimique une fois que le substrat (ici la phényloxime) est correctement positionné au niveau du site actif sans prendre en compte la pénétration du substrat dans la gorge de l'enzyme. De plus, les oximes couramment utilisées possèdent toutes au moins un pyridinium qui établit des interactions fortes avec les résidus aromatiques de la gorge et permet de maintenir le pKa de ces oximes aux alentours de 8. La principale différence entre les oximes utilisées expérimentalement et la phényloxime est donc ce pyridinium, positivement chargé, proche de l'anion oximate. Il est ainsi possible que cette charge ait un effet désactivant sur la réactivation.

Ainsi, nous avons montré l'importance d'utiliser une méthodologie QM/MM pour décrire correctement notre système. Cependant, la QM est beaucoup moins coûteuse en temps et est donc une méthode de choix pour réaliser des études préliminaires sur la réactivation, tous les résultats obtenus en QM devant être vérifiés en QM/MM par la suite.

Nous avons donc continué notre étude QM notamment sur le réactivateur le plus simple utilisé, à savoir la 2-PAM. Jusqu'ici, le mécanisme obtenu en QM et en QM/MM est conforme au mécanisme généralement proposé qui se déroule en deux étapes : addition de l'oxime sur le phosphore puis élimination de la sérine. Cependant, il n'a jamais été prouvé que tous les réactivateurs passent par ce mécanisme. Nous nous sommes donc penchés sur cette problématique.

### III. Etude QM sur le mécanisme de la réactivation

L'une des questions que nous nous sommes posés après avoir étudié la réactivation par l'anion formoximate et l'anion phényloximate est : le mécanisme est-il toujours le même quel que soit le type de réactivateur ? En effet, deux types de mécanisme peuvent être envisagés (Schéma 7) :

- Un mécanisme d'addition-élimination, que l'on a observé avec les oximes précédemment étudiées
- Un mécanisme de substitution nucléophile directe en une seule étape.

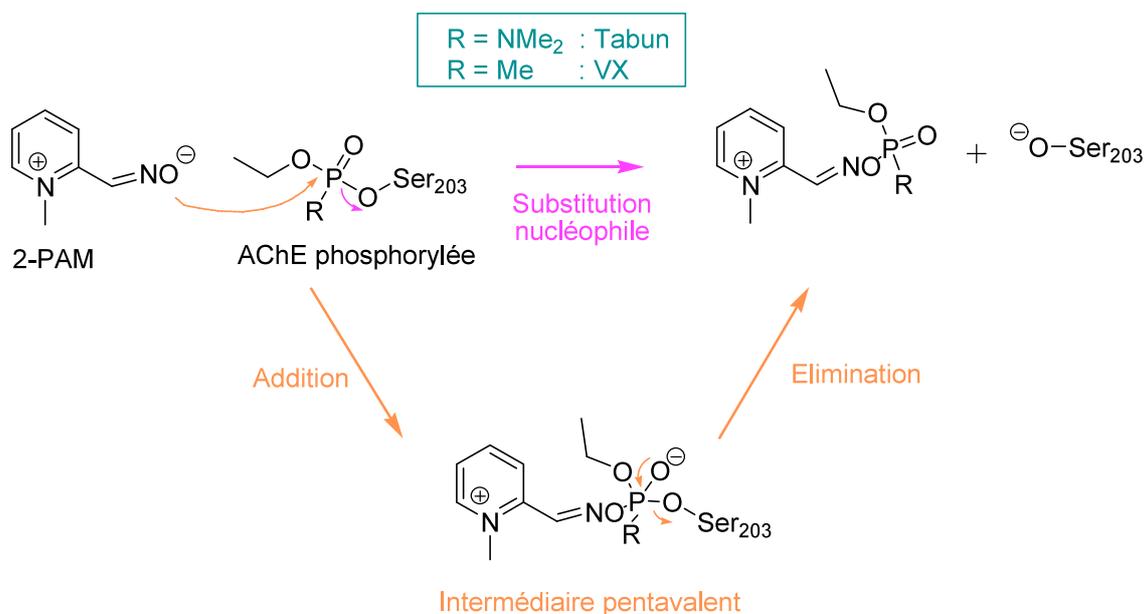


Schéma 7 : Deux mécanismes envisageables pour la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par la 2-PAM

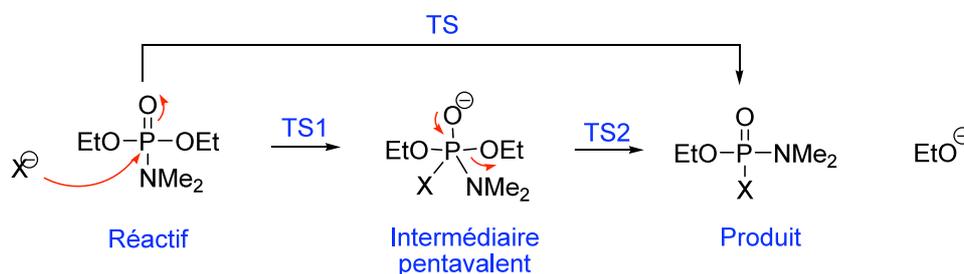
### III.1. Etude QM sur des nucléophiles simples

Le but de cette étude QM est de déterminer si le mécanisme passe ou non par un intermédiaire pentavalent. Cette étude a été réalisée sur le complexe AChE-tabun avec le modèle 1 (la sérine représentée par un groupement éthoxy) en BP86/LACVP\*.

Cinq nucléophiles sont présentés ici :

- L'anion formoximate  $\text{CH}_2\text{NO}^-$
- Le méthanolate  $\text{MeO}^-$
- L'anion hydroxyde  $\text{HO}^-$
- Le chlorure  $\text{Cl}^-$
- Le méthanethiolate  $\text{MeS}^-$

L'anion formoximate déjà étudié précédemment est notre référence en tant qu'oxime. Les autres nucléophiles sont des nucléophiles utilisés classiquement pour des substitutions. Ces différents nucléophiles ne sont bien sûr pas utilisables pour réactiver l'AChE, mais ils sont courants et faciles à modéliser pour avoir une idée de la relation entre la structure du nucléophile et le mécanisme. Les résultats sont résumés dans le tableau 1.



X	Réactif	TS1	Intermédiaire pentavalent	TS2	Produit
$\text{CH}_2\text{NO}^-$	0.00	10.22	10.08	21.06	14.91
$\text{H}^-$	0.00	2.04	-35.76	-24.10	-27.95
$\text{F}^-$	0.00	0.03	-15.21	2.54	-10.31
$\text{HO}^-$	0.00	2.53	-18.60	-12.09	-20.93
$\text{MeO}^-$	0.00	11.27	0.11	8.14	0.53

X	Réactif	TS	Produit
$\text{Cl}^-$	0.00	49.18	39.91
$\text{MeS}^-$	0.00	28.02	20.66

Tableau 1 : Energies relatives des intermédiaires obtenus lors de la réactivation du complexe AChE-tabun par différents nucléophiles en kcal/mol

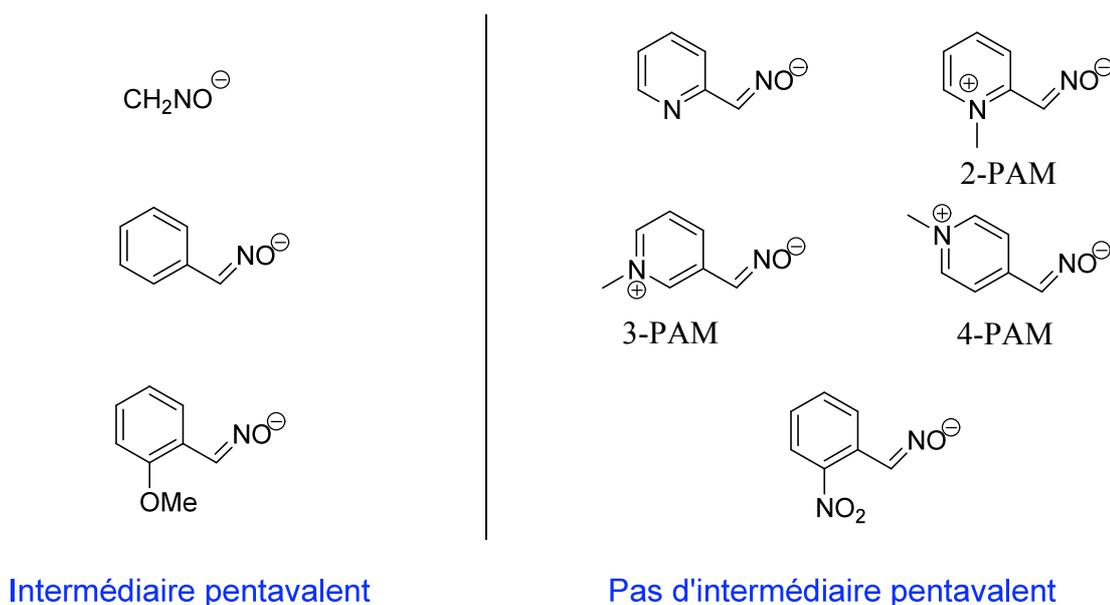
Il apparaît avec ces résultats que les deux mécanismes sont effectivement envisageables, puisqu'avec l'anion formoximate, l'hydrure, le fluorure, le méthanolate et l'anion hydroxyde, l'intermédiaire pentavalent a été isolé, alors qu'il ne l'a pas été pour le chlorure et le thiolate. Ainsi, il semble que plus le nucléophile est basique, plus l'intermédiaire pentavalent a de chance d'exister, ce qui expliquerait les résultats des hydrure, fluorure et alcoolates par rapport au chlorure et au thiolate. D'ailleurs, l'intermédiaire pentavalent est très fortement stabilisé dans le cas de l'anion hydroxyde (-18.60 kcal/mol), alors qu'il est isoénergétique dans le cas du méthanolate (+0.11 kcal/mol) et déstabilisé dans le cas de l'oximate (+10.08 kcal/mol).

Une autre information d'importance peut être relevée ici : lorsque l'intermédiaire pentavalent est isolé, les barrières énergétiques sont d'environ 10-15 kcal/mol au plus ( $\text{H}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{MeO}^-$ ,  $\text{CH}_2\text{NO}^-$ ), alors qu'elles sont d'environ 30-50 kcal/mol lorsqu'il n'est pas isolé ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{MeS}^-$ ). Ainsi, il est beaucoup plus favorable de réaliser la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun en deux étapes plutôt qu'en une.

Cependant, les deux mécanismes sont envisageables, et il convient de vérifier le mécanisme pour les oximes classiques telles que la 2-PAM.

### III.2. Etude QM sur la 2-PAM et ses dérivés

Nous avons cherché ici à déterminer le mécanisme de réactivation, et nous nous sommes donc seulement intéressés à l'existence ou non de l'intermédiaire pentavalent. Des dérivés de la 2-PAM ont été étudiés tel que la 3-PAM ou la 4-PAM. Les différents dérivés et leur réactivité sont présentés schéma 8. Nous avons cherché à isoler l'intermédiaire pentavalent en QM de tous ces dérivés et nous avons constaté que cet intermédiaire n'était pas toujours stable.



**Schéma 8 : Existence de l'intermédiaire pentavalent selon le nucléophile (BP86/LACVP\*)**

Ainsi, nous pouvons constater que dès qu'un azote est présent sur le cycle aromatique, alors l'intermédiaire pentavalent n'est pas stable. Ceci est valable pour un cycle pyridine et pour les 2-PAM, 3-PAM et 4-PAM. De même lorsqu'un groupement nitro est sur le cycle benzénique, l'intermédiaire pentavalent n'est pas stable, contrairement à la phényloxime ou à la méthoxyphényloxime. On peut donc en déduire que dès qu'un groupement attracteur est sur le cycle aromatique, alors l'intermédiaire pentavalent n'est pas stable. Les groupements donneurs tels que le méthoxy, eux, stabilisent cet intermédiaire.

Il est important également de noter la valeur des barrières énergétiques : si l'intermédiaire pentavalent est stable, alors on a deux étapes avec des barrières d'environ 10 kcal/mol (BP86/LACVP\*), ce qui est tout à fait envisageable pour des processus biologiques. S'il ne l'est pas, on a une seule étape avec une barrière supérieure à 30 kcal/mol (BP86/LACVP\*), ce qui est beaucoup moins compatible avec des processus biologiques. Il faut donc essayer de concevoir un réactivateur qui réponde aux propriétés physico-chimiques de l'enzyme pour pénétrer dans la gorge, et qui passe par un mécanisme d'addition-élimination.

Mais avant cela, il est nécessaire de vérifier nos résultats QM en QM/MM. Nous avons donc modélisé la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par la 2-PAM en QM/MM, afin de vérifier que l'on ne passe pas par un mécanisme d'addition-élimination, mais bien par une substitution nucléophile directe.

#### IV. Etude QM/MM de la réactivation par la 2-PAM

Pour valider nos observations formulées à partir de l'étude QM de la réactivation, nous avons modélisé la réactivation par la 2-PAM de l'AChE inhibée par le tabun et le VX en QM/MM (Figure 7).

La première observation est qu'on retrouve bien les résultats observés en QM, à savoir que le mécanisme de réactivation se fait en une seule étape. Les barrières obtenues pour cette étape sont très élevées pour un processus biologique puisqu'elles sont aux alentours de 30 kcal/mol dans le cas du tabun (+35.11 kcal/mol pour la 2-PAM (*E*), +29.79 kcal/mol pour la 2-PAM (*Z*)). Ceci peut expliquer la difficile réactivation du complexe AChE-tabun.

Dans le cas du complexe AChE-VX, les barrières sont toujours un peu élevées (+29.63 kcal/mol pour la 2-PAM (*E*), +23.25 kcal/mol pour la 2-PAM (*Z*)), mais elles sont surtout plus faibles que pour le tabun, ce qui va dans le sens encore une fois des observations expérimentales.

Ainsi, nos résultats QM/MM confirment ceux obtenus en QM, à savoir un mécanisme en une seule étape avec une barrière énergétique importante expliquant la difficile réactivation du complexe AChE-tabun par la 2-PAM.

Cependant, la réaction est fortement endothermique quel que soit l'inhibiteur (tabun ou VX). Encore une fois, nous ne prenons pas en compte l'entropie qui ferait baisser le caractère endothermique, mais peut-être y a-t-il également une difficulté à accommoder le produit formé dans le site actif, soit un effet de simulation.

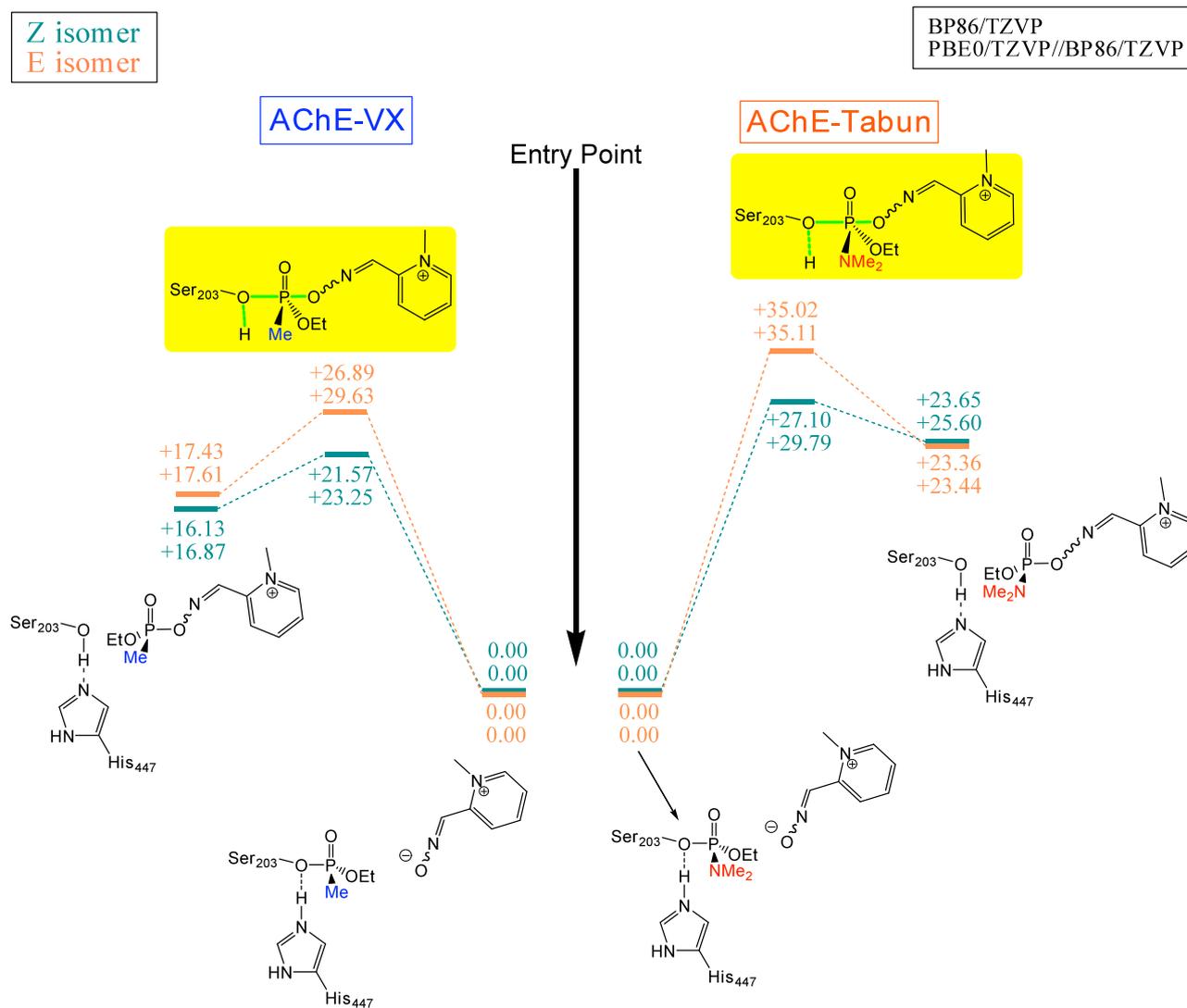


Figure 7 : Profils énergétiques obtenus en QM/MM pour la réactivation des complexes AChE-tabun et AChE-VX par la 2-PAM (E en kcal/mol).

Ainsi, il serait intéressant de concevoir un réactivateur qui répondrait aux exigences physico-chimiques de l'enzyme pour pouvoir pénétrer dans la gorge jusqu'au site actif, et qui passerait par un mécanisme d'addition-élimination pour diminuer les barrières énergétiques.

D'après l'étude QM sur la stabilité de l'intermédiaire pentavalent, il semble que l'azote du cycle aromatique a un effet désactivant sur la réactivation (Schéma 9).

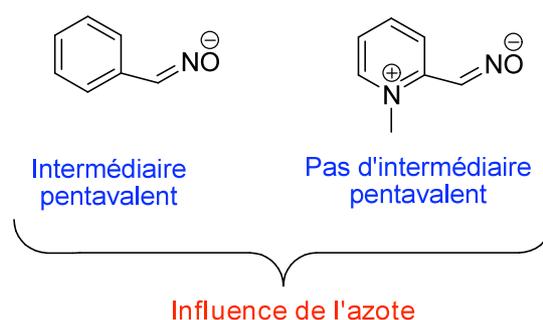


Schéma 9 : Mise en évidence de l'effet de l'azote sur la réactivation de l'ACHé phosphorylée

Ceci s'explique par l'effet attracteur de l'azote, qui en diminuant la densité électronique sur la fonction oxime diminue également sa nucléophilie. C'est pourquoi nous avons décidé de concevoir un réactivateur pour lequel cet azote serait plus éloigné de la fonction oxime pour limiter cet effet désactivant.

## V. Conception d'un nouveau réactivateur

Partant du principe que l'azote du cycle aromatique avait un effet négatif sur la réactivation en captant les électrons de la fonction oxime, nous avons choisi d'éloigner cet azote de la fonction oxime. La façon la plus simple de faire cela est d'introduire un carbone entre l'oxime et le cycle aromatique (Schéma 10). La nouvelle oxime obtenue est la 2-(méthylpyridinium-2yl)acétaldéhyde oxime, appelée 2-PAMCH<sub>2</sub> par la suite.

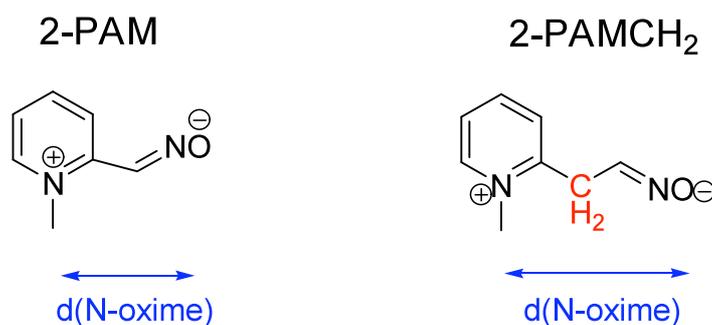


Schéma 10 : Structure du nouveau réactivateur appelé 2-PAMCH<sub>2</sub>

Nous avons donc modélisé cette nouvelle structure en QM/MM afin de voir si nos observations précédentes se vérifient. Ce nouveau réactivateur possédant un cycle pyridinium, il devrait pouvoir établir des interactions favorables ( $\pi$ -cation) pour sa pénétration dans la gorge de l'enzyme. Cependant, nous sommes conscients qu'en ajoutant un carbone, nous rompons la conjugaison, ce qui risque d'entraîner une augmentation du pKa. Or le pKa doit rester aux alentours de 8 pour que ce réactivateur ait une chance d'être efficace. Egalement, nous rajoutons de la flexibilité à la

molécule qui de ce fait interagira peut-être moins bien avec le site actif. Ainsi, au-delà de la modélisation de ce réactivateur, il sera nécessaire de le synthétiser pour en mesurer le pKa, et le tester *in vitro* pour en mesurer l'activité.

### V.1. Etude QM/MM de la réactivation par la 2-PAMCH<sub>2</sub>

Nous avons donc commencé par l'étude QM/MM de la réactivation par la 2-PAMCH<sub>2</sub> de l'ACHé inhibée par le tabun. Les deux isomères (*Z*) et (*E*) ont été modélisés.

Comme on peut le voir en figure 8, cette fois l'intermédiaire pentavalent est stable pour les deux isomères. Et comme on a pu le remarquer dans les études précédentes, les barrières énergétiques sont beaucoup plus basses. En effet, elles sont toutes inférieures à 6 kcal/mol.

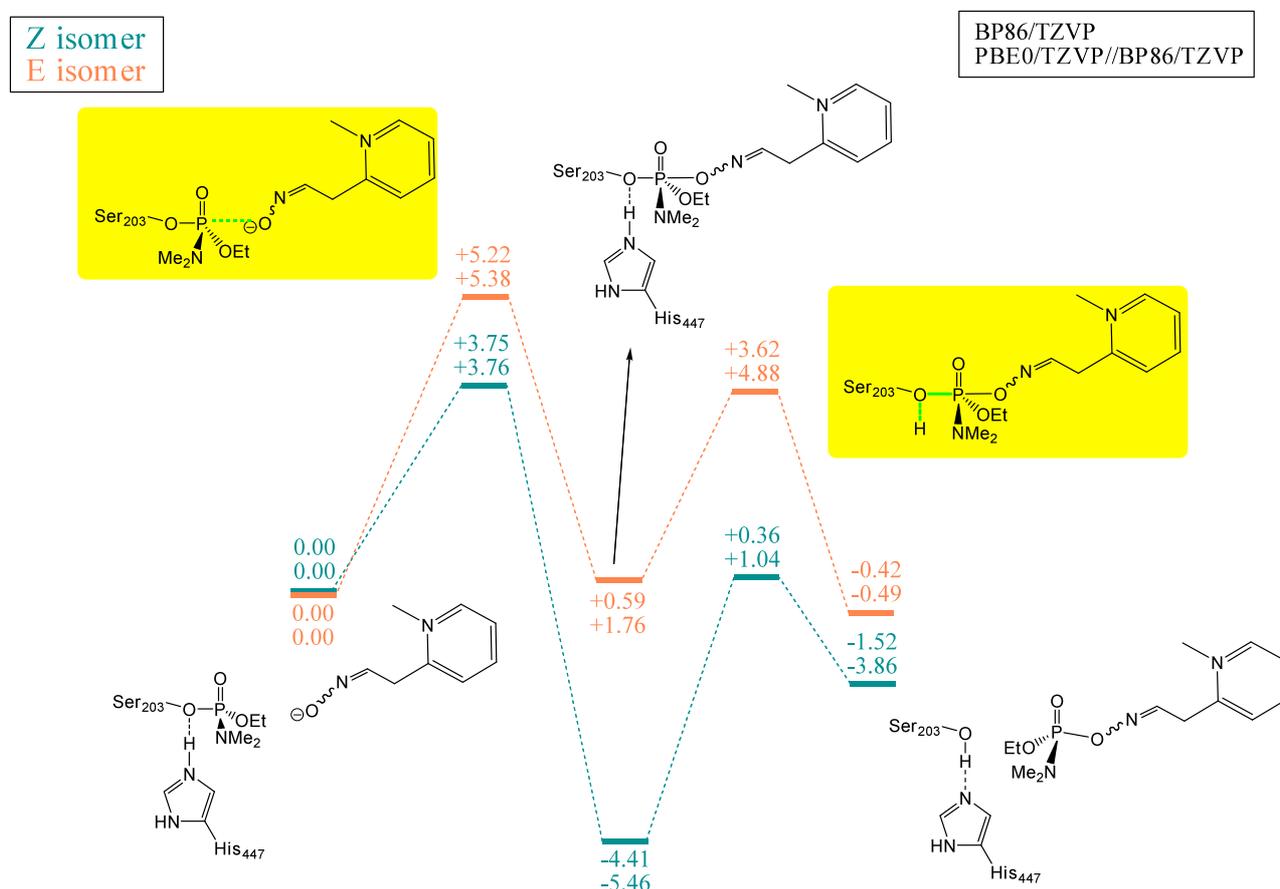


Figure 8 : Profils énergétiques obtenus en QM/MM pour la réactivation du complexe AChE-tabun par la 2-PAMCH<sub>2</sub> (E en kcal/mol).

La première étape est l'addition de l'oxime sur le phosphore conduisant à l'intermédiaire pentavalent. Pour l'isomère (*Z*), la barrière est de 3.76 kcal/mol (PBE0/TZVP) et la réaction est

exothermique (-4.41 kcal/mol en PBE0/TZVP). Pour l'isomère (*E*), la barrière est de 5.38 kcal/mol (PBE0/TZVP), et la réaction est très légèrement endothermique (+1.76 kcal/mol en PBE0/TZVP). Ainsi, L'étape d'addition de la 2-PAMCH<sub>2</sub> sur le complexe AChE-tabun se fait très facilement quel que soit l'isomère.

Il en va de même pour la seconde étape. L'élimination de la sérine a une barrière d'environ 3 kcal/mol pour l'isomère (*Z*), et la réaction est légèrement exothermique d'environ 1 kcal/mol. Pour l'isomère (*E*), la barrière est d'environ 6 kcal/mol, et la réaction est endothermique mais encore une fois nous ne prenons pas en compte l'entropie. Ainsi, la deuxième étape est également très facile à réaliser.

Il apparaît donc que le fait d'avoir augmenté la taille du lien carboné entre la fonction oxime et le cycle pyridinium change complètement le profil de la réaction. Notre analyse sur l'influence de l'azote du cycle aromatique sur la réactivité de l'oxime semble donc se vérifier. En effet, pour la 2-PAM, nous avons un mécanisme en une étape avec des barrières de l'ordre de 30 kcal/mol, alors que pour la 2-PAMCH<sub>2</sub>, le mécanisme se fait en deux étapes avec des barrières inférieures à 6 kcal/mol pour chacune des étapes. Notre réactivateur semble donc être un bon candidat pour la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun.

Il reste maintenant à le synthétiser afin d'en déterminer le pKa, condition *sine qua non* pour une bonne réactivité, et de le soumettre à des tests *in vitro*.

## V.2. Synthèse de la 2-PAMCH<sub>2</sub>

### V.2.1. Première stratégie de synthèse : à partir du 2-(pyridin-2-yl)acétaldéhyde

Nous sommes partis de la synthèse de la 2-PAM pour élaborer notre stratégie (Schéma 11).

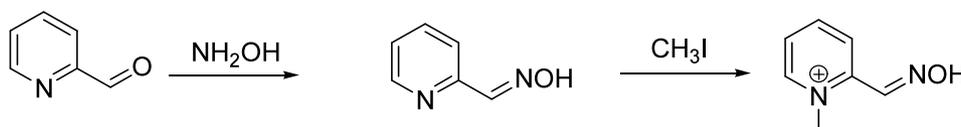


Schéma 11 : Synthèse de la 2-PAM<sup>132</sup>

L'oxime est d'abord synthétisée par addition de l'hydroxylamine sur l'aldéhyde correspondant, ce

---

<sup>132</sup> Kuča, K.; Pícha, J.; Cabal, J.; Liška, F. *Journal of Applied Biomedicine* **2004**, 2, 51.

qui est la voie classique de synthèse des oximes, puis le pyridinium est formé par addition d'iodure de méthyle sur la pyridine.

Ainsi, pour notre molécule, nous avons suivi cette voie de synthèse à partir de l'aldéhyde homologué par rapport à la 2-PAM (Schéma 12).

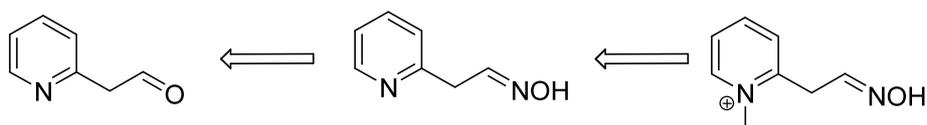


Schéma 12 : Rétrosynthèse de la 2-PAMCH<sub>2</sub> envisagée d'après la synthèse de la 2-PAM

La première étape a donc été de synthétiser le 2-(pyridin-2-yl)acétaldéhyde qui n'est pas commercial.

#### I.1.1.1. Synthèse de l'aldéhyde par homologation

La première idée a été d'homologuer le 2-pyridinecarboxaldéhyde, précurseur de la 2-PAM, pour synthétiser le 2-(pyridin-2-yl)acétaldéhyde.

Une première tentative a été faite en transformant l'aldéhyde en éther de vinyle par une réaction de Wittig avec un rendement de 68% (Schéma 13).

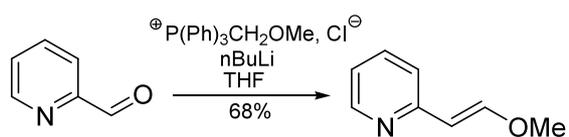


Schéma 13 : Synthèse de l'éther de vinyle

L'hydrolyse du vinyle éther a ensuite été mise en œuvre sous différentes conditions, mais l'aldéhyde n'a jamais été obtenu (Tableau 2). En effet, l'éther de vinyle est stabilisé par conjugaison avec le noyau pyridinique, ce qui rend difficile son hydrolyse.



Entrée	Conditions	Rendement (%)
1	HCl 1M (3 éq.), acétone 3 h, reflux	P.D.
2	HCl 6M (3 éq.) 3h, reflux	P.D.
3	TMSCl (1 éq.), NaI, CH <sub>3</sub> CN 5 min., TA	P.D.
4	TMSCl (2 éq.), NaI, CH <sub>3</sub> CN 5 min., TA	P.D.
5	APTS (0.15 éq.), acétone 2h, reflux	P.D.

Tableau 2 : Conditions testées pour l'hydrolyse de l'éther de vinyle

L'autre façon d'homologuer l'aldéhyde est de réduire celui-ci en alcool<sup>133</sup> (60% de rendement) puis de le métyler et réaliser une substitution nucléophile avec CH<sub>3</sub>CN pour enfin obtenir le nitrile correspondant avec un rendement de 85% sur deux étapes (Schéma 14).

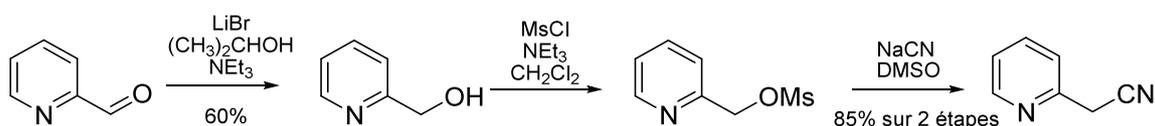


Schéma 14 : Synthèse du nitrile à partir de l'aldéhyde précurseur de la 2-PAM

Il reste ensuite à réduire le nitrile obtenu pour synthétiser l'aldéhyde. Cependant, la réduction du nitrile en aldéhyde soit ne se fait pas, soit conduit à la dégradation du nitrile initial (Tableau 3).

<sup>133</sup> Mojtahedi, M. M.; Akbarzadeh, E.; Sharifi, R.; Abaee, M. S. *Org. Lett.* **2007**, 9, 2791.



Entrée	Conditions	Rendement (%)
1	DIBALH (1.2 éq.), Et <sub>2</sub> O 3h, -78°C	P.D.
2	DIBALH (2 éq.), Et <sub>2</sub> O 3h, -78°C	Dégradation

Tableau 3 : Conditions testées pour l'hydrolyse du nitrile

Ainsi, différentes stratégies ont été utilisées pour synthétiser le 2-(pyridin-2-yl)acétaldéhyde par homologation : soit le passage par un éther de vinyle, soit le passage par un nitrile, mais aucune de ces stratégies n'a été concluante puisque l'aldéhyde n'a jamais été obtenu (Schéma 15). Aux vues de ces échecs, il a fallu chercher une nouvelle stratégie de synthèse de l'aldéhyde.

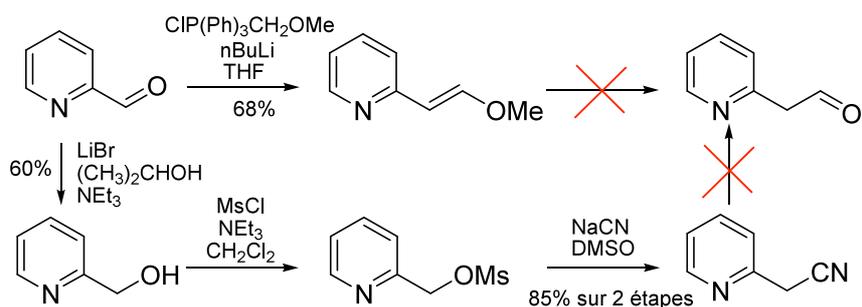


Schéma 15 : Stratégies employées pour synthétiser le 2-(pyridin-2-yl)acétaldéhyde

### I.1.1.2. Synthèse de l'aldéhyde par oxydation

La seconde façon la plus évidente de synthétiser cet aldéhyde est d'oxyder l'alcool correspondant, soit le 2-(pyridin-2-yl)ethanol. Les méthodes classiques d'oxydation ont été utilisées sans succès (Tableau 4).



Entrée	Conditions	Rendement (%)
1	DMP (1 éq.), DCM 30 min., TA	P.D.
2	DMP (2 éq.), DCM 30 min., TA	P.D.
3	PCC (2 éq.), DCM 2h30, TA	P.D.

Tableau 4 : Conditions testées pour l'oxydation de l'alcool

La synthèse de cet aldéhyde a en fait été décrite par Hejazi et al. grâce à une oxydation avec un complexe de cérium.<sup>134</sup> Après avoir adapté leurs conditions, l'énol a été obtenu avec un rendement de 60%. Malheureusement, aucune trace de la forme aldéhyde n'a été observée. La synthèse de l'oxime a quand même été tentée sur la forme énol, espérant déplacer l'équilibre, sans succès (Schéma 16).

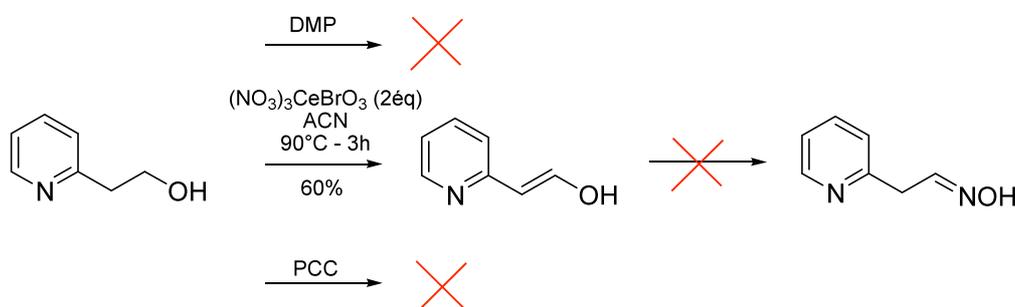


Schéma 16 : Stratégies employées pour synthétiser le 2-(pyridin-2-yl)acetaldehyde

Face à ce nouvel échec, une autre stratégie a dû être mise en place. Cette fois, nous avons abandonné l'idée de partir de l'aldéhyde.

<sup>134</sup> (a) Shirini, F.; Esm-Hosseini, M.; Hejazi, Z. *Synthetic Communications*, **2005**, 35, 2913. (b) Shirini, F.; Tajik, H.; Aliakbar, A.; Akbar, A. *Synthetic communications* **2001**, 31, 767.

### V.2.2. Deuxième stratégie de synthèse : à partir de la 2-éthynylpyridine

Il a été décrit dans la littérature la synthèse de l'oxime qui nous intéresse sans le pyridinium.<sup>135</sup> Le produit désiré pour nous est en fait le produit minoritaire de l'addition de l'hydroxylamine hydratée sur la 2-éthynylpyridine (13% de rendement). Après addition de MeI (45% de rendement) on obtient effectivement la 2-PAMCH<sub>2</sub> (Schéma 17). Cependant, après recristallisation dans l'ACN, il reste environ 7% d'une impureté (déterminée en RMN <sup>1</sup>H). Celle-ci a été identifiée comme étant la forme éneoxime, ce qui ne pose pas de problème pour les tests biologiques.

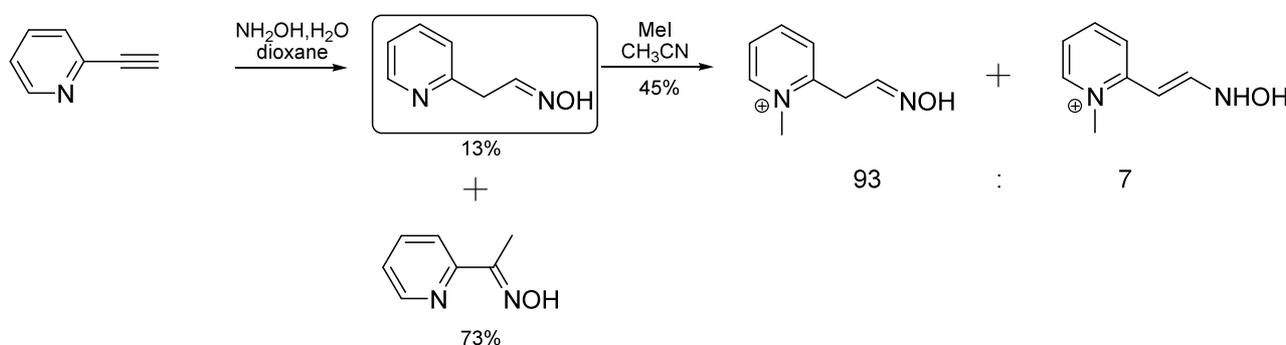


Schéma 17 : Synthèse de la 2-PAMCH<sub>2</sub>

Certes cette synthèse n'a pas un rendement très important, mais le but était de synthétiser suffisamment de produit pour pouvoir en mesurer le pKa et faire des tests *in vitro*. Si les résultats sont positifs, alors il faudra sans doute chercher à optimiser cette synthèse pour en améliorer le rendement.

### V.3. Mesure expérimentale du pKa

Le pKa optimal des oximes pour une bonne pénétration dans l'AChE est d'environ 8. Nous avons donc mesuré expérimentalement le pKa de la 2-PAMCH<sub>2</sub> afin de voir s'il était compatible avec le milieu biologique (Figure 9). Le dosage a été réalisé avec une solution de soude 0.1M.

<sup>135</sup> Beauchemin, A. M.; Moran, J.; Lebrun, M-E.; Séguin, C.; Dimitrijevic, E.; Zhang, L.; Gorelsky, S. I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1410.

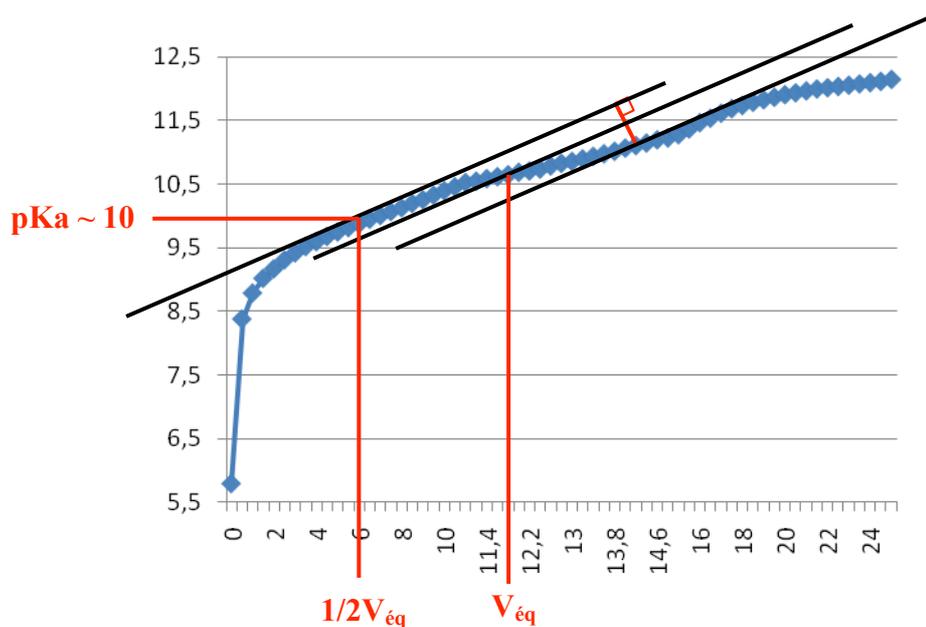


Figure 9 : Mesure expérimentale du pKa de la 2-PAMCH<sub>2</sub>

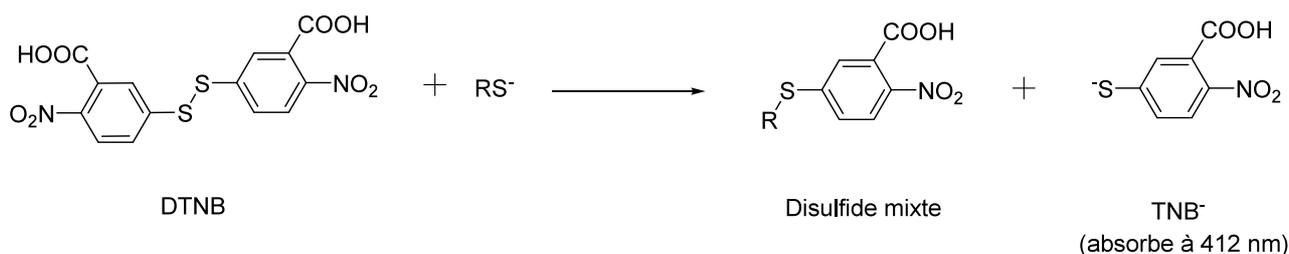
Le pKa mesuré est de 10, ce qui n'est pas de bon augure pour les tests biologiques. Cependant, ceci était prévisible puisqu'on a rompu la conjugaison de la molécule, et donc déstabilisé sa base (par rapport à celle de la 2-PAM par exemple), ce qui entraîne une augmentation du pKa.

#### V.4. Tests *in vitro* de la réactivation par la 2-PAMCH<sub>2</sub> de l'AChE inhibée par le tabun

Les tests *in vitro* ont été réalisés par l'équipe de F. Nachon (CRSSA, La Tronche).

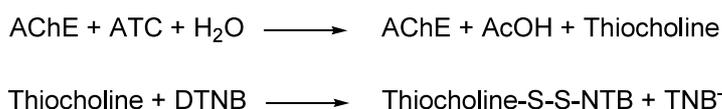
Tout d'abord, on se place dans des conditions où la concentration en inhibiteur est à peu près égale à celle de l'enzyme (conditions cinétiques de second ordre). Après ajout de l'inhibiteur, on suit comment l'activité enzymatique évolue au fil de temps en prenant des aliquots de manière à vérifier que l'enzyme est bien inhibée progressivement. La courbe doit avoir l'allure d'une exponentielle décroissante. Un plateau est atteint au bout d'un certain temps: à ce stade, plus de 90% de l'enzyme est inhibée, et il n'y a plus d'inhibiteur, tout a réagit avec l'enzyme. On peut alors commencer la réactivation en ajoutant 10 mM de réactivateur. On reprend des aliquots pour mesurer l'activité enzymatique et vérifier que l'enzyme se réactive au fil du temps (augmentation de l'activité résiduelle). Parallèlement, on suit l'activité d'un échantillon d'enzyme qui n'a pas été inhibé pour contrôler que l'enzyme ne se dégrade pas durant la durée de l'expérience, ce qui fausserait la mesure de réactivation

La figure 10 montre la densité optique à 412 nm par minute en fonction du temps. Pour mesurer l'activité de l'AChE, des thioesters sont utilisés (acétylTHIOcholine (ATC), propionylTHIOcholine (PTC), etc.). Lorsque le thioester est hydrolysé par l'enzyme, une thiocholine est relarguée dans le milieu, et la fonction thiol de celle-ci va taper sur le pont disulfure d'un composé appelé DTNB ou réactif de Ellman (Schéma 18). C'est la forme réduite de ce composé qui absorbe à 412 nm.



**Schéma 18 : Réaction du DTNB sur un thiol**

Les deux réactions couplées suivantes ont donc lieu :



Malheureusement, ces tests ne montrent aucune activité de la part de la 2-PAMCH<sub>2</sub> (Figure 10).

Plusieurs explications peuvent être évoquées :

- Tout d'abord, le pKa est trop élevé pour une bonne réactivation. En effet, le pKa idéal est de 8, alors que celui de la 2-PAMCH<sub>2</sub> est de 10. Ceci entraîne une moins bonne pénétration cellulaire de la 2-PAMCH<sub>2</sub>, et la forme oxime devient prédominante par rapport à la forme oximate. Or, la forme active est la forme oximate. Donc en diminuant la proportion de forme oximate à pH physiologique, on diminue d'autant la capacité de réactivation
- Ensuite, il y a la question de l'affinité avec l'enzyme qu'on ne peut pas mesurer avec nos calculs théoriques. En effet, une petite variation de structure peut entraîner une grosse différence d'affinité.
- En rajoutant en lien CH<sub>2</sub> entre le cycle pyridinium et la fonction oxime, on a augmenté les degrés de liberté de la molécule. En effet, il peut y avoir libre rotation autour de ce lien CH<sub>2</sub>. Ainsi, du fait de cette flexibilité, le substrat risque de ne pas s'orienter correctement dans le site actif pour la réactivation. Si la fonction oximate n'est pas bien

positionnée pour attaquer le complexe AChE-tabun, alors la réactivation n'aura pas lieu. Dans nos calculs, nous plaçons l'oxime en bonne position pour la réactivation afin d'étudier la réaction chimique proprement dite, donc nous ne prenons pas en compte la difficulté du positionnement de l'oxime dans le site actif.

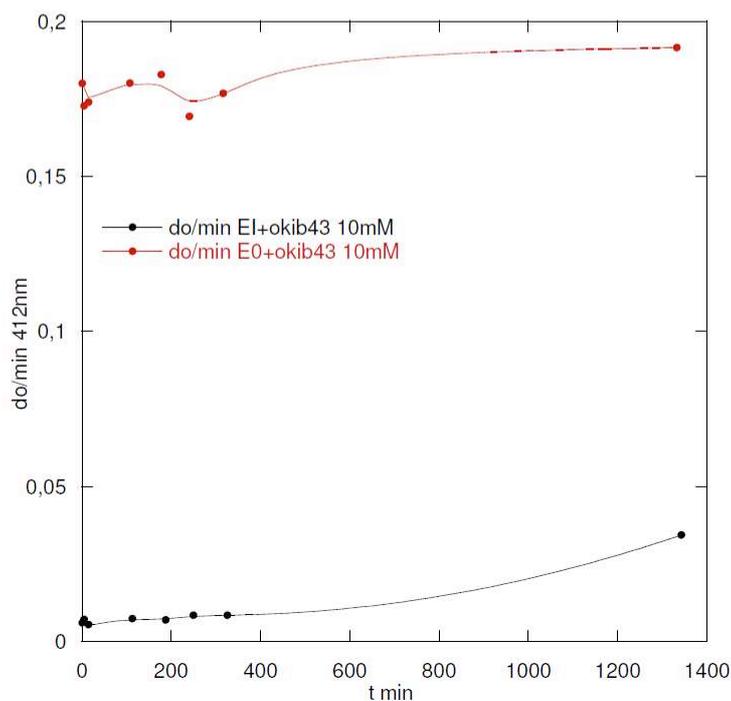
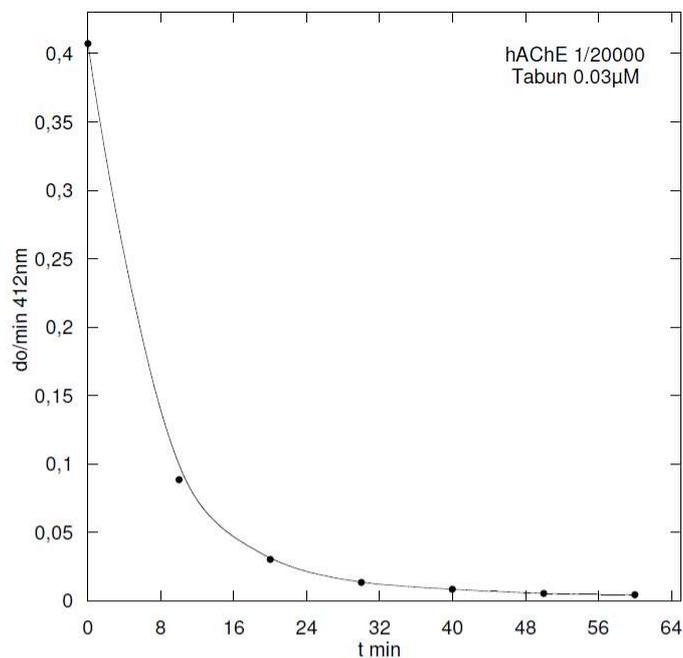


Figure 10 : Résultats des tests in vitro de réactivation par la 2-PAMCH<sub>2</sub> du complexe AChE-tabun

## VI. Conclusion

Ainsi, nous nous sommes intéressés à la réactivation de l'AChE inhibée par le tabun d'un point de vue théorique. Après avoir mis en évidence les propriétés basiques nécessaires pour avoir une bonne réactivation à travers une étude QM de différents nucléophiles, nous avons abordé des réactivateurs plus réalistes.

Nous avons tout d'abord montré que la méthodologie QM/MM est nécessaire pour traiter ce type de réactivité enzymatique grâce aux études comparées QM et QM/MM de la réactivation du complexe AChE-tabun par l'anion formoximate et le phényloximate. Seule la méthodologie QM/MM nous a permis d'obtenir des profils énergétiques exothermiques, et les barrières énergétiques étaient plus basses du fait des interactions du site actif avec l'environnement enzymatique.

Il est ensuite apparu que deux mécanismes pouvaient être envisageables :

- Une substitution nucléophile directe (1 étape)
- Une addition-élimination (2 étapes) avec passage par un intermédiaire pentavalent.

Le mécanisme d'addition-élimination est fortement favorisé par rapport à la substitution nucléophile directe car les barrières des deux étapes sont beaucoup plus basses (10 kcal/mol vs 30 kcal/mol). Il est important de déterminer la stabilité de l'intermédiaire pentavalent formé dans ce mécanisme pour avoir une idée de l'efficacité du réactivateur. Nous recherchons donc un réactivateur qui corresponde aux propriétés physico-chimiques de l'enzyme et qui passe par un intermédiaire pentavalent.

A partir de là, nous nous sommes intéressés au réactivateur le plus courant, à savoir la 2-PAM. Cette oxime passe par un mécanisme de substitution nucléophile directe et donc la réaction de réactivation a une grande barrière énergétique (environ 30 kcal/mol), contrairement à la phényloxime qui passe par un mécanisme d'addition-élimination. L'azote du pyridinium joue donc un rôle désactivant dans la réactivation. Nous avons ainsi conçu un réactivateur pour lequel cet azote est éloigné de la fonction oxime par un lien  $\text{CH}_2$ . D'un point de vue théorique, ce réactivateur, que nous avons appelé 2-PAM $\text{CH}_2$ , passe bien par un intermédiaire pentavalent, ce qui valide notre analyse, et les barrières énergétiques obtenues sont très faibles. L'étape suivante a donc été de synthétiser cette oxime afin d'en mesurer le pKa et de faire des tests in vitro sur l'AChE inhibée par le tabun.

La synthèse de cette oxime se fait en deux étapes à partir de la 2-éthynylpyridine avec un rendement de 6%. Malheureusement, le pKa mesuré est trop haut pour une réactivation efficace puisqu'il est de 10 alors que le pKa idéal est de 8. Pour confirmer cette observation, les tests biologiques *in vitro* n'ont pas donné de résultats probants : la 2-PAMCH<sub>2</sub> ne réactive pas l'AChE inhibée par le tabun. Ceci peut s'expliquer par le pKa trop élevé, mais également par une flexibilité de l'oxime trop importante qui diminue l'affinité de l'enzyme pour la 2-PAMCH<sub>2</sub> et qui peut entraîner un mauvais positionnement de l'oxime dans le site actif empêchant toute réactivation.

Malgré ces résultats quelque peu décevants, notre méthode nous a quand même permis de mettre en évidence des points mécanistiques clés pour la réactivation, notamment le passage par un intermédiaire pentavalent stable. Il reste bien sûr que nous ne pouvons pas prendre en compte tous les effets physico-chimiques existants dans l'enzyme, tels que l'affinité de l'enzyme pour le substrat ou le pKa. Malgré tout, forts de nos observations et particulièrement de l'influence de l'azote du pyridinium sur la réactivation, de nouvelles structures sont envisageables et pourront être étudiées selon notre modèle.

# **CONCLUSION GENERALE**

Au cours de ces travaux, nous avons mis au point une méthodologie pour étudier différents mécanismes faisant intervenir l'acétylcholinestérase.

Nous nous sommes appuyés sur la méthodologie QM/MM pour décrire les interactions entre l'enzyme et différents substrats. Nous avons commencé par étudier le substrat naturel, à savoir l'acétylcholine, afin de définir notre système modèle et de nous confronter aux résultats expérimentaux et théoriques déjà publiés. Ceci nous a permis de soulever l'influence de la méthodologie employée sur les résultats quantitatifs obtenus, et de souligner la grande flexibilité de l'AChE et l'importance du réseau de molécules d'eau. A travers trois méthodologies différentes, les résultats sont qualitativement identiques : la réaction se déroule en deux principales étapes, acylation et déacylation, et la déacylation est cinétiquement déterminante. Mais les différences de barrières énergétiques observées nous font rester prudents quant à une interprétation quantitative de ces résultats. Nous avons donc décidé de travailler comparativement, et donc qualitativement, sur un système défini, à savoir le système AChE-tabun.

En effet, l'AChE est inhibée de façon irréversible par les neurotoxiques tel que le tabun, et le complexe AChE-tabun représente un véritable défi en ce qui concerne la régénération de l'activité biologique de l'AChE. C'est pourquoi notre étude s'est centrée sur ce complexe.

Nous avons tout d'abord exploré l'inhibition de l'AChE par le tabun pour affiner notre modèle sur le système soumis à notre étude. Toute cette étude a été menée pour le VX en parallèle afin de voir l'influence des différents groupements du tabun. Nous avons mis en évidence que, d'un point de vue théorique, l'isomère le plus actif du tabun est le S-Syn. Le mécanisme d'inhibition serait donc une substitution en *syn* par rapport à la sérine de la triade catalytique, contrairement à l'idée communément admise d'une substitution en *anti*. Il faudrait bien sûr tester les deux énantiomères *in vitro* pour vérifier nos prévisions théoriques. Nous avons également souligné l'influence de l'amine tertiaire directement fixée sur le phosphore. Cette influence est manifeste puisque conformément aux observations expérimentales, le complexe AChE-VX (qui possède un méthyle à la place de l'amine) est toujours mieux réactivé que le complexe AChE-tabun. A travers l'étude de différents analogues du tabun, nous avons montré que cet effet est majoritairement stérique et non pas électronique.

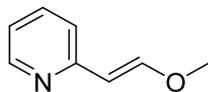
Munis de ces informations, nous nous sommes ensuite penchés sur le but premier de notre étude, à savoir la réactivation du complexe AChE-tabun. Les réactivateurs couramment utilisés sont des oximes. Deux mécanismes de réactivation sont possibles : une substitution nucléophile directe ou un mécanisme d'addition-élimination. La réactivation est plus facile à réaliser en passant par le mécanisme d'addition-élimination, qui présente des barrières énergétiques bien plus faibles que la substitution nucléophile directe. Nous avons montré que dans le cas des oximes classiquement employées en tant que réactivateurs, comme la 2-PAM, le mécanisme était une substitution directe, ce qui peut expliquer la difficulté à réactiver le complexe AChE-tabun. Il nous fallait donc trouver un réactivateur qui réponde aux propriétés physico-chimiques de l'enzyme ( $pK_a$ , interactions  $\pi$ -cations), et qui passe par un mécanisme d'addition-élimination. Ayant mis en évidence le caractère désactivant de l'azote de la pyridine sur la réactivation, nous avons modélisé un nouveau réactivateur, appelé 2-PAMCH<sub>2</sub>, avec un groupe CH<sub>2</sub> supplémentaire entre la fonction oxime et le cycle pyridinium. D'un point de vue théorique, ce réactivateur est très efficace, ce qui valide notre hypothèse de l'influence de l'azote sur la réactivation. Nous l'avons donc synthétisé et testé *in vitro*. Malheureusement, expérimentalement ce réactivateur ne tient pas ses promesses puisqu'il ne réactive pas le complexe AChE-tabun. Ceci peut s'expliquer par son  $pK_a$  trop élevé qui favorise la forme acide et la flexibilité créée en rajoutant le lien CH<sub>2</sub>, effets que nous ne pouvons pas prendre en compte dans notre modèle.

Malgré ces résultats quelque peu décevants, nous avons grâce à notre méthodologie mis en évidence des effets importants au niveau de l'amine tertiaire fixée sur le phosphore du tabun et de l'azote du cycle pyridinium des réactivateurs. Nous avons ainsi mis au point un système modèle représentant bien les interactions entre les réactivateurs et les complexes inhibés de l'AChE, et pouvant être d'une aide précieuse dans la conception de nouveaux réactivateurs.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## General Methods

Reactions were carried out under argon, solvents were purified as such: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub>CN was distilled over calcium hydride, THF was distilled from sodium benzophenone ketyl. Thin layer chromatography (TLC) was performed on Merck 60 F<sub>254</sub> silica gel. Merck Gerudan SI 60 Å silica gel (35-70 μm) was used for column chromatography. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded at 20 °C at 400 and 100 MHz respectively, on a Bruker AVANCE400 spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm, referenced to the residual proton resonance of the solvents (7.26 for CDCl<sub>3</sub>), to the carbon resonance of the solvent (77.16 for CDCl<sub>3</sub>). Coupling constants ( $J$ ) are given in Hertz (Hz). The terms m, s, d, t, q, quint, refer to multiplet, singlet, doublet, triplet, quartet, quintet; bs means that the signal is broad. High resolution mass spectra (HRMS) were performed by Laboratoire Structure et Fonction de Molécules Bioactives (UPMC). Infrared spectra (IR) were recorded on a Bruker Tensor 27 spectrometer. Melting points were measured with a SMP3 Stuart Scientific melting point apparatus and were not corrected.

**2-methoxyvinylpyridine**

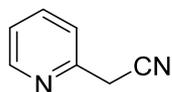
C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO  
Mol. Wt.: 135,16

*n*-BuLi (2.6 mL, 5.64 mmol) was added to a solution of ClPPh<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OMe (2.09 g, 6.11 mmol) in THF (20 mL) at 0°C. The mixture was stirred for an hour at 0°C. A solution of 2-pyridincarboxaldehyde (500 mg, 4.7 mmol) in THF (3 mL) was then added and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. The reaction was quenched with water and extracted with AcOEt. The combined organic extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography using pentane/Et<sub>2</sub>O (80/20) as eluent to afford 2-methoxyvinylpyridine (340 mg, 68%) as a 53/47 mixture of *Z/E* diastereoisomers. Brown oil. **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 3.63 (s, 3H, *E* isomer), 3.73 (s, 3H, *Z* isomer), 5.42 (d, 1H, *J* = 6.2 Hz, *Z* isomer), 5.78 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz, *E* isomer), 6.27 (d, 1H, *J* = 6.2 Hz, *Z* isomer), 6.88-6.97 (m, 3H, *E* isomer), 7.22-7.40 (m, 3H, *Z* isomer), 7.80 (d, 1H, *J* = 12.8 Hz, *E* isomer), 8.31-8.33 (m, 1H, *E* isomer), 8.40-8.43 (m, 1H, *Z* isomer). **<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** : δ = 55.9 (CH<sub>3</sub>, *Z* isomer), 60.2 (CH<sub>3</sub>, *E* isomer), 103.9 (CH, *E* isomer), 105.5 (CH, *Z* isomer), 119.2 (CH, *E* isomer), 119.3 (CH, *Z* isomer), 119.4 (CH, *Z* isomer), 122.6 (CH, *E* isomer), 135.2 (CH, *Z* isomer), 135.4 (CH, *E* isomer), 147.6 (CH, *Z* isomer), 148.1 (CH, *E* isomer), 150.1 (CH, *Z* isomer), 152.1 (CH, *E* isomer), 153.9 (CH, *Z* isomer), 154.8 (CH, *E* isomer). **IR (neat)** : *v* max = 733, 1142, 1273, 1472, 1639, 2934 cm<sup>-1</sup>.

---

**2-(pyridin-2-yl)acetonitrile**

---

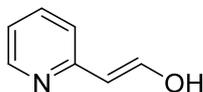
 $C_7H_6N_2$   
Mol. Wt.: 118,14

(Pyridin-2-yl)methanol (150 mg, 1.4 mmol) was added to  $NEt_3$  (0.3 mL) and  $CH_2Cl_2$  (3 mL). The mixture was stirred at  $0^\circ C$ .  $MsCl$  (0.12 mL, 1.5 mmol) was slowly added to this mixture at  $0^\circ C$ . The mixture was stirred for 3 h at this temperature. The reaction was quenched with water, extracted with  $AcOEt$ . The combined organic extracts were washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and concentrated under reduced pressure.  $NaCN$  (1.96 mmol, 96 mg) was added to the crude product in solution in  $DMSO$  (3 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with an aqueous solution of  $NaHCO_3$  and extracted with  $AcOEt$ . The combined organic extracts were washed with brine, dried over  $MgSO_4$  and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography using  $CH_2Cl_2/AcOEt$  (1/1) as eluent to afford 2-(pyridin-2-yl)acetonitrile (138 mg, 85%) as an orange oil.  **$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )** :  $\delta$  = 3.95 (s, 2H), 7.27-7.29 (m, 1H), 7.43-7.45 (m, 1H), 7.72-7.76 (m, 1H), 8.58-8.60 (m, 1H).  **$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )** :  $\delta$  = 26.6 ( $CH_2$ ), 117.0 (C), 122.2 (CH), 123.0 (CH), 137.4 (CH), 149.9 (CH), 150.5 (CH). **IR (neat)** :  $\nu_{max}$  = 731, 910, 1135, 1411, 1475, 1593, 2253, 2925  $cm^{-1}$ .

---

**(2-pyridin-2-yl)ethanol**

---



C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO  
Mol. Wt.: 121,14

(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CeBrO<sub>3</sub> was synthesised following the procedure described by Hejazi et al.<sup>136</sup> (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CeBrO<sub>3</sub> (1.94 g, 3.3 mmol) and (2-pyridin-2-yl)ethanol (166 mg, 1.65 mmol) were added in CH<sub>3</sub>CN (1 mL) in a 3 mL sealed tube. The mixture was stirred at 90°C for 3 h. The reaction was filtered and concentrated under reduced pressure. The crude was purified by flash column chromatography using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> as eluent to afford (2-pyridin-2-yl)ethanol (110 mg, 60%) as a colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 6.62 (s, 1H), 7.16-7.20 (m, 1H), 2.28 (s, 1H), 7.70-7.72 (m, 2H), 8.46-8.48 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 120.8 (CH), 123.2 (CH), 124.5 (CH), 136.7 (CH), 147.5 (CH), 154.6 (CH), 157.8 (CH). IR (neat) : ν max = 728, 906, 1089, 1260, 1435, 1715, 2925 cm<sup>-1</sup>.

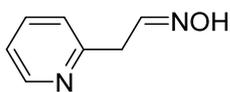
---

<sup>136</sup>(a) Shirini, F.; Esm-Hosseini, M.; Hejazi, Z. *Synthetic Communications*, **2005**, 35, 2913. (b) Shirini, F.; Tajik, H.; Aliakbar, A.; Akbar, A. *Synthetic communications* **2001**, 31, 767.

---

**2-(pyridin-2-yl)acetaldehyde oxime**

---



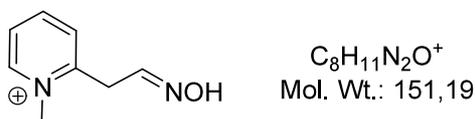
C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O  
Mol. Wt.: 136,15

2-(pyridine-2-yl)acetaldehyde oxime was synthesised following the procedure described in the literature.<sup>137</sup>

In a sealed tube equipped with a magnetic stirbar was added dioxane (0.97 mL, 2.0 M), 2-ethynylpyridine (1.94 mmol, 0.196 mL) and a 50 wt. % aqueous hydroxylamine solution (4.85 mmol, 0.15 mL). The tube was sealed and heated at 110°C for 18h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was diluted with a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with EtOAc. The combined organic extracts were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under reduced pressure. The crude was then purified by flash chromatography on silica gel with pentane and EtOAc (60:40) as eluent to afford 2-(pyridine-2-yl)acetaldehyde oxime (35 mg, 13%) as a 57/43 mixture of *syn/anti* diastereoisomers. Light beige solid. m. p. 82°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) : δ = 11.15 (s, 1H), 10.80 (s, 1H), 8.49-8.51 (m, 2H), 7.60-7.62 (m, 3H), 7.28-7.21 (m, 2H), 7.10-7.13 (m, 2H), 7.01-7.10 (m, 1H), 3.95 (d, 2H, *J* = 5.3 Hz, *syn* isomer), 3.73 (d, 2H, *J* = 6.3 Hz, *anti* isomer). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) : δ = 156.9 (C), 149.1 (CH), 148.5 (CH), 148.05 (CH), 137.3 (CH), 123.6 (CH), 121.9 (CH), 121.8 (CH), 38.23 (CH<sub>2</sub>), 33.9 (CH<sub>2</sub>); IR (neat): ν max = 3175, 3070, 3028, 2855, 2785, 1678, 1652, 1597, 1570, 1480, 1438, 981, 907, 764 cm<sup>-1</sup>.

---

<sup>137</sup> Beauchemin, A. M.; Moran, J.; Lebrun, M-E.; Séguin, C.; Dimitrijevic, E.; Zhang, L.; Gorelsky, S. I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1410.

**2-(methylpyridinium-2-yl)acetaldehyde oxime**

CH<sub>3</sub>I (0.35 mL, 5.5 mmol) was added to a solution of 2-(pyridine-2-yl)acetaldehyde oxime (500 mg, 3.7 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (9 mL). The mixture was refluxed overnight and then evaporated under reduced pressure. The crude was recrystallised in CH<sub>3</sub>CN to afford 2-(methylpyridinium-2-yl)acetaldehyde oxime (470 mg, 45%) as a brown solid contaminated with 7% of the ene-oxime form estimated by <sup>1</sup>H NMR. m. p. = 146°C. The two diastereoisomers were obtained with a ratio of 52/48 (*syn/anti* not attributed). **<sup>1</sup>H NMR (DMSO, 400 MHz)** : δ = 4.13 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz), 4.17 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz), 4.27 (s, 3H), 4.29 (s, 3H), 7.05-7.08 (m, 1H), 7.59-7.62 (m, 1H), 8.02-8.05 (m, 4H), 8.51-8.57 (m, 2H), 9.01-9.04 (m, 2H), 11.06 (s, 1H), 11.6 (s, 1H). **<sup>13</sup>C NMR (DMSO, 100 MHz)** : δ = 30.2 (CH<sub>2</sub>), 33.7 (CH<sub>2</sub>), 46.1 (CH<sub>3</sub>), 46.2 (CH<sub>3</sub>), 126.3 (CH), 126.5 (CH), 129.3 (CH), 129.6 (CH), 142.5 (CH), 144.9 (CH), 145.8 (CH), 145.9 (CH), 147.1 (CH), 154.8 (C), 154.9 (C). **IR (neat)**: *v*<sub>max</sub> = 728, 904, 1100, 1435, 1475, 1595, 1653, 2854, 3070 cm<sup>-1</sup>. **HRMS** : calcd : 151.08659, found : 151.08601.

# **Etude théorique de la réactivation de l'acétylcholinestérase (AChE) inhibée par le tabun**

Mots-clés : AChE, QM/MM, tabun, inhibition, réactivation

L'AChE, enzyme clé pour la neurotransmission, est la cible des neurotoxiques organophosphorés utilisés comme agents de guerre tels que le tabun. En inhibant irréversiblement l'AChE, ces neurotoxiques peuvent entraîner la mort par asphyxie. Des antidotes à ces organophosphorés existent : il s'agit d'oximes, qui sont des nucléophiles puissants. Malheureusement, aucune oxime à l'heure actuelle n'est capable de restaurer l'activité de l'AChE inhibée par le tabun. C'est pourquoi nous nous sommes particulièrement intéressés au complexe AChE-tabun en utilisant une méthodologie hybride QM/MM. Nous avons ainsi défini notre modèle théorique sur l'acétylcholine, substrat naturel de l'AChE, ce qui nous a permis de mettre en évidence la grande flexibilité de l'AChE et la difficulté de la traiter en chimie théorique quantitativement. Nous nous sommes ensuite penchés sur l'inhibition de l'AChE par le tabun pour montrer l'influence de la structure du tabun sur sa réactivité dans le site actif. Notamment le rôle stérique du groupement *N*-diméthyle a été souligné. Enfin, nous avons abordé la réactivation du complexe AChE-tabun. L'influence du mécanisme (une ou deux étapes) a permis d'expliquer la difficile réactivation du complexe AChE-tabun. Un nouveau réactivateur a pu être conçu à partir de ces informations, synthétisé et testé *in vitro*. Ce réactivateur n'est malheureusement pas efficace contre le complexe AChE-tabun du fait de paramètres physico-chimiques que nous ne pouvons pas prendre en compte d'un point de vue théorique. Notre travail a donc permis de mettre au point un modèle théorique efficace pour traiter les interactions de l'AChE avec différents substrats.

## **Reactivation of tabun inhibited acetylcholinesterase (AChE): a QM/MM study**

Key words: AChE, QM/MM, tabun, inhibition, reactivation

Research of efficient reactivation agents of inhibited AChE is still challenging as dysfunction of AChE due to inhibition by organophosphorus (OP) compound is a major threat. We choose to look at tabun since it is one of the more potent nerve agents, and the AChE-tabun complex is very difficult to reactivate. In order to study the interaction between AChE and tabun from a theoretical point of view, we used a QM/MM methodology. First, we defined our model on acetylcholine which is the natural substrate of AChE. We showed that AChE is a very flexible enzyme, and thus that it is difficult to study it using theoretical chemistry. Then we studied tabun inhibition of AChE to underline the importance of tabun structure on its reactivity in the active site, and particularly the steric influence of *N*-dimethyl group. Finally we explored the importance of the mechanism (one or two steps) on the reactivation. Thanks to our results, we designed a new reactivator, which was synthesised and tested *in vitro*. Unfortunately, this new reactivator was not efficient against tabun poisoning because of physico-chemical parameters that we cannot take into account in our methodology. Thus we succeeded in developing an efficient theoretical model to describe interactions between AChE and different substrates.